

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Laura de Andrade Junqueira

**Desenvolvimento e avaliação de formulação transdérmica contendo vitamina D₃
nanoestruturada**

**Juiz de Fora
2018**

Laura de Andrade Junqueira

**Desenvolvimento e avaliação de formulação transdérmica contendo vitamina D₃
nanoestruturada**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós-graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Orientador: Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão
Co-Orientadora: Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

**Juiz de Fora
2018**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Junqueira , Laura de Andrade .

Desenvolvimento e avaliação de formulação transdérmica contendo vitamina D3 nanoestruturada / Laura de Andrade Junqueira . -- 2018.

104 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Fernandes Brandão

Coorientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. Vitamina D3. 2. Administração transdérmica. 3. Carreador lipídico nanoestruturado. I. Brandão , Marcos Antônio Fernandes, orient. II. Raposo, Nádia Rezende Barbosa , coorient. III. Título.

LAURA DE ANDRADE JUNQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÃO TRANSDÉRMICA
CONTENDO VITAMINA D3 NANOESTRUTURADA**

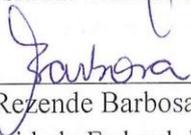
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde – Área de Concentração: Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Saúde.

Aprovada em 30/11/2018

BANCA EXAMINADORA



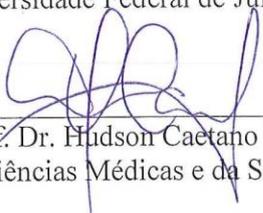
Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa Dra Nádia Rezende Barbosa Raposo – Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Hudson Caetano Polonini
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Dr. Marcos Brandão, por acreditar em mim e me proporcionar grandes oportunidades e desafios, que levaram ao meu desenvolvimento tanto profissional como pessoal.

À professora co-orientadora Dr^a Nádia Raposo, grande exemplo de pesquisadora, professora e pessoa, pelo apoio imensurável para a condução deste trabalho.

Ao professor Dr. Hudson Polonini, pelos incontáveis ensinamentos, amizade e ajuda nos momentos difíceis deste trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), que fizeram meus dias mais alegres. Em especial ao Alexandre, por ser um grande amigo e pelos ensinamentos e experimentos em cultura celular; a Hanny, Pollyana, Elisa, Paulo, Marcela, Molise, Débora, Gustavo, José e José Marcio.

Aos membros da Ortofarma pelo apoio inestimável durante a realização deste projeto. À direção da mesma na figura do Dr. Anderson Ferreira, pela disponibilização da infraestrutura do laboratório. Ao Adelino, pelo auxílio na manipulação das formulações. À Sharlene pelos ensinamentos apoio e amizade. A equipe do laboratório FQII: Fernando, Carolina, Edson, Silvana e Murilo, pela ajuda nos experimentos, incentivo e amizade.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, especialmente à M^a Karla Ribeiro, pela realização das análises de microscopia eletrônica.

Ao Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite e ao Dr. Humberto Brandão pela realização das análises de Potencial Zeta.

Ao meu Pai e Irmão, por todo o incentivo, amor e carinho. À minha mãe, meu anjo da guarda e maior exemplo de força e determinação.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, meus profundos agradecimentos.

RESUMO

A vitamina D₃ é produzida na pele a partir da exposição à radiação ultravioleta, podendo também ser obtida através da dieta. Atualmente, a deficiência e insuficiência de vitamina D₃ são comuns na população; entretanto, este composto apresenta biodisponibilidade oral variável, o que dificulta a suplementação. A vitamina D₃ é importante na regulação do metabolismo osteomíneral; além disso, potenciais ações extra-esqueléticas vêm sendo propostas (ações no sistema imune, sistema cardiovascular e na carcinogênese). Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação transdérmica contendo vitamina D₃. Para isso, foram produzidos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo vitamina D₃, através do método de homogeneização por alto cisalhamento seguido de ultrassonicação. As nanopartículas produzidas foram caracterizadas em relação ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, estabilidade e morfologia. Além disso, a citotoxicidade da nanopartícula foi avaliada em cultura de células de fibroblastos murinos. O carreador lipídico nanoestruturado produzido e a vitamina D₃ (matéria-prima) foram incorporados separadamente em veículo transdérmico, dando origem a duas formulações. As emulsões desenvolvidas, bem como a nanopartícula, foram avaliados em relação à degradação da vitamina D₃, liberação *in vitro* da molécula e também sua permeação *ex vivo*. As nanopartículas apresentaram tamanho adequado para aplicação tópica ($192,5 \pm 10,5$ nm), distribuição estreita de tamanho (índice de polidispersão = $0,13 \pm 0,04$), formato esférico e elevado valor absoluto de potencial zeta ($29,0 \pm 0,6$ mV). Suas características de tamanho e índice de polidispersão mantiveram-se estáveis durante 15 dias quando armazenadas em geladeira e por pelo menos 30 dias à temperatura ambiente e 32 °C. Além disso, a vitamina D₃ foi eficientemente encapsulada ($99,75 \pm 0,03\%$ eficiência de encapsulação). As nanopartículas de vitamina D₃ demonstraram diminuição da citotoxicidade da molécula, quando avaliada em modelo de cultivo de células de fibroblastos murinos (L929). No armazenamento em geladeira, a nanopartícula manteve seu teor de vitamina D₃ por 7 dias. A emulsão de vitamina D₃ (matéria-prima) apresentou diminuição da degradação sob temperatura de 32 °C, quando comparado a vitamina D₃. Enquanto a emulsão contendo nanopartícula minimizou a degradação da vitamina D₃ em todas as condições de armazenamento analisadas, em comparação à nanopartícula. Entre as formulações desenvolvidas, a nanopartícula liberou a maior quantidade de vitamina D₃. Todas as formulações seguiram modelo de cinética de difusão de Higuchi. Ambas as emulsões transdérmicas foram capazes de promover a permeação de quantidades suficientes de vitamina D₃ para atender as necessidades nutricionais diárias.

Palavras-chave: Vitamina D₃, Administração transdérmica, Carreador lipídico nanoestruturado.

ABSTRACT

Vitamin D₃ is synthesized in the skin on exposure to ultraviolet irradiation. Another source of the molecule is through diet. Nowadays the vitamin D deficiency is increasing worldwide; however, it presents variable oral bioavailability, which makes supplementation difficult. Vitamin D is critical for calcium homeostasis and bone health, in addition, potential extra skeletal actions have been proposed (actions in the immune system, cardiovascular system and carcinogenesis). Thus, the aim of this study was to develop an innovative transdermal formulation containing vitamin D₃. For this, nanostructured lipid carriers containing vitamin D₃ were produced, by the high shear homogenization and ultrasonication techniques. The nanoparticles were characterized in terms of particle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, stability and morphology. In addition, cytotoxicity of the nanoparticle was evaluated in murine fibroblast cell culture. The nanostructured lipid carrier produced and the vitamin D₃ (raw material) were incorporated separately into a transdermal vehicle, forming two formulations. The developed emulsions, as well as the nanoparticle, were evaluated in relation to vitamin D₃ degradation, in vitro release and ex vivo permeation. The nanoparticles presented particle size suitable for topical application (192.5 ± 10.5 nm), narrow size distribution (polydispersity index = 0.13 ± 0.04), spherical shape and high absolute zeta potential value (29.0 ± 0.6 mV). Their particle size and polydispersity index remained unaltered for 15 days in refrigerator storage and for at least 30 days in storage at room temperature and 32 °C. Moreover, vitamin D₃ was efficiently encapsulated in the nanoparticle (Entrapment efficiency = $99.75 \pm 0.03\%$). The vitamin D₃ nanoparticle led to decreased cytotoxicity of the molecule, to murine fibroblast (L929) cell at tested conditions. In the refrigerator storage, the nanoparticle maintained its vitamin D₃ content for 7 days. The vitamin D₃ emulsion (raw material) led to a decrease in the degradation under temperature of 32 °C when compared to the raw material. The incorporation of the nanoparticle in the transdermal vehicle led to a decrease in vitamin D₃ degradation at all temperatures tested, when compared to the nanoparticle alone. Among the formulations, the nanoparticle was able to release the largest amount of vitamin D₃. All formulations followed the Higuchi diffusion kinetic model. Both transdermal emulsions were able to promote the permeation of vitamin D₃ according to daily nutritional requirements.

Keywords: Vitamin D₃, transdermal delivery, nanostructured lipid carrier.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química das diferentes formas de vitamina D	17
Figura 2 – Síntese da vitamina D ₃ na pele	18
Figura 3 – Metabolismo da vitamina D	20
Figura 4 – Estrutura da pele	34
Figura 5 – Rotas de penetração de fármacos pela via transdérmica	36
Figura 6 – Desenho esquemático da célula de difusão de Franz	38
Figura 7 – Exemplos de nanomateriais que têm sido utilizados na nanomedicina	40
Figura 8 – Aspecto macroscópico da dispersão aquosa de NLS, desenho esquemático da dispersão aquosa de NLS e desenho esquemático da NLS	42
Figura 9 – Efeitos das nanopartículas lipídicas na pele	43
Figura 10 – Desenho esquemático da produção de NLS por homogeneização a alta pressão e homogeneização de alto cisalhamento seguido de ultrasonicação	45
Figura 11 – Cromatogramas obtidos utilizando-se o método desenvolvido para a quantificação da vitamina D ₃	65
Figura 12 – Curva analítica obtida para o ensaio de linearidade	66
Figura 13 – Gráfica de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica	68
Figura 14 – Aspecto macroscópico dos CLN desenvolvidos	69
Figura 15 – Gráfica de dispersão do tamanho de partícula dos CLN obtidos	71
Figura 16 – Eletromicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando morfologia do carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D ₃	72
Figura 17 – Aspecto macroscópico dos CLN após armazenamento.	75
Figura 18 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos após tratamento.	77
Figura 19 – Avaliação da estabilidade das formulações desenvolvidas sob diferentes temperaturas de armazenamento.	79
Figura 20 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da vitamina D ₃ a partir das formulações	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Status</i> da vitamina D, baseado nas concentrações de 25(OH)D.	25
Tabela 2 – Recomendações de ingestão diária de vitamina D	30
Tabela 3 – Composição dos carreadores lipídicos nanoestruturados	54
Tabela 4 – Composição dos meios receptores biorrelevantes testados	59
Tabela 5 – Porcentagem de discrepância entre a quantificação da vitamina D ₃ no padrão e na amostra e também sob condições de degradação.	64
Tabela 6 – Equação da reta obtida para o ensaio de linearidade	67
Tabela 7 – Resultados do estudo da linearidade do método.	67
Tabela 8 – Resultados do estudo de precisão para quantificação de vitamina D ₃	68
Tabela 9 – Resultados do estudo de exatidão para a quantificação de vitamina D ₃	69
Tabela 10 – Características físico-químicas dos CLN	70
Tabela 11 – Avaliação da estabilidade dos CLN desenvolvidos, em diferentes temperaturas de armazenamento.....	74
Tabela 12 – Solubilidade da vitamina D ₃ nos meios receptores	81
Tabela 13 – Modelos matemáticos para avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> de vitamina D ₃ a partir das formulações	84
Tabela 14 – Permeação das formulações de vitamina D ₃ nas camadas da pele	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D	1,25-dihidroxitamina D
25(OH)D	25-hidroxitamina D
7-DHC	7-deidrocolesterol
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASB	Albumina sérica bovina
C-CLN	Carreador lipídico nanoestruturado controle
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	Carreadore lipídico nanoestruturado
CV	Coefficiente de variação
DBP	<i>Vitamin D-binding protein</i> (Proteína ligadora de vitamina D)
D-CLN	Carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio de Cultura Eagle's Modificado)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EC	Estrato córneo
EE	Eficiência de encapsulação
E _{MP}	Emulsão contendo vitamina D ₃ (matéria-prima)
E _{Nano}	Emulsão contendo nanopartículas de vitamina D ₃
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FCS	Fluido corporal simulado
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF23	Fator de crescimento do fibroblasto 23
HPCD	Hidroxipropil-β-ciclodextrina
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
INF _γ	Interferon gama
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IOM	<i>Institute of Medicine</i>
J_s	Fluxo em estado estacionário
LC-MS/MS	Cromatografia líquida associada a espectrofotometria de massas
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMQ	Método dos mínimos quadrados
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MMQP	Método dos mínimos quadrados ponderados
MP	Matéria-prima
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
PDI	<i>Polydispersity index</i> (Índice de polidispersão)
PTH	Paratormônio
PZ	Potencial zeta
r	Coefficiente de correlação de Pearson
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i> (<i>Ingestão Dietética Recomendada</i>)
RXR	Receptor de retinoide X
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SFB	Soro fetal bovino
SHA	Suor humano artificial
TFS	Tampão fosfato salino
T_L	Tempo de Latência
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tamanho de partícula
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UVB	Radiação ultravioleta B
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (receptor de vitamina D)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 VITAMINA D	17
2.1.1 Metabolismo da vitamina D	20
2.1.2 Ações da vitamina D	22
2.1.2.1 <i>Ações no metabolismo osteomineral</i>	22
2.1.2.2 <i>Ações extra-esqueléticas</i>	23
2.1.3 Doseamento plasmático da vitamina D	24
2.1.4 Deficiência de vitamina D	26
2.1.4.1 <i>Causas da deficiência de vitamina D</i>	26
2.1.4.2 <i>Prevalência da deficiência de vitamina D</i>	27
2.1.4.3 <i>Consequências da deficiência de vitamina D</i>	28
2.1.5 Suplementação de vitamina D	29
2.1.5.1 <i>Recomendação de ingestão diária</i>	29
2.1.5.2 <i>Tratamento para deficiência de vitamina D</i>	30
2.2 ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS.....	32
2.2.1 Estrutura da pele	33
2.2.1.1 <i>Epiderme</i>	34
2.2.1.2 <i>Derme</i>	35
2.2.1.3 <i>Tecido subcutâneo</i>	35
2.2.2 Rotas de permeação	35
2.2.3 Estudos de permeação	37
2.3 NANOTECNOLOGIA	39
2.3.1 Nanopartículas lipídicas	41
2.3.2 Nonopartículas lipídicas na administração transdérmica	43
2.3.3 Métodos para a produção das nanopartículas lipídicas	44
2.3.3.1 <i>Homogeneização a alta pressão</i>	44
2.3.3.2 <i>Homogeneização de alto cisalhamento seguido de ultrasonicação</i>	45
2.3.3.3 <i>Emulsificação e evaporação do solvente</i>	46
2.3.4 Caracterização das nanopartículas lipídicas	46
2.3.4.1 <i>Tamanho de partícula</i>	46
2.3.4.2 <i>Potencial zeta</i>	47
2.3.4.3 <i>Avaliação morfológica</i>	47
2.3.4.4 <i>Eficiência de encapsulação</i>	48

3 OBJETIVOS	49
3.1 GERAL.....	49
3.2 ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	50
4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D ₃ POR CLAE.....	50
4.2.1 Condições cromatográficas	50
4.2.2 Validação analítica	51
4.2.2.1 <i>Seletividade</i>	51
4.2.2.2 <i>Linearidade</i>	52
4.2.2.3 <i>Limite de detecção e quantificação</i>	53
4.2.2.4 <i>Exatidão</i>	53
4.2.2.5 <i>Precisão</i>	54
4.3 PREPARO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	54
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	55
4.4.1 Caracterização físico-química	55
4.4.2 Estudo de estabilidade de curto prazo dos CLNs	55
4.4.3 Eficiência de encapsulação	55
4.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão	56
4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	56
4.6 EMULSÕES TRANSDÉRMICAS	58
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE CURTO PRAZO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	58
4.8 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO	58
4.9 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	60
4.10 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i>	61
4.10.1 Pele humana para permeação <i>ex vivo</i>	61
4.10.2 Características do ensaio	62
4.10.3 Retenção do fármaco na pele	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D ₃ POR CLAE.....	64
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	69
5.2.1 Estudo de estabilidade de curto prazo dos CLNs	73
5.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	75

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE CURTO PRAZO	77
5.5 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO	80
5.6 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	82
5.7 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i>	85
6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANA UFJF	102

1. INTRODUÇÃO

O termo vitamina D abrange moléculas como o metabólito ativo 1,25-dihidroxitamina D, e seus precursores: vitamina D₃, vitamina D₂ e 25-hidroxitamina D (CASTRO, 2011). A maior parte da vitamina D necessária para o funcionamento do organismo humano é proveniente da síntese cutânea, através da exposição da pele à radiação ultravioleta B, a qual produz a vitamina D₃ (MOHAMMED et al., 2017). A vitamina D também pode ser obtida da dieta, nas formas de vitamina D₃ e vitamina D₂ (HOLICK, 2014). Tanto a vitamina D₃ como a vitamina D₂ são metabolizadas no fígado e nos rins, para a produção do metabólito ativo, 1,25-dihidroxitamina D, sendo este o responsável pelas ações da vitamina D, através da interação com seu receptor. A ação clássica da vitamina D é a regulação do metabolismo osteomineral (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018); entretanto, ações extra-esqueléticas vêm sendo propostas, como por exemplo: ações no sistema imune (BOUILLON, 2018), sistema cardiovascular (NORMAN; POWELL, 2014; SCHNATZ; MANSON, 2014) e na carcinogênese (MA; JOHNSON; TRUMP, 2016).

Em todo o mundo, a prevalência e incidência de deficiência em vitamina D têm aumentado: estima-se que mais de 50% da população mundial apresenta deficiência ou insuficiência de vitamina D (WIMALAWANSA; RAZZAQUE, AL-DAGHRI, 2018). A deficiência de vitamina D acontece, principalmente, pela inadequada exposição do indivíduo à luz solar (HOLICK; CHEN, 2008). Além disso, alguns grupos de pacientes estão especialmente em risco de deficiência, como os idosos, pessoas com má absorção de gordura, obesos e pessoas que possuem síndrome nefrótica (GALESANU; MOCANU, 2015). Como consequência, a deficiência de vitamina D causa raquitismo nas crianças; já nos adultos leva a osteomalácia, osteoporose, fraca coordenação muscular, fraqueza, quedas e fraturas (WIMALAWANSA; RAZZAQUE, AL-DAGHRI, 2018). Adicionalmente, estudos observacionais têm descrito a associação entre baixos níveis plasmáticos da 25-hidroxitamina D e várias patologias, tais como: doenças cardiovasculares, câncer, doenças autoimunes, diabetes e obesidade (REJNMARK et al., 2017).

As pessoas que possuem deficiência de vitamina D necessitam de tratamento com suplementação dessa vitamina (PLUDOWSKI, 2018). Comercialmente, a mesma é encontrada em diferentes concentrações e em formas farmacêuticas como: solução oral, cápsula e pó (MAEDA et al., 2014). A vitamina D é uma molécula hidrofóbica, assim sua biodisponibilidade oral é relativamente baixa (KADAPPAN et al., 2018). Além disso, populações como: pacientes com má absorção de gordura, doença celíaca, obstrução biliar e pancreatite crônica, apresentam

grandes diferenças na biodisponibilidade dos suplementos de vitamina D (GROSSMANN; TANGPRICHA, 2010). Assim, para contornar os problemas de biodisponibilidade da vitamina D, é interessante o desenvolvimento de uma via alternativa de administração.

A via de administração transdérmica é uma alternativa às rotas tradicionais, oral e injetável (MATHIAS; HUSSAIN, 2010), e consiste na administração de fármacos através da pele para fins terapêuticos, promovendo concentrações sistêmicas efetivas ao invés do efeito local (ALEXANDER et al., 2012; PONTRELLI; MONTE, 2014; DELGADO-CHARRO; GUY, 2014). Suas vantagens incluem: i) administração simples e não invasiva, sendo geralmente bem aceita pelos pacientes e levando ao aumento da adesão à terapêutica; ii) evita o efeito de primeira passagem no fígado; iii) capacidade de liberar o fármaco de forma controlada; iv) permite a interrupção da administração em situações nas quais a absorção do fármaco já não é mais desejável (WIEDERSBERG; GUY, 2014; PONTRELLI; MONTE, 2014; DELGADO-CHARRO; GUY, 2014). A vitamina D₃ é uma boa candidata para a administração transdérmica, já que ela possui características necessárias para a administração por essa via, como: baixo peso molecular (384.64 g/mol) e baixa dose diária recomendada (0,01-5 mg). O maior desafio para a administração da vitamina D₃ através desta via é sua elevada lipofilicidade, já que a molécula possui log P de 10,2 (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015).

Uma estratégia para contornar a elevada lipofilicidade da vitamina D é a utilização de nanopartículas lipídicas, assim, o fármaco é dissolvido no núcleo lipídico da nanopartícula, e o seu destino no organismo passa a ser controlado pelas características da nanopartícula, ao invés das características do fármaco (KATHE; HENRIKSEN; CHAUHAN, 2014; MEHNERT; MÄDER, 2012). As nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)) têm despertado grande interesse entre os carreadores coloidais, por apresentam métodos de produção acessíveis e baixa toxicidade, entre outras vantagens (GARCÊS, et al., 2018). As NLS são compostas de uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, dispersa em uma fase aquosa e estabilizada por surfactante, com diâmetro médio da partícula entre 50 a 1000 nm (GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016), já nos CLNs a matriz interna é formada por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos (SILVA et al., 2015). Adicionalmente, as nanopartículas lipídicas são uma opção para melhorar a penetração de medicamentos através da pele, já que possuem facilidade em aderir ao estrato córneo, permitindo que as moléculas encapsuladas atinjam as camadas mais profundas da pele (ÜNER et al., 2017).

Observando-se o aumento da prevalência de deficiência de vitamina D em todo o mundo; levando-se em consideração o potencial que esta molécula apresenta para a prevenção e

tratamento de diversas patologias; e devido à sua dificuldade de administração oral, causada pela sua biodisponibilidade variável, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação transdérmica inovadora contendo vitamina D₃ nanoestruturada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VITAMINA D

O termo vitamina D refere-se a um grupo de moléculas derivadas do 7-deidrocolesterol, que estão interligadas através de reações químicas e enzimáticas que acontecem em diferentes células do organismo. Estão incluídos nesta terminologia o metabólito ativo 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) e seus precursores: vitamina D₃ (colecalfiferol), vitamina D₂ (ergocalciferol) e 25-hidroxitamina D (calcidiol) (Figura 1) (CASTRO, 2011). Historicamente a vitamina D foi classificada como uma vitamina, sendo esta convencionalmente definida como item essencial necessário na dieta, entretanto existe um paradoxo, já que a dieta por si só é geralmente pobre em vitamina D. Na verdade, a vitamina D é um pró-hormônio esteroide lipossolúvel, que tem funções endócrinas, parácrinas e autócrinas (MOSTFA; HEGAZY, 2015).

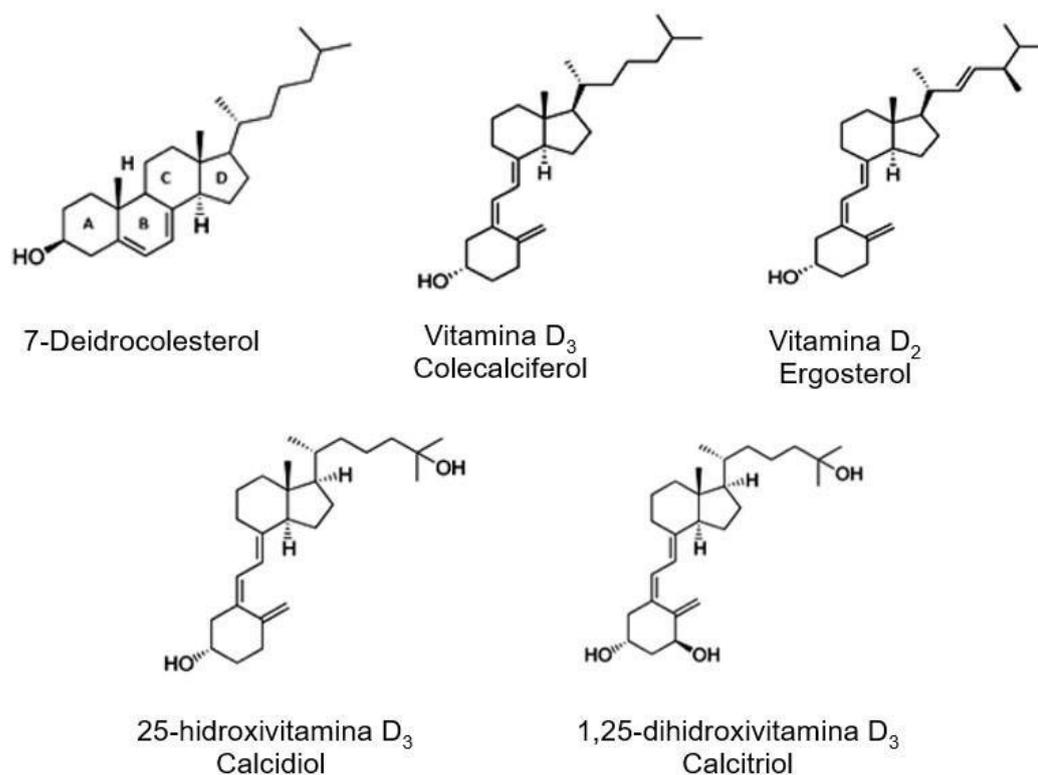


Figura 1: Estrutura química das diferentes formas de vitamina D.

Fonte: CASTRO, 2011.

A principal fonte de vitamina D para os humanos é a exposição da pele à luz solar, na qual pode ser produzido o equivalente a 250 μg (10.000 UI) de vitamina D_3 por dia (MOHAMMED et al., 2017). A síntese da vitamina D_3 na pele está representada esquematicamente na Figura 2. No estrato basal e espinhoso da epiderme, está armazenado o 7-deidrocolesterol (7-DHC), localizado na bicamada lipídica das células. Quando o indivíduo recebe a luz solar, especialmente a radiação ultravioleta B (UVB- 290-315 nm), o 7-DHC absorve o fóton UVB levando à quebra de ligação entre carbonos, resultando no rompimento do anel B e na formação da pré-vitamina D_3 . Essa molécula sofre uma reação de isomerização induzida pelo calor, dando origem à vitamina D_3 (CASTRO, 2011). A exposição prolongada do indivíduo ao sol não produz quantidades tóxicas de vitamina D_3 , devido à conversão da pré-vitamina D_3 nas formas inativas lumisterol e taquisterol (BIKLE, 2011). A vitamina D_3 sintetizada na pele é liberada da membrana plasmática, e entra na circulação sistêmica ligada na proteína ligadora de vitamina D (DBP, do inglês *vitamin D-binding protein*), a mesma funciona como uma proteína de ligação para todos os metabólitos da vitamina D no plasma (MOSTFA; HEGAZY, 2015)

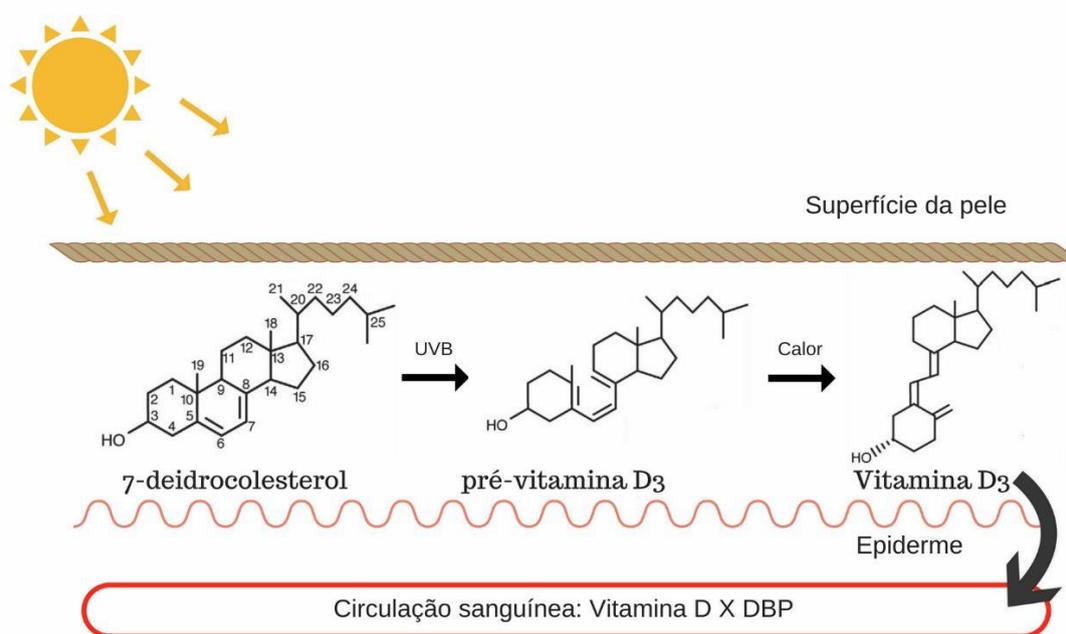


Figura 2: Síntese da Vitamina D_3 na pele.
Fonte: A autora.

