UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO

# DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS

PONTA GROSSA
2020

GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO

# DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Profª Drª Jessica Mendes Nadal

PONTA GROSSA
2020

Camargo, Guilherme dos Anjos
C172 Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da eficiência de encapsulação de nanocápsulas poliméricas contendo Tacrolimus/ Guilherme dos Anjos Camargo. Ponta Grossa, 2020.
113 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração – Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.
Coorientadora: Profa. Dra. Jéssica Mendes Nadal.

1. Imunossupressor. 2. Lactona macrolídea. 3. Poli(ε-caprolactona). 4. Sistema de liberação cutânea. I. Farago, Paulo Vitor. II. Nadal, Jéssica Mendes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. Universidade Estadual do Centro-Oeste- Mestrado em Ciências Farmacêuticas. V. T.

CDD: 615.7

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986

Ponta Grossa, 19 de fevereiro de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 02/2020 DO MESTRANDO **GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO** REALIZADA NO DIA 19 DE FEVEREIRO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezenove dias de fevereiro de dois mil e vinte, às 14h00min, no Auditório do Hall Tecnológico, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando Guilherme dos Anjos Camargo, na linha de pesquisa: Desenvolvimento de fármacos, medicamentos e correlatos, constituída pelo Professor Doutor Paulo Vitor Farago (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Professora Doutora Barbara Celânia Fiorin (UEPG/PR) e Professora Doutora Mona Lisa Smionatto Gomes (Unicesumar/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.
O título do trabalho foi: **"DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS"**
Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se pela aprovação da dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒
Novo título: _____

Paulo Vitor Farago 1 - (DEFAR-UEPG) - Presidente

Barbara Celânia Fiorin - (DEQUIM-UEPG) – Titular

Mona Lisa Simionatto Gomes 3 - (UNICESUMAR) – Titular

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as forças que Ele me concedeu durante essa nova trajetória, me guiando por todos os obstáculos e vitórias. Iluminando meu caminho e nunca me fazendo desistir dos meus sonhos. A sua presença foi o que me fez sempre acreditar.

Aos meus pais, Artur e Cleonice, por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial. Por vocês fui guiado a nunca deixar de estudar e que isso era o bem mais precioso que alguém pode ter, que ninguém pode me tirar. Nunca mediram esforços para me ajudar a chegar até onde cheguei. Serei sempre grato a vocês por ser quem sou.

Aos meus amigos (Ale, Tamy, Ana, Evelyn, Valter, Jéssica Mollina), que acabam sendo a família que Deus colocou na minha vida. Sem vocês provavelmente não chegaria até aqui e enfrentaria todos os obstáculos que existiram. Vocês sempre estão lá para o que eu precisar e sei que posso sempre contar com vocês.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Vitor Farago, que mais uma vez me deu a oportunidade de continuar crescendo para alcançar minha vocação como pesquisador.

À minha grande coorientadora, Drª Jéssica Mendes Nadal, a quem tenho imensa admiração e inspiração. Obrigado por toda paciência, parceria, incentivo e por acreditar em mim. Ser seu aluno me motiva a ser cada vez melhor, justamente pela profissional e pessoa incrível que você é. Obrigado!

As professoras da banca, Drª Mona Lisa Simionatto Gomes e Drª Barbara Celânia Fiorin, por aceitarem o convite de compor a banca, pelo tempo destinado à correção do trabalho e todas as contribuições realizadas.

As minhas colegas de laboratório e pesquisa (Adriana, Bruna, Loanda, Ana Paula, Amanda, Ana Beatriz, Rosana) que enfrentam junto comigo todos os obstáculos diários da pesquisa. Rimos, choramos, desabafamos, comemoramos.

Vocês deixam o mundo UEPG muito mais leve e a vontade de vir todos os dias pro laboratório muito mais fácil.

À profª Fernanda Malaquias Barboza, que além de ter sido minha professora na graduação, hoje é colega de laboratório e uma grande amiga. Obrigado por todo o ensinamento e os perrengues diários, por toda ajuda, motivação e inspiração. Acredito que por onde você passa, faz todos quererem ser um pouco “Fernanda” – saber sobre tecnologia farmacêutica, ao mesmo tempo que se preocupa com o paciente e no momento seguinte está ali rindo junto com a gente. Você é incrível!

À laboratorista Elizabete Munhoz, nossa mãezona na UEPG. Obrigado por todos – e realmente todos – os dias que passamos, almoçamos, comemoramos, conversamos, rimos e tudo mais por aqui. Por sempre estar disposta a ajudar quando precisava de algo. Pelas caronas na hora de ir embora, pelos “bom dia, cadeirudo” quando chegava ou “Isso são horas de bolsista chegar? Vou descontar”. Com certeza você foi peça fundamental em todo esse trabalho. Obrigado por ser esse ser humano maravilhoso!

À laboratorista, mestranda, química e colega de classe, Luciane Mendes Monteiro, por todo convívio, por todas as risadas, pelas dificuldades enfrentadas nas aulas de Química Orgânica Avançada, pela ajuda nos sufocos, quando precisava de algum reagente ou vidraria. Você sempre estava lá, obrigado!

À laboratorista Marilene Terezinha Barbosa, por todo cuidado especial com meus camundongos no NAEVI-UEPG, além de todo carinho e amizade. Mais pessoas deveriam ser como você por aqui, obrigado!

À profª Drª Barbara Celânia Fiorin, pela ajuda durante esse trabalho e com certeza, por todo incentivo durante esses anos que trabalhamos juntos, sempre dizendo que eu deveria seguir em frente na pesquisa. Sempre terei imensa admiração e gratidão. Obrigado por tudo!

A todos os professores que me ajudaram nos experimentos deste e trabalhos posteriores, (Drª Andressa Novatski, Dr. Thiago de Castro Rozada, Dr. Flávio Luis

Beltrame, Dr. Leandro Lipinski, Drª Patrícia Mathias Döll Boscardin, MSc. Priscila de Brito), obrigado!

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/UNICENTRO pela oportunidade de realizar o mestrado e a todos os nossos professores pelos ensinamentos repassados.

À CAPES pela oportunidade da bolsa de mestrado.

Ao CLABMU e CLABMU-SEBISA, com seus técnicos, por todas as análises realizadas.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho. Muito obrigado!

“Se você não sabe descrever aquilo que está fazendo como um processo, então você não sabe o que está fazendo”.

(William Edwards Deming)

## RESUMO

Tacrolimus (TAC) é uma lactona macrolídea pertencente ao grupo dos inibidores de calcineurina, com ação imunomoduladora tópica em casos de dermatite atópica, psoríase e vitiligo. A aplicação tópica do TAC não produz efeitos adversos significativos, porém a sensação de queimação transitória, ondas de calor no local de aplicação e o prurido acarretam em baixa adesão ao tratamento. Portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação pode ser desenvolvido para intensificar a permeação cutânea e reduzir a dose aplicada topicamente, minimizando os efeitos adversos e mantendo a eficácia terapêutica. Diante do exposto, este trabalho objetiva desenvolver e avaliar nanopartículas poliméricas contendo TAC, empregando o polímero poli(*ε*-caprolactona) pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, variando a concentração do fármaco entre 0,1 e 5 mg/mL. Os sistemas poliméricos foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. A estabilidade físico-química das formulações foi avaliada por um período de até 120 dias. O método analítico para a determinação do TAC nas formulações foi validado conforme o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *The International Conference on Harmonization*. A estabilidade do fármaco frente à hidrólise ácida e alcalina também foi investigada. As nanocápsulas poliméricas contendo TAC foram preparadas com êxito pelo procedimento escolhido. Os sistemas nanoparticulados apresentaram formato esférico com uma superfície lisa e regular e tamanho médio de partícula de aproximadamente 250 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,3 e potencial zeta superior a -30 mV. A difração de raios X confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se prioritariamente em dispersão molecular no núcleo oleoso das nanocápsulas. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier e Raman asseguraram que o processo de nanoencapsulação não resultou em ligações químicas entre o TAC e o polímero. As nanocápsulas poliméricas mantiveram-se estáveis até um período de 90 dias, a partir do qual alterações de pH e potencial zeta começaram a modificar significativamente. As formulações apresentaram eficiência de encapsulação superior a 96%, sendo que o método analítico empregado se mostrou comprovadamente seletivo, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso, exato e robusto, mostrando-se capaz de quantificar o TAC nanoencapsulado nos sistemas poliméricos, fornecendo resultados confiáveis. Em relação a estabilidade do fármaco frente a degradação ácida e básica, foi possível observar que o mesmo é suscetível a degradação em ambos os meios, porém sendo mais estável em meio ácido. Portanto, os resultados fornecem uma base experimental para considerar as formulações uma estratégia viável de administração tópica, que pode figurar como uma alternativa a forma comercial atualmente empregada.



**Palavras-chave:** Imunossupressor. Lactona macrolídea. Poli(*ε*-caprolactona). Sistema de liberação cutânea.

## ABSTRACT

Tacrolimus (TAC) is a macrolide lactone belonging to calcineurin inhibitor group, with topical immunomodulatory action in cases of atopic dermatitis, psoriasis and vitiligo. The topical application of TAC does not produce a significant side effects, but the sensation of transient burning, hot flashes at the application site and the pruritus lead to decrease treatment adhesion. Therefore, the development of drug delivery systems can be outlined to enhance skin permeation and reduce the topically applied, dose have been formulated to minimize side effects and maintain therapeutic efficacy. In this sense, this work aims to develop and evaluate TAC-loaded polymeric nanoparticles using poly(ε-caprolactone) polymer by interfacial polymer deposition method, altering the drug concentration between 0.1 and 5 mg/mL. The polymeric systems were characterized by morphological, spectroscopic and thermal studies. The physicochemical stability of the formulations was evaluated in a period up to 120 days. The analytical method for determination of TAC in these formulations was validated as recommended by Agência Nacional de Vigilância Sanitária and The International Conference on Harmonization. The stability of the drug against acid and alkaline hydrolysis was also investigated. TAC-loaded polymeric nanocapsules were successfully prepared by the chosen method. The nanoparticulate systems presented spherical shape with a smooth and regular surface and average particle size of approximately 250 nm, polydispersion index below 0.3 and zeta potential over -30 mV. X-ray diffraction confirmed that the encapsulation method was efficient and the drug primarily is in molecular dispersion in the nanocapsule oil nucleus. Raman and Fourier transform infrared spectra ensured that nanocapsulation process did not result in chemical bonds between TAC and polymer. The polymeric nanocapsules were stable for up to 90 days, where changes in pH and zeta potential began to change significantly. The formulations presented encapsulation efficiency higher than 96%, and the analytical method used proved to be selective, linear for suggested range, accurate, precise and robust, being able to quantify the nanoencapsulated TAC in the polymeric systems, providing reliable results. About hydrolisis assays, was possible to observe that TAC was susceptible to degradation in both medium, but being more stable in the acid medium. With this, the results provide an experimental basis for formulations both as a viable topical and alternative administration strategy, which may appear as an alternative to the commercial form currently employed.



**Keywords:** Immunosuppresive. Macrolide lactone. Poli(ε-caprolactone). Skin delivery system.

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 12**

**2 OBJETIVOS ..... 14**

2.1 OBJETIVO GERAL ..... 14

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 14

**3 REVISÃO DA LITERATURA ..... 15**

3.1 NANOTECNOLOGIA ..... 15

3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS ..... 19

3.3 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS ..... 23

3.3.1 Poli(ε-caprolactona) ..... 26

3.4 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO TACROLIMUS (TAC) ..... 28

**4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 34**

4.1 EQUIPAMENTOS ..... 34

4.2 REAGENTES E SOLVENTES ..... 35

4.2.1 Fármaco ..... 35

4.2.2 Polímero ..... 35

4.2.3 Água Purificada ..... 35

4.2.4 Solventes e Demais Reagentes ..... 35

4.2.5 Materiais ..... 36

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL ..... 36

4.4 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO TACROLIMUS ..... 37

4.4.1 Mistura Física ..... 40

4.5 DETERMINAÇÃO DO TACROLIMUS INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS ..... 40

4.5.1 Validação do Método Analítico para Quantificação do Tacrolimus ..... 40

4.5.2 Estudo da Degradação Forçada ..... 43

4.5.2.1 Espectrometria de massas ..... 43

4.5.2.2 Preparo da amostra....44
4.5.3 Eficiência de Encapsulação ....44
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS....45
4.6.1 Liofilização ....45
4.6.2 Determinação do pH ....45
4.6.3 Análises Morfológicas e de Superfície ....46
4.6.3.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta ....46
4.6.3.2 Análise da morfologia e superfície ....46
4.6.4 Análise Estrutural ....46
4.6.4.1 Análise por difração de raios x ....46
4.6.4.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho ....47
4.6.4.3 Avaliação por espectroscopia raman ....47
4.6.5 Análise Térmica ....47
4.6.5.1 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria ....47
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA....48
**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ....49**
5.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO TACROLIMUS....49
5.2 DETERMINAÇÃO DO TACROLIMUS INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS....51
5.2.1 Desenvolvimento e Otimização do Método Analítico ....51
5.2.2 Validação do Método Analítico para a Quantificação do TAC 53_Toc40185218
5.2.3 Estudo da Degradação Forçada ....59
5.2.3.1 Espectrometria de massas....60
5.2.4 Eficiência de Encapsulação ....66
5.3 DETERMINAÇÃO DO pH....67
5.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE ....68
5.4.1 Análise da Morfologia e Superfície....68
5.4.2 Determinação do Diâmetro Médio e do Potencial Zeta....72

5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL....75
5.5.1 Análise por Difração de Raios X....75
5.5.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho....77
5.5.3 Análise por Espectroscopia Raman....80
5.6 ANÁLISE TÉRMICA....83
5.6.1 Termogravimetria....84
5.6.2 Calorimetria Diferencial Exploratória....89
5.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA....91
**6 CONCLUSÕES....97**
**REFERÊNCIAS....98**

# 1 INTRODUÇÃO

Pacientes submetidos a um tratamento prolongado com determinados medicamentos, especialmente aqueles com estreita relação entre dose terapêutica e tóxica, necessitam ser monitorados, quantificando-se periodicamente o fármaco ou seus metabólitos nos fluidos biológicos, principalmente os fármacos da classe dos imunossupressores. Por isso, existe um evidente estímulo para monitorização biológica desses fármacos, bem como a necessidade de estudar seus parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e tóxicos, além de sempre respeitar os ajustes individuais (GARCIA *et al.*, 2004).

Com o advento dos imunossupressores para a manutenção, principalmente, de órgãos transplantados, diversas teorias têm sido levantadas quanto ao seu uso crônico, uma vez que não somente pacientes transplantados o utilizam. Inclusive questiona-se o seu uso em doenças agudas e inflamatórias da pele, tais como a dermatite atópica (YU *et al.*, 2018; SAVIĆ *et al.*, 2017; LAPTEVA *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2011; NAM; JI; PARK, 2011; YIN; XU; LUO, 2011; EL-BATAWY *et al.*, 2009; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008), psoríase (WAN *et al.*, 2017a; WAN *et al.*, 2017b; JAIN *et al.*, 2016; GABRIEL *et al.*, 2016; LAPTEVA *et al.*, 2014; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008; MOREIRA, 2008) e vitiligo (BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008).

O tacrolimus (TAC) ou FK506 é uma lactona macrolídea isolada da fermentação da bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, que pertence ao grupo dos inibidores de calcineurina, utilizado como alternativa terapêutica à ciclosporina. O principal mecanismo de ação do TAC é atuar no sistema imunológico e diretamente nas células da pele (YU *et al.*, 2018; DHEER *et al.*, 2018; LIENDO *et al.*, 2017; WAN *et al.*, 2017a; WAN *et al.*, 2017b; SAVIĆ *et al.*, 2017; GABRIEL *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2016; LAPTEVA *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2011; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008; MOREIRA, 2008; BUIJSCH, 2007; GARCIA *et al.*, 2004).

A aplicação tópica do TAC não produz efeitos adversos sistêmicos significativos, porém a sensação de queimação transitória, ondas de calor no local de aplicação e o prurido, frequentemente, levam à suspensão da terapia com a pomada, diminuindo a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, quando os pacientes são tratados com a pomada por um período de 3 semanas, a sensação de queimação torna-se mais intensa com o aumento da dose. Para pacientes cujo tempo de

tratamento é de 12 semanas, podem surgir efeitos adversos sistêmicos, como sintomas semelhantes à gripe, eritema e dores de cabeça (YU *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2017).

Assim sendo, este fármaco tem sido amplamente explorado em doenças relacionados à pele e muitos grupos de pesquisa estão trabalhando nessa área. A capacidade de permeação eficaz do TAC na pele é limitada devido a alta massa molecular, a alta hidrofobicidade e a baixa solubilidade em água. Portanto, torna-se viável formular um sistema percutâneo de liberação deste fármaco que aumente a permeação na pele em relação à pomada convencional e, consequentemente, reduza a dose para o tratamento das doenças cutâneas (DHEER *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2018; NAM; JI; PARK, 2011).

Estudos recentes com micelas poliméricas, utilizando pele humana, demonstraram que ocorre maior deposição do fármaco na camada dérmica e a penetração mais profunda acarreta em aumento da sua ação terapêutica e reduz os efeitos adversos (DHEER *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2018; NAM; JI; PARK, 2011). Entretanto, a quantidade de estudos sobre sistemas de liberação para o TAC é reduzida. Micelas poliméricas, microemulsões e microesferas foram os sistemas encontrados na literatura, porém não foram relatados estudos com nanocápsulas do poliéster biodegradável poli($\varepsilon$-caprolactona) (PCL) para uso tópico. Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e quantificar nanocápsulas poliméricas contendo TAC, para futura avaliação da penetração cutânea das mesmas e para redução dos efeitos adversos causados pelo fármaco quando utilizado pela via tópica no tratamento de doenças autoimunes cutâneas.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, quantificar, caracterizar e avaliar a estabilidade físico-química dos sistemas poliméricos para a liberação modificada do tacrolimus.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanocápsulas poliméricas a partir do poliéster biodegradável poli($\varepsilon$-caprolactona) contendo o TAC, segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente;
- Proceder à determinação quantitativa do TAC incorporado nas nanocápsulas pelo método de cromatografia líquida de ultra eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Efetuar a caracterização das nanocápsulas poliméricas por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas.

# 3 REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 NANOTECNOLOGIA

Há muitos séculos, os pesquisadores da área da saúde procuram entender e auxiliar o corpo humano na cura e recuperação frente a uma enfermidade. Com o avanço da ciência, inúmeras tecnologias foram criadas para melhor ajudar nessa investigação. Entre elas, uma das mais proeminentes e com maior rapidez de desenvolvimento é a nanotecnologia (COIMBRA, 2013).

Essa tecnologia tem sido reconhecida como a tecnologia chave do século 21 devido ao seu rápido desenvolvimento e crítico indicador da competência tecnológica dos países, já que ela contribui para a competitividade e o crescimento sustentável em vários campos de aplicação industrial. As organizações fazem investimentos significativos em tecnologias avançadas, na esperança de obter vantagens nos mercados que rapidamente mudam. O crescente interesse em pesquisas relacionadas a essa área a torna como um novo pilar para o conhecimento, com imensos impactos científicos e tecnológicos. Vários governos têm priorizado a nanotecnologia em sua agenda de desenvolvimento de ciência e tecnologia, sendo continuamente refletidas e discutidas, e assim, gerando novas propostas de ações com o objetivo de superar desafios globais apresentados em escala municipal, estadual e/ou nacional. Uma estimativa é que o impacto econômico global da nanotecnologia seja de pelo menos três trilhões de dólares até 2020, o que poderá empregar até 6 milhões de trabalhadores nas crescentes indústrias que utilizam essa tecnologia no mundo (ZHIDEBEKKYZY; KUPESHOVA; YESMURZAYEVA, 2019; QI *et al.*, 2018; DIMER *et al.*, 2013; BARIL *et al*., 2012).