É importante mencionar que fatores como a intensidade da radiação UVB e o nível de pigmentação da pele irão influenciar a taxa de formação da vitamina D_3 . A melanina, presente na pele, dificulta a radiação UVB de atingir o 7-DHC nas camadas da pele, limitando comisso

a produção de vitamina D₃, o que também acontece com os protetores solares e as roupas. A intensidade da radiação UVB a partir da luz solar varia de acordo com a estação e latitude; então, quanto mais longe uma pessoa vive da linha do equador, menor será o tempo do ano em que a mesma poderá contar com exposição solar para produzir vitamina D₃ (BIKLE, 2018).

Outra fonte de obtenção de vitamina D é através da dieta, na qual a vitamina D₃ está presente em alimentos como óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau. Já a vitamina D₂ é encontrada em cogumelos expostos à radiação UV, no qual o precursor é o ergosterol. Tanto a Vitamina D₃ como a vitamina D₂ podem ser utilizadas para fortificar alimentos (HOLICK, 2014). Nos Estados Unidos alguns sucos, leites, iogurtes e queijos são fortificados com vitamina D (HOLICK; CHEN, 2008). No Brasil, produtos lácteos, cereais e margarinas são exemplos de alimentos fortificados com vitamina D, que podem ser encontrados comercialmente (LIBERATO; PINHEIRO-SANT'ANA, 2006).

Após a ingestão de alimentos contendo vitamina D, presume-se que sua absorção será da mesma forma que já vem sendo descrita para os lipídeos principais (triacilgliceróis, colesterol e fosfolipídios), consistindo em várias etapas sequenciais, incluindo eventos físico-químicos e enzimáticos. Estas etapas incluem: emulsificação, solubilização em micelas e permeação através da membrana dos enterócitos. O principal local de absorção da vitamina D em humanos não é conhecido com precisão mas sugere-se que seja no jejuno e íleo (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2013; MAURYA; AGGARWAL, 2017). O mecanismo de absorção da vitamina D foi descrito como um processo de difusão passiva não saturável, entretanto estudos demonstram que transportadores de colesterol [como por exemplo as proteínas: SR-BI (do inglês, *Scavenger Receptor class B type I*), CD36 (do inglês, *Cluster Determinant 36*) e NPC1L1 (do inglês, *Niemann–Pick C1-Like 1*)], da membrana apical de enterócitos também estão envolvidas na absorção. Assim, a absorção passiva ocorreria em situação de alta concentração de vitamina D, já a absorção mediada por transportadores ocorreria em baixas concentrações dietéticas de vitamina D (GONCALVES et al., 2015). Finalmente, a vitamina D é secretada em quilomícrons e transportada até o fígado pela circulação linfática (REBOUL, 2015).

2.1.1 Metabolismo da vitamina D

O metabolismo da vitamina D está representado resumidamente na Figura 3, e será descrito a seguir.

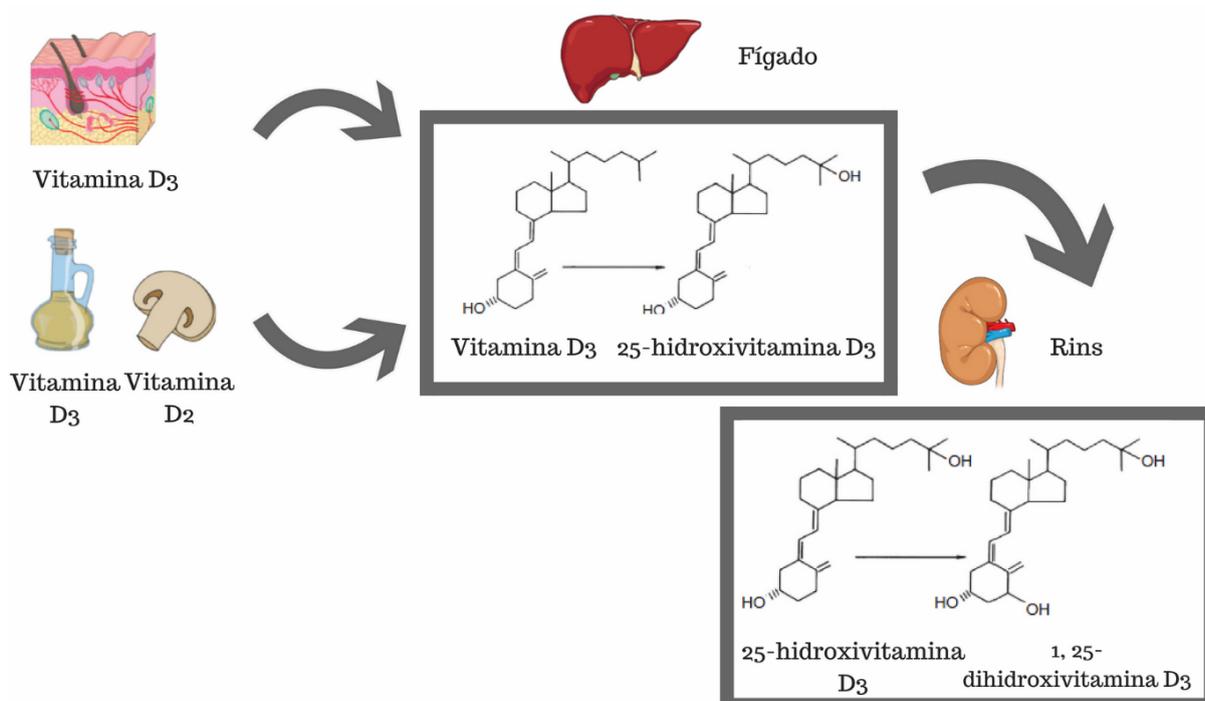


Figura 3: Metabolismo da vitamina D.
Fonte: A autora.

A vitamina D₃ sintetizada na pele, assim como a vitamina D₃ e vitamina D₂ provenientes da dieta são transportadas até o fígado, onde são hidroxiladas no carbono 25 produzindo a 25-hidroxitamina D (25(OH)D), esta molécula é a principal forma circulante de vitamina D (CHRISTAKOS et al., 2016; CHEN; SUN; AGRAWAL, 2015). A hidroxilação no fígado pode ser mediada por várias enzimas, denominadas 25-hidroxilases, a mais importante é a CYP2R1, a mesma é uma enzima P450 do tipo 1. Além disso, esta hidroxilação não parece ser regulada por um mecanismo endógeno, sendo as concentrações sanguíneas de 25(OH)D determinadas principalmente pela ingestão de vitamina D e exposição à radiação ultravioleta (MILLER, 2017).

A 25(OH)D produzida será transportada até os rins, onde acontece a segunda hidroxilação, no túbulo renal proximal, por meio da enzima mitocondrial 1- α -hidroxilase (CYP27B1). Essa enzima é responsável pela conversão da 25(OH)D em 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D), que é o hormônio ativo, e responsável pelas ações biológicas da vitamina D.

Mutações no gene CYP27B1 causam o raquitismo dependente de vitamina D tipo 1, caracterizado por hipocalcemia, hipofosfatemia, diminuição da mineralização e baixos níveis circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. A atividade da enzima é regulada pelo paratormônio (PTH), fator de crescimento do fibroblasto 23 (FGF23) e $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. O PTH estimula a enzima, enquanto o FGF23 e a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inibem a mesma (PIKE; CHRISTAKOS, 2017; CHRISTAKOS et al., 2017). O mecanismo pelo qual o PTH e o FGF23 regulam a enzima ainda não está claro. O mecanismo de *feedback*, no qual a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inibe a atividade da enzima CYP27B1, ocorre através da inibição da produção do PHT e estimulação da produção do FGF23 (BIKLE, 2014).

Além dos rins, outros tecidos também expressam a enzima 1- α -hidroxilase, como as células epiteliais da pele, pulmões, mama, intestino e próstata; glândulas endócrinas como a glândula paratireóide, ilhotas pancreáticas, tireóide, testículos, ovários e placenta; células do sistema imune como macrófagos, linfócitos T e B e células dendríticas; osteoclastos e osteoblastos, além de uma variedade de tumores derivados dessas células (BIKLE, 2014). A presença da 1- α -hidroxilase nessas células, tem como consequência a conversão local da $25(\text{OH})\text{D}$ em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, que exercerá seus efeitos biológicos de uma maneira autócrina ou parácrina (CHEN; SUN; AGRAWAL, 2015).

O receptor de vitamina D (VDR, do inglês *vitamin D receptor*) é o mediador das ações biológicas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. É um fator de transcrição, membro da superfamília de receptores nucleares (LEE et al., 2018; SACCONI; ASANI; BORNMAN, 2015) e age controlando a expressão gênica. A ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR promove uma mudança conformacional que facilita a interação com o receptor de retinoide X (RXR), formando um heterodímero. Este heterodímero se liga a sequências específicas do DNA (VDREs, do inglês, *vitamin D response elements*) nos genes alvo, resultando tanto na ativação como repressão da transcrição. As mudanças na expressão gênica não são mediadas diretamente pelo VDR, mas sim através do recrutamento de complexos corre regulatórios. (PIKE; MEYER, 2010; CHRISTAKOS et al., 2016).

Os principais órgãos que são alvos da ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são o intestino, ossos, glândulas paratiroides e os rins. Entretanto a presença do VDR foi demonstrada em vários outros tecidos (MAEDA et al., 2014), como por exemplo, pele, células beta pancreáticas, placenta, células do sistema imune e células do tecido reprodutivo (LEE et al., 2018). As respostas biológicas mediadas pelo VDR são específicas para cada tecido, e variam de ações altamente complexas, essenciais para o controle do metabolismo mineral, até ações focais que

controlam o crescimento, diferenciação e atividade de diversos tipos celulares, incluindo as do sistema imunológico, pele, pâncreas, ossos, entre outros (PIKE; MEYER, 2010).

2.1.2 Ações da vitamina D

2.1.2.1 Ações no metabolismo osteomineral

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ participa da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio e fosfato atuando na sua absorção intestinal, excreção renal e mobilização do cálcio dos ossos. Quando a concentração plasmática de cálcio diminui, a secreção de PTH é estimulada, e este induz a síntese da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Tanto o PTH como a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimulam a reabsorção renal de cálcio e sua mobilização dos ossos. Entretanto, quando as concentrações de cálcio aumentam, acontece a diminuição da secreção de PTH, com consequente diminuição da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e mobilização de cálcio (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018).

A principal função da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na manutenção da homeostase do cálcio, é o aumento da absorção do cálcio no intestino. Esta absorção ocorre através de mecanismo ativo transcelular, ou então por meio de um processo passivo não saturável que requer altas concentrações de cálcio no lúmen do intestino. Na via transcelular ocorre o influxo de cálcio para dentro da célula através do canal de cálcio apical (TRPV6), difusão através do citosol, possivelmente mediada pela calbindina D_{9k} , e extrusão ativa na membrana basolateral (PMCA1b). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ regula o mecanismo transcelular, através da indução das proteínas: TRPV6, calbindina D_{9k} e PMCA1b (CHRISTAKOS et al., 2017).

Se níveis sanguíneos normais de cálcio não forem alcançados com a absorção intestinal de cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ irá agir em conjunto com o PTH para estimular a reabsorção óssea e o aumento da reabsorção de cálcio no túbulo distal nos rins. A reabsorção de cálcio nos rins acontece, principalmente, por mecanismo passivo paracelular nos túbulos renais proximais. Entretanto, 10 a 15% do cálcio filtrado é reabsorvido no túbulo distal, através de um processo ativo, transcelular regulado pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e PTH. Assim, como no intestino, ocorre a regulação do transporte transcelular, através da indução das proteínas: TRPV5, calbindina D_{9k} e calbindina D_{28k} . A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ também pode agir mobilizando cálcio e fósforo dos ossos, por meio da estimulação da reabsorção óssea, tanto com a indução da atividade dos osteoclastos, como com a formação de novos osteoclastos a partir de precursores celulares. (PIKE; CHRISTAKOS, 2017; GIL, PLAZA-DIAZ, MESA, 2018; CHRISTAKOS et al., 2017).

2.1.2.2 Ações extra-esqueléticas

No sistema imunológico, quase todas as células expressam o VDR e muitas expressam a CYP27B1, resultando em produção e ação autócrina/parácrina da 1,25(OH)₂D. Nessas células o controle da CYP27B1 não é realizado como nos rins, e acontece através do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (INF γ) (BOUILLON, 2018). A 1,25(OH)₂D estimula a imunidade inata enquanto regula negativamente o sistema imune adquirido (PRIETL et al., 2013; CHRISTAKOS et al., 2016).

A 1,25(OH)₂D leva ao aumento da capacidade de defesa dos macrófagos, através da indução da sua diferenciação, capacidade fagocitária e atividade microbiana (aumento da expressão de catelicidinas). Adicionalmente, inibe a proliferação dos monócitos e promove a diferenciação dos mesmos em macrófago. A 1,25(OH)₂D também inibe a proliferação, maturação e propriedades imuno estimulatórias das células dendríticas (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018). Alguns efeitos imunomoduladores e imunossupressores importantes da 1,25(OH)₂D, observados tanto *in vitro* como *in vivo*, incluem: inibição da proliferação de linfócitos T; diminuição da produção de IL-2, IL-12, IL-6, e INF γ ; regulação negativa da produção de TNF; regulação positiva da produção de IL-4, IL-5, IL-10; inibição da produção e secreção de autoanticorpos pelos linfócitos B (MOHAMMED et al., 2017).

Estudos pré-clínicos demonstraram que a 1,25(OH)₂D e seus análogos têm efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*, e diversos mecanismos têm sido propostos para explicar esses efeitos (MA; JOHNSON; TRUMP, 2016). O potencial anticancerígeno da vitamina D pode ser devido a sua capacidade de influenciar, direta ou indiretamente, a expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento celular, apoptose, angiogênese e inflamação, sendo estes quatro mecanismos essenciais para o desenvolvimento e progressão do câncer (MOCELLIN, 2011). A 1,25(OH)₂D inibe a proliferação de muitas células malignas induzindo a parada do ciclo celular e o acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular; além disso, controla o crescimento celular modelando a expressão e atividade dos principais fatores de crescimento na célula cancerosa (VUOLO et al., 2012). A apoptose induzida pela 1,25(OH)₂D acontece tanto através da regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas como a regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas. A inflamação crônica é um dos principais contribuintes para o início da carcinogênese; dados sugerem que a 1,25(OH)₂D exibe ações anti-inflamatórias que podem contribuir para a sua atividade anticâncer (JEON; SHIN, 2018).

Muitos tecidos e células que compõem o sistema cardiovascular apresentam o VDR, tais como: células musculares lisas, endotélio e miocárdio (APOSTOLOKIS et al., 2018). Assim,

estudos experimentais têm demonstrado possíveis vias biológicas, através das quais a vitamina D₃ poderia influenciar na fisiologia e patologia do sistema cardiovascular. (SCHNATZ; MANSON, 2014). A ativação do VDR leva a inibição da proliferação de células musculares lisas, o que acredita-se ser uma ação cardioprotetora. Evidências demonstram que a 1,25(OH)₂D está envolvida na regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, levando conseqüentemente ao controle da pressão arterial. É importante citar que as células do sistema imune têm papel fundamental em todas as doenças cardiovasculares, e como descrito anteriormente, a vitamina D regula negativamente o sistema imune adquirido, sendo esta outra possível hipótese para a ação cardioprotetora da vitamina D (NORMAN; POWELL, 2014; SCHNATZ; MANSON, 2014).

2.1.3 Doseamento plasmático da vitamina D

Recentemente houve um aumento nas solicitações de dosagens séricas de vitamina D, devido ao aumento acentuado na deficiência de vitamina D em todo o mundo e também a relação entre deficiência de vitamina D e doenças extra-esqueléticas (ATEF, 2018). Entretanto, o doseamento dos metabólitos da vitamina D apresenta dificuldades: os mesmos são moléculas lipofílicas, que circulam em baixas concentrações (25(OH)D: 8-60 ng mL⁻¹; 1,25(OH)₂D: 20-60 pg mL⁻¹), fortemente ligados a proteínas (DBP e albumina). Além disso, os metabólitos diferem quimicamente pouco entre si. Esses fatores prejudicam o desenvolvimento de métodos rápidos, com custo razoável para atender a crescente demanda no doseamento da vitamina D (BIKLE, 2018; LIPS, 2007).

É amplamente reconhecido que a 25(OH)D é o marcador mais confiável para indicar o *status* de vitamina D (CHEN; SUN; AGRAWAL, 2015). O nível sérico da 25(OH)D é resultante da exposição da pele à luz solar e da ingestão através da dieta, e é frequentemente considerado como um reflexo do *status* da vitamina D a longo prazo (AUTIER; GANDINI; MULLIE, 2012). A concentração sérica de 25(OH)D é utilizada para avaliar o *status* da vitamina D devido às seguintes razões: i) a 25(OH)D possui meia-vida maior (15 dias) quando comparado à 1,25(OH)₂D (15 horas); ii) a concentração da 25(OH)D na circulação é cerca de 1000 vezes maior do que a concentração da 1,25(OH)₂D, sendo a faixa de concentração sanguínea da 25(OH)D de 8-60 ng mL⁻¹, enquanto da 1,25(OH)₂D é de 20-60 pg mL⁻¹; iii) Os níveis da 1,25(OH)₂D são diretamente influenciados pelas concentrações de cálcio, fósforo e PTH. A deficiência de vitamina D pode resultar na secreção de PTH que induz a produção de

1,25(OH)₂D. Assim níveis normais ou elevados de 1,25(OH)₂D podem ser observados em pacientes com deficiência de vitamina D (SU; NARLA; ZHU, 2014; LIPS, 2007).

As concentrações séricas de 25(OH)D são mensuradas através de várias técnicas analíticas, incluindo: ensaios de ligação competitiva às proteínas (WIELDERS, et al., 2015), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (NEYESTANI, GHARAVI, KALAYI, 2007), radioimunoensaio (GOFF et al., 2015), imunoensaio automático (FREEMAN et al., 2015) e cromatografia líquida associada a espectrofotometria de massas (LC-MS/MS) (JONES, KAUFMANN, 2016). Os métodos baseados em LC-MS/MS são os mais sensíveis e específicos e considerados o padrão-ouro, porém os elevados custos do equipamento têm limitado o amplo uso clínico (BLACK et al., 2015). Os imunoensaios automáticos são a metodologia mais comum na rotina dos laboratórios clínicos (ZIEGLER et al., 2015).

Existem controvérsias em relação as concentrações de 25(OH)D que definem a deficiência e suficiência de vitamina D (PLUDOWSKI, et al., 2018). A diretriz do *Endocrine Society* (2011) (Sociedade de Endocrinologia dos Estados Unidos), define deficiência como níveis de 25(OH)D abaixo de 20 ng mL⁻¹, insuficiência como 25(OH)D de 21-29 ng mL⁻¹ e suficiência como 25(OH)D maior ou igual a 30 ng mL⁻¹ (HOLICK, et al., 2011). Esses pontos de corte são os mais utilizados para definir o *status* da vitamina D (CHEN; SUN; AGRAWAL, 2015). O relatório do *Institute of Medicine* (IOM) de 2011, sugeriu que as pessoas estão em risco de deficiência em relação à saúde óssea em níveis séricos de 25(OH)D abaixo de 12 ng mL⁻¹, algumas pessoas estão potencialmente em risco de inadequação com 25(OH)D entre 12 e 20 ng mL⁻¹ e praticamente todas as pessoas são suficientes com 25(OH)D acima de 20 ng mL⁻¹. Adicionalmente, para o IOM concentrações de 25(OH)D acima de 30 ng mL⁻¹ não estão associadas com aumento do benefício (IOM, 2011). A Tabela 1 resume os pontos de corte descritos (ROSS et al., 2011).

Tabela 1: *Status* da Vitamina D, baseado nas concentrações de 25(OH)D.

<i>Status</i> /Terminologia	<i>Endocrine Society</i>		IOM	
	ng mL ⁻¹	nmol L ⁻¹	ng mL ⁻¹	nmol L ⁻¹
Deficiência	<20	<50	<12	<30
Insuficiência	21-29	52-72	12-20	30-50
Suficiência	≥30	≥75	>20	>50

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), concentrações da 25(OH)D acima de 20 ng mL⁻¹ são desejáveis para a população saudável até 60 anos e concentrações entre 30 e 60 ng mL⁻¹ são recomendadas para pacientes em risco de deficiência (FERREIRA et al., 2017)

2.1.4 Deficiência de vitamina D

2.1.4.1 Causas da deficiência de vitamina D

A maior causa de deficiência de vitamina D é a inadequada exposição a luz solar. Assim, qualquer condição que diminua a transmissão de radiação UVB para a superfície da terra ou qualquer fator que interfira com a penetração da radiação UVB através da pele, afetará a síntese cutânea da vitamina D₃ (HOLICK; CHEN, 2008). Indivíduos com pele escura possuem proteção natural ao sol, e precisam de uma exposição de três a cinco vezes maior do que uma pessoa de pele clara para produzir a mesma quantidade de vitamina D₃. A utilização de protetor solar com fator 30 reduz a síntese de vitamina D através da pele em mais de 95% (HOLICK et al., 2011). Segundo Ginde e colaboradores, campanhas bem sucedidas de controle à exposição solar, por meio da utilização de protetor solar em conjunto com a diminuição de atividades ao ar livre, podem ter contribuído ao aumento da prevalência de insuficiência de vitamina D nos Estados Unidos (GINDE; LIU; CAMARGO, 2009). Essas campanhas de controle à exposição à radiação ultravioleta foram desenvolvidas para minimizar o aumento da incidência de câncer de pele, uma vez que a radiação ultravioleta é o fator de risco ambiental mais importante para o desenvolvimento de todos os tipos de câncer de pele. Dessa forma, existe um debate na comunidade científica sobre qual a quantidade de luz solar é adequada para equilibrar os efeitos positivos e negativos da radiação ultravioleta (MASON; REICHRATH, 2013; REICHRATH; NÜRNBERG, 2009)

Idosos, devido à diminuição da quantidade de 7-DHC na pele, estão particularmente em risco de deficiência de vitamina D. Adicionalmente, a redução na mobilidade e a institucionalização (que desencorajam a exposição a luz solar) e a redução da produção de 1,25(OH)₂D pelos rins, impõem dificuldades para a produção de vitamina D pelo organismo dos idosos (GALESANU; MOCANU, 2015).

Outro grupo de pacientes que estão em risco de deficiência de vitamina D incluem aqueles com síndromes de má absorção de gordura e pacientes pós cirurgia bariátrica, devido à

diminuição da absorção da vitamina D lipossolúvel, assim como pacientes com síndrome nefrótica por causa do aumento na perda de 25(OH) ligada a proteína na urina (KHOKHAR; CASTELLS; PEREZ-COLON, 2016).

As pessoas obesas são propensas a ter deficiência de vitamina D. Uma possível explicação seria devido à gordura subcutânea. A mesma é conhecida por armazenar vitamina D, e seria responsável por sequestrar maior quantidade de vitamina D nos obesos do que nos não obesos, resultando em menor liberação de vitamina D da pele para a corrente sanguínea (GALESANU; MOCANU, 2015).

2.1.4.2 Prevalência da deficiência de vitamina D

Em todo o mundo, a prevalência e incidência de deficiência em vitamina D têm aumentado. Estima-se que mais de 50% da população mundial apresenta níveis de 25(OH)D abaixo de 75 nmol L^{-1} (WIMALAWANSA; RAZZAQUE, AL-DAGHRI, 2018). Nos Estados Unidos da América (EUA), a pesquisa nacional de verificação de saúde e nutrição (*National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) avaliou o *status* da vitamina D de uma amostra representativa ($n = 15.652$) da população americana com idade maior ou igual a um ano, no período entre 2007 e 2010, utilizando LC/MS-MS. A pesquisa demonstrou que, no geral, 5,9%, 13%, 24% e 64% da população apresenta concentrações de 25(OH)D <30 , <40 , <50 e $<75 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente (SCHLEICHER, et al., 2016). Utilizando as definições do IOM (25(OH)D $<30 \text{ nmol L}^{-1}$), conclui-se que 5,9% da população apresenta deficiência de vitamina D; já utilizando as definições do *Endocrine Society* (25(OH)D $<50 \text{ nmol L}^{-1}$), 24% da população apresenta deficiência de vitamina D e somente 36% da população pode ser considerada como tendo suficiência. Também nos EUA, uma pesquisa utilizando crianças (6-18 anos), com classificação de deficiência níveis de 25(OH)D $<50 \text{ nmol L}^{-1}$, encontrou prevalência para crianças com: peso saudável, sobrepeso, obesas e gravemente obesas, de 21%, 29%, 34% e 49% respectivamente (TURER; LIN; FLORES, 2013).

Na União Europeia, Cashman e colaboradores (2016), com uma amostra de 55.844 indivíduos, demonstraram prevalência de 13% de deficiência de vitamina D, utilizando ponto de corte concentrações de 25(OH)D $<30 \text{ nmol L}^{-1}$, já quando valores de 25(OH)D $<50 \text{ nmol L}^{-1}$ são utilizados, a prevalência foi de 40,4%. Também foi observado que durante os meses de inverno a prevalência de concentrações baixas de 25(OH)D é maior, quando comparado com os meses de verão, além disso, os subgrupos étnicos de pele escura tiveram maior prevalência de 25(OH)D $<30 \text{ nmol L}^{-1}$ do que as populações brancas (CASHMAN et al., 2016).

No Brasil, Eloi e colaboradores (2016) realizaram pesquisa envolvendo 39.004 pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 2 e 95 anos, moradores de São Paulo, e encontraram que 33,9% apresentam concentrações da 25(OH)D menor que 50 nmol L⁻¹, e que a grande maioria (70,7%) apresenta deficiência ou insuficiência de vitamina D (<75 nmol L⁻¹) (ELOI et al., 2016).

2.1.4.3 Consequências da deficiência de vitamina D

A deficiência de vitamina D leva à diminuição da absorção de cálcio e fósforo da dieta, resultando em aumento dos níveis de PTH. O PTH mantém os níveis séricos de cálcio na normalidade, mobilizando cálcio dos ossos através do aumento da reabsorção óssea (KHOKHAR; CASTELLS; PEREZ-COLON, 2016). Assim, a deficiência de vitamina D em crianças causa o raquitismo, manifestado como defeitos de mineralização e deformidades esqueléticas significativas. Já nos adultos resulta em osteomalácia, osteoporose, fraca coordenação muscular e fraqueza, sendo que o último leva ao aumento de quedas e consequentemente fraturas (WIMALAWANSA; RAZZAQUE, AL-DAGHRI, 2018).

Um grande número de pesquisas tem sido realizadas nas últimas duas décadas sobre os efeitos da vitamina D na prevenção e controle de doenças. Estudos observacionais têm descrito a associação entre baixos níveis plasmáticos da 25(OH)D e várias patologias, tais como: doenças cardiovasculares, câncer, doenças autoimunes, diabetes e obesidade (REJNMARK et al., 2017).

Estudos epidemiológicos sugerem que viver em latitudes elevadas e possuir concentrações séricas mais baixas de 25(OH)D está associado com maior risco de desenvolver até 15 tipos de câncer, incluindo: cólon, mama, pulmão, linfoma, ovário e próstata. A maioria de ensaios clínicos randomizados, utilizando doses apropriadas de vitamina D, sugere que um aumento do *status* da vitamina D reduz o risco para vários tipos de câncer, embora esse mecanismo ainda não seja compreendido (HOLICK, 2014).

Dados atuais relacionam a deficiência de vitamina D a muitas doenças autoimunes, como: diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide. Tem sido sugerido que a vitamina D e seus análogos não só previnem o desenvolvimento de doenças autoimunes, mas também podem ser usados em seu tratamento (MOHAMMED et al., 2017). Além disso, a deficiência de vitamina D está associada ao risco de dois distúrbios inflamatórias da pele, a psoríase e a dermatite atópica.

Estudos observacionais e clínicos têm sugerido o efeito benéfico da vitamina D na terapia dessas doenças (UMAR et al., 2018).

Estudos observacionais relacionam baixos níveis de vitamina D com risco aumentado para hipertensão, fatores de risco cardiovascular e eventos cardiovasculares como cardiomiopatia, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral e mortes cardiovasculares, sendo o maior risco com 25(OH)D abaixo de 60 nmol L⁻¹. Entretanto, até agora, os estudos de intervenção são inconsistentes (BOUILLON, 2018).

2.1.5 Suplementação de vitamina D

2.1.5.1 Recomendação de ingestão diária

Baseado na saúde ossea, as recomendações do IOM (2011) para a ingestão diária adequada de vitamina D são: 400 UI/dia para bebês de até 1 ano, 600 UI/dia para crianças e adultos até os 70 anos e 800 UI/dia para idosos acima de 70 anos, correspondendo a um nível sérico de 25(OH)D de pelo menos 20 ng mL⁻¹ (50 nmol L⁻¹) (ROSS et al., 2011) . Para a *Endocrine Society* (2011) esses valores são inadequados, especialmente para pacientes em risco para deficiência de vitamina D. Esta diretriz recomenda: 400 UI/dia para bebês até um ano, 600 UI/ dia para crianças até 18 anos e 1.500 UI/dia para pessoas com idade acima de 18 anos, em relação a saúde óssea. Segundo a *Endocrine Society* (2011) ainda não se sabe se essas quantidades são suficientes para fornecer todas os potenciais benefícios extra esqueléticos da vitamina D, e que para atingir níveis sanguíneos acima de 30 ng mL⁻¹ de 25(OH)D é necessário no mínimo: 1.000 UI/dia para bebês e crianças até 18 anos e 2.000 UI/dia para pessoas acima de 18 anos (HOLICK et al., 2011).

No Brasil a SBEM recomenda para a população geral: 400 UI/dia para crianças até 8 anos, 600 UI/ dia para adultos até os 70 anos e 800 UI/dia para os idosos com idade maior do que 70 anos. Já para a população em risco para deficiência de vitamina D a SBEM recomenda: 400-1.000 UI/dia para bebês de até 1 ano, 600-1.000 UI/dia para crianças até os 18 anos e 1.500-2.000 UI/dia para adultos acima de 18 anos (MAEDA et al., 2014). A Tabela 2 resume os valores descritos.

Tabela 2: Recomendações de ingestão diária de vitamina D.

	IOM (RDA)	Endocrine Society (Pacientes em risco para deficiência de vitamina D)	SBEM	
			População geral	População de risco
0-12 meses (M+F)	400 UI	400-1000 UI	400 UI	400-1000 UI
1-8 anos (M+F)	600 UI	600-1000 UI	400 UI	600-1000 UI
8-18 anos (M+F)	600 UI	600-1000 UI	600 UI	600-1000 UI
19-70 anos (M+F)	600 UI	1500-2000 UI	600 UI	1500-2000 UI
>70 anos (M+F)	800 UI	1500-2000 UI	800 UI	1500-2000 UI

M: Masculino; F: Feminino. RDA: Ingestão Dietética Recomendada (do inglês, *Recommended Dietary Allowances*) ; IOM: *Institute of Medicine*; SBEM: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia.

2.1.5.2 Tratamento para deficiência de vitamina D

Os pacientes que possuem deficiência de vitamina D confirmada em exame laboratorial, necessitam da implementação de tratamento com suplementação de vitamina D. Antes do início do tratamento, deve-se levar em consideração a idade do paciente, seu peso e a coexistência de outras doenças. A duração do tratamento deve ser de um a três meses, e no acompanhamento, a primeira verificação da concentração da 25(OH)D não deve ocorrer antes de 8 a 12 semanas depois do começo da suplementação (PLUDOWSKI, 2018).

As dosagens do tratamento devem ser: para bebês e crianças até os 18 anos, 2.000 UI por dia ou 50.000 UI por semana de vitamina D₃ ou vitamina D₂, durante seis semanas; para adultos, 50.000 UI por semana ou o seu equivalente de 6.000 UI por dia de vitamina D₃ ou vitamina D₂ durante oito semanas. Após esse período utiliza-se uma dose de manutenção, que varia de acordo com a idade, sendo de 1.500 a 2.000 UI por dia para adultos. Indivíduos obesos ou com má-absorção precisam de dosagens de duas a três vezes maiores (HOLICK et al., 2011). Pacientes com disfunção hepática grave ou doença renal crônica são os únicos grupos que requerem o uso dos metabólitos ativos da vitamina D (PLUDOWSKI, 2018).

A resposta da suplementação de vitamina D nas concentrações sanguíneas de 25(OH)D varia entre os indivíduos, e muitos fatores podem afetar essa resposta, incluindo: concentração

basal da 25(OH)D, percentual de gordura corporal, presença de outras doenças, utilização de vitamina D₂ ou vitamina D₃ e frequência de administração (MAZAHERY; VON HURST, 2015).

Comercialmente a vitamina D pode ser encontrada como comprimido, solução oral, cápsula e pó. No Brasil estão registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) vários medicamentos, que utilizam a vitamina D₃ em concentrações diferentes, incluindo: Addera D₃ (3.300 e 10.000 UI/mL; 1.000, 5.000, 7.000, 10.000 50.000 UI/comprimido revestido), Altad (2.000 e 6.000 UI/mL; 1.000, 2.000, 5.000, 7.000, 10.000 e 50.000 UI/comprimido revestido) Dprev (1.000, 2.000, 5.000, 7.000, 10.000 e 50.000 UI/comprimido revestido), DePura (1.400 UI/mL; 2.000, 7.000, 30.000 e 50.000 UI/comprimido orodispersível) e Sany D (6.000 e 2.000 UI/mL; 1.000, 2.000, 5.000, 7.000, 10.000 e 50.000 UI/comprimido revestido) (ANVISA). Nos suplementos de vitamina D podem ser utilizados veículos como: pós, óleos e etanol. O veículo tem impacto na biodisponibilidade dos suplementos de vitamina D, fatores como o revestimento e a solubilidade da formulação influenciarão a dissolução do fármaco, e a biodisponibilidade é dependente da dissolução. Uma revisão sistemática avaliou o efeito do tipo de veículo na biodisponibilidade da vitamina D, e concluiu que a vitamina D em um veículo oleoso produziu uma resposta de aumento da 25(OH)D maior do que veículos em pó e etanol (GROSSMANN; TANGPRICHA, 2010).

A biodisponibilidade oral da vitamina D é relativamente baixa devido ao fato de ser uma molécula hidrofóbica, levando a uma baixa solubilidade em fluidos aquosos, como aqueles do trato gastrintestinal (KADAPPAN et al., 2018). Além disso, algumas populações apresentam grandes diferenças na biodisponibilidade dos suplementos de vitamina D (GROSSMANN; TANGPRICHA, 2010). As doenças que levam à má absorção de gordura têm como consequência a diminuição da absorção de vitamina D₃. Em pacientes com doença celíaca, obstrução biliar e pancreatite crônica, a absorção de vitamina D₃ marcada com trítio caiu para 50%, <28% e <18% respectivamente, sendo significativamente menor do que indivíduos normais, que variou de 62 a 91% (TSIARAS, WEINSTOCK, 2011). Assim, para contornar os problemas de biodisponibilidade da vitamina D, é interessante o desenvolvimento de uma via alternativa de administração de fármacos.

2.2 ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS

Nas últimas décadas, pesquisas têm sido realizadas para desenvolver novas vias de administração sistêmica de fármacos, diferentes das rotas tradicionais (oral e injetável). As rotas alternativas podem ser utilizadas para complementar os medicamentos já aprovados, ou para possibilitar o uso daqueles que não podem ser administrados por via oral ou parenteral. As vias intranasal, bucal/sublingual, pulmonar e transdérmica são opções promissoras (MATHIAS; HUSSAIN, 2010).

Alguns fármacos podem apresentar problemas na administração oral e injetável, como por exemplo: toxicidade ao trato gastrointestinal, baixa biodisponibilidade, baixa absorção intestinal, extenso metabolismo de primeira passagem no fígado e instabilidade físico-química no trato gastrointestinal. Além disso, alguns pacientes apresentam dificuldades quanto à utilização da via oral, tais como: disfagia (dificuldade em engolir comprimidos e cápsulas) e absorção errática devido a náuseas e vômitos. Ainda, para a via injetável, a alta frequência de administração de injeções pode ser um inconveniente, além disso, alguns pacientes apresentam fobia de agulhas (MATHIAS; HUSSAIN, 2010; DELGADO-CHARRO; GUY, 2014). A via de administração transdérmica é uma alternativa para minimizar e/ou evitar esses problemas e consiste na administração de fármacos através da pele para fins terapêuticos, promovendo concentrações sistêmicas efetivas ao invés do efeito local. (ALEXANDER et al., 2012; PONTRELLI; DE MONTE, 2014; DELGADO-CHARRO; GUY, 2014).

Os sistemas transdérmicos possuem administração simples e não invasiva, são geralmente bem aceitos pelos pacientes, aumentam a adesão do paciente à terapêutica, evitam o efeito de primeira passagem no fígado, são capazes de liberar o fármaco de forma controlada e permitem a interrupção da administração em situações que a absorção do fármaco já não é mais desejável (WIEDERSBERG; GUY, 2014; PONTRELLI; MONTE, 2014; DELGADO-CHARRO; GUY, 2014).

Diferentes formas farmacêuticas estão disponíveis para a administração transdérmica, incluindo: adesivos, géis, pomadas, loções, cremes, géis-cremes, emplastos e unguentos (ALLEVATO, 2007). Recentemente, as formas farmacêuticas transdérmicas semi-sólidas têm ganhado atenção, já que além de ter a *performance* clínica dos adesivos, também diminuem a ocorrência de irritação na pele, levando ao aumento da adesão do paciente ao tratamento (POLONINI et al., 2014a). Vários fármacos já foram testados na via transdérmica, e na forma de emulsão, incluindo: estradiol, estriol, progesterona (POLONINI et al., 2014b), cetoprofeno,

testosterona (LEHMAN; RANEY, 2012), oxandrolona (POLONINI et al., 2017), nimesulida e piroxicam (PEREIRA et al., 2017).

Para um fármaco ser veiculado pela via transdérmica algumas características são necessárias: i) possuir baixa dosagem diária; ii) o peso molecular ideal é inferior a 400 Daltons, já que o tamanho da molécula é inversamente proporcional ao fluxo transdérmico; iii) possuir solubilidade em água e óleo, com log P entre 1 e 3; iv) não deve induzir uma resposta alérgica cutânea (MARWAH et al., 2016; SAHU et al., 2017; WIEDERSBERG; GUY, 2014). A vitamina D₃ possui peso molecular de 384.64 g/mol, sua dose diária recomendada é pequena (0,01-5 mg), e é uma molécula lipofílica, com isso a vitamina D₃ é uma candidata para a administração transdérmica. O maior desafio para a administração da Vitamina D₃ através desta via é sua alta lipofilicidade, já que a molécula possui log P de 10,2 (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015). Além disso, é considerada como sendo insolúvel em água, com solubilidade neste solvente de $1,3 \times 10^{-5}$ mg L⁻¹ (*National Center for Biotechnology Information*).

A administração de fármacos através da pele é uma área desafiadora, principalmente devido à excelente propriedade de barreira deste órgão, sendo o estrato córneo (EC) a principal camada responsável por essa característica. Quando uma formulação transdérmica é aplicada na pele, inicialmente o princípio ativo precisa ser liberado a partir do veículo; seguido de particionamento para o EC e difusão na mesma camada; após, deve permear pela epiderme viável e derme, e finalmente ser absorvido para o sistema vascular (LANE, 2013; BOLZINGER et al., 2012).

2.2.1 Estrutura da pele

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, em relação a sua área de superfície e também ao seu peso. Possui como principal função a formação de uma barreira efetiva com o objetivo de proteger o organismo de influências ambientais, incluindo danos físicos, químicos e térmicos, além de atuar como um envoltório que retém a água dentro do corpo (PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016; BOLZINGER et al., 2012). A barreira imposta pela pele limita tanto o transporte para fora, como para dentro do organismo, superar essa propriedade para a administração de fármacos através da pele é um desafio (NAIK; KALIA; GUY, 2000).

A pele é constituída de duas camadas, que possuem diferenças em sua composição e estrutura. A camada mais externa é a epiderme, com origem ectodérmica; a camada de tecido conjuntivo abaixo é a derme e possui origem mesodérmica; por fim se encontra a hipoderme,

ou tecido subcutâneo que não faz parte da pele propriamente dita. Adicionalmente, fazem parte da pele os anexos (folículos pilosos, unhas e glândulas) (Figura 4) (BOLZINGER et al., 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

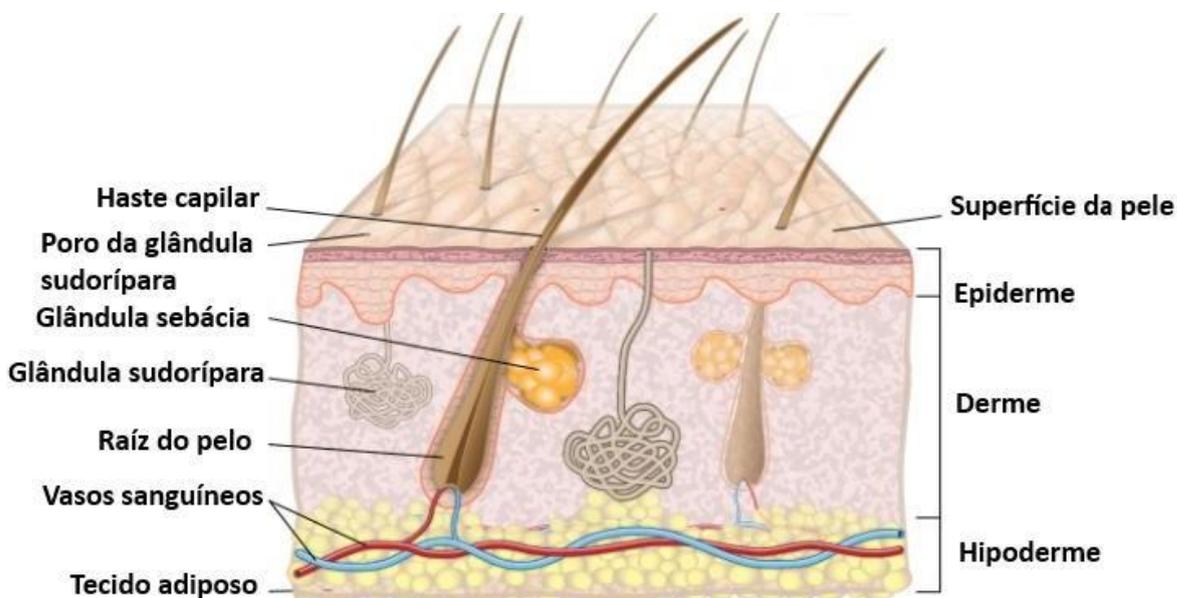


Figura 4: Estrutura da pele.

Fonte: Adaptado de BRUGGER; BOMAR; LEMON, 2016.

2.2.1.1 Epiderme

A epiderme é responsável pela cor, textura e umidade da pele. Esta camada apresenta espessura variável, dependendo da região do corpo, podendo ter de 0,1 mm nas pálpebras até 1,5 mm nas palmas e solas dos pés. Os queratinócitos são as células mais abundantes da epiderme, além disso, também estão presentes melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (LOSQUADRO, 2017; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

É dividida em quatro camadas, que representam a maturação dos queratinócitos. A camada mais profunda é o estrato basal, que contém células tronco denominadas de células basais, que se dividem para formar os queratinócitos, que começam então a migrar para a superfície. A próxima camada é o estrato espinhoso, os queratinócitos desta camada formam ligações intercelulares denominadas desmossomos. A camada seguinte é o estrato granuloso, que possui esse nome devido aos grânulos visíveis de querato-hialina, as células nesta camada perdem gradualmente suas organelas e tornam-se mais compactas, formando o EC, sendo esta a camada mais externa da epiderme (LOSQUADRO, 2017).

O EC é o principal responsável pela propriedade de barreira da pele, sendo formado por queratinócitos em seu estágio final de diferenciação, também denominados como corneócitos, que estão envolvidos por uma matriz lipídica densa e altamente organizada. A estrutura do EC pode ser descrita pelo conceito “tijolo e cimento” onde os corneócitos, como corpos celulares achatados e mortos de queratinócitos, representam os tijolos que estão embebidos por uma matriz lipídica intercelular que constitui o cimento. A matriz lipídica compreende uma mistura de ceramidas, colesterol, triglicérides e ácidos graxos (JEPPS et al., 2013; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

2.2.1.2 Derme

A derme está localizada abaixo da epiderme, e é a camada mais espessa da pele, podendo ter até 4 mm de espessura (JEPPS et al., 2013). A mesma é constituída principalmente de tecido conjuntivo, e promove a entrega de nutrientes e oxigênio para a pele, além da remoção de produtos tóxicos (MARWAH et al., 2016). É dividida em derme papilar, a camada superior que contém fibras de colágeno dispostas de forma livre, e derme reticular, constituída de fibras de colágeno densas, dispostas em paralelo a superfície da pele. A derme também possui uma grande quantidade de elastina, a mesma é responsável pela propriedade elástica da pele. Os fibroblastos são o principal tipo celular desta camada, e produzem o colágeno e a elastina. Diferentemente da epiderme, cuja estrutura é avascular, a derme apresenta vasos sanguíneos e linfáticos, além de possuir nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER 2014).

2.2.1.3 Tecido subcutâneo

O tecido subcutâneo atua como um suporte para a epiderme e derme (MARWAH et al., 2016) e é responsável por conectar a pele as estruturas subjacentes, como músculos e ossos, permitindo o movimento sobre eles (JEPPS et al., 2013).

2.2.2 Rotas de permeação

Fármacos aplicados na pele podem penetrar através de dois caminhos principais, a via transepidermal e a via apendicular ou folicular. Na via transepidermal, a permeação da substância

ocorre diretamente através do EC e pode ocorrer de duas maneiras: intercelular ou intracelular (transcelular) (Figura 5) (VAN GELE et al., 2011).

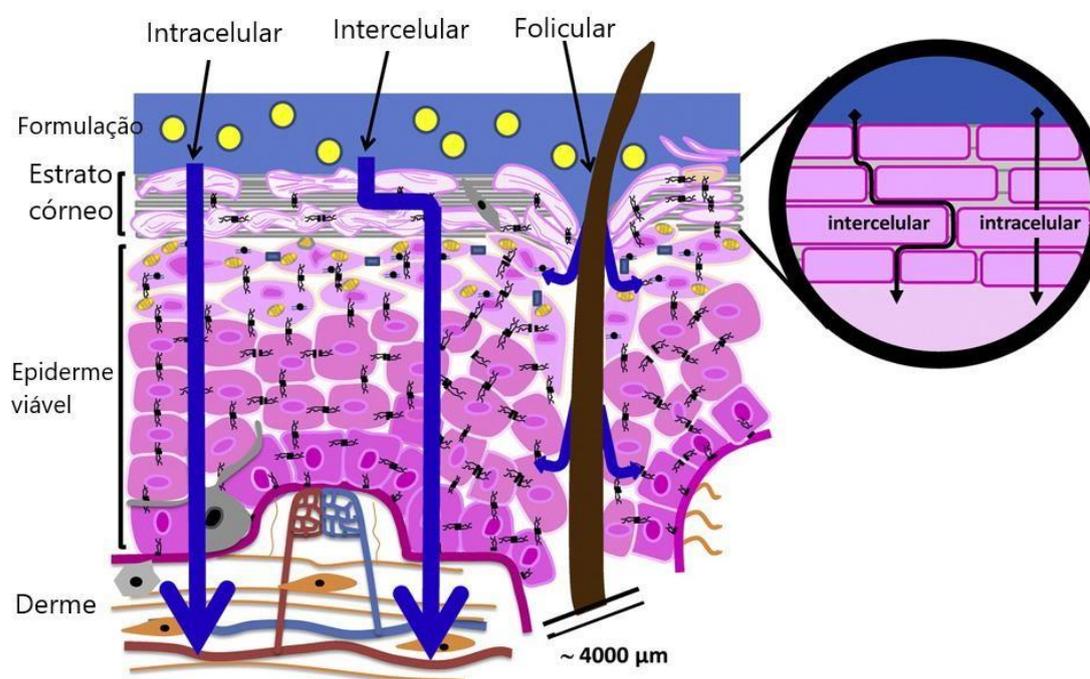


Figura 5: Rotas de penetração de fármacos pela via transdérmica.
Fonte: Adaptado de BOLZINGER et al., 2012.

A via apendicular inclui o transporte de moléculas através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Esta via apresenta uma área relativamente pequena, de apenas 0,1% da área total da pele, assim essa rota é considerada de menor importância. Entretanto é uma rota relevante para íons, compostos de elevado peso molecular e moléculas muito polares, já que essas substâncias têm dificuldade de atravessar o EC intacto (JAMPILEK; BRYCHTOVA, 2012).

A via transepidermal compreende a difusão de moléculas através do EC intacto, e é considerada como a rota predominante pela qual a maioria das substâncias penetra na pele. Pode ocorrer por meio da permeação da molécula através dos corneócitos (intracelular), ou através da matriz lipídica intercelular (intercelular) (VAN GELE et al., 2011). A rota principal de uma substância é definida principalmente pelo seu coeficiente de partição, moléculas hidrofílicas difundem preferencialmente através do compartimento intracelular, apesar do desafio representado pelo baixo teor de água do EC, já as moléculas lipofílicas atravessam o EC majoritariamente pela via intercelular. No entanto, a via intercelular parece ser a principal via de penetração, devido ao denso empacotamento de proteínas no interior dos corneócitos, o que os torna quase impermeáveis (PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

A penetração através da via intracelular pode ser facilitada através do aumento do teor de água nos corneócitos, uma vez que os mesmos contêm compostos hidrofílicos (principalmente aminoácidos) suficientes, capazes de se ligar a água. Podendo levar com isso ao inchaço do corneócitos, aumento do teor de água no espaço intercelular e ruptura da estrutura lamelar lipídica (JAMPILEK; BRYCHTOVA, 2012).

2.2.3 Estudos de permeação

A avaliação da *performance* de formulações transdérmicas pode ser realizada através do teste de liberação de drogas, que mede a capacidade do fármaco de se libertar do veículo em que está inserido, e do teste de permeação que determina a capacidade do princípio ativo, em conjunto com sua formulação, de se difundir efetivamente pelos estratos da epiderme (POLONINI, 2014c). Para os testes de permeação e dissolução de preparações tópicas, o método aprovado pela agência regulatória americana, *Food and Drug Administration* (FDA) utiliza célula de difusão de Franz (Figura 6) (SILVA et al., 2010). A célula de difusão vertical de Franz consiste em um compartimento doador e um compartimento receptor, entre os quais se posiciona uma membrana, sintética ou biológica. No compartimento receptor encontra-se o meio receptor, que sofre agitação constante durante todo o experimento, e deve ser escolhido para mimetizar as condições *in vivo*, e garantir a solubilidade suficiente da droga (FLATEN et al., 2015). No compartimento doador adiciona-se a formulação e em intervalos de tempo pré-determinados coleta-se uma alíquota do meio receptor, para avaliar quanto do fármaco conseguiu se difundir para o mesmo (POLONINI, 2014c). Usualmente, a quantidade de fármaco a ser analisada é muito pequena, fazendo com que sejam necessários métodos seletivos e de alta sensibilidade. Com isso, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido muito utilizada para a quantificação de fármacos nos estudos de liberação e permeação (SILVA et al., 2010).

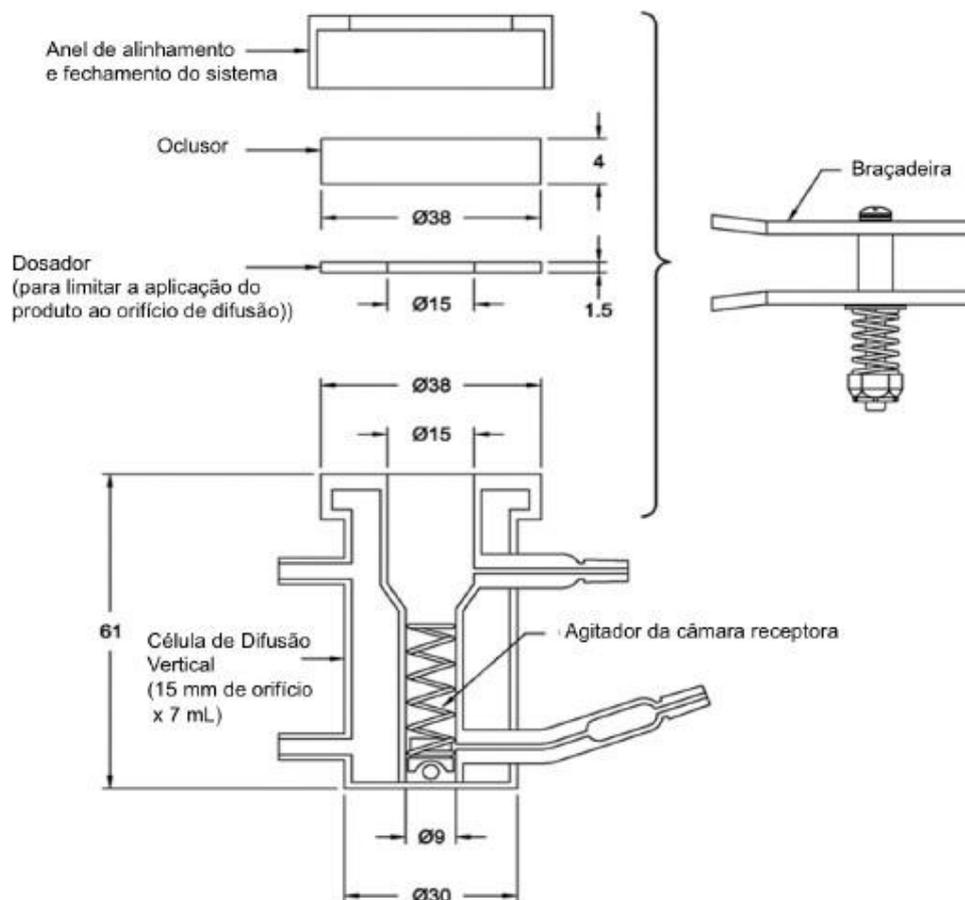


Figura 6: Desenho esquemático da célula de difusão de Franz.
 Fonte: Adaptado de *United States Pharmacopeia* (USP), 2014.

Nos estudos de permeação, a utilização de pele humana é considerada como a abordagem “padrão-ouro”, aproximando-se dos cenários fisiológicos em um contexto realista. A pele humana pode ser obtida a partir de cirurgia plástica, amputação e de cadáveres, sendo as amostras de pele retiradas principalmente do abdômen e tórax (PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016). Entretanto, muitas vezes a obtenção de pele humana não é viável, dessa forma, uma alternativa é a utilização de pele de porco, a qual é reconhecida como o modelo animal mais adequado devido às semelhanças anatômicas, histológicas e fisiológicas com a pele humana (FLATEN et al., 2015).

2.3 NANOTECNOLOGIA

Nas últimas décadas a nanotecnologia surgiu como uma nova área interdisciplinar da ciência, que iniciou as pesquisas no desenvolvimento de nanoestruturas (GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016). A nanotecnologia visa projetar, produzir, caracterizar e utilizar estruturas e dispositivos em nanoescala (10^{-9} m = 1 nm). É importante ressaltar, que nessa escala nanométrica, os materiais apresentam propriedades diferentes das apresentadas quando o mesmo está em tamanho micro ou macroscópico, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Nanopartículas possuem estrutura com tamanho de 1 nm até 1000 nm e podem ser constituídas de material biodegradável como polímeros naturais ou sintéticos, lipídeos, fosfolipídeos e metais. Apresentam alta relação entre superfície e volume, além disso, na nanopartícula o fármaco pode estar integrado na matriz, ou ligado na superfície da partícula (KUMAR; RANDHAWA, 2013). Nanomateriais que têm sido utilizados na medicina incluem: nanotubos de carbono, nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas metálicas, nanopartículas lipídicas e dendrímeros (Figura 7) (SU et al., 2017).