Dentre os principais temas debatidos para o avanço da nanotecnologia destacam-se os relacionados à área da saúde, incluindo o desenvolvimento, caracterização, e à produção de fármacos, medicamentos, estruturas, matérias-primas e materiais inovadores e tradicionais, abrangendo a ciência de nanomateriais, possibilitando uma melhora direta nos diagnósticos, prevenção e tratamento de doenças sem curas ou com prognóstico severo, como câncer, infecções, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, entre outros. Além da utilização dos nanomateriais em engenharia de tecidos e implantes para a fabricação de estruturas para regenerar o tecido dentro do corpo e direcionar e liberar de forma efetiva algumas

drogas em um sistema de liberação modificado (SHI; LAMMERS, 2019; SUN *et al.*, 2019; WAHLICH *et al.*, 2019; ZAVISOVA *et al.*, 2019; ROSTAMI; SAZGARNIA, 2019; COTY; VAUTHIER, 2018; GUERRERO-ARELLANO, 2017; PERRIE, 2016; DIMER *et al.*, 2013). A expectativa mundial é que essa tecnologia represente um poderoso instrumento na pesquisa e desenvolvimento em várias áreas, sendo esperada, também, uma grande revolução no mercado farmacêutico mundial, justamente porque a nanotecnologia é aplicada diariamente na população e com isso, muda suas vidas de forma constante (ZHIDEBEKKYZY; KUPESHOVA; YESMURZAYEVA, 2019; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; BOHOLM; LARSSON, 2019; MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

Essa área de conhecimento emergente e inovação tecnocientífica possui natureza interdisciplinar, já que seus avanços provêm de diversas ciências, como engenharia, química, física, biologia e ciências farmacêuticas, as quais têm focado em formular ingredientes farmacêuticos ativos para esses produtos com habilidades novas e mais eficientes (MALEKI; KARIMPOUR; MALEKI DIZAJ, 2018; POZAS, 2016; COIMBRA, 2013; MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

A nanotecnologia monitoriza, repara, constrói e controla componentes e funções biológicas em humanos mediante o uso de sistemas em nanoescala. Como já citado, a união com a medicina a converte em uma importante opção terapêutica e diagnóstica para múltiplas enfermidades. O combate das doenças em escala molecular permite um diagnóstico precoce e uma forma muito mais especifica de combater as células afetadas. Com isso, desenvolver nanomedicamentos eficientes requer um melhor entendimento de seus mecanismos de ação, incluindo as interações que ocorrem entre as nanopartículas e os sistemas biológicos – já que essas partículas possuem biocompatibilidade e estabilidade coloidal em soluções fisiológicas. Ademais, as pesquisas na área vêm buscando novas formas de administração e melhoria da absorção com maior tempo de ação do fármaco (ZAINAL-ABIDIN *et al.*, 2019; ZAVISOVA *et al.*, 2019; COTY; VAUTHIER, 2018; MALEKI; KARIMPOUR; MALEKI DIZAJ, 2018; SMITH *et al.*, 2018; GUERRERO-ARELLANO, 2017; MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

A função dos sistemas de liberação de fármacos é transportar os ativos através do organismo, melhorando a sua estabilidade frente a degradação química, física e/ou enzimática e facilitando a difusão através das barreiras biológicas. Isso acarreta na penetração pelas células e melhoram a farmacodinâmica e

farmacocinética, além de minimizar os efeitos adversos local e/ou sistêmico. Outro fator importante é o de prolongar seu tempo de ação e reduzir sua frequência de administração (WAHLICH *et al.*, 2019; SILVA, 2017; GUERRERO-ARELLANO, 2017; RIGON *et al.*, 2017; MARCHETTI, SARAIVA, 2009; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

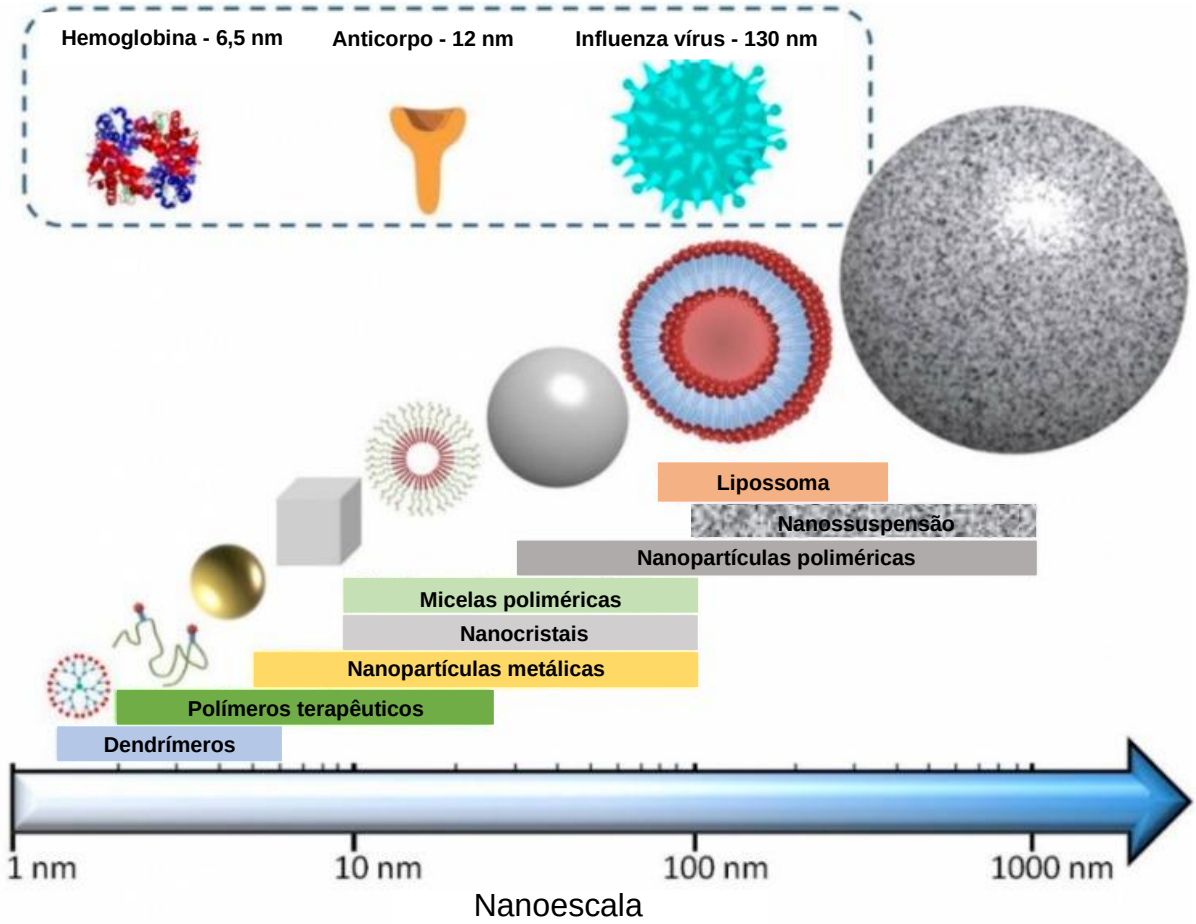
Segundo Perrie (2016), o pequeno tamanho e a grande área de superfície, em relação à proporção de volume das formulações, melhoram a potência e a eficácia dos fármacos, pois aumentam a sua solubilidade e taxa de dissolução, modificam a distribuição e melhoram o direcionamento ao alvo. A melhor solubilidade e dissolução deve-se a conjugação do fármaco a substâncias solúveis em água, formulados como partículas de fármacos nanodimensionados ou incorporados a nanopartículas. Além disso, a biodisponibilidade do fármaco pode aumentar prevendo a eliminação renal do mesmo e protegendo-o contra a liberação pelo sistema fagocítico mononuclear.

A taxa de liberação de forma controlada e direcionada é uma abordagem muito atraente já que resulta no máximo impacto terapêutico com simultânea diminuição dos efeitos indesejáveis causados em suas formas convencionais de uso (MALEKI; KARIMPOUR; MALEKI DIZAJ, 2018; NAKHLBAND *et al.*, 2018).

Portanto, o fundamento tecnológico da nanotecnologia atribui-se as ciências do desenho, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cujo tamanho varia, em geral, de 1 a 100 nanômetros (nm) podendo abranger a manipulação individual de átomos, moléculas ou fótons, com construção e operação de dispositivos de veiculação de fármacos (SHI; LAMMERS, 2019; ROSTAMI; SAZGARNIA, 2019; MEHTA *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2018; GUERRERO-ARELLANO, 2017; PEÑALOZA *et al.*, 2017; CLEBSCH; WATANABE, 2017; BHATIA, 2016; PERRIE, 2016; COIMBRA, 2013; BARIL *et al.*, 2012; HANEMANN; SZABÓ, 2010; MARCHETTI, SARAIVA, 2009). Segundo Perrie (2016) e Marchetti e Saraiva (2009), essa classificação de tamanho permanece em aberto e há certa ambiguidade sobre o que é considerado nanotecnológico já que partículas em ampla faixa de tamanho costumam ser enquadradas como nanotecnologia, uma vez que basear os sistemas nanoestruturados apenas em tamanho é insensato já que a eficiência e utilidade desses sistemas de liberação de fármaco não deve-se somente ao tamanho. A *Food and Drug Administration* (FDA) (2014) costuma considerar 1.000 nm como limite máximo mais apropriado quanto à projeção de materiais a serem tratados como nanotecnológicos, desde que a partícula possua propriedades dependentes do tamanho.

O sistema nanométrico é composto de pelo menos dois componentes: o princípio ativo, ou molécula biologicamente ativa, e o próprio sistema. Os principais nanocarreadores aplicados na terapêutica são os lipossomas, nanopartículas poliméricas ou lipídicas, micelas, nanocristais, dendrímeros, anticorpos, entre outros. A Figura 1 demonstra a dimensão de algum desses sistemas. A escolha do carreador mais adequado do fármaco depende de diversos fatores que podem afetar a biodistribuição e o seu sítio ativo (WAHLICH *et al.*, 2019; BUSATTO *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2018; GUERRERO-ARELLANO, 2017; PERRIE, 2016; VIEIRA; GAMARRA, 2016; DIMER *et al.*, 2013; CISMARU; POPA, 2010).

FIGURA 1 – Sistemas nanométricos e aproximação da faixa de tamanho




Fonte: **Adaptado de** WAHLICH, J.; DESAI, A.; GRECO, F.; HILL, K.; JONES, A. T.; MRSNY, R. J.; PASUT, G.; PERRIE, Y.; SEIB, F. P.; SEYMOUR, L. W.; UCHEGBU, I. F. Nanomedicines for the delivery of biologics. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1–14, 2019.

Segundo Perrie (2016), já existem vários produtos autorizados para uso clínico que podem ser classificados como nanomedicamentos. Alguns deles já foram aprovados há vários anos, tendo sido registrados antes mesmo da criação da

classificação dos produtos nanotecnológicos. O primeiro produto lipossomal aprovado pelo FDA foi o Doxil® (nome fantasia comercializado nos EUA), o qual possui a doxurrubicina encapsulada em lipossoma. Devido à capacidade dos lipossomas melhorarem a direção da doxurrubicina para os locais com tumor, esse medicamento foi o primeiro utilizado no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA) relacionada com o sarcoma de Kaposi, sendo hoje em dia autorizado para outras indicações antitumorais.

## 3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas representam uma alternativa tecnológica com excelente biocompatibilidade, não imunogênica, não tóxica e biodegradável. O seu campo de estudo está rapidamente crescendo e ganhando um papel importante em diversas áreas tecnológicas. A importância dessas partículas começou quando os pesquisadores descobriram que o tamanho pode influenciar nas propriedades físico-químicas do fármaco, assim como nas propriedades ópticas (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; GUERRERO-ARELLANO, 2017; BHATIA, 2016; DIMER *et al.*, 2013; YADAV, H. K. S.; *et al.*, 2012; WOLINKSY; COLSON; GRINSTAFF, 2012).

Essas partículas em escala nanométrica atraíram crescente interesse de todos os ramos farmacêuticos por conta de sua facilidade de obtenção; direcionamento do fármaco ao alvo específico; capacidade de entregar os ativos numa dosagem menor da convencional, aumentando a sua eficiência terapêutica, diminuindo os efeitos adversos e, sendo assim, acarretando na melhor adesão do paciente ao tratamento. Com isso, o desenvolvimento dessa tecnologia é guiado pelo desejo de melhorar a sobrevida global e a sua qualidade (ZHANG; ZHANG; ZHU, 2019; KIM; GRIFFITH; PANYAM, 2019; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; GUERRERO-ARELLANO, 2017; PEÑALOZA *et al.*, 2017; BHATIA, 2016; NAGAVARMA *et al.*, 2012; WOLINKSY; COLSON; GRINSTAFF, 2012).

Segundo Zavisova *et al.* (2019), Nagavarma *et al.* (2012) e Cismaru e Popa (2010), o tamanho nanométrico e a utilização de polímeros melhora a permeação das mesmas através das membranas celulares, eleva a sua estabilidade e aumenta a permanência na corrente sanguínea, assim como também, protege as partículas contra agregação ou aglomeração.

De acordo com Carter; Narasimhan e Wang (2019), Guerrero-Arellano (2017), Bhatia (2016), Nagavarma *et al.* (2012) e Cismaru e Popa (2010), as principais vantagens, de forma geral, das nanopartículas poliméricas são:

- Capacidade de proteger a molécula encapsulada frente a eventual degradação;
- Capacidade de atravessar as barreiras biológicas como pele, mucosas e barreira hematoencefálica;
- Capacidade de alcançar os órgãos e tecidos no qual realizará sua ação, seja de forma passiva ou ativa;
- Capacidade de atingir compartimentos intracelulares;
- Capacidade de controlar a liberação do ativo em seu sítio de ação, aumentando a sua concentração no local;
- Capacidade de responder a estímulos (pH, temperatura, etc);
- Estabilidade por longo período, podendo ser estocada por vários meses;
- Decréscimo da toxicidade do ativo;
- Aumento da biodisponibilidade;
- Aumento da solubilidade;
- Decréscimo da variabilidade paciente-paciente;
- Aumento da estabilidade de qualquer fármaco volátil.

As aplicações desse tipo de sistema na área médica exigem que essas partículas tenham alto valor elétrico, tamanho entre 10 e 1000 nm e uma distribuição de tamanho de partícula estreita. A sua detecção em tecidos pode ser realizada por meio de interações antígeno-anticorpo usando anticorpos marcados com substâncias fluorescentes, enzimas, compostos radioativos ou ouro coloidal (ZHANG; ZHANG; ZHU, 2019; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; NAGAVARMA *et al.*, 2012).

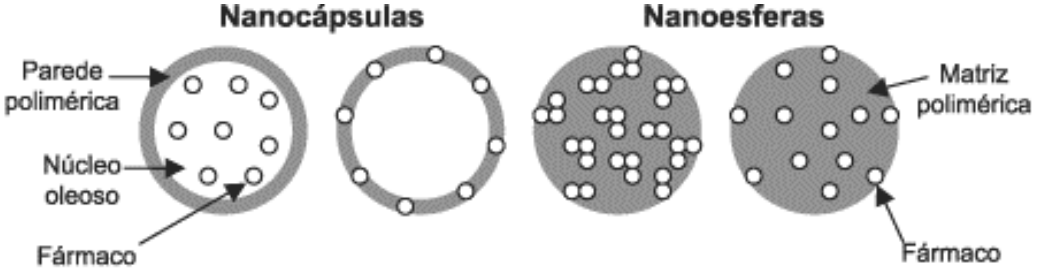
Quando se trata de um sistema de liberação controlada transepidermal, as nanopartículas poliméricas frequentemente mostram liberação superior do ativo e penetração mais profunda. Com isso, grupos de pesquisa têm mostrado que nanopartículas variando de 50 a 500 nm são ótimas opções para esse sistema de liberação, isso por conta das vantagens que apresentam, como aderência ao paciente em comparação a outras vias de administração invasivas dolorosas e evasão do efeito

de primeira passagem causado no fígado por administração oral (CARTER; NARASIMHAN; WANG, 2019). Segundo Bhatia (2016), partículas com tamanho na faixa de 500-1000 nm conseguem atingir as camadas mais superficiais da pele, enquanto as com tamanho inferior são capazes de penetrar até camadas mais profundas.

Essas partículas poliméricas não são moléculas simples e contém várias camadas. A camada superficial pode ser funcionalizada com uma variedade de moléculas pequenas, como, íons metálicos, surfactantes e outros polímeros; a camada da casca, que é quimicamente diferente do núcleo e o próprio núcleo, que é a parte central da nanopartícula (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; GUERRERO-ARELLANO, 2017; DIMER *et al.*, 2013).

Elas são consideradas partículas sólidas coloidais e podem se apresentar na forma de nanocápsulas ou nanoesferas, de acordo com a estrutura, composição e método de preparação, como representado na Figura 2. As nanocápsulas, ou reservatórios, são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas, ou sistema matricial, não contêm óleo na sua formação, mas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido uniformemente (IYISAN; LANDFESTER, 2019; ZHANG; ZHANG; ZHU, 2019; NAKHLBAND *et al.*, 2018; RIGON *et al.*, 2017; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; BHATIA, 2016; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; NAGAVARMA *et al.*, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

FIGURA 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas




**Fonte: Adaptado de** SCHAFFAZICK, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

Os mecanismos de liberação do fármaco em sistemas poliméricos ocorre por várias maneiras diferentes, sendo eles: 1) intumescimento das nanopartículas por

hidratação seguida de liberação por difusão; 2) reação química ou enzimática resultando na ruptura, clivagem ou degradação do polímero no local de entrega, liberando o fármaco do núcleo interno; 3) dissociação do fármaco do polímero e sua adsorção/liberação das partículas intumescidas; 4) difusão através da matriz polimérica; 5) bombeamento osmótico e 6) erosão (SOUMYA; SAHU, 2017; KAMALY *et al.*, 2016; NAGAVARMA *et al.*, 2012).

A nanoencapsulação é conhecida como o processo ou tecnologia responsável pela incorporação ou revestimento de substâncias ativas por um material protetor, essas podem liberar seu conteúdo de forma controlada ou em condições específicas, como a temperatura e o pH. Os sistemas carreadores nanoestruturados podem exibir diferentes formas dependendo dos materiais e métodos utilizados em sua preparação (MALEKI; KARIMPOUR; MALEKI DIZAJ, 2018; FREIRE, 2017).

Segundo Iyisan e Landfester (2019), Bhatia (2016), Nagavarma *et al.* (2012) e Schaffazick *et al.* (2003), existem vários métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas que são classificadas de acordo com o tipo de partícula que se deseja formar. Esses processos podem ser classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* dos monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados, como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona e, ainda, os copolímeros de ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico. Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas.

A escolha dos materiais utilizados na produção é de grande importância, principalmente nos casos de nanocápsulas poliméricas, por conta da variedade de polímeros existentes e como eles podem influenciar no perfil de liberação, no tamanho da partícula e no potencial zeta do sistema. Além disso, o uso de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis reafirmam o comprometimento com o desenvolvimento sustentável. A escolha do polímero deve ser realizada de acordo com o princípio ativo, pois se o fármaco for hidrofílico, o polímero será de característica apolar e o meio será oleoso, se o fármaco for lipofílico ocorre de maneira inversa. Polímeros são materiais muito convenientes para fabricação de inúmeros projetos que podem ser integrados na construção de nanopartículas com aplicações médicas potenciais (HERNANDEZ-PATLAN *et al.*, 2019; MEHTA *et al.*, 2019; FREIRE, 2017; SILVA, 2017; RIGON *et al.*, 2017; NAGAVARMA *et al.*, 2012). Estes polímeros são muitas vezes hidrofóbicos e são idealmente adequados para uso a longo prazo e

estabilização interna de fármacos insolúveis em água (WOLINKSY; COLSON; GRINSTAFF, 2012).

De acordo com Zhang; Zhang; Zhu (2019), o primeiro medicamento com nanopartícula polimérica foi aprovado pelo FDA em 1997, composto por PLGA carreando acetato de leuprolida na forma injetável. A partir desse, vários outros produtos foram desenvolvidos.

## 3.3 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição). Portanto, um polímero é uma macromolécula formado por inúmeras unidades de repetição ligadas por ligação covalente, onde cada mero é composto por um monômero. Cada monômero deve ter pelo menos funcionalidade 2, ou seja, dois pontos reativos. A bifuncionalidade pode ser obtida com a presença de grupos funcionais e/ou duplas ligações reativas. Além disso, o monômero deve ser capaz de se combinar com outros monômeros para ocorrer a reação de polimerização. Dependendo dos grupos químicos formadores dos mesmos e da quantidade de meros por cadeia é possível classificá-los e verificar sua massa molecular (MM), que é importante para muitas das propriedades físicas do polímero (CANEVAROLO, 2002).

Como os polímeros normalmente envolvem uma faixa larga de valores de massa molecular, é normal encontrar grande variação de propriedades físicas, que ao modificar o tamanho da cadeia, altera essa propriedade como um todo. Isso é vantajoso ao produzir vários tipos de polímeros com diferentes MM para atender às necessidades particulares de uma dada aplicação ou técnica de processamento. Polímeros de interesse comercial apresentam geralmente MM > 10.000 g/mol (CANEVAROLO, 2002).

A utilização de um novo produto depende de suas propriedades e principalmente de seu custo, o qual, no caso de polímeros, deve-se ao custo do processo de polimerização e disponibilidade do monômero. Sendo assim, as principais fontes de matérias-primas para a produção dos monômeros são as naturais, como a celulose e borracha natural; o carvão mineral de onde se gera o etileno e, por fim, os advindos do petróleo, que é a fonte mais importante, de onde produz, por exemplo, o PCL (BRITO *et al.*, 2011; CANEVAROLO, 2002).

O material que carrear o fármaco ou a molécula biologicamente ativa deve ser química e biologicamente inerte, assim como seus produtos de degradação, para não causar nenhuma reação ou dano ao organismo e deve ser biodegradável, além de liberar diretamente o fármaco no local desejado. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação a outros materiais deve-se a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, fios, dentre outros), custo razoável e a facilidade de encontrar materiais com as propriedades necessárias para as aplicações específicas (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; DING *et al.*, 2016; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os polímeros sintéticos têm sido amplamente empregados na produção de nanopartículas poliméricas para veiculação de fármacos, proteínas e peptídeos. A escolha do polímero adequado irá depender da aplicação terapêutica requerida. Para decidir a melhor opção, deve-se verificar as características físico-químicas, como viscosidade e higroscopicidade, além de que, o polímero deve ser biocompatível e ter capacidade de liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o desenvolvimento. Além disso, vários dos polímeros sintéticos possuem cinética de degradação conhecida e podem ser sintetizados de forma controlada e reprodutiva (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; RANCAN; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2014; SEVERINO *et al.*, 2011).

Uma das formas de classificar os polímeros sintéticos é dividi-los em não-biodegradáveis e biodegradáveis. A diferença entre eles, é que os biodegradáveis não precisam ser removidos cirurgicamente e são amplamente utilizados na área farmacêutica por conta de sua segurança e biocompatibilidade, sendo os principais representantes os poliésteres alifáticos. Esses poliésteres não possuem toxicidade e são biodegradáveis pelo fato de, em ambiente aquoso sofrerem degradação hidrolítica e/ou enzimática mediante a clivagem de ligações éster originando ácidos hidroxicarboxilícos atóxicos, que são metabolizados a dióxido de carbono e água, pela via do ciclo do ácido cítrico e são excretados na urina. Os fatores que influenciam essa degradação são a composição polimérica, MM do polímero, pH e a força iônica do meio (NAKHLBAND *et al.*, 2018; SEVERINO *et al.*, 2011; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Segundo Villanova; Oréfice; Cunha (2010), os polímeros biodegradáveis são aqueles que sofrem degradação macromolecular *in vivo* graças a ação de enzimas, microrganismos ou de células do sistema imune. O processo de degradação envolve

quebra da cadeia polimérica e, com isso, a modificação da MM e da solubilidade do polímero. Outros processos biológicos, físicos e químicos também podem atuar na biodegradação.

A Tabela 1 lista alguns polímeros sintéticos mais utilizados na formulação de sistemas de liberação de fármacos.

TABELA 1 – Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistemas de liberação de fármacos

| ***Polímeros não biodegradáveis*** |
|---|
| - Acrilatos: poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(ácido acrílico) (PA), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA) |
| - Acrilamidas: poliacrilamida, poli(*N*-isopropilacrilamida) |
| - Polidimetilsiloxano (PDMS) |
| - Copolímeros de acetato de etilenovinil (EVA) |
| - Polivinilpirrolidona (PVP) |
| ***Polímeros biodegradáveis*** |
| - Poliésteres: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-coglicólico) (PLGA), poli(ε-caprolactona) (PCL), poli(diaxanona) (PDS) |
| - Poliortoésteres |
| - Polifosfazenos |
| - Polianidridos |
| - Poliuretanas |
| - Poliaminoácidos sintéticos |

Fonte: **Adaptado de** SILVA, M. C. P. **Micro/nanopartículas poliméricas e biodegradáveis de mesocarpo de babaçu: ação imunomoduladora na polarização de macrófagos e efeito anti-leishmania**. 2017, 91 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2017.

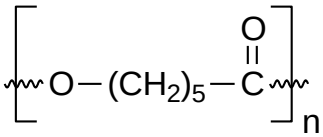
Os principais grupos funcionais suscetíveis à hidrólise são os ésteres, *orto*-ésteres, anidridos, carbonatos, amidas, uretanas e outros. Os poliésteres alifáticos, poliamidas, poliuretanas, polianidridos, polifosfoéteres e as polifosfazonas se degradam via hidrólise química ou enzimática (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Se a biodegradação for enzimática por microrganismos, a cadeia polimérica deve-se ajustar nos sítios ativos das enzimas e

isto acontece graças a flexibilidade dessas cadeias (SIQUEIRA *et al.*, 2018; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

### 3.3.1 Poli(ε-caprolactona)

Poli(ε-caprolactona), cuja estrutura encontra-se mostrado na Figura 3, foi um dos primeiros polímeros sintetizados na década de 1930 e tornou-se comercialmente atrativo, principalmente durante a ascensão dos polímeros entre as décadas de 70 e 80, pelo fato de ser um polímero sintético que pode ser degradado por microrganismos. A sua síntese ocorre por polimerização do monômero cíclico ε-caprolactona – cujo anel é primeiramente clivado e aberto – utilizando uma variedade de catalisadores aniônicos, catiônicos, de ordenação e/ou radicais livres. Cada método afeta na MM, que pode variar de 3.000 a 80.000 g/mol, assim como a distribuição dessa massa e composição dos grupos químicos (JANMOHAMMADI; NOURBAKHSH, 2019; ABAMOR *et al.*, 2018; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

FIGURA 3 - Estrutura química do PCL




Fonte: O autor

O PCL é um poliéster alifático sintético linear, derivado do petróleo, semi-cristalino, hidrofóbico, biocompatível, biodegradável – apesar de não ser de fonte natural –, barato e solúvel em uma grande variedade de solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano, e 2-nitropropano à temperatura ambiente; levemente solúvel em acetona, acetato de etila, dimetilformaldeido e acetonitrila. Possui baixa temperatura de fusão (59 a 64 °C), temperatura de transição vítrea ($T_v$) entre -65 a -60 °C, temperatura de decomposição acima de 350 °C e propriedades reológicas e viscoelásticas superiores a outros poliésteres, o que o torna fácil de manipular, permitindo obter uma ampla gama de produtos de custo baixo (BOSE *et al.*, 2019; CHAN *et al.*, 2019; KIM, 2019; HIVECHI; BAHRAMI; SIEGEL, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2018; ABAMOR *et al.*, 2018; AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018; KAMALY *et al.*, 2016; JUSTUS *et al.*, 2015; PIRES;

BIERHALZ; MORAES, 2015; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; LABET; THIELEMANS, 2009; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

De acordo com Feng *et al.* (2019) e Abamor *et al.* (2018), o PCL é aprovado pelo FDA para a utilização na biomedicina e na indústria farmacêutica, o que atrai o interesse de inúmeros pesquisadores que desejam utilizar esse polímero na área clínica.

Além disso, é um termoplástico, ou seja, um plástico com a capacidade de amolecer e fluir quando sujeito a um aumento de temperatura e pressão. Quando retirado esses fatores, o polímero solidifica-se em um produto com formas definidas e devido a isso, ele possui amplas aplicações tecnológicas. Ademais, outras características também são muito atrativas como boa tenacidade, flexibilidade e compatibilidade com outros polímeros sintéticos (SIQUEIRA *et al.*, 2018; LABET; THIELEMANS, 2009; CANEVAROLO, 2002). Essa compatibilidade depende das razões empregadas e é geralmente utilizado para melhorar o controle da permeabilidade dos sistemas carreadores (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A degradação desse polímero é mais lenta e acontece sob condições fisiológicas em duas etapas. A primeira ocorre a clivagem hidrolítica não enzimática dos grupos ésteres da camada amorfa e a segunda, quando o polímero está mais cristalino e com uma baixa MM (menos de 3.000 g/mol), macrófagos e fagócitos promovem sua degradação intracelularmente, sendo assim, absorvido completamente pelo organismo, indicando que o PCL também é bioabsorvível. A vantagem da utilização desse polímero é que o mesmo evita a criação de um ambiente ácido no tecido, além de possuir estabilidade *in vitro* (JANMOHAMMADI; NOURBAKHSH, 2019; JUSTUS *et al.*, 2015; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; LABET; THIELEMANS, 2009). Segundo Woodruff; Hutmacher (2010) e Labet; Thielemans (2009), a primeira etapa da degradação é idêntica à observada na hidrólise *in vitro* a 40 °C e obedece a cinética de primeira ordem. A sua degradação é autocatalisado pelos ácidos carboxílicos liberados durante a hidrólise.

A biodegradação do PCL é lenta quando comparada a outros polímeros, por isso é mais adequado para a entrega de moléculas ativas a longo prazo. Nas últimas décadas, o PCL tem sido muito importante na área farmacêutica para desenvolver sistemas de liberação controlada especialmente de peptídeos e proteínas (HIVECHI;

BAHRAMI; SIEGEL, 2019; CHAN *et al.*, 2019; BOSE *et al.*, 2019; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

## 3.4 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO TACROLIMUS (TAC)

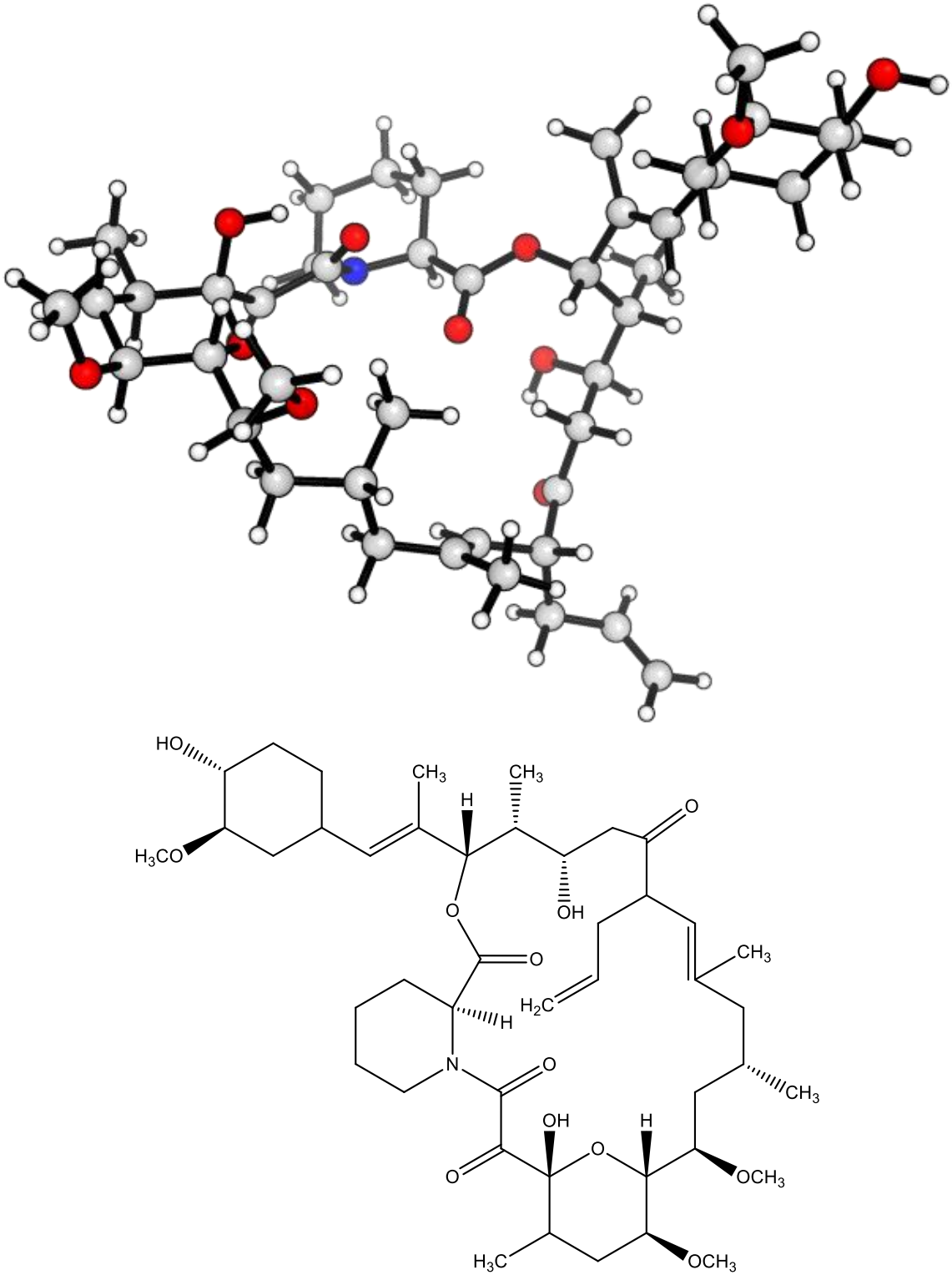
Pacientes submetidos a um tratamento prolongado com determinados medicamentos, especialmente aqueles com estreita relação entre dose terapêutica e tóxica, necessitam ser monitorados, quantificando-se periodicamente o fármaco ou seus metabólitos nos fluidos biológicos, principalmente os fármacos da classe dos imunossupressores. Por isso, existe um potente estímulo para monitorização biológica desses fármacos, bem como a necessidade de estudar seus parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos, além de sempre estar respeitando os ajustes individuais (GARCIA *et al.*, 2004).

Com o advento dos imunossupressores para a manutenção principalmente de órgãos transplantados, diversas teorias têm sido levantadas quanto ao seu uso crônico, uma vez que não somente pacientes transplantados o utilizam. Inclusive questiona-se o seu uso em doenças agudas e inflamatórias da pele, tais como a dermatite atópica (YU *et al.*, 2018; SAVIĆ *et al.*, 2017; LAPTEVA *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2011; NAM; JI; PARK, 2011; YIN; XU; LUO, 2011; EL-BATAWY *et al.*, 2009; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008), psoríase (WAN *et al.*, 2017a; WAN *et al.*, 2017b; JAIN *et al.*, 2016; GABRIEL *et al.*, 2016; LAPTEVA *et al.*, 2014; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008; MOREIRA, 2008) e vitiligo (BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008).

Tacrolimus (TAC) ou FK506, cuja fórmula molecular é $C_{44}H_{69}NO_{12}$ e a estrutura química está representada na Figura 4, é uma lactona macrolídea hidrofóbica isolada da fermentação da bactéria *Streptomyces tsukubaensis,* descoberta em 1984 para uso como antifúngico. Pertence ao grupo dos inibidores de calcineurina – proteína citoplasmática ativada pela enzima cálcio fosfatase 2B – utilizado como alternativa terapêutica à ciclosporina. O TAC atua no sistema imunológico e diretamente nas células da pele, além de possuir efeito neurorregenerativo e neuroprotetor (FIORENTINI; KHURRAM, 2019; KITA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018; DHEER *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2017; LIENDO *et al.*, 2017; WAN *et al.*, 2017a; WAN *et al.*, 2017b; SAVIĆ *et al.*, 2017; GABRIEL *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2016; LAPTEVA *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2011; LAN *et al.*, 2011; PEREIRA *et*

*al.*, 2010; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008; MOREIRA, 2008; BUIJSCH, 2007; GARCIA *et al.*, 2004).

FIGURA 4 – Estrutura tridimensional otimizada pelo pacote de programas Gaussian 09 em nível de teoria HF/6-31G e estrutura química do TAC




Fonte: O autor

Segundo as suas propriedades físico-químicas, podemos destacar a alta MM de 804,02 g/mol, pKa 1 = 2,94; pKa 2 = 9,95; pKa 3 = 14,07, log *P* de 3,96 ± 0,83 e ponto de fusão de 126-129 ºC. É insolúvel em água (4-12 µg/mL), levemente solúvel em hidrocarbonetos saturados e altamente solúvel em lipídios e solventes orgânicos. Em pH acima de 7 o fármaco é propenso a degradação, o que implica na estabilidade de formulações contendo água. Apresenta-se isoladamente na forma de cristais brancos e como forma farmacêutica é possível encontrar como cápsula, injetável e pomada para aplicação tópica (JAIN *et al.*, 2016; YAMAMOTO *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018; DHEER *et al.*, 2018; SAVIĆ *et al.*, 2017; WAN *et al.*, 2017a; WAN *et al.*, 2017b; ANDRADE *et al.*, 2017; UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP, 2013; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008; MOREIRA, 2008). Em relação a classificação biofarmacêutica, o TAC é um fármaco classe II, sendo, portanto, de alta permeabilidade e baixa solubilidade. Enquanto que na categoria de risco na gravidez pelo FDA ele se enquadra como risco C (CÉSAR; AZEVEDO; MOTA, 2017; AusPAR, 2010).

Em relação a farmacocinética, o tempo de meia-vida é em média de 5-7 horas e seu pico de concentração máxima no sangue e plasma atinge aproximadamente em 2 horas. Por ser altamente lipofílico a sua distribuição ocorre por todos os tecidos. É extensamente metabolizado no fígado, pelas enzimas do citocromo P450 3A, ocorrendo primeiramente reação de desmetilação e hidroxilação, seguida de oxidação. Menos de 1% de sua composição original é excretada inalterada pela urina e bile (MOREIRA, 2008).

Apesar de possuir estrutura química completamente diferente da ciclosporina, ambos possuem mecanismo de ação semelhantes, sendo o TAC 10 a 100 vezes mais potente que a mesma. São classificados como inibidores da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T e indiretamente afetam a ativação dos linfócitos B. Ao penetrar no citoplasma do linfócito, o TAC liga-se à proteína FK506 e forma um complexo que se liga à calcineurina, calmodulina e ao cálcio inibindo assim a ativação da calcineurina e a translocação do fator nuclear do linfócito T ativado (NF-AT) citoplasmático, impedindo a união com sua subunidade nuclear. Essa inibição bloqueia a produção de linfócitos e citocinas pró-inflamatórias que são necessárias para a proliferação e diferenciação dos linfócitos. O complexo formado com o TAC também se associa a receptores de glicocorticoides ou de progesterona através da ação de proteínas de fase aguda da inflamação. Essa ligação com os receptores

protege o fármaco contra degradação ou inativação, promovendo a sua translocação para o núcleo e potencializando a sua ligação ao DNA, inibindo a transcrição de diversas citocinas inflamatórias, como IL-2, IL-4, IL-5, interferon-Y, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e mimetizando o efeito dos corticóides (KITA *et al.*, 2019; FIORENTINI; KHURRAM, 2019; JAIN *et al.*, 2019; DHEER *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018; LIENDO *et al.*, 2017; WAN *et al.*, 2017b; JAIN *et al.*, 2016; LAPTEVA *et al.*, 2014; NAM; JI; PARK, 2011; PEREIRA *et al.*, 2010; EL-BATAWY *et al.*, 2009; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008; MOREIRA, 2008; BUIJSCH, 2007; GONTIJO *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2004).

O TAC é aprovado pelo FDA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e comercializado na forma de pomada para o uso tópico nas concentrações de 0,03% (m/m) para crianças acima de 2 anos e 0,1% (m/m) para demais pacientes acima de 16 anos. A eficácia da pomada 0,1% é praticamente equivalente a classe mais forte de corticoide, porém a pomada tem sido relatada com uma baixa absorção e alta variabilidade, o que acarreta a garantia da entrega tópica adequada do medicamento pelas camadas da pele. Em estudos com ratos, foi relatado a eficácia do TAC na supressão das células T, eosinófilos, mastócitos e imunoglobulina E (IgE). Uma formulação ideal de TAC deveria levar o fármaco até o seu local de destino, no caso, a epiderme e a derme, que é onde encontra-se o infiltrado de células T na pele. Porém, a pomada comercializada é lipofílica e fármacos insolúveis em água para atravessar a barreira da pele acaba sendo um desafio. Além disso, a utilização de excipientes como surfactantes para melhorar a solubilidade e o particionamento do fármaco, podem potencializar a sua penetração e, com isso, causar uma entrega sistêmica desnecessária do fármaco. Contudo, o uso tópico é sempre preferível em relação a terapia sistêmica, já que os efeitos adversos podem ser ainda maiores nesse último caso (KITA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018; ZHUO; ABOUREHAB; HUSSAIN, 2018; SHI *et al.*, 2017; SAVIĆ *et al.*, 2017; LIENDO *et al.*, 2017; WAN *et al.*, 2017b; JAIN *et al.*, 2016; LAPTEVA *et al.*, 2014).

De acordo com Lan *et al.* (2011), o TAC no uso em pacientes com vitiligo promove o crescimento de melanoblastos através do seu impacto nos queratinócitos, mas tem efeitos limitados sobre os melanoblastos imaturos em termos de crescimento celular. Como essas células são derivadas da crista neural, é concebível que o TAC tópico também induza a diferenciação dessas células pigmentares imatura, resultando na pigmentação folicular observada clinicamente.

Já com relação a psoríase, Wan *et al*. (2017b), indicam que a administração do TAC pode desempenhar um papel importante no tratamento da psoríase severa e recalcitrante da face, genitália, áreas intertriginosas e placas corporais. Porém, o uso tópico não promoveu a deposição necessária de TAC em placas psoriáticas hiperqueratósicas. Vários relatos demonstraram que a aplicação tópica da pomada foi eficaz apenas sob oclusão ou em regiões especificas do corpo onde a pele era mais fina e permeável, como a face e áreas intertriginosas. Essa baixa eficácia na terapia foi atribuída à sua alta hidrofobicidade e alta MM, que impedem a penetração na pele e através dela.