Recentemente é perceptível que somente o desenvolvimento de novas drogas não é suficiente para garantir o progresso na terapia medicamentosa. Muitas vezes bons resultados *in vitro*, não representam resultados favoráveis *in vivo*. Isso acontece pelas seguintes razões: i) concentração da droga insuficiente devido à má absorção, rápido metabolismo e eliminação; ii) distribuição para outros tecidos combinado com alta toxicidade; iii) baixa solubilidade do fármaco e variação dos níveis plasmáticos do mesmo, devido à biodisponibilidade oral variável (MEHNERT; MÄDER, 2012). Exemplos de fármacos que apresentam problemas na administração são os antitumorais: doxarrubicina, vincristina e paclitaxel, que possuem efeito adverso cardíaco, alta toxicidade e baixa solubilidade, respectivamente (DAWIDCZYK et al., 2014). Uma estratégia para contornar estes problemas é o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, assim o destino do fármaco no organismo passa a ser controlado pelas características do carreador, ao invés das características do fármaco. Carreadores com tamanho de alguns nanômetros são chamados de carreadores coloidais (MEHNERT; MÄDER, 2012).

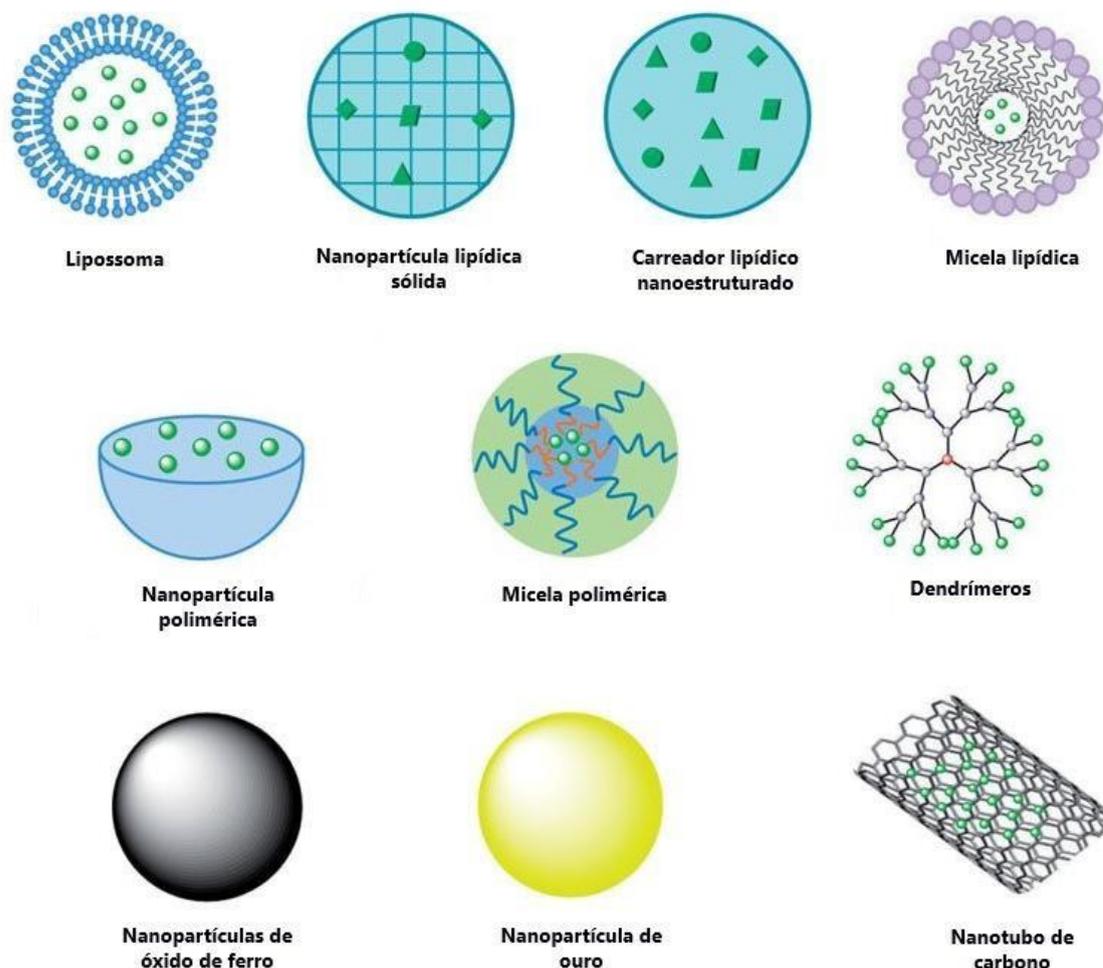


Figura 7: Exemplos de nanomateriais que têm sido utilizados na Medicina.
 Fonte: RIZWANULLAH et al., 2017.

Os nanocarreadores têm sido utilizados como estratégia para possibilitar o tratamento de várias doenças. Os mesmos são projetados para alcançar o máximo efeito terapêutico, com os menores efeitos colaterais possíveis. As nanoestruturas podem ser modificadas de maneira a torná-las responsivas a vários estímulos internos e externos, sendo essa propriedade útil para a liberação controlada das substâncias encapsuladas (TAPEINOS; BATTAGIINI; CIOFANI, 2017). As principais vantagens das nanopartículas são: i) aumento da biodisponibilidade ii) aumento da solubilidade iii) direcionamento da droga para um local específico no corpo (seu sítio de ação) iv) aumento do tempo de permanência no corpo (aumentando a meia vida para depuração e aumentando a especificidade para o receptor), resultando na diminuição da dosagem do medicamento, assim como sua toxicidade e proteção de tecidos e células que não são os alvos da droga (RIZWANULLAH et al., 2017; MUDSHINGE et al., 2011).

O primeiro nanomedicamento aprovado pelo FDA foi o Doxil[®] em 1995. Ele é um lipossoma que contém o antitumoral doxarrubicina, e foi desenvolvido para superar a toxicidade do fármaco, e seu efeito adverso cardíaco. Os lipossomas de Doxil[®] possuem um revestimento de polietilenoglicol, levando a uma diminuição da captação pelo sistema mononuclear fagocitário com consequente aumento do tempo de meia-vida na circulação plasmática, além disso, essas nanopartículas são passivamente vetorizadas até as células tumorais (BARENHOLZ, 2012; DAWIDCZYK et al., 2014). Outro exemplo de antitumoral que utiliza a nanotecnologia é o Abraxane[®], que foi desenvolvido para contornar a baixa solubilidade do fármaco paclitaxel, e consiste em nanopartículas de albumina. Normalmente, devido a sua baixa solubilidade, o paclitaxel é utilizado com o solvente Cremophor, no entanto, este solvente é tóxico, podendo levar a reações alérgicas. As nanopartículas de albumina ligada ao paclitaxel são uma alternativa para superar a baixa solubilidade do fármaco (BOBO et al., 2016; DAWIDCZYK et al., 2014). Adicionalmente, o Ambisome[®] é utilizado para o tratamento de infecções fúngicas, e é um lipossoma que encapsula a anfotericina B, possuindo como vantagem a diminuição da nefrotoxicidade. Finalmente, além dos nanomedicamentos citados, vários outros estão disponíveis comercialmente, tais como: Cimzia[®], Copaxone[®], Eligard[®], Macugen[®] e Mircera[®] (BOBO et al., 2016).

2.3.1 Nanopartículas lipídicas

Desde a criação das nanopartículas lipídicas [nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)] nos anos noventa, tem crescido o interesse dos pesquisadores nestes sistemas, já que eles apresentam métodos de produção acessíveis e vantagens em relação a outros carreadores coloidais, principalmente a baixa toxicidade (GARCÊS et al., 2018). Os lipídeos utilizados na preparação das nanopartículas lipídicas são geralmente lipídeos fisiológicos (biocompatíveis e biodegradáveis), que apresentam baixa toxicidade aguda e crônica (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

NLS são compostas de uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, dispersa em uma fase aquosa e estabilizada por surfactante, com diâmetro médio da partícula entre 50 a 1000 nm (Figura 8).

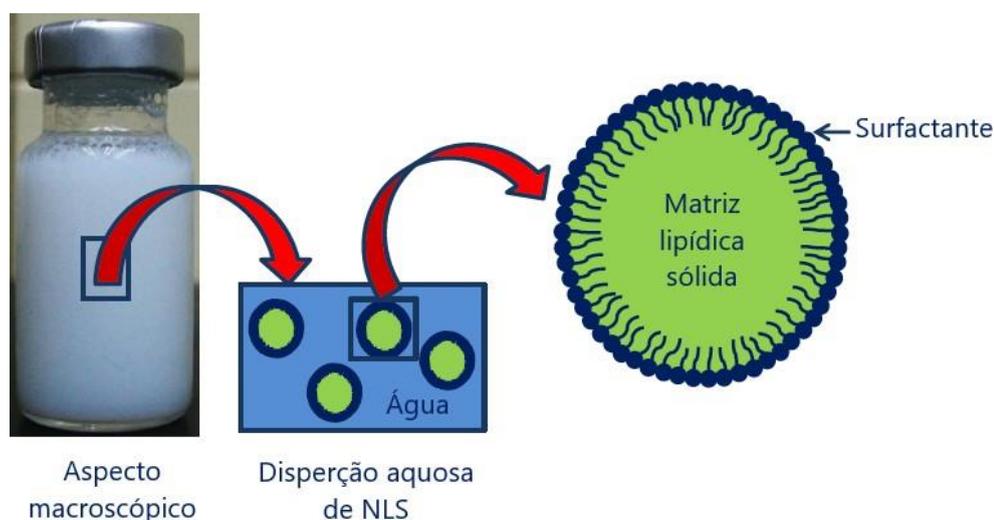


Figura 8: Aspecto macroscópico da dispersão aquosa de NLS, desenho esquemático da dispersão aquosa de NLS e desenho esquemático da NLS.
 Fonte: Adaptado de MARTINS, 2012a.

A utilização de lipídeos sólidos ao invés de óleos líquidos pode fornecer uma liberação controlada do fármaco, já que a mobilidade do mesmo na matriz sólida é substancialmente menor quando comparado com o óleo líquido (GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016). Adicionalmente, apresentam vantagens como: i) possibilidade de incorporação de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas (devido à baixa afinidade entre a molécula e o lipídeo, é esperado uma baixa encapsulação, porém sob condições otimizadas, é possível a incorporação) (PERES et al., 2016); ii) podem ser administradas por diferentes rotas (oral, parenteral, tópico, ocular, etc.); iii) não utilização de solventes orgânicos na sua produção; iv) facilidade para esterilização; v) estabilidade do sistema a longo prazo (KALAYCIOGLU; AYDOGAN, 2016, KUMAR; RANDHAWA, 2013).

A diferença entre as NLSs e os CLNs está na estrutura do núcleo lipídico interno. As NLSs foram desenvolvidas primeiramente e tem uma matriz composta por apenas um lipídeo sólido, enquanto nos CLNs, a matriz interna é formada por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos (SILVA et al., 2015). As NLSs apresentam baixa capacidade de encapsulamento de fármacos, assim, investigações na formulação levaram a incorporação de óleos líquidos na matriz lipídica sólida, fazendo com que o número de imperfeições na matriz lipídica aumentasse, facilitando a incorporação de uma quantidade maior de fármaco, enquanto mantém a estabilidade física da nanopartícula (BELOQUI et al., 2016, ANDONOVA; PENEVA, 2017).

NLSs podem ser preparadas utilizando uma variedade de lipídeos, incluindo: triglicérides, glicerídeos parciais, ácidos graxos (por exemplo: ácido esteárico), esteroides (por

exemplo: colesterol) e ceras (por exemplo: palmitato de cetila) (MEHNERT, MÄDER, 2012). Os CLNs, além desses lipídeos citados, também utilizam lipídeos líquidos, tais como: óleo de amêndoa, óleo de milho, óleo de soja e ácido oleico. Os principais surfactantes utilizados, que agem também como estabilizadores são: polaxamer 188, Tween[®] 80, Cremophor[®] EL e Cremophor[®] RH. A seleção adequada dos lipídeos e surfactantes, assim como suas quantidades, afeta as propriedades físico-químicas da nanopartícula, como por exemplo: tamanho, polidispersão, carga de superfície, estabilidade a curto e longo prazo e capacidade de encapsulação (TAPEINOS; BATTAGIINI; CIOFANI, 2017).

2.3.2 Nanopartículas lipídicas na administração transdérmica

As nanopartículas lipídicas estão entre as estratégias mais promissoras para melhorar a penetração de medicamentos através da pele. A facilidade das nanopartículas lipídicas em aderir ao EC permite que as moléculas encapsuladas atinjam as camadas mais profundas da pele (ÜNER et al., 2017). Os lipídeos fisiológicos apresentados pelas nanopartículas lipídicas podem interagir com o EC, levando ao seu rearranjo lipídico, o que facilita a penetração de moléculas. Além disso, o pequeno tamanho das nanopartículas contribui para aumentar a adesividade e superfície de contato, promovendo o influxo de moléculas através da pele. Finalmente, a aplicação cutânea das nanopartículas lipídicas promove a hidratação da pele, através da formação de um filme oclusivo na superfície do EC evitando a perda de água transepidermal, o que também contribui para a permeação transdérmica (GARCÊS et al., 2018; VITORINO et al., 2013).

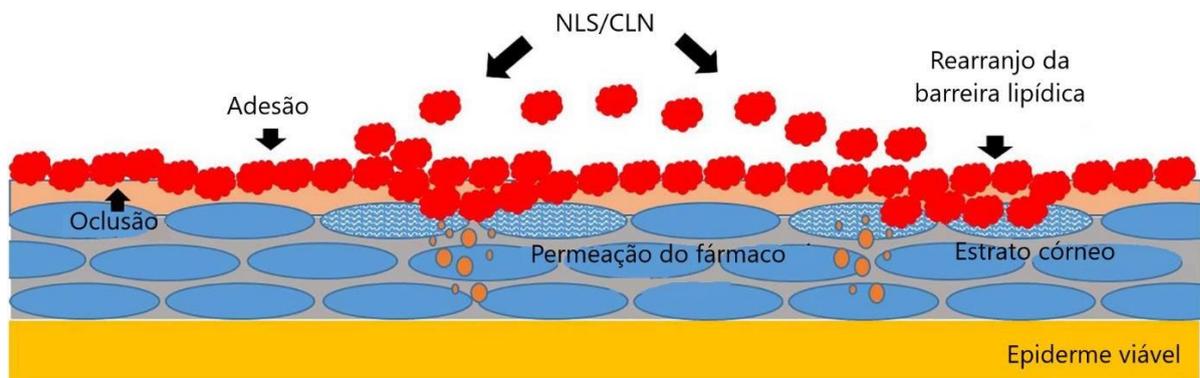


Figura 9: Efeitos das nanopartículas lipídicas na pele.

Fonte: Adaptado de GARCÊS et., al 2018.

2.3.3 Métodos para a produção das nanopartículas lipídicas

2.3.3.1 Homogeneização a alta pressão

A homogeneização a alta pressão é a técnica mais popular para a fabricação das NLS, devido à sua facilidade no manuseio, baixo custo relativo e capacidade de produção em larga escala. Além disso, produz nanopartículas com tamanho reduzido e baixo índice de polidispersão (TAPEINOS; BATTAGIINI; CIOFANI, 2017). Neste método, utilizam-se homogeneizadores de alta pressão, que empurram o líquido com alta pressão (100-2000 bar) através de um orifício com diâmetro micrométrico; com isso, o líquido acelera à alta velocidade (1000 km/h), resultando nas forças de cisalhamento e cavitação, que serão responsáveis pela quebra das partículas aceleradas para o tamanho submicrométrico. Este método pode ser realizado à temperatura elevada (homogeneização à quente), ou abaixo da temperatura ambiente (homogeneização a frio) (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

Na homogeneização a quente (Figura 10) o fármaco é dissolvido no lipídeo fundido (aproximadamente 5 °C acima do seu ponto de fusão). Nessa mistura, é adicionada uma solução aquosa com surfactante, na mesma temperatura. Uma pré-emulsão quente é formada por agitação a alta velocidade. Em seguida essa pré-emulsão é levada ao homogeneizador de alta pressão, dando origem a uma nanoemulsão, sendo resfriada até a temperatura ambiente, levando a recristalização do lipídeo e a formação das nanopartículas (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

A homogeneização a frio foi desenvolvida para solucionar alguns problemas da técnica à quente, como a degradação acelerada da droga mediada por temperatura. A primeira etapa é semelhante ao método a quente; na etapa seguinte o lipídeo fundido contendo o fármaco é resfriado rapidamente, utilizando gelo ou nitrogênio líquido; em seguida ocorre a moagem em um moinho de pó e a dispersão do pó em uma solução aquosa contendo surfactante. Finalmente a mistura é submetida à homogeneização a alta pressão, com a formação das nanopartículas (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2014).



Figura 10: Desenho esquemático da produção de NLS por homogeneização a alta pressão e homogeneização de alto cisalhamento seguido de ultrasonicação.

Fonte: Adaptado de: MARTINS, 2012a.

2.3.3.2 Homogeneização de alto cisalhamento seguido de ultrasonicação

A homogeneização de alto cisalhamento e a ultrasonicação são técnicas de dispersão, que podem ser utilizadas juntas. Nessas técnicas, assim como na homogeneização de alta pressão a quente, o fármaco é dissolvido no lipídeo fundido (aproximadamente 5 °C acima do seu ponto de fusão), e estes são combinados com uma solução aquosa com surfactante, na mesma temperatura. Uma pré-emulsão quente é formada por agitação a alta velocidade. Em seguida essa pré-emulsão é levada a uma sonda ultrassônica, dando origem a uma nanoemulsão, sendo esta resfriada até a temperatura ambiente, o que leva à recristalização do lipídeo e à formação das nanopartículas (Figura 10) (MARTINS, 2012a). Desvantagens dessa técnica incluem o risco de contaminação por metais e a presença de micropartículas (MEHNERT; MÄDER, 2012).

2.3.3.3 Emulsificação e evaporação do solvente

Nesta técnica o lipídeo é dissolvido em um solvente imiscível em água, seguido de adição de uma solução contendo o surfactante. Essa mistura é homogeneizada a alta velocidade ou é ultrassonicada por alguns minutos, para formação de uma emulsão. Em seguida, a mesma é deixada sob agitação suave para a evaporação do solvente orgânico o que leva ao endurecimento/estabilização das partículas (TAPEINOS; BATTAGIINI; CIOFANI, 2017). Uma desvantagem relevante apresentada por este método é a utilização de solventes como: clorofórmio, diclorometano e tolueno, que são prejudiciais para os seres humanos e o ambiente, principalmente o clorofórmio e o diclorometano, que são potencialmente cancerígenos (GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016).

2.3.4 Caracterização das nanopartículas lipídicas

A caracterização adequada da dispersão das nanopartículas lipídicas formadas, é um pré-requisito para o controle de qualidade do produto final, e representa um desafio devido ao pequeno tamanho das nanopartículas e complexidade do sistema. Vários parâmetros devem ser considerados, e serão descritos abaixo (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, et al., 2000).

2.3.4.1 Tamanho de partícula

A determinação do diâmetro e da distribuição do tamanho das partículas é importante para indicar a qualidade da dispersão de nanopartículas formadas bem como sua estabilidade (MARCATO et al., 2009). Os métodos mais utilizados para a determinação desse parâmetro são a espectroscopia de correlação de fótons e a difração a laser (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). Vários fatores influenciam no tamanho das nanopartículas, incluindo: concentração do surfactante, tipo de lipídeo, propriedades do ativo a ser encapsulado e condições de produção (tempo, temperatura e pressão) (MARCATO et al., 2009).

A espectroscopia de correlação de fótons também denominada de espalhamento dinâmico de luz (do inglês, *dynamic light scattering*, DLS), baseia-se na medida da flutuação da intensidade da luz, causada pelo movimento das partículas em suspensão (movimento browniano). Quando o *laser* incide sobre as partículas a intensidade da luz espalhada flutua em uma taxa que depende do tamanho das partículas, já que partículas menores se movem mais rapidamente. Assim, a análise dessas flutuações de intensidade fornece a velocidade do

movimento browniano e consequentemente o tamanho da partícula usando a equação de Stokes-Einstein. O diâmetro mensurado nesta técnica é chamado de hidrodinâmico e refere-se a como uma partícula se difunde em um fluido (KUMAR, RANDHAWA, 2013; ANDONOVA, PENEVA, 2017).

A espectroscopia de correlação de fótons também estima o índice de polidispersão (do inglês, *polydispersity index*, PDI). Esse índice descreve a amplitude da distribuição do tamanho da partícula, e pode variar de 0 até 1, sendo que o valor 0 representa uma amostra monodispersa completamente homogênea, enquanto um PDI de 1 indica uma distribuição de tamanho de partícula muito ampla. Geralmente uma amostra com um PDI <0,25 é considerada monodispersa (MARTINS, 2012b).

2.3.4.2 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) é uma propriedade física exibida por uma partícula em suspensão, e está relacionado com a sua carga de superfície (VITORINO et al., 2013). É uma característica essencial da nanopartícula, que pode ser mensurada utilizando a técnica de espalhamento de luz eletroforético. Resumidamente, a amostra é colocada em uma câmara, que contém dois eletrodos, e aplica-se um campo elétrico fazendo com que as nanopartículas carregadas migrem para o eletrodo correspondente, com uma velocidade proporcional ao seu potencial zeta. A velocidade é medida usando o espalhamento da luz difusa (SMITH et al., 2017).

Os dados obtidos a partir do PZ podem ser utilizados para prever a estabilidade das nanopartículas. A instabilidade pode ser resultado da interação entre nanopartículas mal carregadas, levando a formação de agregados. Esta agregação ocorre devido à falta de repulsão eletrostática entre as partículas (MANAIA et al., 2017; KALAYCIOGLU; AYDOGAN, 2016). As nanopartículas lipídicas que possuem valores absolutos de PZ entre 20 e 40 mV são consideradas estáveis e menos suscetíveis a formar agregados ou aumentar o tamanho de partícula (KATHE; HENRIKSEN; CHAUHAN, 2014).

2.3.4.3 Avaliação morfológica

Para a avaliação da morfologia da superfície das nanopartículas, as técnicas que têm sido mais utilizadas são a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A MEV fornece uma imagem tridimensional da partícula com foco em sua superfície, o método consiste na emissão de um feixe de elétrons que varre a

superfície da amostra revestida com uma camada de metal durante o processo de preparação. À medida que o feixe de elétrons atinge a amostra, elétrons e fótons são emitidos pelos elementos na superfície da amostra, e sua intensidade é utilizada para formar a imagem. A MET proporciona imagem bidimensional, formada por elétrons que passaram pela amostra, permitindo determinar o tamanho e forma da partícula. As técnicas também são diferentes em relação à resolução que fornecem, para MEV está em um intervalo entre 1-10 nm e para MET entre 0,1 – 0,5 nm (ANDONOVA; PENEVA, 2017).

2.3.4.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) visa determinar quanto do ativo utilizado para o preparo do sistema realmente está incorporado na nanopartícula. A técnica usualmente utilizada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana é utilizada para a separação das nanopartículas da fase aquosa. A concentração livre do ativo é determinada no ultrafiltrado, por técnicas como CLAE, e a quantidade de ativo associada a nanopartícula é calculada pela diferença entre a concentração total e livre do ativo.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma formulação transdérmica inovadora contendo vitamina D₃ nanoestruturada.

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método analítico por CLAE para o doseamento da vitamina D₃;
- Preparar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) controle (C-CLN) e contendo a vitamina D₃ (D-CLN);
- Caracterizar os CLNs obtidos quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, estabilidade e eficiência de encapsulação;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos CLNs em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929);
- Incorporar tanto a matéria-prima (MP) de vitamina D₃ como os CLNs em veículo transdérmico e avaliar a estabilidade das formulações obtidas;
- Avaliar a liberação da vitamina D₃ de suas formulações por meio de técnica *in vitro*.
- Avaliar a permeação transdérmica da vitamina D₃ de suas formulações por meio de técnica *ex vivo*, utilizando modelo experimental com pele humana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

O metanol (MeOH) utilizado na preparação da fase móvel foi grau CLAE, (Sigma-Aldrich, EUA). Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄), cloreto de magnésio (MgCl₂), sulfato de sódio (Na₂SO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), soro porcino, etanol (EtOH), albumina sérica bovina (ASB) e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD) foram todos obtidos do mesmo fornecedor (Sigma-Aldrich, EUA). A vitamina D₃ foi gentilmente doada por Fagron (Brasil). O padrão de referência de vitamina D₃ foi proveniente da USP (EUA). Todas as fases móveis foram filtradas à vácuo empregando filtros de celulose com poro de 0,45 μm (Sartorius, Alemanha) e degaseificadas utilizando ultrassom (Cristófoli, Brasil) por 30 minutos antes do uso. Para os estudos de cultura celular, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da Synth (Brasil). O soro fetal bovino (SFB), a penicilina, a estreptomicina e o meio DMEM foram adquiridos da Invitrogen (EUA). O brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), bicarbonato de sódio e o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). Células de fibroblastos murinos (L929) foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Substâncias Antitumorais, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Água ultrapura obtida em um sistema AquaMax-Ultra 370 Series (Young Lin, Coreia) (18,2 MΩ cm de resistividade a 25 °C e < 10 ppb de carbono orgânico total) foi utilizada em todos os experimentos.

4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D₃ POR CLAE

4.2.1 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatográfico qualificado e calibrado Agilent Infinity 1260 (EUA) composto por bomba binária (DEACB03781), degaseificador (JPAAB06432), detector UV/Vis (DEACN13590), injetor automático (DEAAC12590) e software de controle (OpenLAB). A separação cromatográfica foi obtida utilizando coluna de octadecilsilano (C18) (100 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro

interno, com tamanho médio de partículas de 5 µm - Phenomenex, EUA). A coluna foi conectada com uma pré-coluna C18 (4,0 mm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno, com tamanho médio de partículas de 5 µm - Phenomenex, EUA). A fase móvel foi constituída por uma mistura de MeOH e água 970: 30, v/v. A eluição foi realizada empregando sistema isocrático com fluxo de fase móvel a 0,8 mL min⁻¹ e detecção por ultravioleta em comprimento de onda fixo de 264 nm. A fase móvel foi filtrada a vácuo em filtro de celulose de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha) e desgaseificada com o auxílio de ultrassom (Cristófoli, Brasil), por 30 minutos antes do uso.

A solução-padrão utilizada para quantificação, dita solução na concentração de trabalho, a 100%, foi obtida a partir da pesagem exata de padrão em balança digital (AY220, Shimadzu, Japão), o qual foi dissolvido e diluído em MeOH 90% (v/v), a fim de se obter solução na concentração de 5 µg mL⁻¹. A solução-amostra foi obtida a partir da emulsão transdérmica, diluindo-a da mesma maneira e na mesma concentração do padrão.

4.2.2 Validação analítica

O método desenvolvido foi validado, conforme a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, que regulamenta a validação de métodos analíticos no Brasil. Os testes também seguiram as diretrizes do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2018).

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade visa demonstrar que a resposta analítica obtida se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz (veículo transdérmico), de impurezas ou de produtos de degradação. Assim, comparou-se as áreas dos picos cromatográficos (n = 6) da vitamina D₃ padrão e da mesma incorporada a emulsão transdérmica, na concentração de trabalho. Através destas determinações, foi calculado o grau de discrepância entre as áreas utilizando a Equação 1:

$$\% \text{ discrepância} = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_P}{\bar{X}_P} \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual \bar{X}_A é a média das áreas da vitamina D₃ na amostra e \bar{X}_P é a média das áreas da vitamina D₃ no padrão. O critério de aceitação foi definido como uma porcentagem de discrepância inferior a 2%. Adicionalmente, realizou-se a comparação qualitativa dos cromatogramas do padrão de vitamina D₃, da formulação e da matriz, com o objetivo de demonstrar que os picos cromatográficos são provenientes somente da vitamina D₃.

Para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação, o padrão foi exposto as seguintes condições: pH ácido, pH básico, calor (70 °C), luz e oxidação. Para isso, na condição de pH ácido e pH básico, o padrão foi preparado na concentração de trabalho, porém utilizando solução de cloreto de sódio 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M respectivamente. Na condição de oxidação, adicionou-se 10 mL de H₂O₂ ao padrão e o mesmo foi preparado na concentração de trabalho, utilizando a solução diluente. Nas condições de calor e luz, quantidades de padrão foram levadas a estufa e luz UV durante 24h, em seguida preparou-se as soluções conforme o método. Os cromatogramas foram analisados qualitativamente, para avaliar a presença de picos adicionais, além disso, foi calculado o grau de discrepância em relação ao padrão.