Segundo Kita *et al.* (2019), Jain *et al.* (2019), YU *et al*. (2018), Shi *et al.* (2017), Wan *et al.* (2017b) e Pereira *et al.* (2010), a aplicação tópica do TAC não produz efeitos adversos significativos como o dos corticosteroides, que seria atrofia ou aumento da absorção percutânea depois de longo tempo de utilização, porém a sensação de queimação transitória, as ondas de calor no local da aplicação e o prurido frequentemente levam à suspensão da terapia com a pomada, diminuindo a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, quando os pacientes são tratados com a pomada por 3 semanas, como no caso da dermatite atópica, a sensação de queimação torna-se mais frequente com o aumento da dose de 0,03% para 0,3%. Em pacientes cujo tempo de tratamento é de 12 semanas de aplicação do fármaco, pode ocorrer efeitos adversos sistêmicos, como sintomas semelhantes à gripe, eritema e dores de cabeça. Outro problema é o desconforto ao paciente em passar a pomada, que é difícil retirar da superfície da pele e pode criar uma sensação pegajosa devido à sua natureza gordurosa.

Como visto, esse fármaco tem sido amplamente explorado em problemas relacionados com a pele e, por isso, grupos de pesquisa estão trabalhando nessa área. Estudos recentes com micelas poliméricas utilizando pele humana demonstraram que ocorre maior deposição do fármaco na camada dérmica e essa penetração mais profunda acarreta aumento da sua ação terapêutica e reduz os efeitos adversos. Portanto, é clinicamente válido formular um sistema de liberação do fármaco para intensificar a permeação do mesmo na pele e assim reduzir sua dose aplicada topicamente para minimizar os efeitos adversos e manter a eficácia ao mesmo tempo. Espera-se que esse sistema de liberação tenha a capacidade de depositar mais fármaco, persista na pele por mais tempo e não cause danos (DHEER *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2018; NAM; JI; PARK, 2011).

Entretanto, a alta MM, alta hidrofobicidade e baixa solubilidade em água do TAC podem limitar sua capacidade de permear eficazmente a pele. Assim, torna-se importante formular um sistema percutâneo de liberação de fármaco que aumente a sua permeação em relação a sua pomada convencional e, consequentemente, reduza a dose e os efeitos adversos no tratamento das doenças (YU *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2017a; WAN *et al.*, 2017b; SAVIĆ *et al.*, 2017).

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a detector de fotodiodos (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quito, Japão);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas (WATERS, Acquity HClass, Massachusetts, USA);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratômetro de raios X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quito, Japão);
- Equipamento DSC/TG (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Evaporador rotatório (FISATOM, modelo 801, Diadema, Brasil);
- Liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- pHmetro digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos);
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, NANO ZS 90, Malvern Reino Unido).

## 4.2 REAGENTES E SOLVENTES

### 4.2.1 Fármaco

- Tacrolimus – TAC ($\overline{Mw}$ 822,0389 g/mol, 99,3% (m/m) de pureza, Fagron S.A., Rotterdam, Holanda).

### 4.2.2 Polímero

- Poli(***ε***-caprolactona) ($\overline{Mw}$ 14.000 g/mol, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

### 4.2.3 Água Purificada

- Água purificada pelo processo de destilação ($H_2O$ destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Água ultrapurificada pelo sistema de ultrapurificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

### 4.2.4 Solventes e Demais Reagentes

- Acetona ($(CH_3)_2CO$) (Synth, Diadema, Brasil);
- Ácido Clorídrico (HCl) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Ácido Fórmico ($CH_2O_2$) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Hidróxido de Sódio (NaOH) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil);
- Lactose Monohidratada PA (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Metanol ($CH_3OH$) grau HPLC (Hexis Científica, Phillispsburg, Estados Unidos);

- Monooleato de sorbitano etoxilado 20 (polissorbato 80, Tween® 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

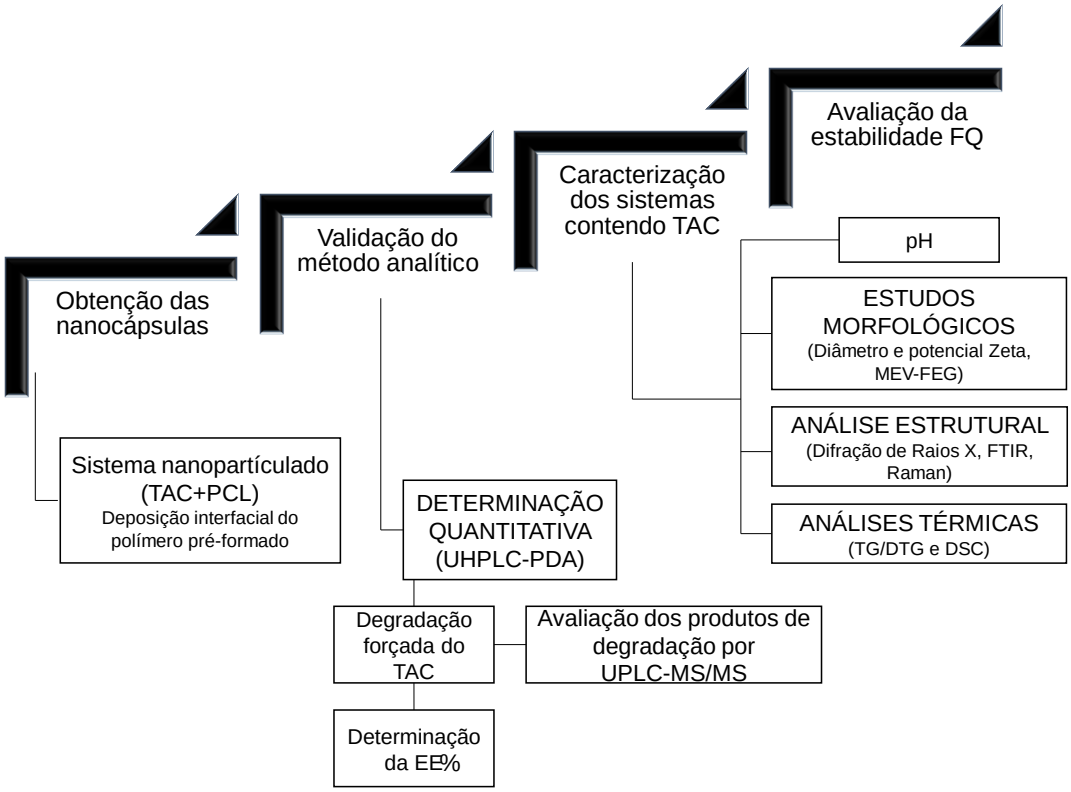
### 4.2.5 Materiais

- Amicon® Ultra – 0,5mL, dispositivo de ultrafiltração com membrana de celulose regenerada 10000 Da, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda;
- Chromafil® O-45/15 MS, filtro hidrofílico, 0,45 $\mu$m de abertura dos poros, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha;
- Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,20 $\mu$m de abertura dos poros, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha.

## 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente trabalho teve início com a síntese das nanocápsulas poliméricas. Conseguinte, houve a quantificação do fármaco incorporado nas partículas realizado por meio da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector de fotodiodos (UHPLC-PDA), validado de acordo com a Resolução 166, de 24 de julho de 2017, avaliando, assim, a eficiência de encapsulação do TAC, além de verificar quais eram os possíveis produtos de degradação do TAC frente a hidrólise ácida e básica por meio da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). Por fim, as formulações foram caracterizadas por métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos, e foi investigada a estabilidade físico-química das mesmas. As etapas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 5.

FIGURA 5 – Fluxograma das etapas da pesquisa




Fonte: O autor

## 4.4 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO TACROLIMUS

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir do polímero PCL contendo TAC foram preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrito por Fessi, *et al.* (1989), cuja formulação encontra-se na Tabela 2.

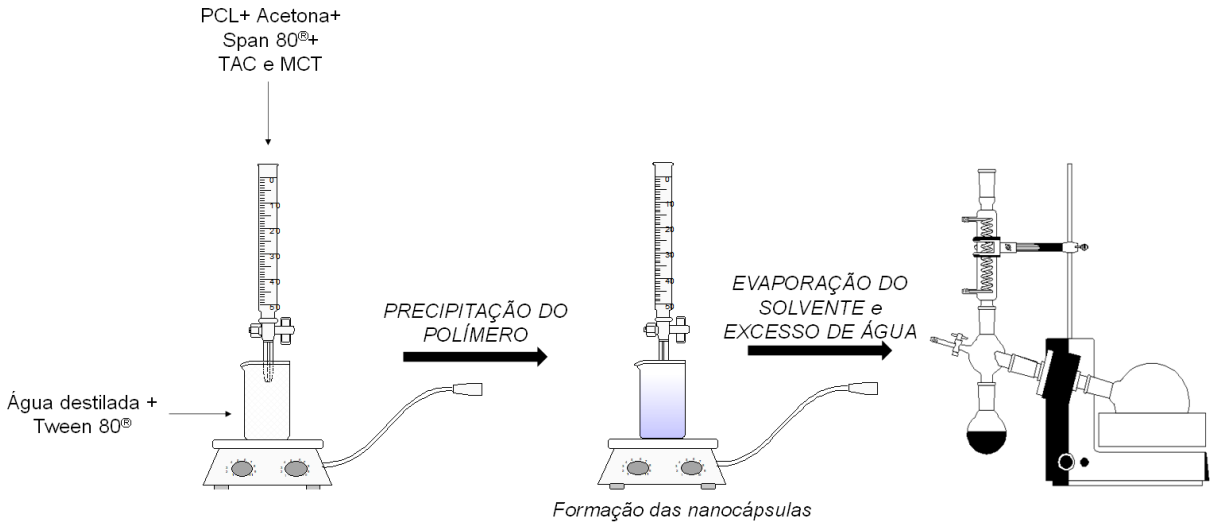
TABELA 2 – Formulações das nanocápsulas poliméricas contendo TAC, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado

| ***Composição*** | ***Formulação*** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **NC-N** (0 mg/mL) | **NC-1** (0,1 mg/mL) | **NC-2** (1 mg/mL) | **NC-3** (5 mg/mL) |
| **Fase aquosa** | | | | |
| Tween 80® (g) | 0,077 | 0,077 | 0,077 | 0,077 |
| Água ultrapura (mL) | 53 | 53 | 53 | 53 |
| **Fase orgânica** | | | | |
| TAC (g) | – | 0,001 | 0,01 | 0,05 |
| PCL (g) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Span 80® (g) | 0,077 | 0,077 | 0,077 | 0,077 |
| MCT* (g) | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Acetona (mL) | 27 | 27 | 27 | 27 |

*MCT: Triglicerídeos de cadeia média
Fonte: O autor

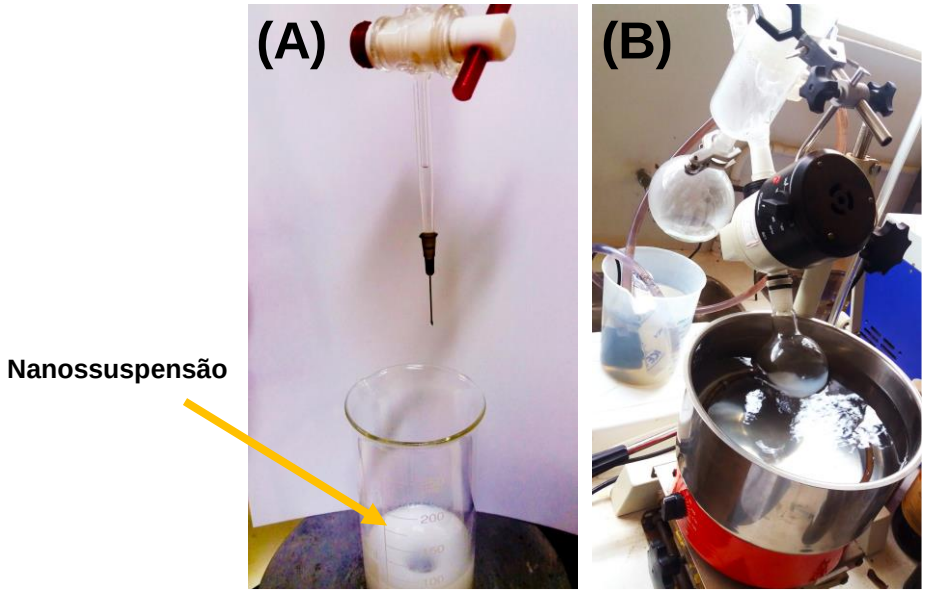
Constituindo a fase orgânica, o polímero foi solubilizado em acetona na presença de Span 80®, TAC e triglicerídeos de cadeia média (MCT). Para a fase aquosa, foi adicionado o Tween 80® e agitado magneticamente para incorporação do tensoativo. A fase orgânica após alguns minutos em agitação moderada e a temperatura de 40 °C, foi adicionada na fase aquosa sob gotejamento lento, contínuo (1 gota/s), e agitação vigorosa. Ao final, a suspensão foi mantida em agitação por mais 10 minutos e o solvente orgânico eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Figuras 6 e 7), atingindo um volume final de 10 mL e concentração de TAC de 0,1 mg/mL (NC-1), 1 mg/mL (NC-2) e 5 mg/mL (NC-3).

FIGURA 6 – Esquema do método de obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo TAC preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado




Fonte: O autor

FIGURA 7 – Método para obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo TAC preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado. (A) Nanoprecipitação, (B) Evaporação do solvente por evaporador rotatório




Fonte: O autor

Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NC-N), como controle negativo e todas as formulações foram preparadas em triplicata.

### 4.4.1 Mistura Física

A mistura física (MF) na proporção, em massa, de 1:1 (TAC:PCL) (50% m/m) foi preparada para uma caracterização comparativa.

## 4.5 DETERMINAÇÃO DO TACROLIMUS INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS

A concentração do TAC encapsulado nas nanocápsulas poliméricas (mg/mL) foi determinada a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC), em equipamento Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Quito, Japão), com bomba quaternária (LC-30AD), desgaseificador (DGU-20A5RA), amostrador automático (SIL-30 AC), compartimento de coluna termostatizado (CTO-20AC) e um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), conforme parâmetros estabelecidos na Tabela 3.

TABELA 3 – Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do Tacrolimus por UHPLC

| ***CARACTERÍSTICAS*** | ***DESCRIÇÃO*** |
|---|---|
| *Detecção* | UV (λ = 235nm) |
| *Fluxo* | 0,55 mL/min |
| *Coluna* | Shimadzu Shim-pack XR-ODS III $C_{18}$ (2,0 mm x 200 mm x 2,2 µm) |
| *Temperatura* | 50º C |
| *Fase móvel* | Metanol e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico PA (89:11, v/v) |
| *Volume de injeção* | 5 µL |
| *Tempo de análise* | 3 min |

Fonte: O autor

Previamente, o método analítico foi validado conforme descrito a seguir.

### 4.5.1 Validação do Método Analítico para Quantificação do Tacrolimus

A validação do método analítico foi desenvolvida conforme o preconizado na Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e com as

recomendações da *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005).

Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. A aquisição e processamento dos dados foram obtidos com o software LabSolutions® chromatography (Shimadzu UK Ltd, Milton Keynes, UK, versão 5.73).

A seletividade foi determinada pela análise do cromatograma das nanocápsulas preparadas sem fármaco (NC-N) em comparação com o cromatograma do TAC numa concentração de 200 µg/mL, com a intenção de confirmar que a formulação e o processo de preparo das nanocápsulas não interferem na quantificação do fármaco.

Para o estudo de linearidade foram elaboradas três curvas analíticas com cinco pontos de concentrações diferentes (100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL), como preconizados na RDC 166/17, utilizando a fase móvel (89:11 metanol e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico) como solvente. A equação da reta e o coeficiente de correlação (*r*) foram obtidos. A análise de regressão linear ocorreu pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por Análise de Variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados, por meio da relação entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (σ) e a média dos coeficientes angulares das curvas (IC), utilizando fatores multiplicadores sugeridos pela ICH (2005), conforme as Equações 1 e 2.

$$LD = \left(\frac{3{,}3\sigma}{IC}\right) \quad (1)$$

$$LQ = \left(\frac{10\sigma}{IC}\right) \quad (2)$$

Para determinar a repetibilidade do método analítico, seis réplicas a 100% da concentração de 200 µg/mL foram individualmente preparadas, nas mesmas condições de operação, mesmo analista, mesma instrumentação e no mesmo dia. O resultado foi expresso em termos de coeficiente de variação (CV) de acordo com a

Equação abaixo, onde DP é o desvio padrão da série de medições e CMD a concentração média determinada.

$$CV = \left(\frac{DP}{CMD}\right) x\ 100 \quad (3)$$

A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise de doze réplicas a 100% da concentração de 200 µg/mL, que também foram individualmente preparadas, em dois dias diferentes, no mesmo laboratório e por operadores diferentes. Em seguida, foi calculado o CV inter-dia utilizando a Equação 3. A análise estatística dos resultados foi realizada por Teste-t com $p < 0,05$.

Para a exatidão foi utilizado o método de recuperação com adição de padrão. Para isso, foi adicionado uma quantidade conhecida do fármaco (50 µg/mL) à solução-amostra, resultando nas concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de recuperação, a partir da Equação 4, onde CME é a concentração média experimental e CT a concentração teórica.

$$Recuperação\ (\%) = \frac{CME}{CT} x\ 100 \quad (4)$$

Na avaliação da robustez, soluções de TAC a 200 µg/mL foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna analítica e variação da composição da fase móvel. O fluxo foi modificado de 0,55 mL/min para 0,50 mL/min e 0,60 mL/min. A temperatura da coluna analítica foi alterada de 50 ºC para 45 ºC e 55 ºC. A variação da composição da fase móvel variou de 89:11 para 88:12 (metanol:água acidificada) e 90:10 (metanol:água acidificada). Os resultados dos parâmetros foram analisados por meio do CV e Recuperação do analito (%) e comparados com os valores obtidos em condições padrão. A significância dos resultados foi verificada por ANOVA com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

### 4.5.2 Estudo da Degradação Forçada

O ensaio de degradação forçada foi adaptado de Nadal *et al*. (2015), onde foi verificado a estabilidade do fármaco e seletividade do método proposto. Para isso, a solução mãe de TAC foi sujeita a degradação forçada em condições ácidas e básicas.

Para investigar a degradação ácida, 10 mL de solução-mãe padrão (2 mg/mL) foi diluída em 25 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente (25 ± 2 ºC) e ao abrigo da luz durante 1 hora. Após o tempo de reação, a solução foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M. Em seguida, essa solução foi completada para 100 mL em balão volumétrico com metanol, obtendo uma concentração de 200 µg/mL. A solução foi filtrada e realizada a leitura em UHPLC-PDA. O mesmo procedimento foi utilizado para a degradação alcalina, exceto pelo fato de que a solução de HCl 0,1M foi substituída por NaOH 0,1M durante o preparo da amostra.

#### 4.5.2.1 Espectrometria de massas

Com a intenção de verificar quais eram os produtos de degradação existentes durante a degradação ácida e alcalina, fez-se necessário o desenvolvimento de um método analítico de separação e detecção por UPLC-MS/MS. O cromatógrafo utilizado foi do modelo Waters Acquity HClass (MA, USA) equipado com autoinjetor refrigerado (Sampla Manager FTN) e bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager). A corrida cromatográfica foi realizada em coluna Acquity UPLC BEH $C_{18}$ (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm) mantida a 40 ºC. A fase móvel consistiu também em metanol:água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (95:5 v/v) em fluxo isocrático de 0,3 mL $min^{-1}$ e volume de injeção de 5 µL, por 2 min de análise.

A ionização e detecção do TAC foi realizada em espectrômetro de massa Xevo TQD (Waters) triplo quadrupolo, equipado com uma fonte de ionização eletrospray e operando em modo positivo de ionização. A quantificação ocorreu por meio do monitoramento de reações múltiplas (MRM) para monitorar o precursor e os íons produtos de *m/z* 826,3 > 770,3. Os parâmetros otimizados para espectrometria de massas foram a voltagem do capilar 3,2 kV, temperatura desolvatação 300 ºC, fluxo do gás desolvatação 500 L/h e temperatura da fonte de 150 ºC. Os parâmetros

específicos para o composto foram de 28 V de voltagem do cone e 20 eV (eletrovolts) de energia de fragmentação (UPADHYAY *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2012).

Todas as operações foram realizadas pelo programa MassLynx (Waters).

#### 4.5.2.2 Preparo da amostra

As amostras para verificação da degradação forçada foram realizadas da mesma maneira que a por UHPLC-PDA, porém resultando em uma concentração final de 100 ng/mL.

### 4.5.3 Eficiência de Encapsulação

Considerando os resultados obtidos na quantificação do TAC, a eficiência de encapsulação (EE%) para a NC-1 foi calculada a partir da razão entre a massa do fármaco obtido e a massa teórica, segundo a Equação 5 (HEO *et al*., 2019; DE SOUZA *et al.*, 2015), e em relação as demais, a EE% foi verificada pela diferença entre a massa do fármaco inicialmente adicionado em cada formulação e a massa presente nas formulações, conforme a Equação 6 (NADAL *et al.*, 2015).

$$EE\ (\%) = \left(\frac{Concentração\ obtida}{Concentração\ teórica}\right)\ x\ 100 \quad (5)$$

$$EE\ (\%) = \left(\frac{Concentração\ téorica - Concentração\ obtida}{Concentração\ teórica}\right)\ x\ 100 \quad (6)$$

Para a formulação NC-1, a EE% foi determinada por método direto do fármaco encapsulado, onde adicionou-se 500 µL da nanossuspensão em um dispositivo de ultrafiltração Amicon® e o mesmo centrifugado em centrifuga Hermle Z326K por 30 min a 6000 rotações centrífuga (rcf). Em seguida adicionou-se 100 µL de acetona ao material filtrado e o mesmo foi deixado em banho de ultrassom por 10 min para quebra da matriz polimérica que forma a nanocápsula, e com isso, desestruturando e liberando o fármaco encapsulado. Posteriormente foi adicionado 1,2 µL de metanol e 200 µL de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e essa solução foi novamente

centrifugada por 5 min para precipitação do polímero. Por fim, o sobrenadante foi filtrado em Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,20 µm de abertura dos poros, e realizado a leitura em UHPLC-PDA.