4.2.2.2 Linearidade

Em um método analítico, a linearidade deve ser demonstrada através da capacidade do mesmo em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para a determinação da linearidade utilizaram-se cinco concentrações diferentes de vitamina D₃ em uma faixa de 70% a 130% da concentração de trabalho (3,5; 4,25; 5; 5,75 e 6,5 µg mL⁻¹); cada concentração foi preparada em triplicata (n=3). Com o objetivo de avaliar se a resposta analítica é, de fato, proporcional à concentração do analito, inicialmente plotou-se os dados de concentração e de resposta analítica (área do pico) em um plano cartesiano. Em seguida foi realizada análise visual, para verificar se os pontos, quando dispostos no gráfico, apresentavam relação linear aparente. Em caso positivo, estimou-se a equação da reta de regressão através do método dos mínimos quadrados (MMQ). Este método pode ter um fator de ponderação (método dos mínimos quadrados ponderados MMQP) ou pode ser aplicado diretamente, sem fator de ponderação (método dos mínimos quadrados ordinários MMQO). Para a decisão entre os métodos, observou-se a análise da variância dos resultados de y para cada valor de x. Se a variância de y fosse constante (situação denominada homocedasticidade) utilizaria-se o método MMQO, se a variância apresentasse alterações (situação denominada

heterocedasticidade) utilizaria-se MMQP. Em seguida o coeficiente angular foi avaliado através de análise de variância (ANOVA), seguido pela determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo que o valor mínimo aceito para r é de 0,990. Finalmente, o resíduo (diferença entre o valor encontrado de y e o valor estimado pelo modelo em um determinado ponto) foi avaliado em relação à normalidade.

4.2.2.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir das três curvas analíticas obtidas na linearidade da amostra, e também a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de 10 amostras do branco (matriz), utilizando-se as Equações 2 e 3:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que: IC é a média das inclinações das curvas de calibração e σ é o desvio padrão obtido a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de 10 amostras do branco.

4.2.2.4 Exatidão

O teste de exatidão foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de vitamina D₃ à matriz (veículo transdérmico). Para isso, foram realizadas 9 determinações, nas concentrações de 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho, com três réplicas em cada nível. A exatidão foi expressa pela relação percentual entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela Equação 4:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

A concentração teórica foi calculada a partir da equação analítica obtida no ensaio de linearidade. Taxas de recuperação entre 98 e 102% foram consideradas satisfatórias. Adicionalmente, calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração.

4.2.2.5 Precisão

O teste de precisão visa avaliar a proximidade entre os resultados encontrados para as amostras preparadas conforme descrito no método analítico. É realizado pela determinação da repetibilidade e precisão intermediária. Para a determinação da repetibilidade, avaliaram-se as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, de seis réplicas ($n=6$) na concentração de trabalho. A precisão intermediária foi demonstrada pela análise de seis réplicas, em dois dias e por dois analistas diferentes ($n=24$). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas, sendo valores menores ou iguais a 5% considerados satisfatórios.

4.3 PREPARO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Os CLN foram preparados pelo método de homogeneização por alto cisalhamento, seguido de ultrassonicação (ABDELBARY; FAHMY, 2009; MARTINS et al., 2012b), com algumas modificações. A fase orgânica, composta por manteiga e óleo vegetal (CLN controle C-CLN) ou manteiga, óleo e vitamina D₃ (D-CLN) foi aquecida a 45 °C. Em seguida, a fase aquosa constituída de Pluronic[®]F-127, previamente aquecida na mesma temperatura, foi vertida na fase oleosa. Após esta etapa, a dispersão foi submetida à alta agitação (12.000 rpm) por 10 min em Ultra Turrax (SilentCrusher M, Heidolph, Alemanha), seguida de ultrassonicação por 10 minutos com uma intensidade de 3%, auxiliado por uma ponta de ultrassom (Vibra Cell, Sonics, EUA) (6 mm de diâmetro), formando a C-CLN e D-CLN (Tabela 3). Os CLN preparados foram deixados à temperatura de geladeira durante 24 horas para a solidificação do núcleo lipídico.

Tabela 3: Composição dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

	C-CLN	% (m/v)	D-CLN	% (m/v)
Composição	Manteiga vegetal	0,68	Manteiga vegetal	0,68
	Pluronic [®] F-127	0,70	Pluronic [®] F-127	0,70
	Óleo vegetal	2,27	Óleo vegetal	2,27
			Vitamina D ₃	0,68

C-CLN: CLN controle, sem ativo; D-CLN: CLN contendo vitamina D₃.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

4.4.1 Caracterização físico-química

Os CLN desenvolvidos foram caracterizados pelo tamanho de partícula (TP) e índice de polidispersão (PDI), utilizando o equipamento Zetatrac (Microtrac, EUA). O TP e o PDI foram determinados por meio da técnica de DLS, como uma medida do comprimento da distribuição do tamanho das partículas. Adicionalmente, os CLN foram caracterizados em relação ao potencial zeta (PZ), utilizando o equipamento Zetasizer (Malvern instruments, Reino Unido), os valores de PZ foram determinados através da avaliação da mobilidade eletroforética, que foi transformada em PZ pela equação de Smoluchowski. Antes da caracterização, as amostras foram diluídas (1:300, v/ v) em água ultrapura para propiciar uma intensidade adequada de espalhamento de luz. Os valores foram obtidos através do cálculo da média de 3 leituras, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). C-CLN e D-CLN foram comparados em relação às características: TP, PDI e PZ utilizando teste *t* de *Student*, para isso utilizou-se *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4.2 Estudo de estabilidade de curto prazo dos CLNs

Após o preparo, os CLN-C e CLN-D foram armazenados durante 30 dias, em frascos de vidro, protegidos da luz, sob temperatura ambiente (25 °C), geladeira (4 °C), congelador (-6 °C) e 32 °C, sendo avaliados físico-quimicamente quanto aos aspectos de TP e PDI nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias de armazenamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para comparações de grupos, usando o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada através do método de ultrafiltração/centrifugação, no qual a vitamina D₃ livre (não encapsulada) presente na fase aquosa da dispersão é separada do sistema, utilizando uma membrana, e quantificada. Utilizou-se método previamente descrito por Araújo e colaboradores (2012), com algumas modificações.

Resumidamente, as amostras de D-CLN (n=3) foram diluídas (1:100, v/v) em etanol 20% (v/v) (para solubilização de possíveis cristais de vitamina D₃ na dispersão), e alíquotas de 2 mL desta suspensão foram transferidas para unidades de filtração Amicon[®] (MMWL 10.000, Millipore, Alemanha) e centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos (Eppendorf[®] 5810 R, Alemanha). Segundo informações do fabricante, a unidade de filtração é classificada de acordo com o peso molecular limite, do inglês: *Nominal molecular weight limit* (MMWL), assim, a unidade de filtração classificada com NMWL de 10000, excluirá moléculas com peso de 10.000 Daltons. A vitamina D₃ (livre) possui peso molecular de 384,64 g mol⁻¹, dessa forma, ela não será retida pela membrana. No entanto, as nanopartículas serão retidas pela membrana, pois o tamanho do poro é de aproximadamente 1 nm (PALL CORPORATION).

Após a separação, 500 µL do filtrado (fármaco não encapsulado) foram retirados e diluídos em 500 µL de solução diluente, para determinação da EE. As amostras foram analisadas por CLAE, conforme método descrito previamente. A EE da vitamina D₃ no CLN foi calculada como sendo a diferença percentual entre a concentração de ativo presente na suspensão (concentração total) e a encontrada no filtrado (concentração livre), através da Equação 5.

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentração total} - \text{Concentração livre}}{\text{Concentração total}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

4.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A dispersão de D-CLN foi diluída em água ultrapura (1:5, v/v), em seguida uma gota da suspensão foi aplicada sobre *grid* coberta com filme de carbono (formvar) (RIBEIRO et al., 2018). A amostra foi mantida à temperatura ambiente durante 72 horas para a secagem. As nanopartículas foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (EM 109, Zeiss, Alemanha) operando a 80 kV.

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular foi realizada de acordo com o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) (MOSMANN, 1983) frente à linhagem de células imortalizadas de fibroblastos murinos (L929). Essa linhagem celular foi cultivada como uma monocamada aderente em garrafas plásticas de cultura, contendo meio

DMEM suplementado com 10% de SFB inativado, 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 10 mM de HEPES, em pH 7,4, mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37 °C e com 5% de CO₂.

No ensaio de viabilidade celular, os fibroblastos foram cultivados em placas de 96 poços com densidade celular de 5x10³ células mL⁻¹, com volume de 100 µL por poço. Após 24h de incubação, tempo necessário para aderência celular, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos. Poços em quintuplicatas receberam os tratamentos: solução etanólica de vitamina D₃, C-CLN e D-CLN, solubilizados em meio de cultura, em concentrações que variam entre 600 a 4,69 µg mL⁻¹ de vitamina D₃. O controle do experimento foi realizado nas mesmas condições, porém aplicou-se apenas meio de cultura. Adicionalmente, foi preparado o controle do solvente através da adição de 1% de etanol absoluto em meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ durante 48 horas. Após esse período, os tratamentos foram removidos, e os poços foram lavados com 100 µL de Tampão fosfato salino (TFS). Em seguida, aplicou-se a solução de MTT a 10% (10 µL de MTT (5 mg mL⁻¹) e 90 µL de DMEM). As placas foram novamente incubadas por 3h e posteriormente, os cristais de formazana formados, foram solubilizados com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA). O grupo controle foi considerado como 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular foi determinada pela Equação 6:

$$\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que A_{amostra} e A_{controle} é o valor da absorvância obtida para a amostra e para o controle, respectivamente. Adicionalmente, calculou-se a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), ou seja, concentração que reduz a viabilidade celular em 50% através da elaboração do gráfico de mortalidade celular em função das concentrações, usando o *Microsoft Office Excel*. Os resultados foram analisados empregando ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações de grupos, usando o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.6 EMULSÕES TRANSDÉRMICAS

As emulsões transdérmicas contendo vitamina D₃ (MP) e nanopartículas de vitamina D₃ foram manipuladas utilizando-se veículo transdérmico, previamente descrito por Pereira e colaboradores (2017). Na emulsão transdérmica contendo vitamina D₃ (MP), denominada E_{MP}, a vitamina D₃ foi exatamente pesada, transferida para um cadinho de ágata, levigada gota a gota com óleo de amêndoas 5% e então homogeneizada geometricamente com o veículo transdérmico, com concentração final de 25.000 UI g⁻¹ de vitamina D₃. Na emulsão contendo nanopartículas de vitamina D₃, denominada E_{Nano}, a dispersão de nanopartículas foi transferida para cadinho de ágata, utilizando micropipeta, e então homogeneizada geometricamente com o veículo transdérmico, com concentração final de 25.000 UI g⁻¹ de vitamina D₃.

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE CURTO PRAZO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Estudo realizado para verificar se as formulações mantêm seu teor durante a estocagem em diferentes temperaturas. Para isso, amostras de: vitamina D₃, E_{MP}, E_{Nano} e D-CLN foram armazenadas nas temperaturas: ambiente (25 °C), geladeira (4 °C), congelador (-6 °C) e 32 °C, sendo analisadas em relação ao teor, nos tempos: 0, 7, 15 e 30 dias.

4.8 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO

Previamente à realização dos estudos de liberação e permeação, foi necessária a seleção do meio receptor adequado, a fim de obter as condições *sink* [condição de não saturação do sistema dinâmico, definida como, o volume de solvente no mínimo três vezes o necessário para obter uma solução saturada do fármaco (USP, 2014)]. Diferentes meios receptores biorrelevantes foram testados para se determinar qual é capaz de solubilizar a maior quantidade de vitamina D₃. O método de preparação dos meios foi adaptado de Baert e colaboradores (2010), e a composição dos meios: tampão fosfato salino pH 7,4 (TFS), suor humano artificial (SHA) e fluido corporal simulado (FCS) estão disponíveis na Tabela 4. Além desses meios, também foram testados os mesmos acrescidos de EtOH 20% (v/v) e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD) 0,5%. Ao meio TFS também foi adicionada albumina sérica bovina (ASB) 5% (m/v) e EtOH 50% (v/v), separadamente. A solução diluente foi utilizada como meio

receptor padrão. Finalmente, foi testado como meio receptor (soro porcino), totalizando 13 meios receptores diferentes.

Para a seleção do meio receptor, alíquotas de 10 mg da vitamina D₃ foram exatamente pesadas e transferidas para 13 tubos de ensaio de 10 mL, os quais foram preenchidos com os diferentes meios. Os tubos foram agitados mecanicamente por 10 min, levados a ultrassom por 30 min e deixados em estufa (32 °C) por 12 h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 20.000 × g e então o sobrenadante foi transferido para *vials* de CLAE para quantificação utilizando o método previamente validado.

O meio receptor mais adequado foi definido como o que apresentou maior solubilização da vitamina D₃.

Tabela 4: Composição dos meios receptores biorrelevantes testados.

Componente	Tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,4(mM)	Suor humano artificial (mM)	Fluido corporal simulado (mM)
NaCl	138,00	49,96	136,80
KCl	2,70	-	3,00
CaCl ₂	-	0,15	2,50
MgSO ₄	-	1,0	-
MgCl ₂	-	-	1,50
Na ₂ SO ₄	-	-	0,50
NaHCO ₃	-	-	4,20
KH ₂ PO ₄	1,43	7,50	1,00
Na ₂ HPO ₄	8,57	-	-

NaCl: cloreto de sódio. KCl: cloreto de potássio. CaCl₂: cloreto de cálcio. MgSO₄: sulfato de magnésio. MgCl₂: cloreto de magnésio. Na₂SO₄: sulfato de sódio. NaHCO₃: bicarbonato de sódio. KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico. Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico.

4.9 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para a avaliação da liberação da vitamina D₃ a partir do D-CLN e das emulsões, foram utilizadas células de difusão vertical volumétricas (células de Franz) de 7 mL e área de difusão total de 1,86 cm², com coleta automática, prateleira agitadora com capacidade para agitação calibrada de 6 células simultaneamente e banho de aquecimento com a mesma capacidade, para aquecer as células através de seu sistema de camisa-de-água (Microette Plus, Hanson Research, EUA).

Ao compartimento doador foram adicionadas alíquotas de 60 mg das formulações E_{MP} e E_{Nano} e 20 µL de D-CLN (n=6 para cada formulação) utilizando uma pipeta de deslocamento positivo Pos-D MR-110 (Rainin, EUA). As quantidades aplicadas de vitamina D₃ para as formulações foram diferentes, isso porque como a concentração das formulações é diferente, aplicar a mesma quantidade de ativo levaria a aplicação de massas muito grandes ou muito pequenas da formulação. O compartimento receptor foi preenchido com o meio receptor TFS + EtOH 50% (v/v), conforme selecionado. Entre os compartimentos posicionou-se discos circulares de polisulfona de 25 mm de diâmetro (Tuffryn, Pall Corporation, EUA), certificando-se de que não houvesse ar entre o meio e as membranas. O meio receptor permaneceu em agitação constante a 600 rpm por meio de uma barra magnética, exceto nos períodos de coleta, e foi mantido a 32 ± 2 °C durante todo o experimento. As células foram então fechadas para manutenção de oclusão por todo o experimento, com auxílio de uma braçadeira. Alíquotas do meio receptor (1 mL) foram coletadas em intervalos regulares de tempo (1, 2, 4, 8, 12, 18 horas após a aplicação dos produtos) diretamente em *vials* para CLAE, após cada coleta as células de difusão foram imediatamente repostas com o mesmo volume de meio, na mesma temperatura. A tubulação do sistema era rinsada com 1,5 mL de meio 30 segundos antes de cada coleta para evitar interferência de coletas anteriores, período no qual a agitação era interrompida. As concentrações de vitamina D₃ foram devidamente corrigidas em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela rinsagem e pela reposição do meio. A concentração de vitamina D₃ em cada tempo de coleta foi determinada utilizando CLAE, sendo a quantidade permeada do fármaco no tempo *t* (Q_{real,t}) calculada usando a Equação 7.

$$Q_{real,t} = C_{mensurado,t} \cdot V_r \cdot V_a \cdot \sum_{i=0}^{n-1} C_a \quad (\text{Equação 7})$$

na qual $C_{\text{mensurado},t}$ é a concentração calculada no tempo t , V_r é o volume da célula de difusão, V_a é o volume da alíquota coletada e C_a é a concentração da alíquota.

Com o objetivo de determinar os perfis de liberação, quantidades cumulativas da vitamina D₃ (µg) liberadas por unidade de área de superfície (cm²) foram plotadas em função do tempo (hora). Para determinar a cinética de liberação, foram aplicados modelos matemáticos. Para avaliar se a liberação seguia cinética de ordem zero, foram plotadas quantidades cumulativas de vitamina D₃ liberadas por área (µg cm⁻²) versus tempo (hora); para cinética de pseudoprimeira ordem (modelo de Higuchi), quantidades cumulativas de vitamina D₃ liberadas por área (µg cm⁻²) versus a raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}); e o log das quantidades cumulativas de vitamina D₃ liberadas por área (log µg cm⁻²) versus tempo (hora) para cinética de primeira ordem. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente linear da curva plotada para a quantidade cumulativa de vitamina D₃ versus tempo. O tempo de latência (T_L) representa o tempo necessário para que se atingisse o fluxo em estado estacionário.

4.10 ESTUDOS DE PERMEACÃO *EX VIVO*

4.10.1 Pele humana para permeação *ex vivo*

Nos testes de permeação *ex vivo*, utilizou-se pele humana excisada da região abdominal de uma paciente com idade de 45 anos, submetida à abdominoplastia, sem doença cutânea prévia. O procedimento cirúrgico foi realizado por cirurgião plástico no Hospital Monte Sinai (Juiz de Fora, MG).

Com o consentimento do doador, a pele foi coletada imediatamente após a cirurgia e checada visualmente para a garantia de que estava íntegra a olho nu e inalterada pelas condições de remoção cirúrgica. Durante o transporte, com tempo inferior a 30 minutos, a pele foi mantida em recipiente isotérmico a 4 °C. Ao chegar ao laboratório, a pele foi identificada por meio de um código numérico, para manter o sigilo (quanto a identidade) do indivíduo. Em seguida, a gordura subcutânea e o tecido conectivo foram removidos utilizando bisturi. Posteriormente, a pele foi lavada com água corrente e seca com papel toalha. A pele foi utilizada no estudo de permeação imediatamente após sua limpeza, sem que ocorresse armazenamento em freezer/geladeira.

Para os experimentos, as peles foram utilizadas íntegras em sua espessura (*full thickness*), e foram cortadas em discos circulares de 25 mm de diâmetro, sendo posicionados sobre as células de Franz de maneira aleatória.

Este protocolo seguiu o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo n° 2.698.850) (Anexo A).

Após a utilização da pele nos estudos de permeação, os resíduos teciduais foram acondicionados em saco plástico branco e leitoso, com símbolo de material infectante, e descartados como material biológico, conforme as regras para descarte desse tipo de material pela UFJF.

4.10.2 Características do ensaio

Os estudos de permeação foram realizados no mesmo equipamento descrito no ensaio de liberação (item 4.10). O compartimento receptor foi preenchido completamente com TFS+ EtOH 50% (v/v). Os discos de pele foram posicionados entre os compartimentos doador e receptor com o EC superiormente, e assegurando que não houvesse ar entre o meio e as membranas. As peles ficaram 30 minutos em contato com o meio receptor para equilíbrio da temperatura, e após este período uma dose finita das formulações (60 mg para E_{MP} e E_{Nano} e 20 µL de D-CLN) foi aplicada na superfície da pele utilizando uma pipeta de deslocamento positivo Pos-D MR-110 (Rainin, EUA). Durante o experimento, as células foram mantidas fechadas, e braçadeiras foram utilizadas para manter os sistemas fixos. O meio receptor permaneceu a 32 ± 2 °C durante todo o experimento e agitação constante a 600 rpm por meio de uma barra magnética, exceto nos períodos de coleta.

O experimento teve duração total de 24 horas. Após a aplicação do produto, foram realizadas seis coletas do meio receptor (1 mL por coleta), em intervalos regulares de tempo (1, 2, 4, 8, 16, 24 horas). As alíquotas foram coletadas diretamente em frascos para CLAE. Posteriormente a cada coleta, as células de difusão foram imediatamente repostas com o mesmo volume de meio, na mesma temperatura. A tubulação das células era rinsada com 1,5 mL de meio 30 segundos antes de cada coleta para evitar interferência de coletas anteriores, período no qual a agitação era interrompida. As concentrações de vitamina D₃ foram devidamente corrigidas em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela rinsagem e pela reposição do meio. A concentração da vitamina D₃ em cada tempo de coleta foi determinada utilizando CLAE, e cada experimento foi realizado em réplicas de seis. A quantidade permeada de droga

no tempo t ($Q_{real,t}$), foi calculada usando a equação 7. Ao final dos experimentos, as quantidades restantes das formulações que ficaram em contato com o oclusor, foram retirados com auxílio de espátula e transferidas para tubos cônicos de polipropileno (Eppendorf, Alemanha) os quais foram preenchidos com 5 mL de meio receptor e em seguida quantificadas por CLAE.

Com o objetivo de determinar os perfis de permeação, quantidades cumulativas da vitamina D₃ (μg) permeadas por unidade de área de superfície (cm^2) foram plotadas em função do tempo (hora). Para determinar a cinética de permeação, foram aplicados modelos matemáticos. Para avaliar se a permeação seguia cinética de ordem zero, foram plotadas quantidades cumulativas de vitamina D₃ permeadas por área ($\mu\text{g cm}^{-2}$) versus tempo (hora); para cinética de pseudoprimeira ordem (modelo de Higuchi), quantidades cumulativas de vitamina D₃ permeadas por área ($\mu\text{g cm}^{-2}$) versus a raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}); e o log das quantidades cumulativas de vitamina D₃ permeadas por área ($\log \mu\text{g cm}^{-2}$) versus tempo (hora) para cinética de primeira ordem. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente linear da curva plotada para a quantidade cumulativa de vitamina D₃ versus tempo. O tempo de latência (T_L) representa o tempo necessário para que se atingisse o fluxo em estado estacionário.

4.10.3 Retenção da vitamina D₃ na pele

Após os experimentos de permeação, cada disco de pele foi retirado das células de difusão para análise da quantidade de vitamina D₃ em suas camadas. Para a quantificação do ativo retido no EC, foi utilizado o método de *tape stripping*, que utiliza fitas adesivas para a remoção do EC. Para cada disco de pele foram utilizados 10 quadrados de fita adesiva. As fitas adesivas referentes a cada disco de pele foram colocadas em tubos cônicos de polipropileno (Eppendorf, Alemanha) preenchidos com 5 mL de meio receptor. Para a quantificação da vitamina D₃ retida na epiderme viável e derme, os discos de pele foram cortados em pequenos pedaços, e colocados em tubos cônicos de polipropileno, preenchidos com 5 mL de meio receptor. Todos os tubos utilizados foram agitados mecanicamente e submetidos a banho de ultrassom, por 1 hora. Em seguida, a parte líquida de cada tubo foi individualmente filtrada em filtros de celulose de 0,45 μm e transferida para frascos de CLAE para quantificação da vitamina D₃ em solução. As concentrações foram corrigidas de acordo com as diluições realizadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D₃ POR CLAE

A validação analítica é definida como sendo a avaliação sistemática de um método por intermédio de ensaios experimentais com o objetivo de confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017). O método desenvolvido foi validado seguindo os parâmetros da ANVISA (2017), ICH (2005) e INMETRO (2018).

Inicialmente, realizou-se o ensaio de seletividade, no qual é avaliada a capacidade do método em quantificar somente o composto de interesse, mesmo em presença de outros componentes. A porcentagem de discrepância encontrada (Tabela 5) foi menor que 2%, indicando que não há diferença significativa entre a quantificação da vitamina D₃ padrão e na amostra e que o método apresenta seletividade adequada. A análise qualitativa dos cromatogramas (Figura 11) confirma que não houve interferência do veículo na análise.

Tabela 5: Porcentagem de discrepância entre a quantificação da vitamina D₃ no padrão e na amostra e também sob condições de degradação.

	Discrepância (%)
Padrão/Amostra	0,95
Degradação	
pH ácido	100,00
pH alcalino	100,00
Luz	33,14
Oxidação	53,67
Calor	59,88

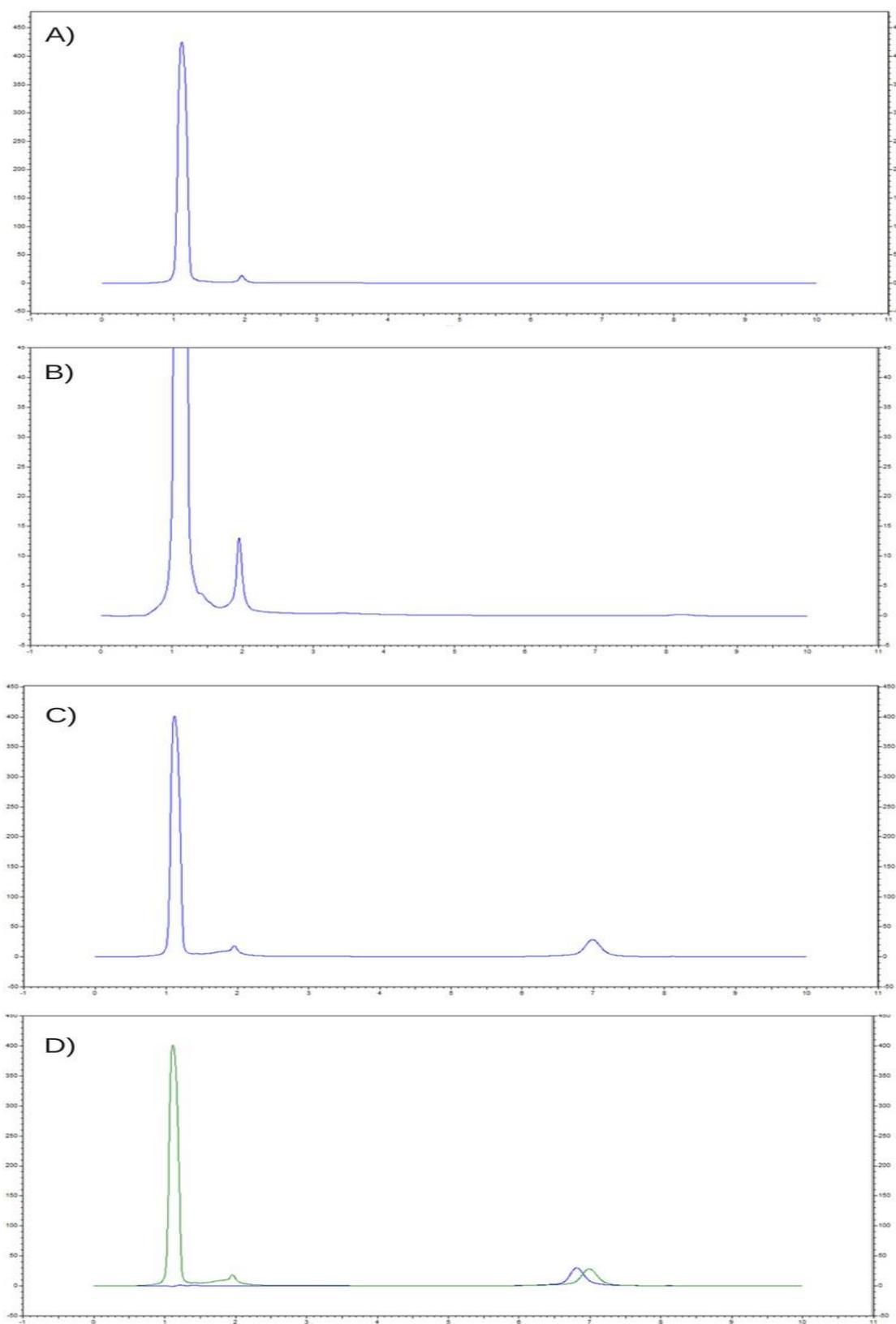


Figura 11: Cromatogramas obtidos utilizando-se o método desenvolvido para a quantificação da vitamina D₃. A): branco; B): branco em escala aproximada; C): amostra; D): amostra (verde) e padrão (azul) sobrepostos.

Adicionalmente, para assegurar a seletividade, o padrão foi exposto a condições extremas de degradação. Em todas as condições, durante a avaliação dos cromatogramas, não foram observados picos adicionais que interferissem no pico de vitamina D₃, confirmando a seletividade do método. Ainda, para todas as situações de degradação, ocorreu a diminuição do pico de vitamina D₃, devido à degradação da molécula, fato demonstrado pelo percentual de discrepância (Tabela 5). Os elevados percentuais de discrepância obtidos, não interferem na avaliação da seletividade do método analítico, já que neste parâmetro, pretende-se avaliar somente a presença/ausência de picos que interfiram na quantificação da vitamina D₃.