Para as demais nanocápsulas (NC-2 e NC-3) foi realizado o método indireto de encapsulação do fármaco, onde quantificou-se a concentração de fármaco não encapsulado. Desta forma, 500 µL da nanosuspensão foi adicionado também em dispositivo de ultrafiltração Amicon® e centrifugado por 30 min a 6000 rcf. O filtrado foi analisado em UHPLC-PDA e indiretamente verificado quanto do fármaco foi encapsulado.

Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

## 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

### 4.6.1 Liofilização

Para realizar a caracterização por alguns métodos, fez-se necessário a liofilização das nanocápsulas poliméricas contendo TAC. Para isso 1 g de lactose (LAC) monohidratada foi dispersa na nanossuspensão sob agitação magnética. Em seguida, a suspensão foi congelada em ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos) a -80 ºC por 24 horas e liofilizada em liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil) por 48 horas, até total remoção da água.

### 4.6.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média de três amostras diferentes.

### 4.6.3 Análises Morfológicas e de Superfície

#### 4.6.3.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O tamanho médio de partícula, o índice de polidispersidade (IPD) (distribuição do tamanho de partícula) e o potencial zeta foram medidos (n=3) pela espectroscopia de correlação de fótons (PCS) de acordo com o espalhamento dinâmico da luz (DLS) após a diluição de uma alíquota da suspensão de nanocápsulas em água ultrapurificada (1:500) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). Para verificar a diferença estatística entre os diâmetros médios, foi realizado teste ANOVA 1 via entre os valores da média dos resultados.

#### 4.6.3.2 Análise da morfologia e superfície

A avaliação morfológica e da superfície dos materiais de partida e das nanocápsulas preparadas foi realizada em microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM) (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em um metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 8 a 10 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

### 4.6.4 Análise Estrutural

#### 4.6.4.1 Análise por difração de raios x

O TAC puro, os polímeros, a MF e as nanocápsulas poliméricas foram examinadas por difração de raios X (XRD) em difratômetro Shimadzu XRD-6000, *scan* de 2 º/min e $2\theta$ de 3º a 80º, radiação Kα de cobre ($\lambda$ = 1.5418 Å), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.6.4.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

As formulações foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 $cm^{-1}$, com resolução de 2 $cm^{-1}$ e 64 scan/min. Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, polímero, MF e da formulação sem a adição do TAC (NC-N).

Para verificar a intensidade dos sinais foi utilizado a Equação 7.

$$I = \left(\frac{A0}{A}\right) \quad (7)$$

Onde I é a intensidade, $A_0$ a área da banda analisada e A a área da banda referência.

4.6.4.3 Avaliação por espectroscopia raman

A análise por espectroscopia Raman foi realizada em espectrômetro Horiba Xplora Plus com detector Syncerity, com comprimento de onda de 638 nm. A potência do feixe de 35 mW, com 15 s de aquisição, lente de 50x, pinhole de 30 µm e fenda de 50x1000 µm. A grade de espectro de 600 ranhuras/mm, com faixa de aquisição de 50 a 3650 $cm^{-1}$.

4.6.5 Análise Térmica

4.6.5.1 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

As técnicas empregadas foram a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG), onde as amostras foram colocadas em uma célula calorimétrica de alumina e realizadas simultaneamente. O instrumento STA 6000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando índio (In; p.f.= 156,6ºC; $\Delta H_{fusão}$ = 28,54 J/g) como padrão. As amostras foram aquecidas a uma taxa

constante de 10 ºC/min, de 20 a 600 °C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min).

## 4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

As suspensões foram armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 ºC) e protegidas da luz em frascos de vidro âmbar. As formulações foram monitoradas durante 120 dias de armazenamento, verificando mensalmente o pH, tamanho de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Todos os dados resultantes da estabilidade foram avaliados pelo programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student foi usada para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha$=0,05).

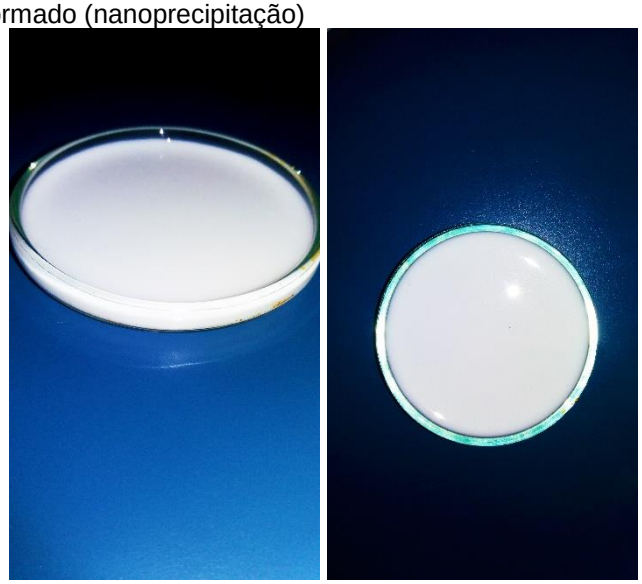
# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO TACROLIMUS

As nanopartículas de PCL contendo TAC (NC-1, NC-2 e NC-3) e as nanopartículas controle negativo (NC-N) foram obtidas com êxito pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação). Todas as formulações apresentaram macroscopicamente o aspecto leitoso (Figura 8) no instante em que se adicionou a fase orgânica sob a fase aquosa, sendo essa a característica do efeito Tyndall que resulta da reflexão de luz pela formação das partículas (GOMES *et al.*, 2019; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; FESSI *et al.*, 1989).

A faixa de escolha das concentrações do fármaco utilizado nas formulações em estudo (0,1 mg/mL, 1 mg/mL e 5 mg/mL) foram selecionadas com objetivo de comparação com as concentrações encontradas na literatura para tratamento das doenças autoimunes cutâneas que podem variar de 0,03% a 0,3% (YU *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2017b; SHI *et al.*, 2017).

FIGURA 8 – Nanossuspensão de PCL contendo TAC obtidas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação)



Fonte: O autor

Esse método consiste na precipitação de um polímero pré-formado a partir de uma solução orgânica e a difusão do solvente orgânico em meio aquoso na presença ou ausência de um tensoativo. O polímero é dissolvido em um solvente de polaridade

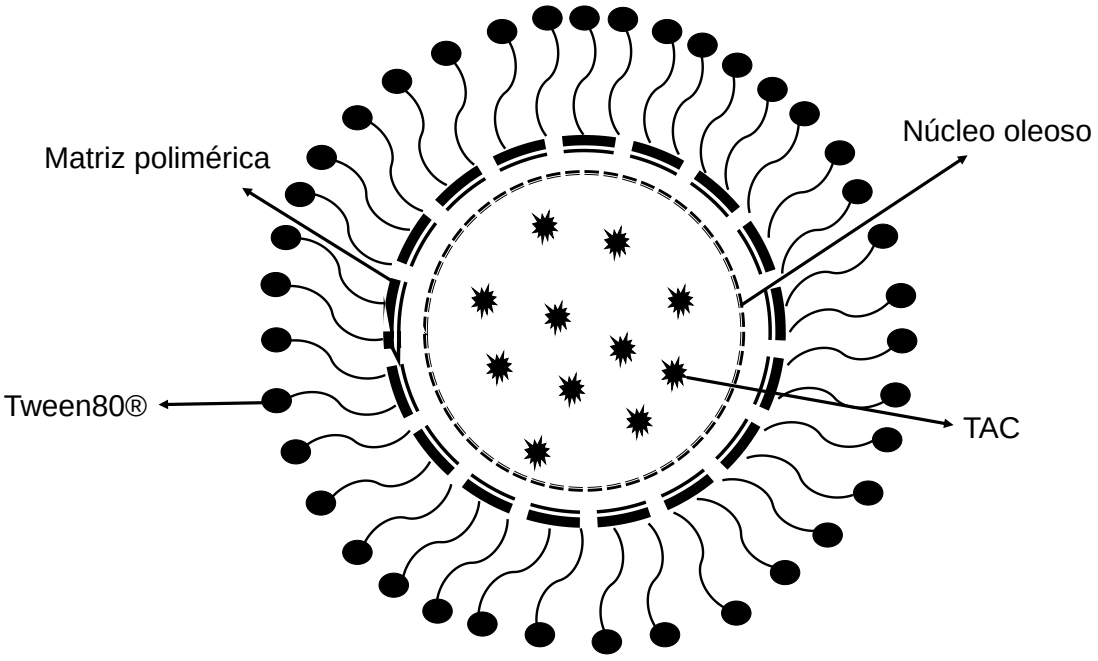
intermediária miscível em água, levando à precipitação das nanopartículas. Essa deposição de polímero na interface entre a água e o solvente orgânico, causada pela rápida difusão do solvente, leva à formação instantânea de uma suspensão coloidal (NAGAVARMA *et al.*, 2012).

Essa técnica é fácil, simples, de ótima reprodutibilidade e utiliza um solvente de baixa toxicidade. Foi desenvolvida para fármacos hidrofóbicos e solventes miscíveis em água, como etanol e acetona (ABRIATA *et al.*, 2019).

Segundo Nagavarma *et al.* (2012) e Venturini *et al.* (2011), a formação de nanocápsulas ocorre quando um pequeno volume de óleo não tóxico é incorporado na fase orgânica, como no caso o MCT. Considerando essa cavidade central à base de óleo, uma alta eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos é observado, justamente pela afinidade pelo núcleo. De acordo com Granata *et al*. (2018) e Fessi, *et al.* (1989), esse núcleo oleoso é cercado por uma parede fina formada pela deposição interfacial do polímero PCL, formando, portanto, a nanocápsula (Figura 9).

Além disso, o Tween® 80, utilizado como surfactante não iônico, recobre o PCL garantindo a hidrofilia adequada com o sistema formado impedindo a coalescência das nanocápsulas por um efeito de estabilização estérica (ABRIATA *et al.*, 2019; GRANATA *et al.*, 2018).

FIGURA 9 – Esquema da nanocápsula polimérica obtida pelo método de nanoprecipitação




Fonte: O autor

## 5.2 DETERMINAÇÃO DO TACROLIMUS INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS

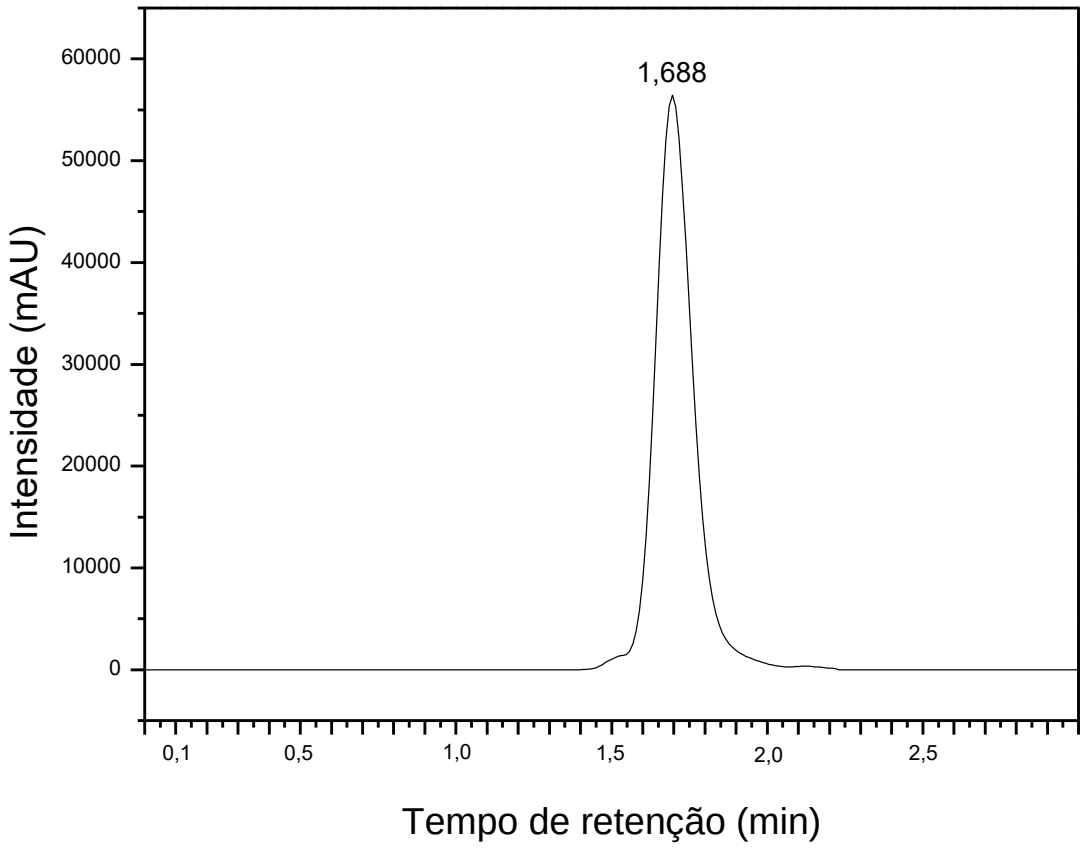
### 5.2.1 Desenvolvimento e Otimização do Método Analítico

Primeiramente fez-se necessário a pesquisa literária para verificar a existência de outros trabalhos que também realizaram a quantificação do TAC, independente da matriz utilizada por eles. A maioria dos trabalhos encontrados optaram por matrizes mais complexas como sangue e urina, utilizando, portanto, o detector de espectrometria de massas (SIEGL *et al.*, 2019; MEI *et al.*, 2018; *PENSI et al.*, 2017; SALLUSTIO; NOLL; MORRIS, 2011; SEGER *et al.*, 2009). Em contrapartida, poucos trabalhos utilizaram o detector por absorbância no ultravioleta (A-ELBASIT; IMRAN; NAYEEM, 2018; DHANI *et al.*, 2016; SALLUSTIO; NOLL; MORRIS, 2011). A partir da análise dos trabalhos foi possível observar que a variação nas condições cromatográficas se devia a fase móvel, temperatura da coluna e fluxo.

Corridas iniciais foram realizadas adaptando o encontrado na literatura e utilizando como fase móvel metanol:água (75:25 v/v), fluxo de 0,2 mL/min, temperatura ambiente e comprimento de onda de 256 nm (SIEGL *et al.*, 2019; (A-ELBASIT; IMRAN; NAYEEM, 2018). No entanto, picos irregulares foram observados, mostrando baixa resolução cromatográfica devido, provavelmente, a diferenças instrumentais e coluna analítica.

Pensando na melhora e otimização do método cromatográfico, várias proporções em modo isocrático da fase móvel foram testadas usando diferentes misturas de metanol:água acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Assim como, a mudança do fluxo, no forno que aquece a coluna analítica e comprimento de onda do detector, até selecionar aquele em que o TAC absorvia melhor gerando um pico cromatográfico de maior intensidade. Com isso, uma melhor resolução cromatográfica foi obtida, detectando o pico do fármaco em 1,688 min, o que é adequado para análises de rotina – Figura 10 e Tabela 4.

FIGURA 10 – Cromatograma de UHPLC correspondente ao padrão de Tacrolimus (200 µg/mL). Fase móvel: metanol e água acidificada com ácido fórmico 1% (89:11 v/v); Fluxo: 0,55 mL/min; Comprimento de onda de detecção: 235 nm; Temperatura da coluna: (50 ±2 ºC) e volume de injeção: 5 µL




Fonte: O autor

TABELA 4 – Sumarização dos principais parâmetros relativos ao método

| **Parâmetros** | **Resultados** |
|---|---|
| Tempo de retenção (min) | 1,688 |
| Largura do pico a 5% da altura (min) | 0,277 |
| Fator de simetria do pico (*Tailing factor*) | 1,132 |

Fonte: O autor

Sintetizando, as condições cromatográficas adequadas para otimização, validação do método e quantificação do TAC incorporado nas nanopartículas foram a fase móvel metanol:água acidificada (89:11 v/v), temperatura da coluna de (50 ±2 ºC), volume de injeção da amostra de 5 µL, fluxo isocrático de 0,55 mL/min, detector ajustado a 235 nm e tempo de análise de 3 min.

### 5.2.2 Validação do Método Analítico para a Quantificação do TAC

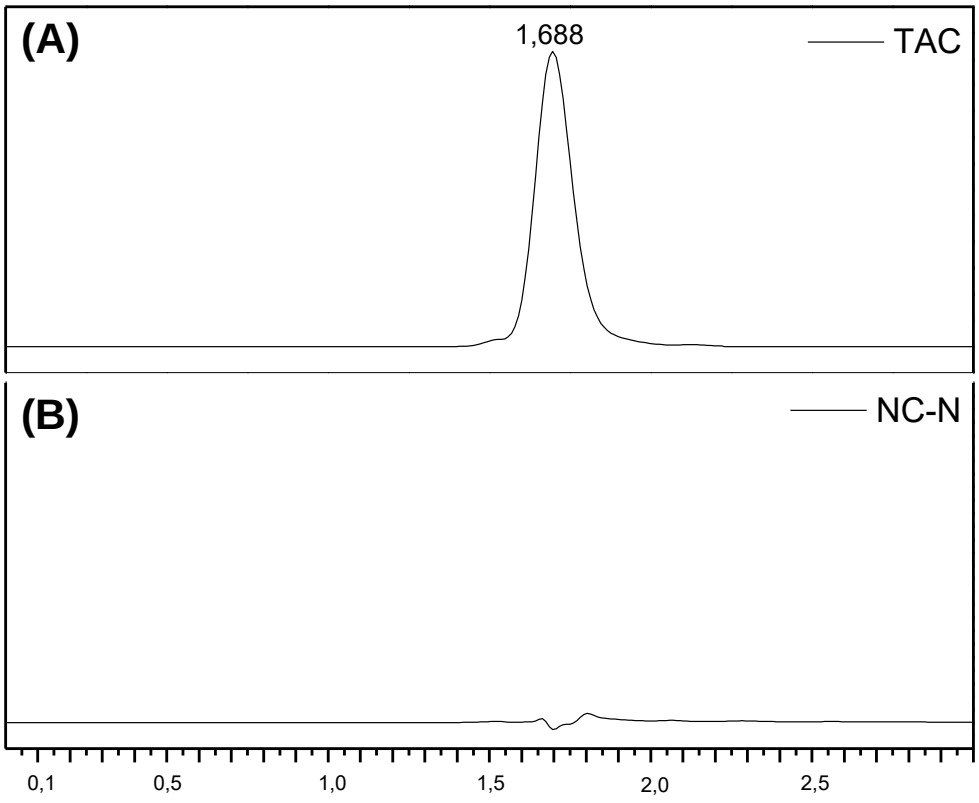
A pesquisa científica de qualidade requer que seus resultados sejam confiáveis e reprodutíveis. Para isso, deve-se utilizar métodos que atendam estas exigências e, ainda, sejam de fácil execução e baixo custo. O processo de validação é responsável por garantir que os resultados obtidos sejam condizentes com o real (RIBANI *et al.*, 2004). Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada Nº 166, de 24 de julho de 2017, a validação deve comprovar que o método analítico empregado produz resultados confiáveis e é adequado para o fim ao qual foi destinado e, para isso, deve respeitar rigorosamente alguns parâmetros, estabelecidos por esta resolução.

O método foi validado conforme o preconizado na RDC 166, de 24 de julho de 2017 e com as recomendações da ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de quantificação e detecção, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

A seletividade deve assegurar a capacidade do método de identificar ou quantificar a substância em estudo, em meio a qualquer outro componente que não se tenha interesse, como impurezas, diluentes e componentes de matriz. Além de assegurar resultado positivo para o analito e negativo para as demais substâncias. Esse parâmetro certifica que a resposta gerada como resultado seja exclusiva da amostra de interesse (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

O método desenvolvido para quantificação do TAC mostrou-se seletivo e o detector de arranjo de diodos indicou que o pico cromatográfico do TAC não apresentou interferentes, já que não houve sobreposição de leitura da formulação NC-N no tempo de retenção do TAC (Figura 11), indicando que nenhum componente da formulação apresentou absorção da radiação eletromagnética neste intervalo de comprimento de onda.

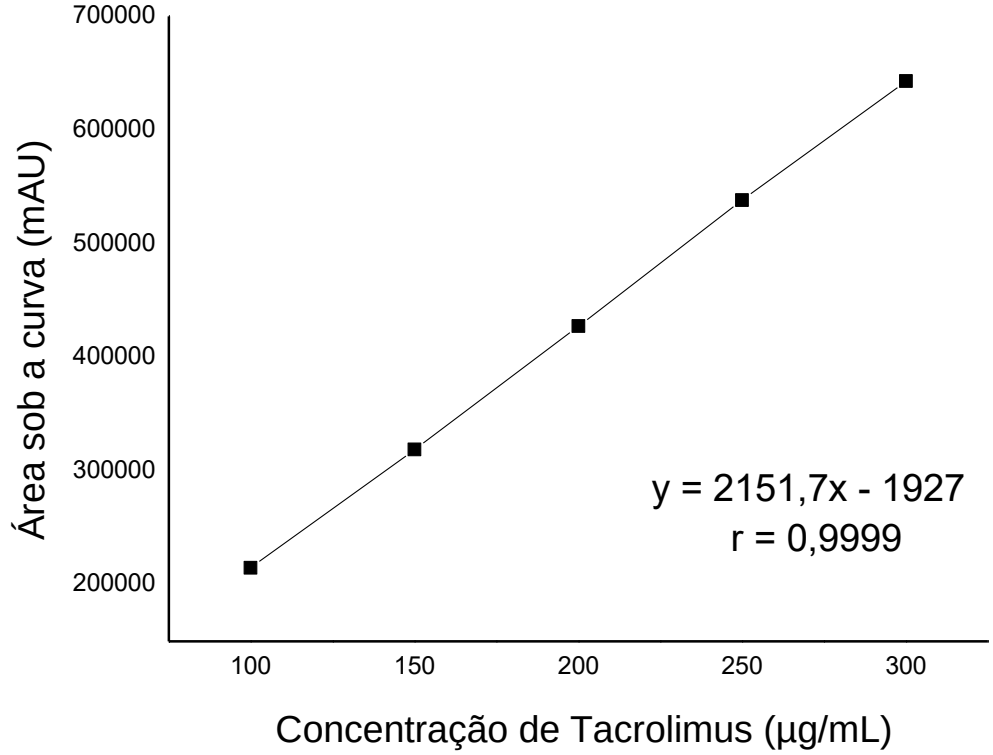
FIGURA 11 – Cromatogramas (y = 235nm) da nanocápsula preparada sem o fármaco: NC-N (B); em comparação com o do TAC para seletividade (A)




Fonte: O autor

A linearidade de um método deve ser compreendida como a capacidade do mesmo em obter respostas proporcionalmente equivalentes a concentração do analito em estudo, dentro de uma determinada faixa de trabalho definida. Para isso, o teste foi realizado em cinco concentrações diferentes do analito. A curva analítica média obtida está representada na Figura 12.

FIGURA 12 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação do TAC obtida por UHPLC na faixa de concentração de 100 a 300 µg/mL (n=3)




Fonte: O autor

Por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de coeficiente angular (inclinação da reta), coeficiente linear (intercepto com o eixo y) e coeficiente de correlação (r), sendo este último o valor responsável por evidenciar a qualidade da regressão linear obtida, pois quanto mais próximo de 1 menor é a dispersão entre os pontos e maior a segurança dos resultados (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5, a equação linear obtida pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 2151,7x - 1927$, onde $y$ é a área do pico e $x$ é a concentração da solução padrão em µg/mL.

Os resultados revelaram um coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 e coeficiente angular diferente de zero ($p < 0,05$). Desta forma, fica claro a necessidade de utilização de curva de calibração ao invés de um ponto único da padronização na rotina de análise.

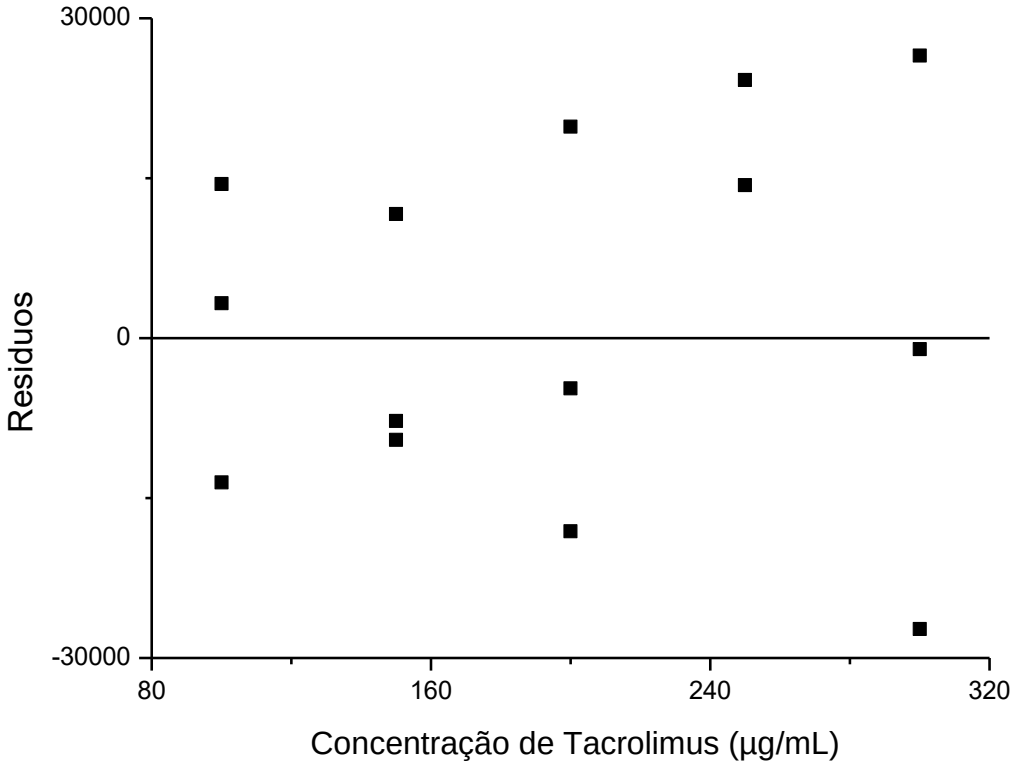
TABELA 5 – Dados obtidos por meio da análise da regressão linear

| Parâmetros | Resultados |
|---|---|
| Faixa de trabalho | 100 a 300 µg/mL |
| Equação da reta (y= ax +b) | y = 2151,7x - 1927 |
| Inclinação da reta (a) | 2151,7 |
| Intercepto com o eixo y (b) | 1927 |
| Coeficiente de correlação de Pearson (r) | 0,9999 |
| Coeficiente de determinação ($r^2$) | 0,9999 |

Fonte: O autor

Com o objetivo de demonstrar que *y* realmente varia em função de *x* foi necessário avaliar que a variação devida à regressão é suficientemente maior que a dos erros (resíduos). Desta forma, a Figura 13 demonstra o gráfico dos resíduos, onde foi possível observar pela análise visual que os resíduos são independentes e homogeneamente distribuídos em função da média, garantindo a confiabilidade da resposta gerada pelo método.

FIGURA 13 – Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada replicata das concentrações das curvas analíticas




Fonte: O autor

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio das Equações 1 e 2, respectivamente. O LD refere-se a menor concentração do analito o qual o método deve ser capaz de detectar, ao passo que o LQ é a menor quantidade de substância que a metodologia utilizada consegue quantificar com precisão e exatidão (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Os valores de LD e LQ encontrados foram, respectivamente, 31,45 e 95,31 μg/mL, assegurando a viabilidade de aplicação do método dentro da faixa de trabalho definida. A partir disso, é possível afirmar que o método cromatográfico é adequado para detectar e quantificar o TAC na faixa de concentração de 100 a 300 μg/mL.

A RDC Nº166/2017 descreve que a precisão deve ser capaz de avaliar a proximidade entre os valores encontrados nos experimentos e deve ser expressa como repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade mostra a concordância entre os resultados encontrados para um mesmo método, executado nas mesmas condições, em um breve intervalo de tempo. Enquanto a precisão intermediária mostra o efeito das variações, dentro de um mesmo laboratório, considerando dias diferentes de execução do método e analistas diferentes (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtidos para o método desenvolvido encontram-se na Tabela 6. Os valores de CV obtidos foram inferiores a 5,0%, e a análise estatística ($p < 0,05$) mostrou que os resultados não possuem diferença significativa, indicando, portanto, que o método foi considerado preciso.

TABELA 6 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária

| **Parâmetros** | **Concentração (µg/mL)** | **CV* (%)** |
|---|---|---|
| Repetibilidade (n=6) | 200 | 0,90 |
| Precisão intermediária (n=12) | 200 | 3,26 |

*CV = coeficiente de variação
Fonte: O autor

Os resultados encontrados para a exatidão comprovaram a concordância entre os dados obtidos frente a um valor de referência real. O parâmetro foi avaliado usando um método de recuperação e mostrou valores de porcentagem de recuperação entre 96,55 e 98,19% para os três níveis de concentração avaliados, o

que caracteriza o método como exato, segundo os preceitos do ICH (2005) e da ANVISA (2017). A Tabela 7 descreve os dados do estudo.

TABELA 7 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de exatidão

| **Concentração teórica de TAC (µg/mL)*** | **CV%** | **Recuperação (%)** |
|---|---|---|
| 100 | 1,76 | 98,19 |
| 200 | 1,38 | 97,37 |
| 300 | 1,21 | 96,55 |

*n=9
Fonte: O autor

Adicionalmente, o método foi avaliado quanto a habilidade de suportar pequenas variações nas condições de análise, sem comprometer a sua exatidão. Um método é considerado robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Para isso, a avaliação da robustez do método analítico foi baseado nos valores de CV obtidos a partir da alteração dos parâmetros de análise, tais como a temperatura da coluna analítica (45 e 55 ºC), o fluxo isocrático (0,50 e 0,60 mL/min), e composição da fase móvel (metanol:água acidificada 88:12 e 90:10 v/v). Com relação a esses valores, os valores de CV% foram inferiores a 5% e a taxa de recuperação acima de 90%, a análise estatística demonstrou valores maiores que $p < 0,05$, o que caracteriza o método como robusto para todos os parâmetros analisados conforme resumido na Tabela 8.

TABELA 8 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de robustez (n=3)

| **Parâmetros** | | **CV%** | **Recuperação (%)** |
|---|---|---|---|
| Fluxo da fase móvel (± 0,05 mL/min) | 0,5 mL/min | 3,25 | 90,07 |
| | 0,6 mL/min | 3,13 | 97,79 |
| Temperatura da coluna (± 5 ºC) | 45 ºC | 1,59 | 91,24 |
| | 55 ºC | 3,24 | 90,91 |
| Concentração da fase móvel (± 1% de metanol) | 88:12 (metanol:água) | 2,98 | 91,31 |
| | 90:10 (metanol:água) | 4,02 | 91,09 |

Fonte: O autor

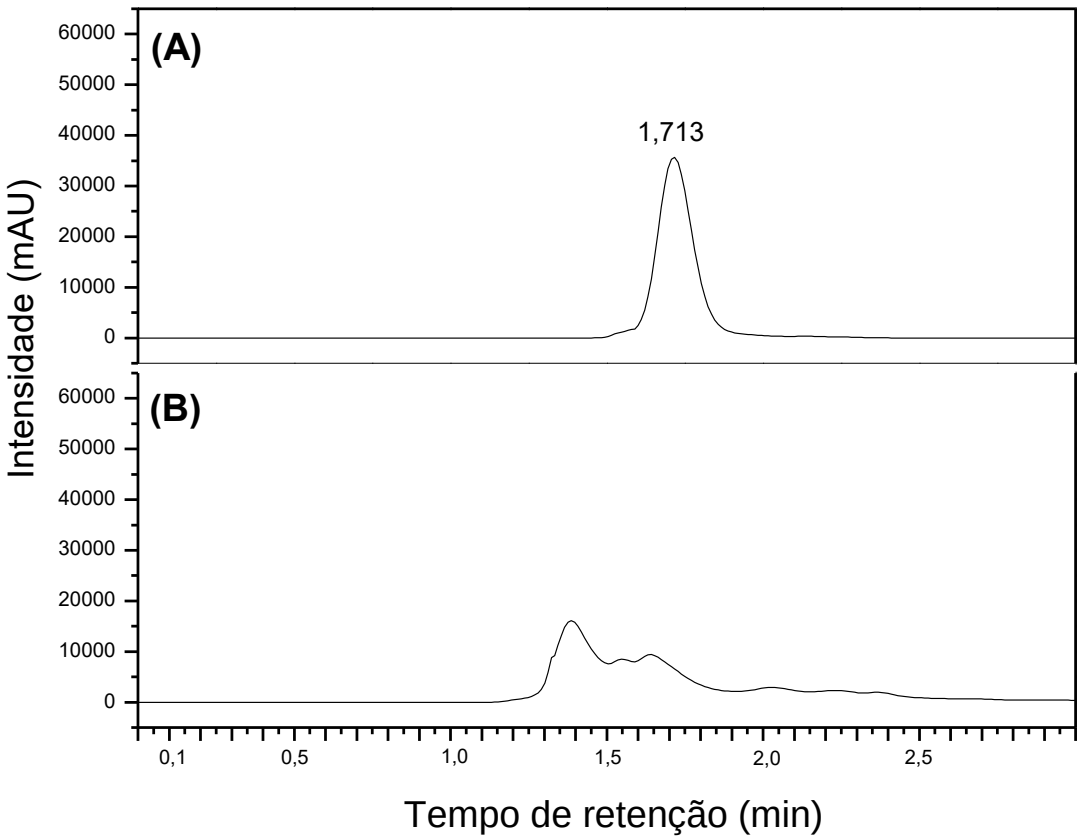
Considerando os resultados obtidos o método foi considerado seletivo, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso, exato e robusto e, portanto, foi devidamente validado. Diante do exposto foi possível concluir que se trata de um método capaz de quantificar o TAC incorporado nas nanopartículas fornecendo resultados confiáveis.

### 5.2.3 Estudo da Degradação Forçada

Quanto à presença de produtos de degradação, o estudo da degradação forçada apresentou resultados diferentes, dependendo da condição de estresse utilizado. Após a exposição em meio ácido, aproximadamente 37,58% do TAC foi degradado (Figura 14, A) e o pico do fármaco foi detectado em 1,713 min. Em condições alcalinas (Figura 14, B), o método não foi capaz de quantificar, pois praticamente todo o fármaco foi degradado e ocorreu um alargamento do pico, sendo incapaz de integrar para conhecer seu valor. Esse resultado vai de encontro com a literatura que relata que pH acima de 7 o fármaco é propenso a degradação, o que implica na estabilidade de formulações contendo água, sugerindo-se que possivelmente os produtos de degradação do TAC acabaram se agrupando ao pico principal, sendo esse o motivo do alargamento do mesmo e alterando seu tempo de retenção (SAVIĆ *et al.*, 2017; SKAK; HANSEN, 2016).

Peterka *et al.* (2019), avaliou a degradação forçada do TAC frente a meio ácido e alcalino – 0,01 e 0,1 mol/L de HCl e 0,01 e 0,1 mol/L de NaOH – respectivamente, por 24 horas em temperatura ambiente e também verificou que em pH ácido o TAC é menos suscetível a degradação, não ocorrendo aumento na concentração de produtos de degradação. Porém em condições alcalinas (0,01 mol/L de NaOH) o TAC foi altamente degradado, aumentando os seus produtos de degradação, principalmente em pH acima ou igual a 9. No experimento com 0,1 mol/L de NaOH o TAC foi completamente degradado após 24 horas, indicando a formação de vários produtos de degradação secundários ou terciários com fatores de respostas diferentes ao TAC.

FIGURA 14 – Cromatogramas obtidos após uma hora de exposição do TAC sob condições ácidas (A) e alcalinas (B)




Fonte: O autor

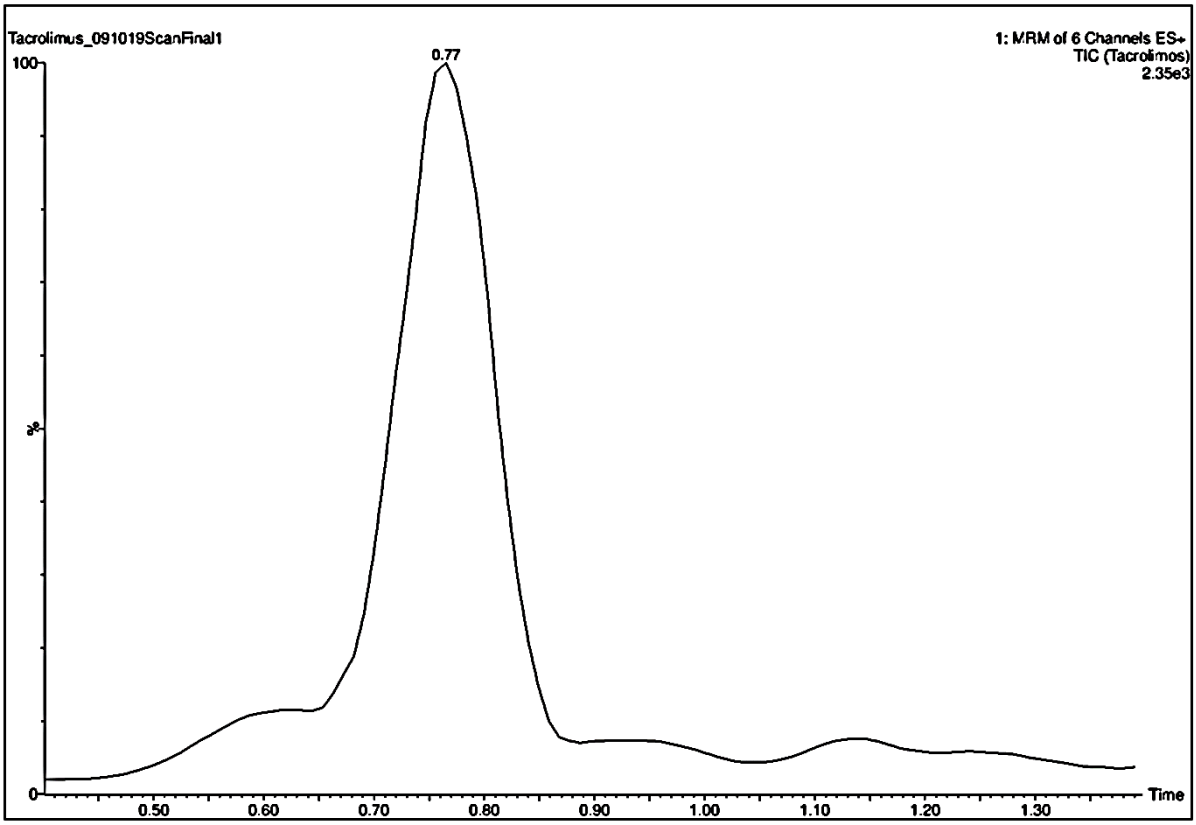
### 5.2.3.1 Espectrometria de massas

No intuito de verificar quais eram os possíveis produtos de degradação em condições ácidas e alcalinas foi desenvolvido um método por UPLC-MS/MS. As

condições de separação foram próximas as otimizadas para o UHPLC-PDA, sendo elas: fase móvel metanol:água acidificada (95:5 v/v), temperatura da coluna de 40 ±2 ºC, volume de injeção da amostra de 5 µL, fluxo isocrático de 0,3 mL/min e tempo de análise de 1,5 min.

A Figura 15 apresenta o cromatograma do TAC nessas condições, onde foi possível observar boa resolução da banda cromatográfica, com tempo de retenção de 0,77 min, sendo também ótima para análises de rotina.