Na linearidade avaliou-se se a resposta analítica é, de fato, proporcional à concentração da vitamina D₃. Para isso, antes de qualquer avaliação estatística, foi necessária a análise visual do gráfico (Figura 12), onde foram plotados os dados de concentração e de resposta analítica (área do pico).

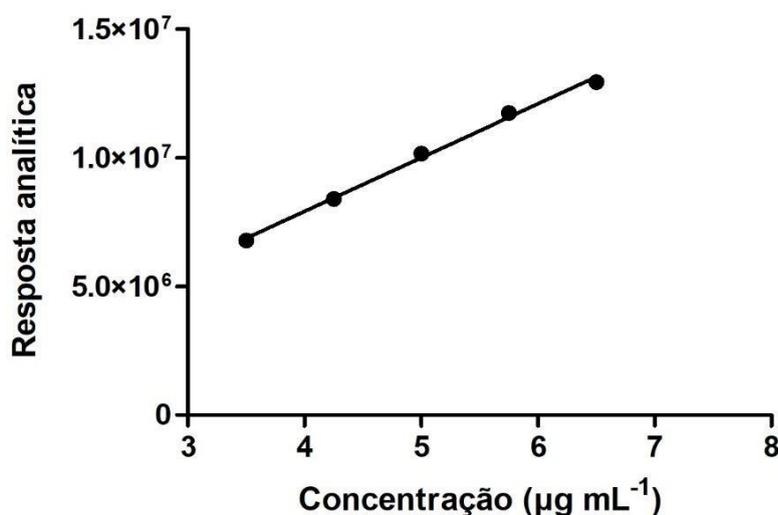


Figura 12: Curva analítica obtida para o ensaio de linearidade.

Ao analisar o gráfico foi possível observar que os pontos apresentam relação linear aparente. Assim, foram realizadas as análises estatísticas necessárias e os resultados são apresentados nas Tabelas 6 e 7. Inicialmente, avaliou-se a homogeneidade das variâncias, por meio do teste de Cochran. Como o $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$ (nível de significância = 5%) os dados são homocedásticos, ou seja, a variância dos resultados de y para cada valor de x é constante. A partir desse resultado, a reta de regressão linear foi determinada, utilizando-se o MMQO e em seguida o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi calculado. Este coeficiente representa o grau de associação linear entre as variáveis. Segundo a legislação, o valor do coeficiente de correlação deve ser maior que 0,990. Adicionalmente, quanto maior o valor de r, mais forte é a

correlação entre as duas variáveis e mais realista é o modelo (equação) proposto. O valor de r obtido no presente trabalho foi maior que o valor especificado pela legislação ($r > 0,990$).

Tabela 6: Equação da reta obtida para o ensaio de linearidade.

	Intercepto	Inclinação da reta	r *
Equação da reta	-426384,978	2084565,689	0,996

* Valor especificado pela legislação: $r > 0,990$.

Tabela 7: Resultados do estudo da linearidade do método.

Teste	Valor calculado	Valor crítico *
Homocedasticidade	$C = 0,268$	$C = 0,684$
ANOVA	$F = 1641,56$	$F = 4,67$
Normalidade dos resíduos ^c	$W = 0,887$	$W = 0,881$

* Nível de significância de 5%.

Os dados da linearidade foram submetidos à ANOVA para avaliar se a reta de regressão estimada explica satisfatoriamente a relação existente entre a concentração e a área do pico. Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o $F_{\text{crítico}}$ (nível de significância = 5%) assume-se que y efetivamente varia em função de x e que o método pode ser considerado linear. Finalmente, foi realizada a análise de resíduos; conceituado como a diferença entre o valor encontrado de y e o valor estimado pelo modelo (equação) em um determinado ponto (BRASIL, 2017). É desejável que os resíduos apresentem distribuição normal. Para a avaliação da normalidade dos resíduos (Figura 13), foi realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk. É possível observar que os resíduos apresentaram um comportamento aleatório, sem apresentar nenhuma tendência. De acordo com os resultados, como $W_{\text{calculado}} > W_{\text{crítico}}$ (nível de significância = 5%) é possível afirmar que os resíduos apresentaram distribuição normal.

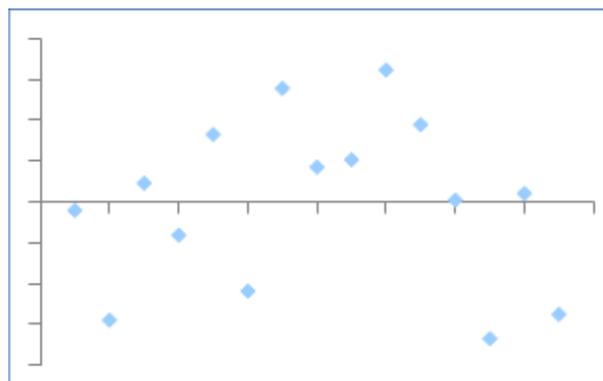


Figura 13: Gráfico de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica.

Os LD ($0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$) e LQ ($0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram calculados a partir das três curvas analíticas obtidas na linearidade e também utilizando a estimativa de ruído proveniente da análise de amostras do branco. O LD é a menor quantidade da vitamina D₃ em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições estabelecidas para o ensaio. Já o LQ representa a menor quantidade da vitamina D₃ presente na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os baixos resultados obtidos são importantes e também necessários para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que a concentração de vitamina D₃ na amostra é baixa e também devido ao fato que durante os ensaios de permeação, em geral, a quantidade de fármaco a ser analisada é muito pequena.

O ensaio de precisão avaliou a repetibilidade e a precisão intermediária. Os resultados obtidos (Tabela 8) estão dentro do limite de aceitação ($\leq 5\%$), e demonstram a habilidade do método de proporcionar resultados próximos para uma série de medidas de uma mesma amostra nas mesmas condições experimentais e quando são realizadas alterações de analista e dia.

Os resultados obtidos para exatidão são apresentados na Tabela 9. O valor de percentual de recuperação médio obtido encontra-se dentro da especificação (98-102%), demonstrando a capacidade do método de fornecer resultados próximos ao valor verdadeiro.

Tabela 8: Resultados do estudo de precisão para quantificação de vitamina D₃.

Parâmetro	n	Valor	Especificação
Repetibilidade	6	0,92	$\leq 5\%$
Precisão Intermediária	24	1,15	$\leq 5\%$

Tabela 9: Resultados do estudo de exatidão para a quantificação de vitamina D₃.

Concentração (%)	Concentração real*	Área	Concentração calculada*	Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	3,36	6428185	3,29	97,89		
70	3,36	6480677	3,31	98,64	98,26	0,38
	3,36	6453309	3,30	98,25		
	4,75	9361686	4,70	98,84		
100	4,75	9364208	4,70	98,87	98,73	0,23
	4,75	9324196	4,68	98,47		
	6,25	12333657	6,12	97,91		
130	6,25	12338798	6,13	97,95	98,01	0,15
	6,25	12368607	6,14	98,18		
Total					98,33	0,40

* Concentração expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$. DPR = Desvio padrão relativo

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Após a produção dos CLN, a primeira etapa de caracterização foi a avaliação do aspecto macroscópico das dispersões. Ambos os CLN apresentaram aspecto similar ao leite, com coloração branca e baixa viscosidade (Figura 14).



Figura 14: Aspecto macroscópico dos CLN desenvolvidos
1: C-CLN: carreador lipídico nanoestruturado controle; 2: D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

Em seguida, os CLN foram diluídos em água e avaliados em relação ao TP, PDI e PZ (Tabela 10). Os resultados encontrados demonstram que o processo de homogeneização por alto cisalhamento seguido de ultrassonicação foi capaz de produzir nanopartículas com tamanho desejado para a administração tópica (SOLDATI, 2015). De acordo com Danaei et al. (2018) sistemas nanocarreadores lipídicos com diâmetro de até 300 nm são capazes de promover a liberação de seu conteúdo até as camadas mais profundas da pele. Além disso, as proporções de lipídio sólido, óleo e tensoativo utilizadas neste trabalho, também foram adequadas, visto que as mesmas influenciam no tamanho e distribuição das partículas.

Tabela 10: Características físico-químicas dos CLN.

	C-CLN	D-CLN
TP (nm)*	180,9 ± 10,0	192,5 ± 10,5
PDI*	0,18 ± 0,04	0,13 ± 0,04
PZ (mV)**	-31,2 ± 0,7	-29,0 ± 0,6

TP: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; C-CLN: carreador lipídico nanoestruturado controle; D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

Os valores são apresentados como média ± DP (n=3).

*Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as nanopartículas.

** Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as nanopartículas.

Através da análise dos gráficos de distribuição dos tamanhos dos C-CLN e D-DLN (Figura 15), observa-se que ambos apresentam distribuição estreita de tamanho, fato confirmado pelos baixos valores de PDI obtidos. Como esses valores foram inferiores a 0,25, as nanopartículas podem ser classificadas como monodispersas (MARTINS, 2012b). Ao comparar os valores de TP e PDI encontrados para C-CLN e D-CLN, conclui-se que a incorporação da vitamina D₃ não levou a alterações significativas nestes parâmetros ($p = 0,2370$ e $p = 0,1451$ para TP e PDI respectivamente).

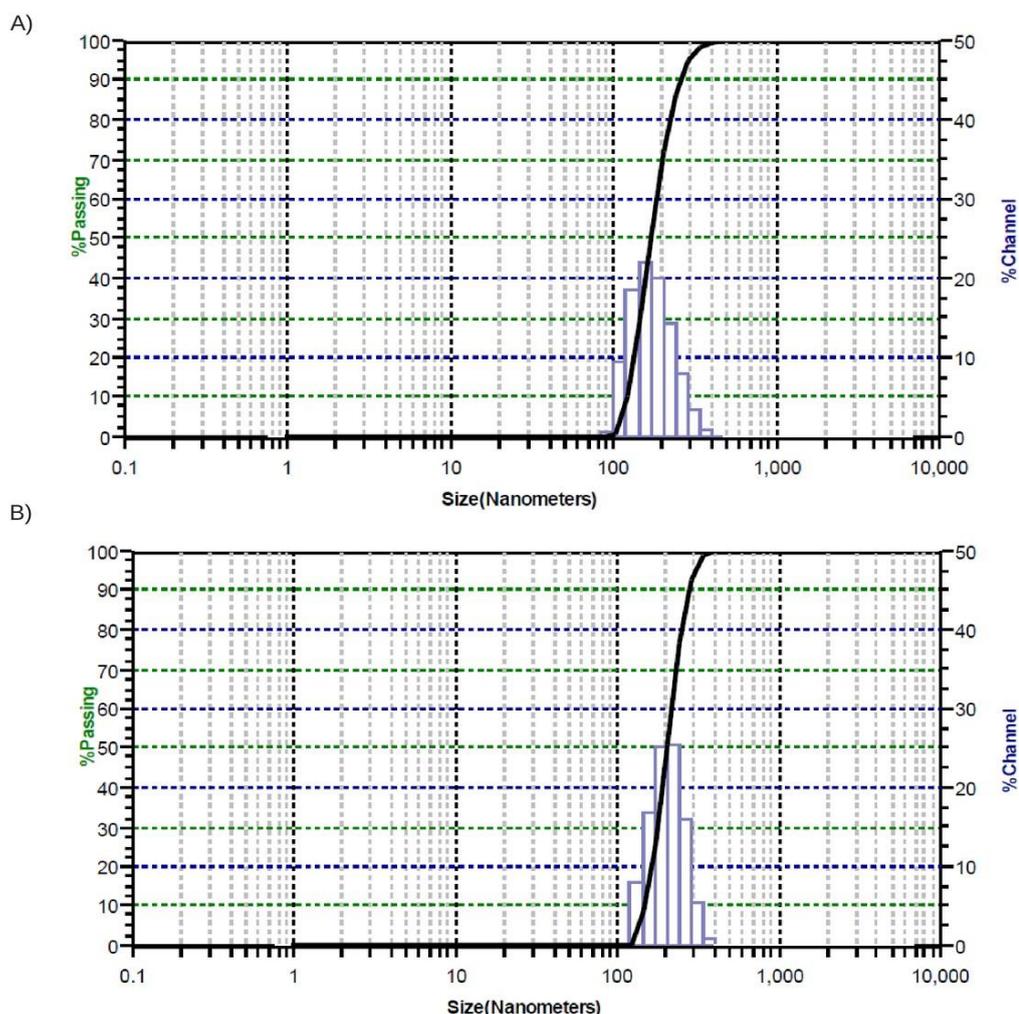


Figura 15: Histograma de dispersão do tamanho de partícula dos CLN obtidos.
 A: C-CLN: carreador lipídico nanoestruturado controle; B: D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

O PZ é um indicador útil para prever a estabilidade física das nanopartículas (KIANI; FATHI; GHASEMI, 2016). Para ambos os CLN desenvolvidos, a carga de PZ foi negativo (Tabela 10). Embora a incorporação da vitamina D₃ em D-CLN tenha diminuído significativamente ($p = 0,0153$) o valor absoluto do PZ, em comparação com C-CLN, para ambos o valor absoluto se encontra na faixa entre 20 e 40 mV. As nanopartículas lipídicas que possuem PZ nesta faixa são consideradas estáveis e menos suscetíveis a formar agregados ou aumentar o tamanho de partícula, isso porque, se as nanopartículas possuem carga suficiente, elas podem se repelir, aumentando a estabilidade da dispersão (KATHE; HENRIKSEN; CHAUHAN, 2014).

Com o objetivo de avaliar a morfologia do D-CLN, foi realizada análise por MET (Figura 16). De acordo com a imagem obtida, D-CLN apresenta morfologia esférica. Além disso, sugere-se que o TP encontrado por MET está de acordo com os resultados de DLS.

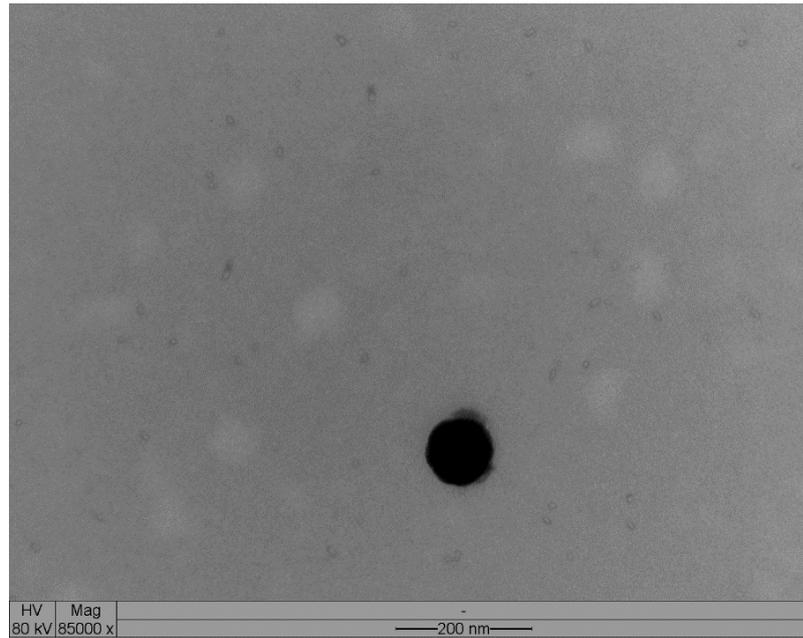


Figura 16: Eletromicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando morfologia do carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

O ensaio de EE avalia a eficiência do processo de encapsulação, ou seja, quantifica o fármaco que realmente está aprisionado na nanopartícula. Para isso, é necessário separar as nanopartículas do meio de dispersão, e o tamanho reduzido das mesmas dificulta esse processo. Uma das técnicas que tem sido empregada com sucesso é a ultrafiltração, na qual membranas são utilizadas para realizar a separação. Nesta técnica, o fármaco livre passa através da membrana, enquanto as nanopartículas ficam retidas (KATHE; HENRIKSEN; CHAUHAN, 2014). Em seguida o fármaco livre é quantificado por técnicas como CLAE.

O elevado valor de EE obtido para D-CLN ($99,75\% \pm 0,03\%$) pode ser devido à utilização conjunta de lipídeos líquido e sólido, o que leva à redução da cristalização do lipídeo e aumento das imperfeições na matriz lipídica, com consequente aumento do espaço para acomodar as moléculas do fármaco (THATIPAMULA, 2011). Além disso, a manteiga vegetal utilizada apresenta composição com diferentes ácidos graxos; essa mistura aumenta a distância entre as cadeias dos ácidos graxos, o que também ocasiona imperfeições no cristal (CARVALHO, 2016). Outro fator que pode ter influenciado na EE é a lipofilicidade da vitamina D₃.

Na literatura, muitos autores também encontraram valores elevados de EE. Ali e colaboradores (2010) encontraram EE de $99,9 \pm 1,3$ e $99,9 \pm 0,8$ para dois CLNs de sinvastatina desenvolvidos utilizando método de produção semelhante ao presente trabalho. Almeida (2011) encontrou EE de 100% para CLN de ácido ursólico. Sena (2016) encontrou EE de 99% para

CLN de cetoconazol desenvolvido utilizando gordura vegetal de murumuru, que também apresenta composição de ácidos graxos variados.

5.2.1 Estudo de estabilidade de curto prazo dos CLNs

As dispersões aquosas de NLS e CLN podem apresentar problemas de estabilidade física, como por exemplo, a expulsão do fármaco e tendência a gelatinização e agregação (ANDONOVA, PENEVA, 2017). Desse modo, o teste de estabilidade é importante para avaliar possíveis alterações na qualidade das nanopartículas ao longo do tempo e sob a influência de condições distintas de armazenamento. No presente trabalho, as nanopartículas foram avaliadas em relação ao tamanho de partícula e PDI, nas condições de armazenamento: ambiente (25 °C), geladeira (4 °C), congelador (-6 °C) e 32 °C. A temperatura de 32 °C foi escolhida, pois é a temperatura de realização dos testes de liberação e permeação. A avaliação do tamanho de partícula permite verificar a tendência de agregação e sedimentação das partículas ao longo do tempo (GOMES et al., 2014). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 11.

Após sete dias de armazenamento em congelador, tanto C-CLN como D-CLN apresentaram a formação de aglomerados visíveis (Figura 17), desse modo não foi possível a avaliação do tamanho de partícula e PDI. Assim, conclui-se que as nanopartículas foram instáveis nessa forma de armazenamento. Ao final de 30 dias de armazenamento em geladeira, D-CLN apresentou deposição de material na parede do frasco (Figura 17), o que não aconteceu com C-CLN; desse modo, provavelmente ocorreu a expulsão da vitamina D₃ das nanopartículas, com cristalização da mesma e subsequente deposição na parede. Entretanto, na avaliação do tamanho de partícula, D-CLN não apresentou alterações significativas ao longo do tempo ($p = 0,2371$), o mesmo ocorreu com C-CLN ($p = 0,0617$). O PDI das nanopartículas também não apresentou alterações significativas ao longo do armazenamento ($p = 0,7834$ para C-CLN e $p = 0,2276$ D-CLN). Assim, conclui-se que D-CLN foi estável, em relação ao tamanho de partícula e PDI, somente durante 15 dias de armazenamento em geladeira, já que, após esse período ocorreu a cristalização da vitamina D₃.

Tabela 11: Avaliação da estabilidade dos CLN desenvolvidos, em diferentes condições de armazenamento.

	C-CLN		D-CLN	
	TP	PDI	TP	PDI
Geladeira (4 °C)				
1 dia	180,9 ± 10,0	0,18 ± 0,04	192,5 ± 10,5	0,13 ± 0,04
7 dias	171,1 ± 7,0	0,20 ± 0,09	189,2 ± 15,5	0,15 ± 0,04
14 dias	182,5 ± 3,3	0,16 ± 0,04	175,2 ± 9,2	0,21 ± 0,08
30 dias	167,7 ± 3,5	0,21 ± 0,10	180,2 ± 3,0	0,15 ± 0,02
Ambiente (25 °C)				
1 dia	180,9 ± 10,0	0,18 ± 0,04	192,5 ± 10,5	0,13 ± 0,04
7 dias	175,1 ± 8,2	0,17 ± 0,09	184,2 ± 6,8	0,10 ± 0,05
14 dias	179,4 ± 4,0	0,23 ± 0,06	183,0 ± 12,1	0,19 ± 0,05
30 dias	184,7 ± 6,8	0,14 ± 0,04	186,2 ± 8,5	0,10 ± 0,02
32 °C				
1 dia	180,9 ± 10,0	0,18 ± 0,04	192,5 ± 10,5	0,13 ± 0,04
7 dias	181,1 ± 8,2	0,27 ± 0,20	175,9 ± 11,4	0,23 ± 0,09
14 dias	186,4 ± 6,1	0,20 ± 0,04	178,9 ± 9,5	0,18 ± 0,06
30 dias	181,3 ± 3,8	0,17 ± 0,04	173,2 ± 5,1	0,42 ± 0,35

TP: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão. C-CLN: carreador lipídico nanoestruturado controle; D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

Todos os valores representam média ± DP (n=3). Nenhuma diferença estatística (p > 0,05) foi observada para C-CLN e D-CLN ao longo dos 30 dias, analisado separadamente cada condição de armazenamento.



Figura 17: Aspecto macroscópico dos CLN após armazenamento.
 A): carreador lipídico nanoestruturado controle após sete dias de armazenamento em congelador. A dispersão foi transferida para frasco transparente para possibilitar a visualização; B) carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃ após 30 dias de armazenamento em geladeira.

No armazenamento em temperatura ambiente, não houve alteração significativa para os parâmetros analisados de tamanho de partícula ($p = 0,5152$ para C-CLN e $p = 0,6484$ para D-CLN) e PDI ($p = 0,3859$ para C-CLN e $p = 0,0799$ D-CLN). O mesmo ocorreu para o armazenamento a 32 °C (TP: $p = 0,7664$ para C-CLN e $p = 0,1351$ para D-CLN; PDI: $p = 0,6528$ para C-CLN e $p = 0,3033$ para D-CLN). Assim, percebe-se que os CLN desenvolvidos se mantiveram estáveis durante 30 dias sob armazenamento a temperatura ambiente e 32 °C, sem que ocorresse a agregação das nanopartículas e alteração significativa na homogeneidade das mesmas.

A temperatura de armazenamento pode ter influenciado na rigidez do núcleo lipídico, dessa forma, em temperaturas mais baixas como geladeira e congelador, o núcleo lipídico poderia ter apresentado maior rigidez, com conseqüente expulsão da vitamina D₃ e instabilidade. Por outro lado, em temperaturas mais elevadas, como ambiente e 32 °C, a matriz lipídica pode ter apresentado menor rigidez, levando a maior estabilidade das nanopartículas nessas temperaturas.

5.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Usualmente as NLS e CLN são produzidos a partir de materiais biodegradáveis e que já são utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos; desse modo, são geralmente bem tolerados pelo organismo. Ainda assim, a toxicidade potencial dessas nanopartículas deve ser levada em consideração (DEMIRBILEK et al., 2017; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

As nanopartículas podem causar citotoxicidade através da aderência da partícula à membrana celular, degradação e posterior liberação de produtos tóxicos. Outro mecanismo é a internalização de nanopartículas pelas células seguido de degradação intracelular e da ocorrência de efeitos tóxicos dentro da célula. Desse modo, o primeiro passo para avaliar a segurança de uma formulação envolve a utilização de métodos que analisam a citotoxicidade *in vitro*. Um método colorimétrico muito utilizado é o MTT, que avalia a atividade mitocondrial da célula (RIDOLFI et al., 2011).

No presente estudo utilizou-se a linhagem celular L929 de fibroblasto murino, a qual é muito utilizada em testes de biocompatibilidade de materiais, citotoxicidade de fármacos e estudos de biologia celular (AL-AMIN et al., 2016; THEERAKITTAYAKORN; BUNPRASERT, 2011). Além disso, como os fibroblastos estão presentes na pele, essa é uma linhagem celular adequada para avaliar a citotoxicidade de nanopartículas que serão administradas pela via transdérmica.

Os resultados de viabilidade celular para C-CLN, D-CLN e vitamina D₃ estão apresentados na Figura 18. Ao analisar o gráfico de C-CLN (Figura 18 A) observa-se que a viabilidade celular foi maior que 100% em todas as concentrações testadas, sendo assim essa nanopartícula não foi citotóxica frente a fibroblastos murinos. Adicionalmente, nota-se que C-CLN estimulou a proliferação celular em todas as concentrações testadas. Provavelmente, esse estímulo observado foi devido a composição de ácidos graxos variados presentes no núcleo lipídico da nanopartícula.

Relatos científicos demonstram a atividade antiproliferativa da vitamina D₃ e seus metabólitos *in vitro* frente a células normais e neoplásicas (PELCZYNSKA et al., 2006; POPADIC et al., 2008). Observando o gráfico da viabilidade celular da vitamina D₃ (Figura 18 B), nota-se que na faixa de concentração 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – 37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular foi baixa, em torno de 20%, demonstrando citotoxicidade da vitamina D₃ nessas concentrações. Somente nas concentrações de 9,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular foi acima de 70%. O valor de 70 % foi usado como referência, pois de acordo com a ISO 10993-5, considera-se que um tratamento apresenta citotoxicidade quando a viabilidade celular é reduzida em mais de 30% (ISO, 2009).

A D-CLN (Figura 18 C) também apresentou citotoxicidade nas concentrações iniciais. Entretanto, demonstrou percentual de viabilidade celular superior a 70% nas concentrações 18,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 9,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como C-CLN não apresentou citotoxicidade, provavelmente a toxicidade apresentada por D-CLN é devido a vitamina D₃. Na Figura 18 D observa-se que D-CLN apresentou maior percentual de viabilidade celular na faixa de

concentração de 37,5 a 9,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em relação à vitamina D₃ livre. De fato, a CI₅₀ de D-CLN (32,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$) demonstra que a incorporação da vitamina D₃ na nanopartícula auxiliou na redução da citotoxicidade do fármaco (CI₅₀ vitamina D₃ 16,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Esse efeito de diminuição da toxicidade poderia ser devido a encapsulação da vitamina D₃ no núcleo lipídico da nanopartícula e sua liberação controlada a partir do mesmo, fazendo com que o contato do fármaco com as células fosse minimizado.

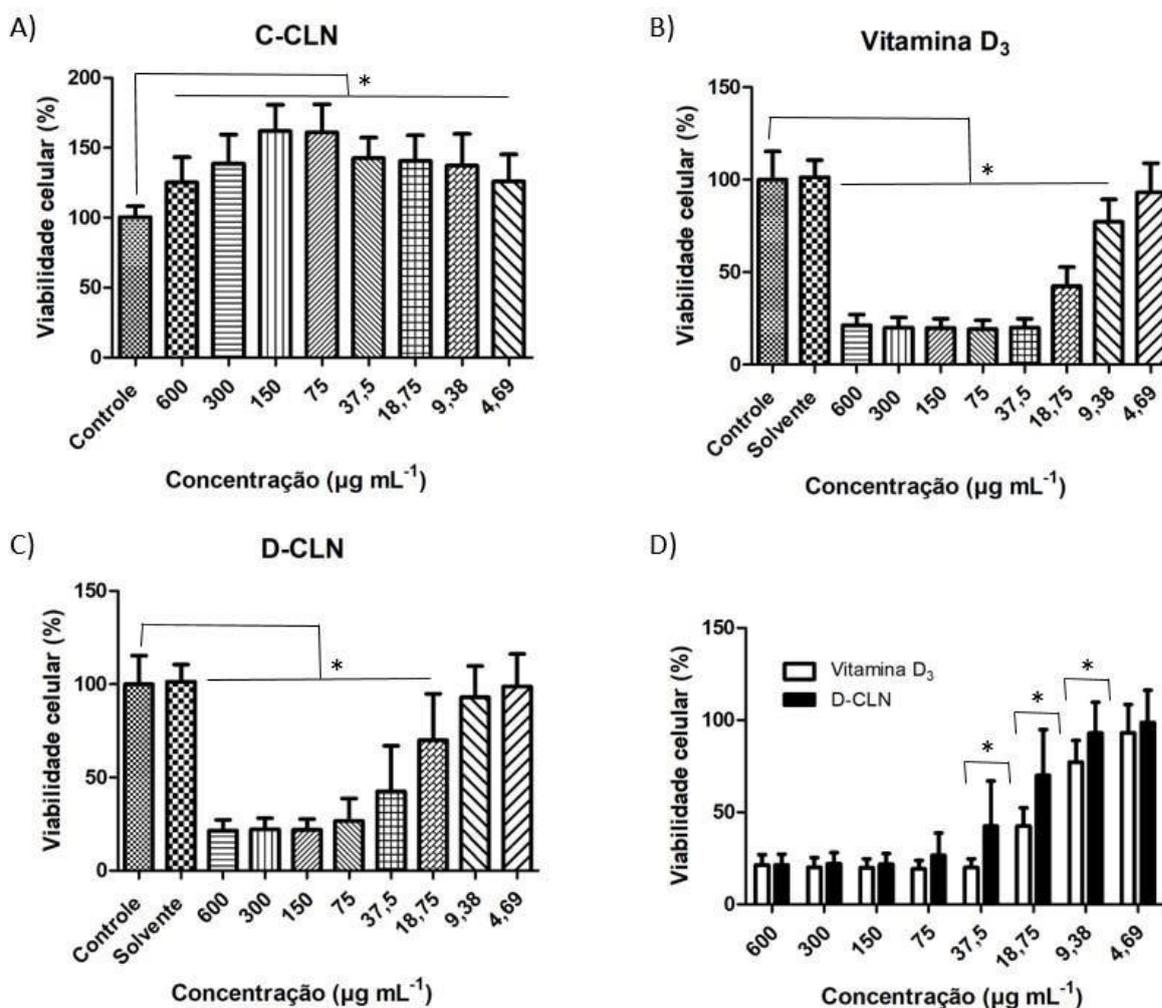


Figura 18: Viabilidade celular de fibroblastos murinos após tratamento: A) C-CLN: carreador lipídico nanoestruturado controle; B) vitamina D₃; C) D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃ e D) comparação entre vitamina D₃ e D-CLN. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=5). * p<0,05 (ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE CURTO PRAZO

A vitamina D₃ é uma molécula instável e suas duplas ligações podem ser alteradas por diferentes condições de estresse, como exposição à luz, ao ar e ao calor (LOEWEN; CHAN;

LI-CHAN, 2018). Podem ocorrer reações como, por exemplo, isomerização induzida quimicamente, termicamente e fotoquimicamente, além de oxidação química (BALLARD et al., 2007). Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura no teor das formulações desenvolvidas, as mesmas foram expostas às seguintes condições de temperatura: geladeira (4 °C), ambiente (25 °C), 32 °C e congelador (-6 °C). Como controle, a matéria-prima de vitamina D₃ também foi exposta às mesmas condições. Os resultados são apresentados na Figura 19.

Ao final dos 30 dias de experimento, a matéria-prima de vitamina D₃ se manteve estável nas temperaturas de geladeira e congelador. Na temperatura ambiente houve uma pequena diminuição do teor (95,63%), já na temperatura de 32 °C a diminuição do teor foi elevada, restando apenas 46,90% de vitamina D₃. Além disso, nessa condição foi observada mudança de coloração do pó, que inicialmente era branco e no final da avaliação apresentou coloração amarelada. Grady e colaboradores (1980) avaliando a degradação da vitamina D₃ pó, encontraram resultados semelhantes, em que a molécula se manteve estável em temperatura ambiente e se decompôs rapidamente sob temperatura de 40 °C, apresentando teor de cerca de 3% após 21 dias de experimento.

Observando o gráfico do D-CLN, nota-se que na temperatura de 32 °C ocorreu degradação significativa da vitamina D₃, uma vez que, ao final dos 30 dias o teor encontrado foi de 8,75%. O armazenamento em geladeira foi capaz de manter o teor do D-CLN durante 7 dias, após esse período, houve uma brusca diminuição do teor. Como reportado anteriormente, D-CLN apresentou cristalização visível da vitamina D₃ após 30 dias de armazenamento, o que poderia explicar a diminuição brusca de teor observada. Na condição de temperatura ambiente também ocorreu degradação, sendo esta aparentemente dependente do tempo de armazenamento; ao final do experimento o teor encontrado foi de 26,18%. Abbasi e colaboradores (2014) encapsularam a vitamina D₃ em nanopartícula de *whey protein* isolado e também obtiveram elevada degradação da molécula; eles encontraram quantidade residual de vitamina D₃ de 37% após sete dias sob armazenamento em temperatura ambiente. Paucar e colaboradores (2016) desenvolveram três micropartículas lipídicas sólidas de vitamina D₃ e embora a degradação da vitamina D₃ também tenha ocorrido, ela aconteceu com menor intensidade durante 27 dias de armazenamento em temperatura de 25 °C ($77,61 \pm 6,90$; $85,99 \pm 8,80$; $77,61 \pm 6,91$) e 10 °C ($89,61 \pm 8,30$; $92,20 \pm 3,31$; $86,86 \pm 3,84$), quando comparado ao presente trabalho. Uma possível explicação para a diferença encontrada em relação ao estudo de Paucar e colaboradores (2016) é que neste as micropartículas se encontravam na forma de pó e no presente trabalho os D-CLN foram avaliados na forma de dispersão.

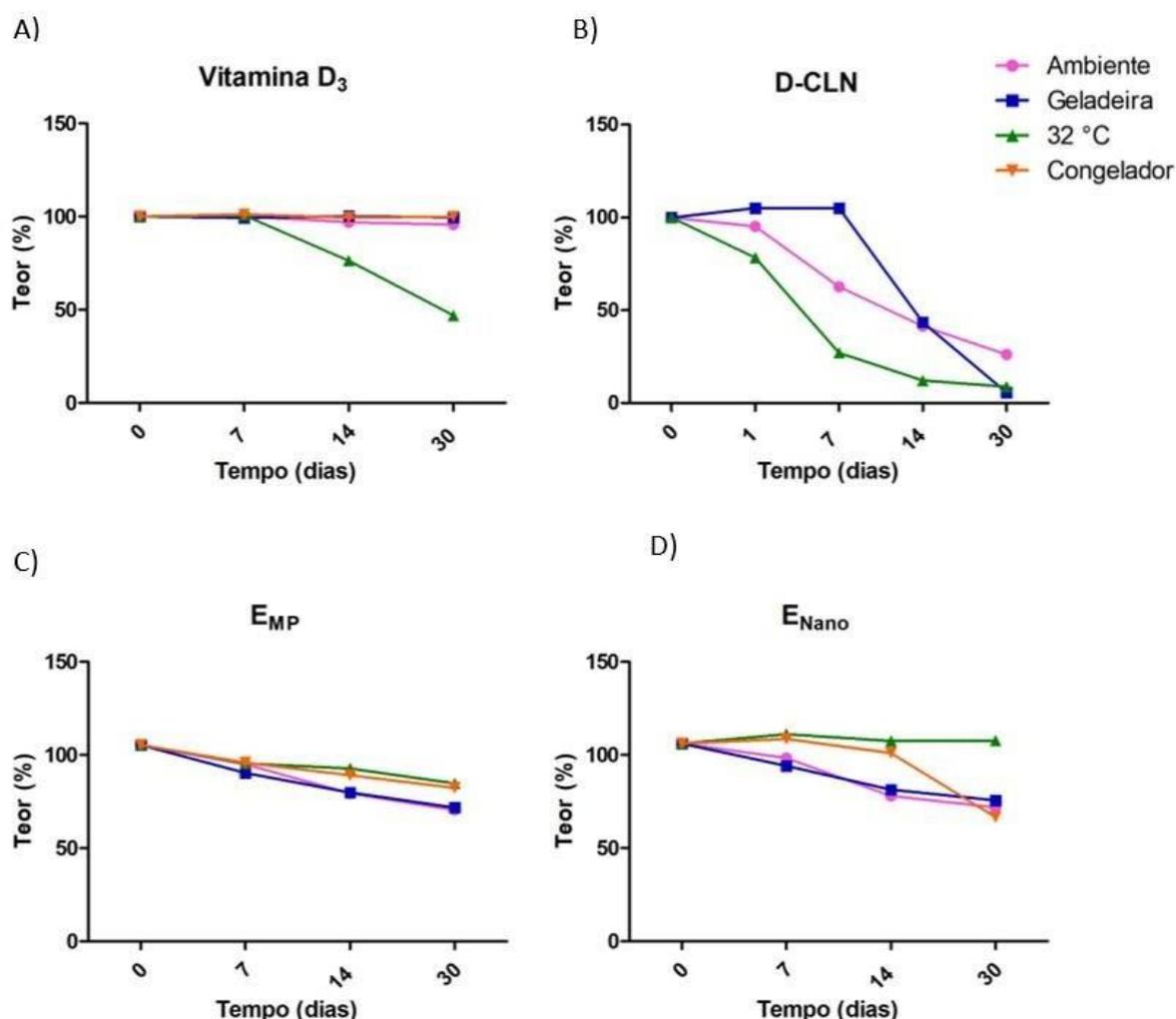


Figura 19: Avaliação da estabilidade das formulações desenvolvidas sob diferentes condições de armazenamento. A: Vitamina D₃ (MP); B: D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃; C: E_{MP}: emulsão transdérmica com vitamina D₃ (MP); D: E_{Nano}: emulsão transdérmica contendo nanopartícula de vitamina D₃. Para D-CLN não foi apresentada a estabilidade em temperatura de congelador, pois se verificou a instabilidade visualmente.

Ao longo do tempo de armazenamento, pode ter ocorrido a expulsão da vitamina D₃ da nanopartícula, o que fez com que a mesma ficasse em suspensão na fase aquosa e não mais protegida na nanopartícula. Dessa forma, a molécula estaria mais propensa a sofrer influência da temperatura de armazenamento, com consequente degradação. De fato, Abbasi e colaboradores (2014) encontraram que, em uma solução de água e etanol, sob temperatura ambiente, a vitamina D₃ atingiu 4% do seu valor inicial, após 7 dias de experimento.

A incorporação da vitamina D₃ (matéria-prima) no veículo em E_{MP} foi capaz de proteger a vitamina D₃ da degradação na temperatura de 32 °C, apresentando teor de 84,74% ao final dos 30 dias, sendo o mesmo aproximadamente 1,6 vezes o valor encontrado para a matéria-prima pura (46,90%), na mesma condição. Em todas as temperaturas de armazenamento, no final do experimento o teor foi superior a 70%. Da mesma forma, a incorporação da

nanopartícula no veículo transdérmico em E_{Nano} , também possibilitou a diminuição da degradação da molécula; entretanto, essa proteção foi observada em todas as temperaturas analisadas. O menor teor obtido para essa formulação foi na temperatura de congelador, com valor de 66,52% depois de 30 dias.

Analisando os gráficos de E_{MP} e E_{Nano} observa-se que a degradação da vitamina D₃ parece não estar relacionada com a temperatura para essas formulações, já que, por exemplo, os maiores valores encontrados de teor foram para o armazenamento a 32 °C. Uma hipótese que poderia explicar essa observação é que a degradação nessas formulações teria ocorrido não devido à temperatura, mas sim causada por outra condição de estresse, como por exemplo, a oxidação, provocada pela interação dos componentes do veículo transdérmico com a vitamina D₃. Outro ponto importante é que a vitamina D₃ pode sofrer isomerização térmica reversível, originando a pré-vitamina D₃ (BALLARD et al., 2007). Dessa forma, na condição de 32 °C pode ter acontecido essa reação de isomerização, ao invés de reações de degradação. Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para a identificação do mecanismo de degradação.

5.5 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO

Previamente à realização dos estudos de permeação, é essencial verificar qual o meio receptor mais adequado. O mesmo deve possibilitar a solubilização da substância de interesse, não limitando a sua difusão através da membrana. Para compostos hidrofílicos, soluções salinas podem ser apropriadas para a adequada solubilização; entretanto, para compostos lipofílicos, como a vitamina D₃, é improvável que as mesmas sejam adequadas (COLIPA, 1997; OECD, 2011).

Nos estudos de permeação *ex vivo*, um obstáculo importante é a dificuldade de estimar a absorção dérmica de substâncias muito lipofílicas, podendo ocorrer a subestimação da absorção dérmica. Isso acontece, devido às substâncias lipofílicas serem pouco solúveis na maioria dos meios receptores, fazendo com que a partição para o meio receptor seja inibida. *In vivo*, os compostos lipofílicos são rapidamente absorvidos pelo sangue quando entram nos capilares cutâneos. O meio receptor usado *in vitro* deve ter o mesmo papel que o sangue *in vivo*. Assim, uma estratégia para melhorar a solubilidade das moléculas lipofílicas é a adição de substâncias como: etanol, albumina sérica bovina e hidroxipropil- β -ciclodextrina no meio receptor (OECD, 2011).

A vitamina D₃, como mencionado anteriormente, é uma substância lipofílica, com baixa solubilidade em água. Desse modo, além das soluções salinas: TFS, SHA e FCS, também foram

testadas as mesmas acrescidas de etanol, HPCD e ASB, a fim de melhorar a solubilização da vitamina D₃. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Solubilidade da vitamina D₃ nos meios receptores.

Meio receptor	Solubilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
TFS	< 0,06
TFS + 5% ASB	0,43
TFS + 0,5% HPCD	1,05
TFS + 20% EtOH	< 0,06
TFS + 50% EtOH	108,90
SHA	0,08
SHA + 0,5% HPCD	< 0,06
SHA + 20% EtOH	< 0,06
FCS	< 0,06
FCS + 0,5% HPCD	< 0,06
FCS + 20% EtOH	< 0,06
Soro Porcino	5,47
MeOH 90%, v/v	1000,82

TFS: tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,4. SHA: suor humano artificial. FCS: fluido corporal simulado. ASB: albumina sérica bovina. HPCD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. MeOH: metanol. EtOH: etanol.

O metanol 90% foi utilizado como solução de referência, já que teoricamente é capaz de solubilizar toda vitamina D₃ adicionada. O resultado obtido confirma essa hipótese, sendo o mesmo próximo da concentração máxima que poderia ser alcançada ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Em alguns meios receptores, como TFS, SHA + 0,5% HPCD e FCS, não foi possível detectar a vitamina D₃ na análise por CLAE; desse modo, os resultados foram expressos como $< 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerado o LD do método analítico. Como esperado, para as soluções salinas, a solubilidade da vitamina D₃ foi muito baixa, não sendo possível a detecção nos meios TFS e FCS. Esse resultado está de acordo com os dados da literatura, em que a solubilidade da vitamina D₃ em água é de $0,0013 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*National Center for Biotechnology Information*).

A adição de HPCD e ASB no TFS levou a uma pequena melhora na solubilidade, já a adição de HPCD nos meios SHA e FCS não demonstrou melhora na solubilização da vitamina D₃. Desse modo, conclui-se que, devido à elevada lipofilicidade da vitamina D₃, a adição dessas substâncias não foi suficiente para melhorar a solubilidade da molécula.

A utilização de soro porcino como meio receptor foi descrita por Alsaqr e colaboradores (2015), como uma maneira de aumentar a solubilidade da vitamina D₃, devido ao fato de o mesmo possuir naturalmente a proteína de ligação à vitamina D e albumina. Alsaqr e colaboradores encontraram solubilidade da vitamina D₃ no soro porcino de $2,6 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$ nM ($10,00 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), este valor é próximo ao encontrado no presente trabalho, sendo que a diferença pode ser devido à temperatura na qual o experimento foi realizado [37 °C para Alsaqr et al. (2015) e 32 °C neste trabalho]. Apesar da solubilidade no soro porcino ter aumentado, em relação as soluções salinas, ela foi considerada insuficiente para a realização dos ensaios de liberação e permeação.

A adição de etanol nas soluções salinas foi outra estratégia empregada para aumentar solubilidade da vitamina D₃, sendo permitido o acréscimo de até 50% de etanol nos meios receptores (OEDC, 2011). A adição de 20% de etanol não foi suficiente para melhorar a solubilidade da vitamina D₃. Entretanto, a adição de 50% de etanol ao TFS foi capaz de aumentar significativamente a solubilidade da molécula, sendo o TFS + 50% de EtOH o meio receptor escolhido. Apesar de menor que em MeOH 90%, a solubilidade ainda foi alta o suficiente para não ser um fator limitante da difusão através da membrana, uma vez que a quantidade de substância que permeia por hora é baixa, quando comparada às concentrações aqui testadas.

5.6 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Previamente aos estudos de permeação foram realizados os estudos de liberação. O estudo de liberação *in vitro*, utiliza membrana sintética e permite a avaliação da quantidade máxima de ativo liberado a partir de sistemas semissólidos, possibilitando a caracterização de formulações e conseqüentemente à verificação da qualidade da produção, bem como a comparação entre diferentes formulações (BABY et al., 2009). Este teste é comumente empregado para prever o comportamento *in vivo* das nanopartículas e é um parâmetro importante para assegurar a qualidade e segurança das mesmas (D'SOUZA, 2014). Para tanto, os perfis de liberação *in vitro* da vitamina D₃ a partir de E_{Nano}, E_{MP} e D-CLN, foram construídos e se encontram na Figura 20.

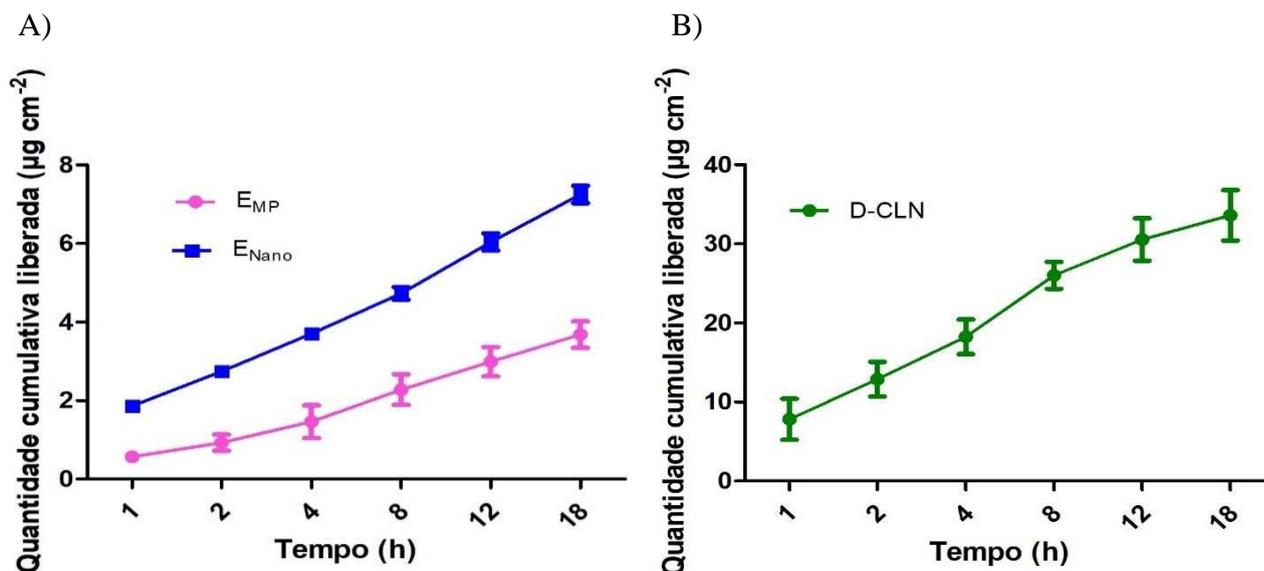


Figura 20: Perfil de liberação *in vitro* da vitamina D₃ a partir das formulações.

A) Perfil de liberação de E_{MP}: emulsão transdérmica contendo vitamina D₃ (MP) e E_{Nano}: emulsão transdérmica contendo nanopartícula de vitamina D₃; B) Perfil de liberação de D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

Ao final das 18 horas de experimento os percentuais de liberação cumulativo para as formulações E_{Nano}, E_{MP} e D-CLN foram: 37%, 22% e 54% de vitamina D₃ respectivamente. O uso da nanotecnologia possibilitou um aumento significativo na liberação cumulativa do fármaco. Comparando os percentuais de liberação, observa-se que em relação à E_{MP} a formulação E_{Nano} liberou mais de 1,6 vezes a quantidade de vitamina D₃ liberada por E_{MP}, já para D-CLN o valor foi cerca de 2,5 vezes maior. Uma hipótese que explicaria a baixa liberação de vitamina D₃ a partir da E_{MP} seria a elevada afinidade da molécula com o veículo, devido à lipofilicidade da vitamina D₃, fazendo com que a mesma apresentasse dificuldades para conseguir se liberar do veículo e se difundir para o meio receptor. A encapsulação da vitamina D₃ no CLN fez com que a maior parte dessa substância ficasse encapsulada no núcleo lipídico, que é estabilizado pelo tensoativo, e dessa forma houve uma melhora da solubilidade da vitamina D₃. Assim, o fármaco encapsulado presente no D-CLN e E_{Nano} conseguiu se liberar mais facilmente das formulações e se difundir para o meio receptor. Sendo que a liberação do fármaco a partir do D-CLN foi facilitada em relação a E_{Nano}.

Em comparação com a literatura, D-CLN demonstra ser uma nanopartícula promissora. Demirbilek e colaboradores (2017) desenvolveram três NLSs diferentes contendo vitamina D₃ e encontraram percentuais de liberação de: $45,25 \pm 5,47\%$, $59,93 \pm 3,64\%$ e $88,31 \pm 2,97\%$, entretanto esses valores foram obtidos após 120 hora de liberação. Kiani, Fathi e Ghasemi (2016) desenvolveram nanocápsula lipídica de vitamina D₃, na qual, cerca de 9,6% da liberação

de vitamina D₃ ocorreu após 2 horas em fluido gástrico simulado e 16,2%, ao longo das próximas 6 horas em meio intestinal simulado. Almouazen e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas poliméricas de calcidiol e calcitriol e obtiveram, pelo método de centrifugação, liberação de 27% para as nanopartículas de calcidiol e 64% para calcitriol durante 24 horas.

Para avaliar a cinética de liberação da vitamina D₃ a partir das formulações, os dados obtidos foram aplicados em diferentes modelos matemáticos (Tabela 13).

Tabela 13: Modelos matemáticos para avaliação da cinética de liberação *in vitro* de vitamina D₃ a partir das formulações.

Formulação	Modelo Matemático	Equação	R ²	J _S *	T _L **
E _{Nano}	Ordem-zero	Y = 0,34 x + 1,96	0,9820	1,71	0,011
	Higuchi	Y = 1,71 x + 0,18	0,9919		
	Primeira-ordem	Y = 0,04 x + 0,35	0,8998		
E _{MP}	Ordem-zero	Y = 0,20 x + 0,53	0,9910	1,03	0,264
	Higuchi	Y = 1,03 x - 0,53	0,9958		
	Primeira-ordem	Y = 0,05 x - 0,14	0,8906		
D-CLN	Ordem-zero	Y = 1,66 x + 9,62	0,9361	8,61	0,003
	Higuchi	Y = 8,61 x + 0,42	0,9902		
	Primeira-ordem	Y = 0,04 x + 1,01	0,8221		

* $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$; ** h.

J_S: fluxo estacionário. T_L: tempo de latência.

E_{MP}: emulsão transdérmica contendo vitamina D₃ (MP); E_{Nano}: emulsão transdérmica contendo nanopartícula de vitamina D₃; D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo vitamina D₃.

Esses modelos são utilizados para prever o mecanismo de liberação dos fármacos (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014). O modelo mais adequado é aquele que possui o maior valor de coeficiente de determinação (R²). Para todas as formulações a liberação de vitamina D₃ segue o modelo de pseudo-primeira-ordem, ou modelo de Higuchi, no qual a liberação de uma substância para o meio, a partir da matriz em que está inserida, é um processo de difusão que obedece à lei de Fick, sendo proporcional à raiz quadrada do tempo. Na Figura 20, observa-se para todas as formulações, que há um aumento lento e gradual na taxa de liberação da vitamina D₃ até que um pico discreto é notado, seguido por uma liberação relativamente sustentada.

A partir da determinação do modelo de Higuchi como o mais adequado, foram calculados o fluxo de liberação (J_s , $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$) e o tempo de latência (T_L , h), parâmetros também expostos na Tabela 13. Os resultados de fluxo de liberação das formulações estão de acordo com os percentuais de liberação obtidos, sendo que D-CLN exibiu o maior fluxo. O tempo de latência é o tempo necessário para atingir o fluxo constante, para todas as formulações o tempo de latência foi baixo, sendo inferior a 16 minutos.

5.7 ESTUDOS DE PERMEACÃO *EX VIVO*

O ensaio de permeação *ex vivo* é um instrumento importante para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos transdérmicos. O objetivo do ensaio é avaliar a capacidade do fármaco em atravessar as barreiras da pele, para que o mesmo seja absorvido em quantidade e velocidade adequadas para o alcance do efeito terapêutico desejado (RAPOSO, 2016).

No experimento, a quantidade real de ativo que permeia através da pele é representada não somente pela quantidade de fármaco presente no meio receptor, mas também pela quantidade retida na derme. Esta camada é vascularizada *in vivo*, dessa maneira, a quantidade de ativo presente nela é capaz de atingir a corrente sanguínea (COLIPA, 1997). Além disso, a pele utilizada possui sua microcirculação obliterada, podendo reter moléculas que permeariam *in vivo* (OECD, 2004). Assim, no presente trabalho a quantidade permeada foi definida como a soma do fármaco retida na epiderme viável e derme e no meio receptor. Entre as formulações testadas, somente no D-CLN a vitamina D₃ foi capaz de atingir o meio receptor, tanto em E_{Nano} como em E_{MP} não se detectou vitamina D₃ no meio receptor. A Tabela 14 apresenta os resultados da permeação.

A vitamina D₃ presente em D-CLN conseguiu alcançar o meio receptor, entretanto, apesar de ter sido detectada na análise cromatográfica, não foi possível sua quantificação, já que a concentração do ativo foi inferior ao LQ do método ($0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dessa forma, não foi viável a aplicação dos modelos matemáticos para a determinação da cinética de permeação. Comparando as formulações testadas, a presença de vitamina D₃ no meio receptor somente em D-CLN poderia indicar que a nanopartícula foi mais eficiente em promover a permeação do ativo, já que nas demais formulações a vitamina D₃ não foi detectada. Além disso, é importante mencionar que D-CLN foi a formulação que apresentou maior percentual de liberação de vitamina D₃. Entretanto, deve-se levar em consideração que a quantidade aplicada de vitamina D₃ nessa formulação foi maior em relação as demais, o que também poderia explicar a diferença encontrada.

Tabela 14: Permeação das formulações de vitamina D₃ nas camadas da pele.

Parâmetro	E _{MP}	E _{Nano}	D-CLN
Quantidade de vitamina D ₃ aplicada (mg)	0,0377	0,0377	0,1070
Vitamina D ₃ quantificada no meio receptor + EV + derme (µg)	2,39 (6,34%)	1,39 (3,69%)	2,61 (2,43%)
Vitamina D ₃ quantificada no EC (µg)	2,79 (7,40%)	1,25 (3,32%)	1,62 (1,51%)
Vitamina D ₃ Perdida (oclusor) (µg)	28,13 (74,61 %)	6,28 (16,67%)	-
Percentual de recuperação (%)	88,35	23,67	3,95
Percentual de permeação (%)	6,34	3,69	2,43

E_{MP}: emulsão transdérmica contendo vitamina D₃ (MP); E_{Nano}: emulsão transdérmica contendo nanopartícula de vitamina D₃; D-CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EV: epiderme viável; EC: estrato córneo.

Dados sobre a quantidade de vitamina D₃ aplicada no compartimento doador, a quantidade final presente nas soluções doadora e receptora, e a quantidade retida nas diferentes camadas da pele permitem calcular os percentuais de recuperação, sendo o ideal entre 85% a 115%. Entre os percentuais de recuperação obtidos, somente o da formulação E_{MP} se encontra dentro desta faixa, para as formulações contendo nanopartícula (E_{Nano} e D-CLN) os percentuais de recuperação foram baixos e fora da faixa ideal. Um fator que poderia ser responsável por esse resultado é a degradação da vitamina D₃. Como já foi descrito no tópico 5.4, a vitamina D₃ presente na nanopartícula demonstrou elevada degradação, principalmente na temperatura de 32 °C, apresentando teor de 78,29% após 24 h nesta temperatura. O que não ocorreu na matéria-prima de vitamina D₃, em que o teor permaneceu estável durante 7 dias nesta temperatura. Outro fator que poderia explicar os baixos percentuais de recuperação encontrados, seria a obtenção de quantidades permeadas abaixo do limite de detecção em alguns pontos de coleta, fazendo com que parte da vitamina D₃ não fosse quantificada. Ainda, a presença de luz pode ter influenciado nos resultados de recuperação, já que a vitamina D₃ sofre elevada degradação quando exposta a luz (HEMERY, 2015). Dessa forma, durante os experimentos o sistema foi mantido protegido da luz, porém, devido aos resultados obtidos, essa proteção pode não ter sido completa. Castro (2017), também relatou percentual de recuperação baixo, com valor inferior a 50% em estudos de permeação de emulsão transdérmica contendo vitamina D₃, quando foi aplicado dose finita de formulação e sistema exposto à luz.