FIGURA 15 – Cromatograma de UPLC correspondente ao padrão de Tacrolimus (100 ng/mL). Fase móvel: metanol e água acidificada com ácido fórmico 1% (95:5 v/v); Fluxo: 0,3 mL/min; Temperatura da coluna: 40 ±2 ºC e volume de injeção: 5 µL

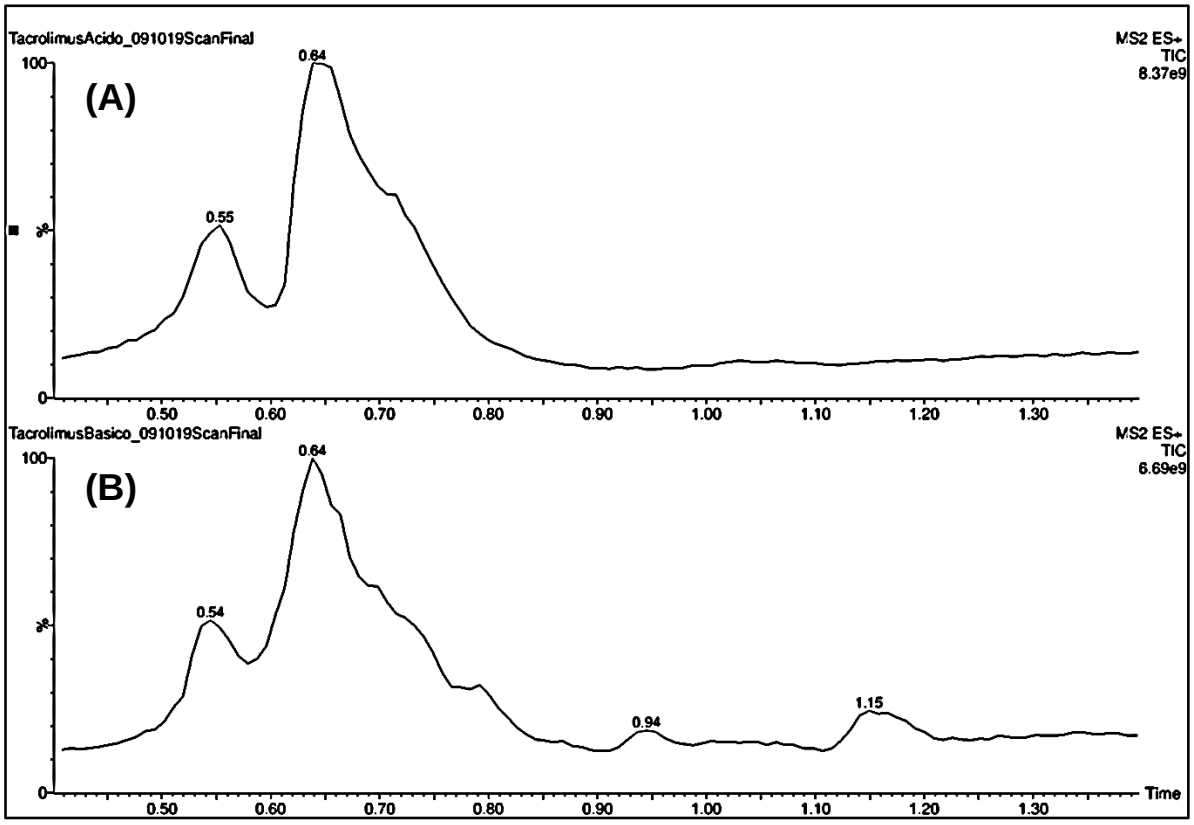



Fonte: O autor

Os cromatogramas das amostras de degradação em condições ácidas e alcalinas estão representados na Figura 16. Foi possível investigar que ambas as amostras se comportaram de forma semelhante, obtendo as mesmas bandas cromatográficas e tempo de retenção diferente ao do TAC (0,64 min), porém com resolução cromatográfica inferior já que a banda se apresentou mais alargada e sem separação de outros produtos.

Comparando com o cromatograma da degradação forçada pelo UHPLC-PDA (Figura 14) foi possível notar a semelhança entre os cromatogramas em meio alcalino, incluindo a presença de outras bandas cromatográficas menos intensas acima de 0,90 min para o UPLC-MS/MS e 1,9 min para o UHPLC-PDA. Em relação ao meio ácido, os cromatogramas diferem entre os equipamentos, possivelmente pela sensibilidade do detector de espectrometria de massas ser maior ao de fotodiodo.

FIGURA 16 – Cromatogramas obtidos após uma hora de exposição do TAC sob condições ácidas (A) e alcalinas (B)



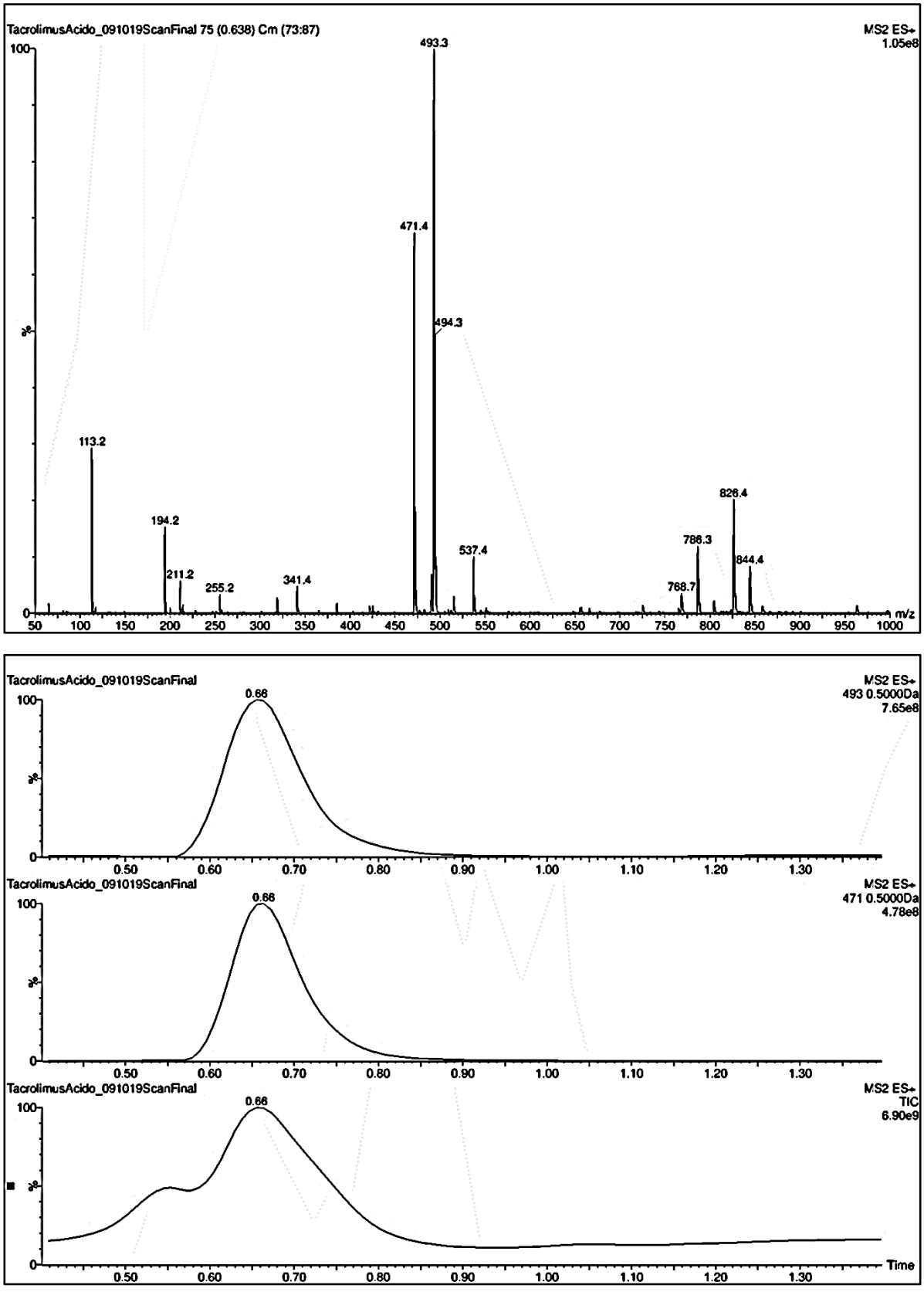

Fonte: O autor

As Figuras 17 e 18 demonstram os espectros de massas dos produtos de degradação encontrados na banda cromatográfica após hidrólise ácida (Figura 17) e básica (Figura 18). Em relação a hidrólise ácida, os produtos de degradação majoritários possuem *m/z* de 493,3 e 471,4 e foi possível observar a presença do íon *m/z* = 826,4 que representa o TAC, indicando que o fármaco é passível de degradação nessa condição, porém uma parte dele continua presente após a exposição por uma hora. Já em meio alcalino foi possível notar a presença dos mesmos íons de degradação majoritários, e também do íon representante do TAC, porém em

quantidade inferior que na degradação ácida, além da presença de outros íons que não apareceram durante a hidrólise ácida.

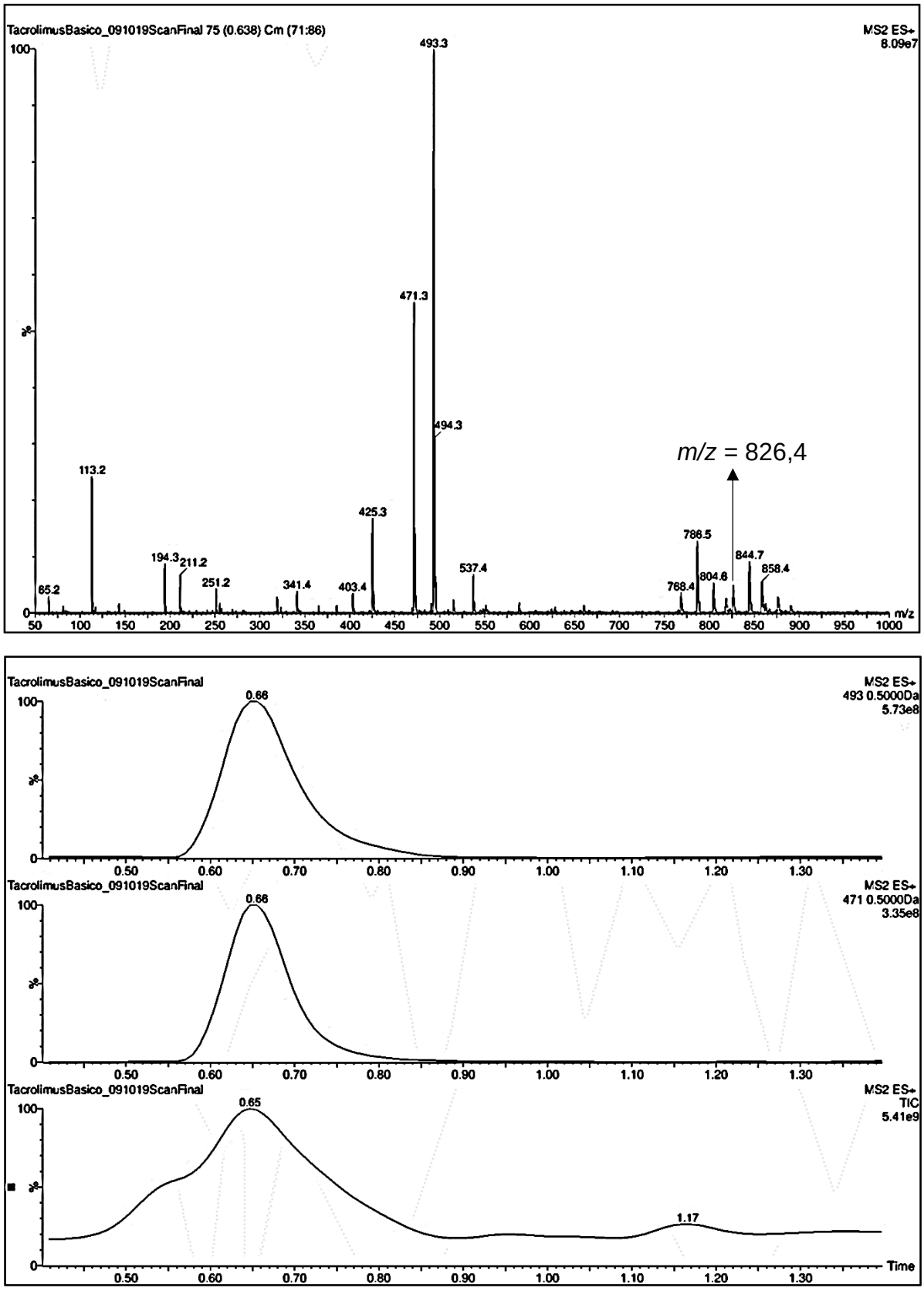
Além disso, na corrida cromatográfica foi possível observar que os íons saem no mesmo tempo de retenção que o TAC, tanto em condições ácidas como alcalinas, sendo, portanto, difícil a sua separação.

FIGURA 17 – Espectro de massas do TAC após hidrólise ácida e cromatogramas dos íons majoritários




Fonte: O autor

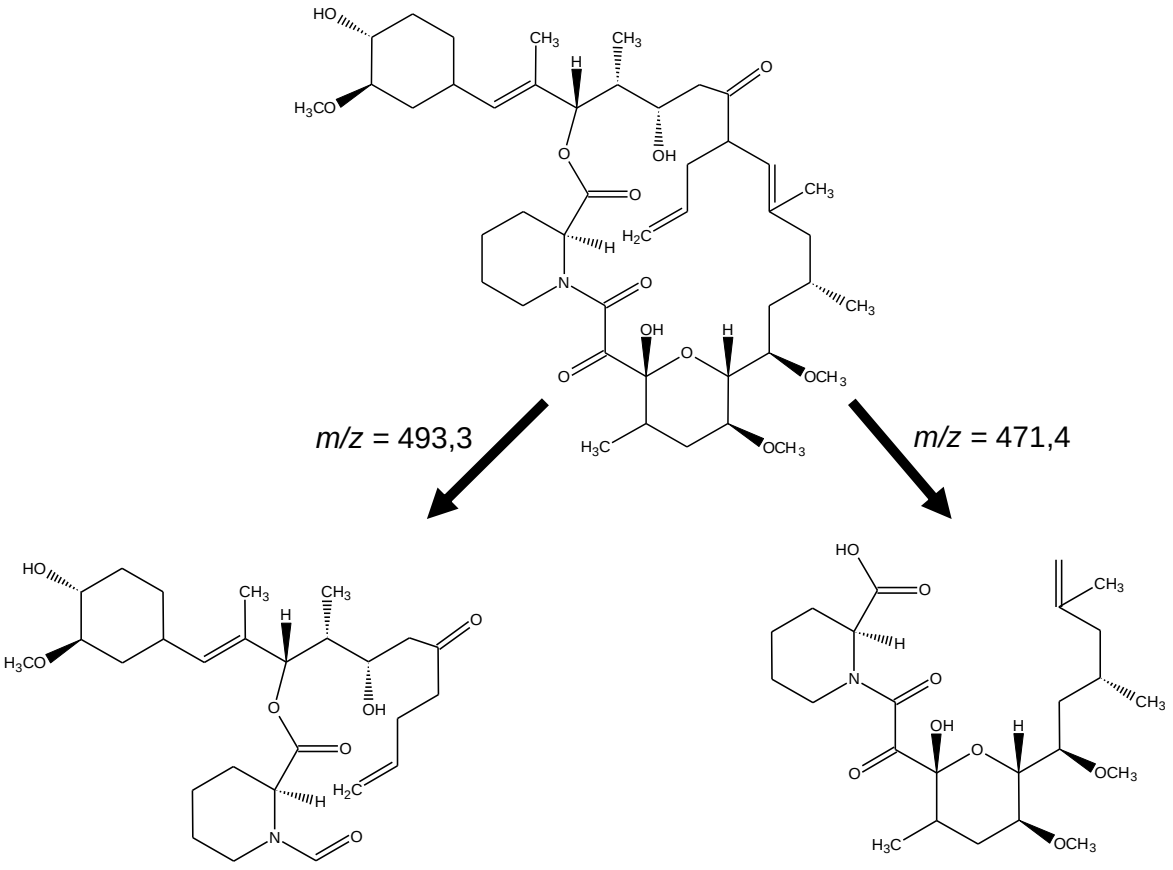
FIGURA 18 – Espectro de massas do TAC após hidrólise básica e cromatogramas dos íons majoritários




Fonte: O autor

A partir disso, as estruturas químicas dos íons formados sob as condições ácidas e alcalinas ao qual o TAC foi submetido encontram-se representadas na Figura 19, sendo, então esses os principais produtos de degradação do TAC.

FIGURA 19 – Estruturas químicas dos íons majoritários a partir do TAC




Fonte: O autor

Com isso, foi possível concluir que o TAC é suscetível a degradação tanto ácida como alcalina (HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M, respectivamente), porém sendo mais degradável em condições básicas. O que não condiz com o relatado na literatura que afirma que o mesmo é propenso a degradação apenas em pH acima da neutralidade, principalmente acima de 9,0 (PETERKA *et al.*, 2019; SAVIĆ *et al.*, 2017; SKAK; HANSEN, 2016).

### 5.2.4 Eficiência de Encapsulação

A concentração do fármaco incorporado nas nanopartículas (mg/mL) e a EE (%) foi realizada a partir do método de UHPLC desenvolvido, devidamente validado,

e os resultados estão resumidos na Tabela 9. Todas as formulações preparadas pelo método de nanoprecipitação apresentaram valores superiores a 96%, que é adequado para EE%. Isso se deve ao fato de que o método empregado no preparo das NCs ser adequado para fármacos altamente lipofílicos e que otimiza a encapsulação nas nanopartículas.

TABELA 9 – Teor de TAC incorporado nas nanocápsulas de PCL (mg/mL) e eficiência de encapsulação (EE %)

| **Formulação** | **Concentração teórica de TAC (mg/mL)** | **EE (%)*** |
|---|---|---|
| NC-1 | 0,1 | 96,47 |
| NC-2 | 1 | 99,39 |
| NC-3 | 5 | 99,82 |

*n=3
Fonte: O autor

Estes valores podem ser justificados, principalmente, devido à baixa solubilidade aquosa (4-12 µg/mL, PubChem) do TAC e a cavidade central à base de óleo na nanocápsula, onde uma alta EE de fármacos lipofílicos é observada, justamente pela afinidade pelo núcleo (NAGAVARMA *et al.*, 2012; VENTURINI *et al.*, 2011). Estes resultados são semelhantes e até melhores que em outros trabalhos anteriormente relatados na literatura. Nanomicelas poliméricas contendo TAC mostraram uma EE de 91,1 a 96,2 % (LIU *et al.*, 2019). Nanopartículas de mPEG-*b*-PLGA contendo TAC apresentaram uma EE de 80% (WU et al., 2019). Uma EE de 97,2 a 98,7% foi verificado em nanopartículas lipídicas formadas por técnica de microemulsão (ANDRADE *et al.*, 2017).

Portanto, o método validado foi aplicado com sucesso para a determinação do TAC em nanopartículas poliméricas e pode ser considerado uma ferramenta importante para o controle de qualidade destas formulações.

## 5.3 DETERMINAÇÃO DO pH

A Tabela 10 mostra os valores adquiridos para o pH das nanosuspensões no momento em que foram formuladas.

TABELA 10 – Valores obtidos de pH logo após a obtenção das suspensões de nanocápsulas

| Formulações | Média | DP* |
|---|---|---|
| **NC-N** | 5,77 | ± 0,45 |
| **NC-1** | 5,86 | ± 0,28 |
| **NC-2** | 6,25 | ± 0,18 |
| **NC-3** | 5,98 | ± 0,11 |

*DP = desvio padrão (n = 3)
Fonte: O autor

Foi possível verificar com esses valores que a adição do fármaco nas formulações NC-1, NC-2 e NC-3 não exerceu influência significativa, pois elevou levemente o pH das mesmas, porém mantendo o caráter ácido esperado por conta da estrutura química do polímero utilizado. O PCL é um poliéster contendo grupos carboxílicos que podem ser expostos e gerar, assim, o pH mais ácido, devido a eletronegatividade do grupo carbonila e efeito de ressonância do éster (GOMES *et al.*, 2018; SOLOMONS, 2009).

## 5.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE

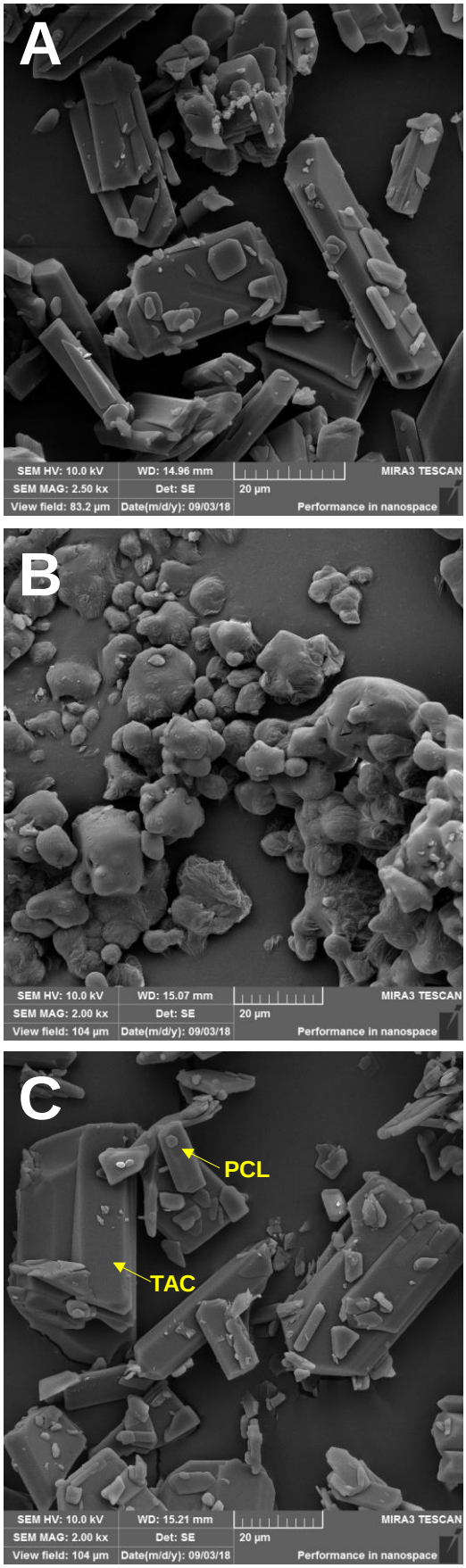
### 5.4.1 Análise da Morfologia e Superfície

Os resultados obtidos por FEG-SEM para o TAC, PCL e MF estão indicados na Figura 9, sendo que as fotomicroscopias foram obtidas em aumento aproximado de 2000 vezes. Foi possível verificar que o fármaco (Figura 20, a) apresentou uma morfologia cristalina, irregular e de superfície aparentemente lisa. O PCL (Figura 20, b) mostrou-se com partículas de superfície levemente irregular, dura e quebradiça, enquanto na MF é possível observar um emaranhado das duas substâncias (Figura 20, c) (GOLÇALVES, 2003).