Analisando os percentuais de permeação, observa-se que o maior valor encontrado foi para a formulação E_{MP} , seguido por E_{Nano} e D-CLN. Esses resultados podem ter sido influenciados pela degradação da vitamina D_3 , já que a mesma quando encapsulada na nanopartícula parece estar mais propensa a sofrer degradação, em relação à matéria-prima. Para emulsões transdérmicas, a dose usual utilizada é 1 g. Assim, considerando os percentuais de permeação obtidos, e a concentração das emulsões desenvolvidas (25.000 UI/g), um paciente utilizando E_{MP} teria 1.585 UI de vitamina D_3 em sua corrente sanguínea. Já para a formulação E_{Nano} , o valor seria de 922 UI. Para D-CLN não se aplicou esse raciocínio, já que a nanopartícula apresentou degradação elevada e baixo percentual de permeação. De acordo com esses resultados, E_{MP} e E_{Nano} seriam capazes de fornecer quantidades suficientes de vitamina D_3 para atender a recomendação nutricional de ingestão diária de vitamina D_3 do IOM (600-800 UI/d). No entanto, as formulações provavelmente não conseguiriam atingir as concentrações recomendadas para tratar a deficiência de vitamina D_3 (6.000 UI/d)

O fato de E_{MP} ter apresentado maior percentual de permeação entre as formulações nos estudos de permeação *ex vivo* não significa, necessariamente, que *in vivo* essa seja a melhor formulação para promover a permeação transdérmica da vitamina D_3 . Isso porque, a diminuição do tamanho de uma partícula, como em D-CLN, leva ao aumento na relação entre área de superfície e volume, aumentando dessa forma a reatividade da partícula (RIZVI; SALEH, 2018; GATOO et al., 2014). A maior área de superfície e reatividade demonstradas pela nanopartícula, poderiam influenciar na atividade *in vivo* da vitamina D_3 , fazendo com que mesmo concentrações mais baixas da molécula, fossem capazes de promover o efeito terapêutico. Porém, seriam necessários estudos *in vivo* para avaliar, se as quantidades permeadas de vitamina D_3 a partir das formulações, seriam suficientes para exercer os efeitos terapêuticos e também verificar qual formulação é mais eficiente em promover a permeação transdérmica da vitamina D_3 .

Alguns estudos sobre o uso transdérmico da vitamina D_3 encontram-se disponíveis na literatura científica. Alsaqr e colaboradores (2015) desenvolveram formulações (pomada) transdérmicas contendo lanolina anidra, vaselina, polietilenoglicóis (400 e 1500) e os promotores de permeação ácido oleico e dodecilamina e avaliaram a permeação de vitamina D_3 durante 24 horas, utilizando pele de porco. Os resultados demonstraram que essas formulações não foram capazes de promover a permeação de quantidades de vitamina D_3 suficientes para a suplementação nutricional. Somente quando a pele teve um pré tratamento durante 4 horas com etanol 50%, a formulação contendo dodecilamina foi capaz de promover a permeação de 760 ng de vitamina D_3/cm^2 . De acordo com os autores, uma dose diária de 400 UI poderia ser

atingida, aplicando-se a formulação em uma área de $3,6 \times 3,6$ cm de pele. Ramezanli e colaboradores (2017) produziram nanoesfera polimérica de vitamina D₃ e avaliaram a permeação em pele humana (proveniente de cadáver) dermatomizada, durante 12 horas. As quantidades de vitamina D₃ encontradas na epiderme foram superiores as quantificadas na derme. Ainda, no meio receptor não se detectou vitamina D₃. Assim, os autores concluíram que as nanoesferas de vitamina D₃ são viáveis para uso tópico. Costa e colaboradores (2018) investigaram duas formulações transdérmicas contendo vitamina D₃: um gel controle e um creme contendo promotores de permeação (lecitina de soja, palmitato de isopropila, etoxidiglecol propilenoglicol e álcool de cereais). A permeação foi avaliada durante 24 horas, utilizando pele humana (*full thickness*). Ao final do experimento, para o gel controle, somente uma pequena proporção de vitamina D₃ alcançou a derme + epiderme (1,83%), ficando a maior parte do ativo retido na superfície da pele (79,99%). Já para o creme contendo os promotores de permeação, a vitamina D₃ demonstrou elevada afinidade pelo veículo, não conseguindo alcançar a derme + epiderme, permanecendo retida na superfície da pele (90,98%). Em nenhuma das duas formulações a vitamina D₃ conseguiu atingir o meio receptor. Kim e colaboradores (2018) desenvolveram um sistema transdérmico para a administração de vitamina D₃, combinando nanopartículas de PLGA (do inglês, poly (lactic-co-glycolic acid) em microagulhas. O sistema foi submetido ao teste de permeação, com duração de 24 horas, utilizando pele de porco. Os resultados demonstraram elevada eficiência de permeação para o sistema desenvolvido (81,08%).

Diante do exposto, percebe-se que a administração da vitamina D₃ pela via transdérmica em quantidades suficientes para tratar a deficiência de vitamina D ainda é um desafio. As principais barreiras a serem enfrentadas para a administração do ativo por esta via são: a elevada lipofilicidade da molécula e sua tendência a sofrer degradação. Os estudos citados no parágrafo anterior demonstraram que o uso de tecnologias isoladas, como o desenvolvimento de cremes contendo promotores de permeação e a produção de nanopartículas, não foram capazes de promover a permeação de quantidades suficientes de vitamina D₃, para o tratamento da deficiência. Entretanto, a combinação de mais de uma tecnologia, como o desenvolvimento de nanopartículas e o uso de microagulhas, parece ser uma estratégia promissora para possibilitar a administração do ativo através da pele. Assim, conclui-se que a administração transdérmica da vitamina D₃ deve continuar sendo estudada, a fim de ser implantada como uma opção terapêutica para os pacientes.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que:

- O método de CLAE desenvolvido para quantificar a vitamina D₃ na emulsão transdérmica foi adequado aos objetivos e atendeu aos critérios de validação estabelecidos pela RDC 166;
- A homogeneização por alto cisalhamento, seguido de ultrassonicação produziu CLNs com características adequadas para aplicação tópica (TP = 192,5 nm; PDI = 0,13; PZ = 29,0 mV); formato esférico; eficiência de encapsulação de 99,75% e estáveis, em relação ao TP e PDI, durante 15 dias quando armazenada em geladeira e por pelo menos 30 dias à temperatura ambiente e 32 °C;
- D-CLN possibilitou a diminuição da citotoxicidade da vitamina D₃, quando avaliada em modelo de cultivo de células de fibroblastos murinos;
- As emulsões transdérmicas desenvolvidas promoveram a permeação de quantidades suficientes de vitamina D₃ para atender à recomendação nutricional de ingestão diária (600 UI). No entanto, são necessários novos estudos para possibilitar a permeação de quantidades suficientes para o tratamento da deficiência de vitamina D₃ (6.000 UI/d).

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A. et al. Stability of vitamin D₃ encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 143, p.379-383, 2014.
- ABDELBARY, G.; FAHMY, R.H. Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. **AAPS Pharm SciTech**, v. 10, n. 1, p.211-219, 2009.
- AL-AMIN, M. et al. Increased therapeutic efficacy of a newly synthesized tyrosinase inhibitor by solid lipid nanoparticles in the topical treatment of hyperpigmentation. **Drug Design, Development And Therapy**, v. 10, p.3947-3957, 2016.
- ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal Of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p.26-40, 2012.
- ALI, H. et al. Preparation, characterization, and anticancer effects of simvastatin–tocotrienol lipid nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 389, n. 1-2, p.223-231, 2010.
- ALLEVATO, M.A. Sistemas Terapéuticos Transdérmicos. **Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas**, v. 30, p. 154-166, 2007.
- ALMEIDA, M.M. **Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética**. 2012. 181 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ALMOUAZEN, E. et al. Nano-encapsulation of Vitamin D₃ Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and in Vitro Evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p.1137-1146, 2012.
- ALSAQR, A.; RASOULLY, M.; MUSTEATA, F.M. Investigating Transdermal Delivery of Vitamin D₃. **AAPS Pharmscitech**, v. 16, n. 4, p.963-972, 2015.
- ANDONOVA, V.; PENEVA, P. Characterization Methods for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 43, p.6630-6642, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=3337&monodroga=S&situacaoRegistro=V>>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- APOSTOLAKIS, M. et al. Vitamin D and cardiovascular disease. **Maturitas**, v. 115, p.1-22, 2018.
- ARAÚJO, J. et al. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): in vitro and ex vivo studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 6, p.1034-1041, 2012.

ATEF, S.H. Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 175, p.136-137, 2018.

AUTIER, P.; GANDINI, S.; MULLIE, P. A Systematic Review: Influence of Vitamin D Supplementation on Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentration. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 8, p.2606-2613, 2012.

BABY, A.R. et al. Influence of Urea, Isopropanol, and Propylene Glycol on Rutin In Vitro Release from Cosmetic Semisolid Systems Estimated by Factorial Design. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 3, p.272-282, 2009.

BAERT, B. et al. A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 218-230, 2010.

BALLARD, J.M. et al. Degradation of vitamin D₃ in a stressed formulation: The identification of esters of vitamin D₃ formed by a transesterification with triglycerides. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p.142-150, 2007.

BARENHOLZ, Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal Of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p.117-134, 2012.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p.143-161, 2016.

BIKLE, D.D. Vitamin D Assays. **Frontiers Of Hormone Research**, v. 50, p.14-30, 2018.

BIKLE, D.D. Vitamin D metabolism and function in the skin. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 347, n. 1-2, p.80-89, 2011.

BIKLE, D.D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 3, p.319-329, mar. 2014.

BLACK, L.J. et al. Analytical Bias in the Measurement of Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Impairs Assessment of Vitamin D Status in Clinical and Research Settings. **Plos One**, v. 10, n. 8, p.1-13, 2015.

BOBO, D. et al. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 10, p.2373-2387, 2016.

BOLZINGER, M. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p.156-165, 2012.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N.J. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 55, n. 9, p.1193-1205, 2 out. 2013.

BOUILLON, R. Extra-Skeletal Effects of Vitamin D. **Frontiers Of Hormone Research**, v. 50, p.72-88, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de julho de 2017.

BRUGGER, S.D.; BOMAR, L.; LEMON, K.P. Commensal–Pathogen Interactions along the Human Nasal Passages. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 7, p.1-9, 2016.

CARVALHO, I.P. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no transporte de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica in vitro em células de câncer de bexiga**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

CASHMAN, K.D. et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic?. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 4, p.1033-1044, 2016.

CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 8, p.566-575, 2011.

CHEN, S.; SUN, Y.; AGRAWAL, D.K. Vitamin D deficiency and essential hypertension. **Journal Of The American Society Of Hypertension**, v. 9, n. 11, p.885-901, 2015.

CHRISTAKOS, S. et al. Intestinal Regulation of Calcium: Vitamin D and Bone Physiology. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p.3-12, 2017.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p.365-408, 2016.

COLIPA. Cosmetic ingredients: Guidelines for percutaneous Absorption/ Penetration, 1997.

COSTA, G.M. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D₃**. 2017. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

COSTA, G.M. et al. Is Vitamin D₃ Transdermal Formulation Feasible? An Ex Vivo Skin Retention and Permeation. **AAPS Pharmscitech**, v. 19, n. 5, p.2418-2425, 2018.

D'SOUZA, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances In Pharmaceutics**, v. 2014, p.1-12, 2014.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p.1-17, 2018.

DAWIDCZYK, C.M. et al. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal Of Controlled Release**, v. 187, p.133-144, 2014.

DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Effective use of transdermal drug delivery in children. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 73, p.63-82, 2014.

DEMIRBILEK, M. et al. VitD3-loaded solid lipid nanoparticles: stability, cytotoxicity and cytokine levels. **Journal Of Microencapsulation**, v. 34, n. 5, p.454-462, 2017.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E.B.; SILVA, A.M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p.1-18, 2014.

ELOI, M. et al. Vitamin D deficiency and seasonal variation over the years in São Paulo, Brazil. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 12, p.3449-3456, 2016.

FERREIRA, C.E. et al. Consensus – reference ranges of vitamin D [25(OH)D] from the Brazilian medical societies. Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC/ML) and Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 6, p. 377-381, 2017.

FERREIRA, H.S.; RANGEL, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**. v. 32, n.7, p. 1860-1870. 2009.

FLATEN, G.E. et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p.10-24, 2015.

FREEMAN, J. et al. Performance evaluation of four 25-hydroxyvitamin D assays to measure 25-hydroxyvitamin D2. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 16-17, p.1097-1104, 2015.

GALESANU, C.; MOCANU, V. Vitamin d deficiency and the clinical consequences. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**. v.119, n.2, p 310-318, 2015.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry And Pharmacy**, v. 6, p.37-56, 2017.

GARCÊS, A. et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p.159-167, 2018.

GATOO, M.A. et al. Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-8, 2014.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science And Engineering: C**, v. 68, p.982-994, 2016.

GIL, A.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M.D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. **Annals Of Nutrition And Metabolism**, v. 72, n. 2, p.87-95, 2018.

GINDE, A.A.; LIU, M.C.; CAMARGO C.A. Demographic Differences and Trends of Vitamin D Insufficiency in the US Population, 1988-2004. **Archives of Internal Medicine**. v. 169, n. 6, p. 626-632, 2009.

GOFF, C.L. et al. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. **Practical Laboratory Medicine**, v. 2, p.1-14, 2015.

GOMES, J.G. et al. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal Of Nanomedicine**, p.1231-1242, 2014.

GONCALVES, A. et al. Fat-soluble vitamin intestinal absorption: Absorption sites in the intestine and interactions for absorption. **Food Chemistry**, v. 172, p.155-160, 2015.

GRADY, L.T.; THAKKER, K.D. Stability of Solid Drugs: Degradation of Ergocalciferol (Vitamin D₂) and Cholecalciferol (Vitamin D₃) at High Humidities and Elevated Temperature. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.69, n.9, p. 1099-1102, 1980.

GROSSMANN, R.E.; TANGPRICHA, V. Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: A systematic review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n.8, p.1055-1061, 2010.

HEMERY, Y.M. et al. Influence of light exposure and oxidative status on the stability of vitamins A and D₃ during the storage of fortified soybean oil. **Food Chemistry**, v. 184, p.90-98, 2015.

HOLICK, M.F. et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p.1911-1930, 2011.

HOLICK, M.F.; CHEN, T.C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p.1080-1086, 2008.

HOLICK, M.F. Cancer, sunlight and vitamin D. **Journal Of Clinical & Translational Endocrinology**, v. 1, n. 4, p.179-186, 2014.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline on Validation of Analytical Procedure Methodology (Q2BR1), Geneva, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, ver. 7, 2018.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 10993-5: 2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Genebra, 2009.

JAISWAL, P.; GIDWANI, B.; VYAS, A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v. 44, n. 1, p.27-40, 2014.

JAMPILEK, J.; BRYCHTOVA, K. Azone analogues: classification, design, and transdermal penetration principles. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 5, p.907-947, 2012.

- JEON, S.M.; SHIN, E.A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 4, p.1-14, 2018.
- JEPPS, O.G. et al. Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p.152-168, 2013.
- JONES, G.; KAUFMANN, M. Vitamin D metabolite profiling using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 164, p.110-114, 2016.
- JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 359-370.
- KADAPPAN, A.S. et al. The Efficacy of Nanoemulsion-Based Delivery to Improve Vitamin D Absorption: Comparison of In Vitro and In Vivo Studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 4, p.1-24, 2018.
- KALAYCIOGLU, G.D.; AYDOGAN, N. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 510, p.77-86, 2016.
- KATHE, N.; HENRIKSEN, B.; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 12, p.1565-1575, 2014.
- KHOKHAR, A.; CASTELLS, S.; PEREZ-COLON, S. Genetic Disorders of Vitamin D Metabolism. **Clinical Pediatrics**, v. 55, n. 5, p.404-414, 2016.
- KIANI, A.; FATHI, M.; GHASEMI, S.M. Production of novel vitamin D₃ loaded lipid nanocapsules for milk fortification. **International Journal Of Food Properties**, v. 20, n. 11, p.2466-2476, 2016.
- KIM, H.; GATER, D.L.; KIM, Y. Development of transdermal vitamin D₃ (VD₃) delivery system using combinations of PLGA nanoparticles and microneedles. **Drug Delivery And Translational Research**, v. 8, n. 1, p.281-290, 2018.
- KUMAR, S.; RANDHAWA, J.K. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. **Materials Science And Engineering: C**, v. 33, n. 4, p.1842-1852, 2013.
- LANE, M.E. Skin penetration enhancers. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p.12-21, 2013.
- LEE, S.M. et al. The impact of VDR expression and regulation in vivo. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 177, p.36-45, 2018.
- LEHMAN, P.A.; RANEY, S.G. In vitro percutaneous absorption of ketoprofen and testosterone: comparison of pluronic lecithin organogel vs. pentravan cream. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 16, n.3, 2012.

LIBERATO, S.C; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Fortification of industrialized foods with vitamins. **Revista de nutrição**, v. 19, n. 2, p.215-231, 2006.

LIPS, P. Relative Value of 25(OH)D and 1,25(OH)2D Measurements. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 22, n. 11, p.1668-1671, 2007.

LOEWEN, A.; CHAN, B.; LI-CHAN, E.C. Optimization of vitamins A and D₃ loading in re-assembled casein micelles and effect of loading on stability of vitamin D₃ during storage. **Food Chemistry**, v. 240, p.472-481, 2018.

LOSQUADRO, W.D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics Of North America**, v. 25, n. 3, p.283-289, 2017.

MA, Y.; JOHNSON, C.S.; TRUMP, D.L. Mechanistic Insights of Vitamin D Anticancer Effects. **Vitamin D Hormone**, p.395-431, 2016.

MAEDA, S.S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p.411-433, 2014.

MANAIA, E.B. et al. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 12, p.4991-5011, 2017.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p.1-37, 2009.

MARTINS, S.A. **Drug delivery across blood-brain barrier by means of intravenous administration of lipid nanoparticles**. 2012. 321 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2012a.

MARTINS, S.M. et al. Development and validation of a simple reversed-phase HPLC method for the determination of camptothecin in animal organs following administration in solid lipid nanoparticles. **Journal Of Chromatography B**, v. 880, p.100-107, 2012b.

MARWAH, H. et al. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p.564-578, 2016.

MASON, R.S.; REICHRATH, J. Sunlight Vitamin D and Skin Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p.83-97, 2013.

MATHES, S.H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69-70, p.81-102, 2014.

MATHIAS, N.R.; HUSSAIN, M.A. Non-invasive Systemic Drug Delivery: Developability Considerations for Alternate Routes of Administration. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p.1-20, 2010.

MAURYA, V. K.; AGGARWAL, M. Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. **Journal Of Food Science And Technology**, v. 54, n. 12, p.3753-3765, 2017.

MAZAHERY, H.; VON HURST, P. Factors Affecting 25-Hydroxyvitamin D Concentration in Response to Vitamin D Supplementation. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p.5111-5142, 2015.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p.83-101, 2012.

MILLER, W.L. Genetic disorders of Vitamin D biosynthesis and degradation. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 165, p.101-108, 2017.

MOCELLIN, S. Vitamin D and cancer: Deciphering the truth. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1816, n. 2, p.172-178, 2011.

MOHAMMED, H.A. et al. Immunomodulatory and Immunosuppressive Roles of 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in Autoimmune Diseases. **Scandinavian Journal Of Immunology**, v. 85, n. 2, p.95-103, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MOSTAFA, W.Z.; HEGAZY, R.A. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship. **Journal Of Advanced Research**, v. 6, n. 6, p.793-804, 2015.

MUDSHINGE, S.R. et al. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 3, p.129-141, 2011.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n.1, p.161-177, 2000.

NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p.318-326, set. 2000.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5280795. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280795>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

NEYESTANI; GHARAVI; KALAYI. Determination of Serum 25-hydroxy Cholecalciferol Using High-Performance Liquid Chromatography: A Reliable Tool for Assessment of Vitamin D Status. **International Journal For Vitamin And Nutrition Research**, v. 77, n. 5, p.341-346, 2007.

NORMAN, P.E.; POWELL, J.T. Vitamin D and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 114, n. 2, p.379-393, 2014.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance document for the conduct of skin absorption studies, n. 28, 2004.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance notes on dermal absorption, n. 156, 2011.

PALL CORPORATION. Selection Guide: Separation Products for Centrifugal and Tangential Flow Filtration. Disponível em: <<https://laboratory.pall.com/content/dam/pall/laboratory/literature-library/non-gated/id-7046.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

PAUCAR, O.C. et al. Production by spray chilling and characterization of solid lipid microparticles loaded with vitamin D3. **Food And Bioproducts Processing**, v. 100, p.344-350, 2016.

PELCZYNSKA, M. et al. Antiproliferative activity of vitamin D compounds in combination with cytostatics. **Anticancer Research**, v. 26, p. 2701-2706, 2006.

PEPPAS, N.A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, v. 190, p.75-81, 2014.

PEREIRA, R.O. et al. Ex vivo Skin Permeation Evaluation of An Innovative Transdermal Vehicle Using Nimesulide and Piroxicam as Model Drugs. **Current Drug Delivery**, v. 14, n. 4, p.516-520, 2017.

PERES, L.B. et al. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p.317-323, 2016.

PIKE, J.W.; CHRISTAKOS, S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, v. 46, n. 4, p.815-843, 2017.

PIKE, J.W.; MEYER, M.B. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, v. 39, n. 2, p.255-269, 2010.

PLANZ, V.; LEHR, C.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal Of Controlled Release**, v. 242, p.89-104, 2016.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D supplementation guidelines. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 175, p.125-135, 2018.

POLONINI, H. et al. Transdermal Oxandrolone: Ex Vivo Percutaneous Absorption Study. **Current Drug Delivery**, v. 14, n. 5, p.696-700, 2017.

POLONINI, H.C. et al. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and in vitro drug release. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p.720-727, 2014a.

POLONINI, H.C. et al. Evaluation of Percutaneous Absorption Performance for Human Female Sexual Steroids into Pentravan Cream. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.18, n.4, p.332-340, 2014b.

POLONINI, H.C. **Permeação transdérmica de formulações tópicas contendo hormônios sexuais e eco toxicidade aquática de micro e nano partículas de titanato de bário.** Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação em saúde, Universidade de Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014c.

PONTRELLI, G.; MONTE, F. A two-phase two-layer model for transdermal drug delivery and percutaneous absorption. **Mathematical Biosciences**, v. 257, p.96-103, 2014.

POPADIC, S. et al. Antiproliferative Effect of Vitamin A and D Analogues on Adult Human Keratinocytes in vitro. **Skin Pharmacology And Physiology**, v. 21, n. 4, p.227-234, 2008.

PRIETL, B. et al. Vitamin D and Immune Function. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p.2502-2521, 2013.

RAMEZANLI, T. et al. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1-2, p.196-203, 2017.

RAPOSO, F.J. **Desenvolvimento de um dispositivo tecnológico para a fabricação de filmes transdérmicos: possíveis aplicações para a terapêutica individualizada com tadalafila.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

REBOUL, E. Intestinal absorption of vitamin D: from the meal to the enterocyte. **Food & Function**, v. 6, n. 2, p.356-362, 2015.

REICHRATH, J.; NÜRNBERG, B. Cutaneous vitamin D synthesis versus skin cancer development. **Dermato-Endocrinology**, v. 1, n. 5, p.253-261, 2009.

REJNMARK, L. et al. Non-skeletal health effects of vitamin D supplementation: A systematic review on findings from meta-analyses summarizing trial data. **Plos One**, v. 12, n. 7, p.1-39, 2017.

RIBEIRO, K.V. et al. Bacteriophage Isolated from Sewage Eliminates and Prevents the Establishment of Escherichia Coli Biofilm. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 1, p.85-95, 2018.

RIDOLFI, D.M. et al. In vitro cytotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial and dermal cells. **Journal Of Physics: Conference Series**, v. 304, p.1-4, 2011.

RIZVI, S.A.; SALEH, A.M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p.64-70, 2018.

RIZWANULLAH, M. et al. Phytochemical based nanomedicines against cancer: current status and future prospects. **Journal Of Drug Targeting**, v. 26, n. 9, p.731-752, 2017.

ROSS, A. C. et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 1, p.53-58, 2011.

SACCONI, D.; ASANI, F.; BORNMAN, L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. **Gene**, v. 561, n. 2, p.171-180, 2015.

SAHU, M. et al. Medicated transdermal therapeutic systems: an updated overview. **International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences**. v.7, n.1, p. 43-49, 2017.

SCHLEICHER, R.L. et al. National Estimates of Serum Total 25-Hydroxyvitamin D and Metabolite Concentrations Measured by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in the US Population during 2007–2010. **The Journal Of Nutrition**, v. 146, n. 5, p.1051-1061, 2016.

SCHNATZ, P.F.; MANSON, J.E. Vitamin D and Cardiovascular Disease: An Appraisal of the Evidence. **Clinical Chemistry**, v. 60, n. 4, p.600-609, 2014.

SENA, L.W. **Obtenção e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de murumuru (*astrocaryum murumuru* mart.)**. 2016. 116 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SILVA, A. et al. Lipid Nanoparticles for the Delivery of Biopharmaceuticals. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 4, p.291-302, 2015.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SMITH, M.C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p.5779-5787, 2017.

SOLDATI, P.P. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para aplicação tópica**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

SU, H. et al. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. **Journal Of Applied Toxicology**, v. 38, n. 1, p.3-24, 2017.

SU, Z.; NARLA, S.N.; ZHU, Y. 25-Hydroxyvitamin D: Analysis and clinical application. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, p.200-205, 2014.

TAPEINOS, C.; BATTAGLINI, M.; CIOFANI, G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. **Journal Of Controlled Release**, v. 264, p.306-332, 2017.

THATIPAMULA, R.P. et al. Formulation and in vitro characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Daru**, v. 19, n.1, p. 23-32, 2011.

THEERAKITTAYAKORN, K.; BUNPRASERT, T. Differentiation Capacity of Mouse L929 Fibroblastic Cell Line Compare With Human Dermal Fibroblast. **International Journal of Medical and Health Sciences**, v.5, n.2, p. 51-53, 2011.

TSIARAS, W; WEINSTOCK, M. Factors Influencing Vitamin D Status. **Acta Dermato Venereologica**, v. 91, n. 2, p.115-124, 2011.

TURER, C.B.; LIN, H.; FLORES, G. Prevalence of Vitamin D Deficiency Among Overweight and Obese US Children. **Pediatrics**, v. 131, n. 1, p.152-161, 2013.

UMAR, M. et al. Vitamin D and the Pathophysiology of Inflammatory Skin Diseases. **Skin Pharmacology And Physiology**, v. 31, n. 2, p.74-86, 2018.

UNER, M. et al. Therapeutic Potential of Drug Delivery by Means of Lipid Nanoparticles: Reality or Illusion?. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 43, p.6573-6591, 2017.

USP –The United States Pharmacopeia. 37. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

VAN GELE, M. et al. Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations. **Expert Opinion On Drug Delivery**, v. 8, n. 6, p.705-720, 2011.

VITORINO, C. et al. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. **Journal Of Controlled Release**, v. 167, n. 3, p.301-314, 2013.

VUOLO, L. et al. Vitamin D and Cancer. **Frontiers In Endocrinology**, v. 3, p.1-13, 2012.

WIEDERSBERG, S.; GUY, R.H. Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting!. **Journal Of Controlled Release**, v. 190, p.150-156, 2014.

WIELDERS, J.P. et al. Automated Competitive Protein-Binding Assay for Total 25-OH Vitamin D, Multicenter Evaluation and Practical Performance. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, v. 29, n. 6, p.451-461, 2015.

WIMALAWANSA, S.J.; RAZZAQUE, M.S.; AL-DAGHRI, N.M. Calcium and vitamin D in human health: Hype or real? **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 180, p.4-14, 2018.

WISSING, S.A.; KAYSER, O; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p.1257-1272, 2004.

ZIEGLER, T.E. et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D_{2&3} and 1,25-dihydroxyvitamin D_{2&3} by tandem mass spectrometry: A primate multispecies comparison. **American Journal Of Primatology**, v. 77, n. 7, p.801-810, 2015.

**ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA HUMANA UFJF**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Taxa de absorção transdérmica de produtos dermatológicos.

Pesquisador: NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84453418.4.0000.5147

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.698.850