Com relação as nanopartículas, foi possível observar a presença de partículas com formato esférico bem definido, superfície lisa e uniforme (Figura 21, c) mesmo na presença de lactose utilizada como agente crioprotetor 10% (Figura 21, a – lactose pura pós processo de liofilização), condizente com o encontrado na literatura sobre nanopartículas preparadas a partir do PCL e pelo método de nanoprecipitação, como nota-se na formulação NC-N (Figura 21, b) sem adição do TAC (KONG *et al.*, 2018;

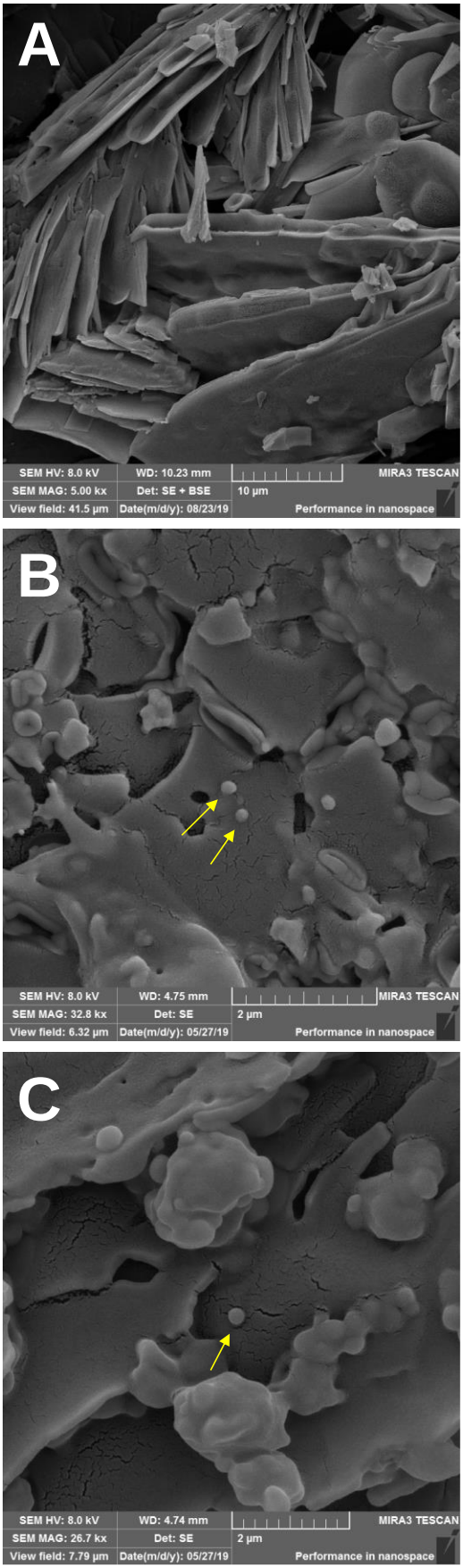
PARASHAR *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2017; SHAABAN; SHAKER; MADY, 2017; KALITA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2013; FESSI *et al.*, 1989). Para as nanocápsulas contendo TAC todas obtiveram a mesma morfologia e superfície lisa, e em nenhuma foi possível verificar a presença de cristais do fármaco na parte externa, indicando a sua encapsulação.

FIGURA 20 – Aspectos morfológicos do tacrolimus puro (a), do PCL triturada (b) e da mistura física (PCL:TAC) (c) por FEG-SEM, aumento de 2.000 a 2.500 x




Fonte: O autor

FIGURA 21 – Fotomicrografias da lactose (a) e das nanocápsulas poliméricas liofilizadas NC-N (b) e NC-3 (c) por FEG-SEM, aumento de 5.000 a 32.800 x




Fonte: O autor

### 5.4.2 Determinação do Diâmetro Médio e do Potencial Zeta

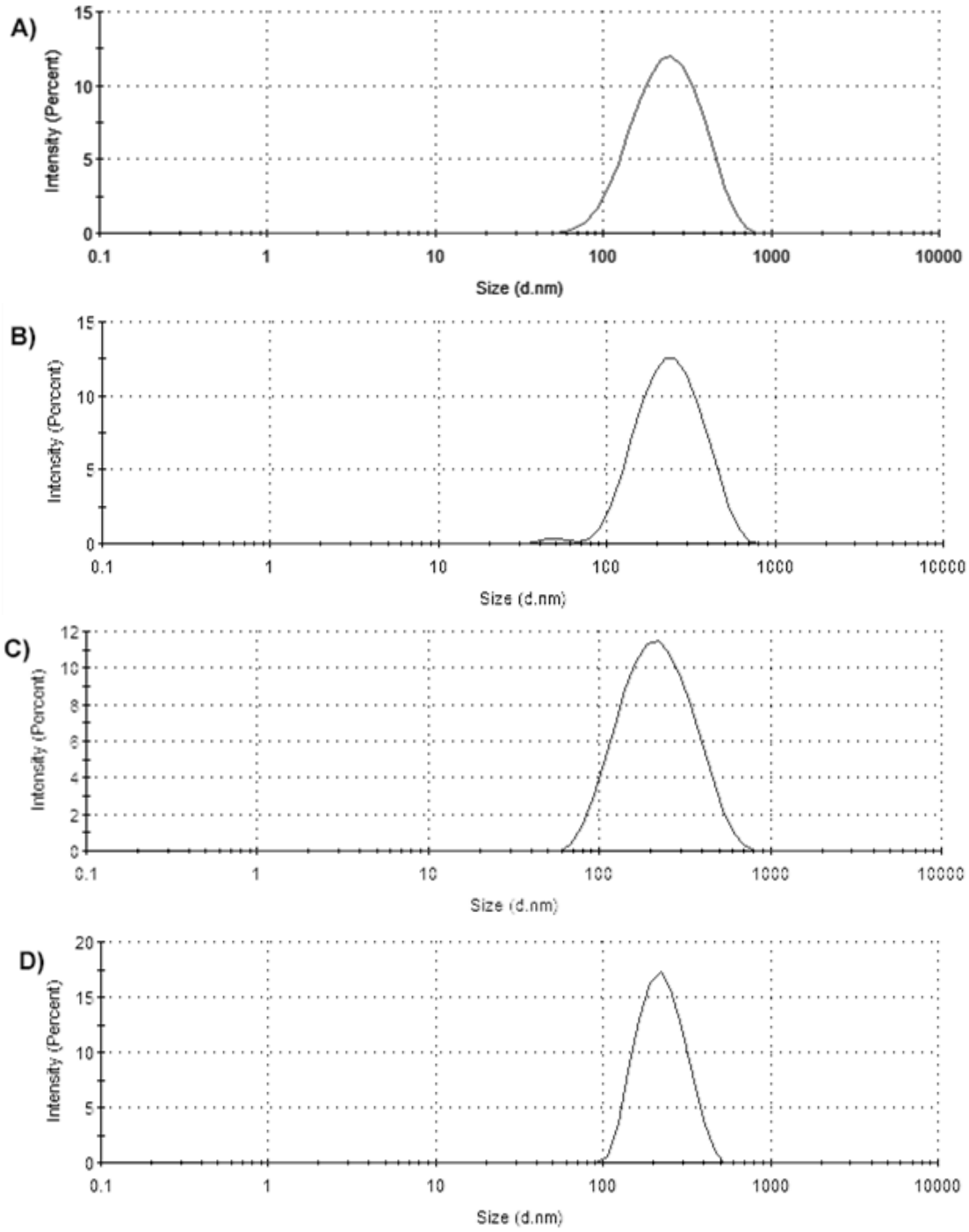
Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta para as nanocápsulas poliméricas contendo TAC estão apresentados na Tabela 11, sendo que os gráficos de IPD estão demonstrados na Figura 22.

TABELA 11 – Valores obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanocápsulas poliméricas contendo TAC

| **Formulação** | **Diâmetro médio (nm)** | | **Índice de Polidispersidade** | | **Potencial Zeta (mV)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Média*** | **DP**** | **Média** | **DP** | **Média** | **DP** |
| **NC-N** | 250,53 | ± 43,11 | 0,24 | ± 0,04 | -42,60 | ± 5,58 |
| **NC-1** | 243,66 | ± 43,95 | 0,23 | ± 0,03 | -44,48 | ± 1,48 |
| **NC-2** | 226,64 | ± 32,28 | 0,23 | ± 0,04 | -38,11 | ± 3,12 |
| **NC-3** | 233,19 | ± 30,02 | 0,21 | ± 0,04 | -38,52 | ± 3,74 |

*Teste estatístico ANOVA 1 via. **DP = desvio padrão (n = 3).
Fonte: O autor

FIGURA 22 – Gráficos de IPD das nanocápsulas poliméricas sem ou com TAC, NC-N (a), NC-1 (b), NC-2 (c) e NC-3 (d)




Fonte: Complexo de Laboratórios Multiusuários – UEPG, 2018

Em todas as formulações foi possível encontrar a presença de nanocápsulas poliméricas com diâmetro médio entre 226,64 nm (formulação NC-2) e 250,53 nm (formulação NC-N). Segundo teste estatístico realizado, não há diferença significativa entre as formulações, indicando que ambas possuem diâmetro médio similares.

Esse diâmetro médio deve-se a determinação do diâmetro hidrodinâmico pela técnica do DLS e efeito Doppler – frequência de radiação emitida pelas partículas que se desloca para valores maiores ou menores dependendo da velocidade e direção. Em dispersão líquida as partículas coloidais possuem uma camada adsorvida de íons ou moléculas do meio de dispersão que se move com as partículas em movimento browniano. Portanto, o diâmetro hidrodinâmico acaba sendo maior que o tamanho físico da partícula e, por isso, o valor encontrado fica maior que o visualizado microscopicamente (BUCKTON, 2016; BHATIA, 2016; PIRES, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Segundo Schaffazick *et al.* (2003), as nanopartículas poliméricas geralmente apresentam diâmetro entre 100 e 300 nm e isso deve-se a fatores determinantes como a formulação, método de preparo e, no caso de nanocápsulas, a natureza do óleo utilizado no núcleo, assim como, o polímero e sua massa molecular e a presença do fármaco.

Com relação ao IPD, todas as formulações revelaram valores inferiores a 0,3, o que indica distribuição homogênea do tamanho das nanocápsulas poliméricas, apresentando um comportamento unimodal, como visualizado na Figura 11. Uma distribuição uniforme do tamanho da partícula é obtida quando as fases orgânicas e aquosas se misturam rapidamente para formar uma solução homogênea (MARKWALTER *et al.*, 2019; VÁSQUEZ MARCANO *et al.*, 2018; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial zeta determinado nas nanocápsulas de PCL indica uma ótima estabilidade eletrostática das partículas, já que o mesmo reflete indiretamente o potencial de superfície das mesmas e o valor para isso deve ser maior que ± 30 mV, estando as formulações de acordo. Essa boa estabilidade deve-se a grandes forças repulsivas que evitam que as partículas se agreguem em função de colisões ocasionais (BHATIA, 2016; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Com isso, os valores de tamanho de partícula e as propriedades da superfície podem desempenhar um papel importante na sua bioatividade, influenciando a liberação *in vitro* do fármaco, já que o menor tamanho da partícula leva a uma maior área superficial, o que resulta na rápida liberação do ativo. Além disso, melhora a interação com células bacterianas, captação celular e citotoxicidade destas nanopartículas, bem como sua farmacocinética e biodistribuição *in vivo*, aumentando

assim, a eficácia terapêutica do fármaco encapsulado (BHATIA, 2016; KALITA *et al.*, 2015).

## 5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL

### 5.5.1 Análise por Difração de Raios X

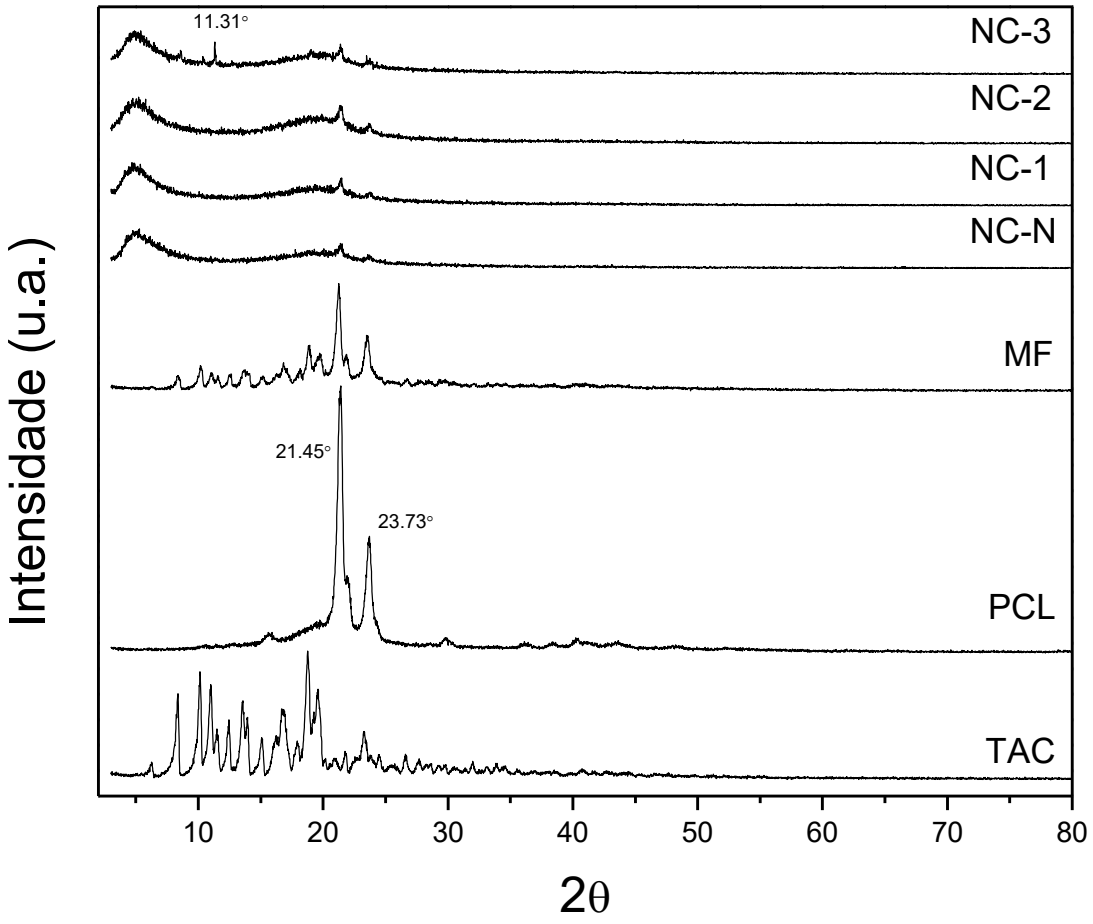
Substâncias no estado sólido podem ser cristalinas ou amorfas (ou ambas), sendo as cristalinas aquelas nas quais as moléculas são dispostas segundo uma ordem especifica em nível molecular, que se repete indefinidamente ao longo de toda partícula, enquanto que as amorfas não apresentam um arranjo padrão de repetição ordenado e extenso e possuem propriedades diferentes das cristalinas (BUCKTON, 2016; CUFFINI; PITALUGA-Jr; TOMBARI, 2009). Quando os fármacos são submetidos a nanodimensionamento, elas podem sofrer mudanças no estado sólido e isto é crítico, já que estar no estado cristalino ou amorfo está diretamente relacionado com a estabilidade física e a solubilidade do ativo e, portanto, suas propriedades de dissolução (SERRANO; GALLAGHER; HEALY, 2015).

Na Figura 23 é possível verificar os difratogramas das nanopartículas, preparadas na presença e ausência do fármaco. Em relação ao fármaco puro, foi visualizado picos intensos de cristalinidade entre $2\theta$ = 5 e 20º, como encontrado na literatura (DANTAS *et al.*, 2018; PONNAMMAL *et al.*, 2018; OBAIDAT *et al.*, 2017; BINKHATHLAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016), enquanto que o PCL comprovou sua natureza semicristalina, com picos característicos ($2\theta$ = 21,45 e 23,73º) (GOMES *et al.*, 2019; VÁSQUEZ MARCANO *et al.*, 2018; CARLETTO *et al.*, 2016). A MF demonstra picos coincidentes com os do fármaco e do polímero e foi possível observar que a mistura não altera a cristalinidade tanto do PCL como do TAC (YAMASHITA *et al.*, 2003).

Com relação as nanocápsulas, visualizou-se o desaparecimento dos picos de cristalinidade do fármaco, indicando que ocorreu amorfização do TAC durante o encapsulamento. Em todas as nanocápsulas, tanto na presença ou ausência de fármaco, apareceram os picos de cristalinidade do PCL. No difratograma da NC-3 é possível verificar a existência de um pico de cristalinidade em $2\theta$ = 11,31º que corresponde ao mesmo pico encontrado no XRD do fármaco puro, indicando a possível presença de cristais de fármaco na superfície da partícula devido a maior

concentração do mesmo nessa formulação, mesmo não sendo visualizado na microscopia eletrônica.

FIGURA 23 – Difratograma do TAC, PCL, da MF e das nanocápsulas




Fonte: O autor

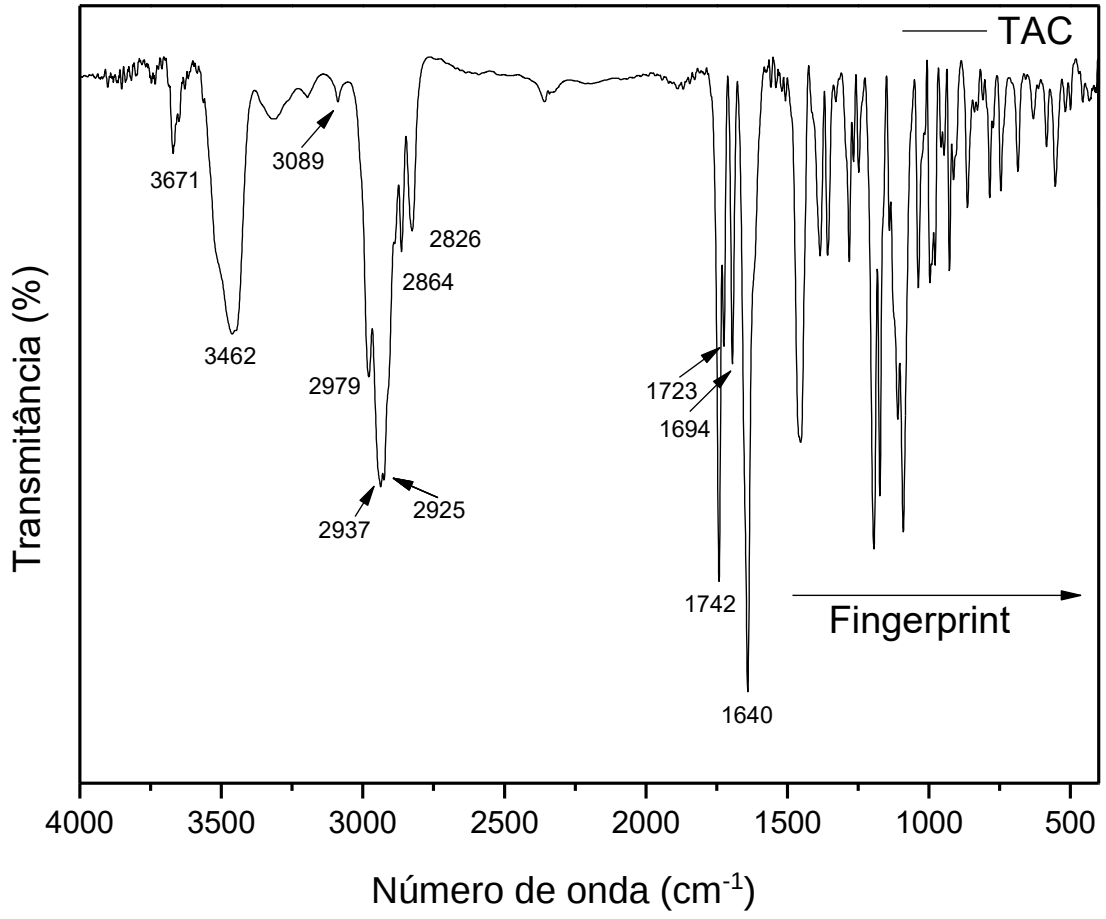
Dantas *et al*. (2018), Obaidat *et al.* (2017) e Wang *et al.* (2016), observaram que a incorporação de TAC leva a uma desordem no sistema cristalino e com isso reduz a sua organização estrutural. A ausência de picos do fármaco no XRD das nanocápsulas pode ser pela baixa quantidade do mesmo ou a total conversão do fármaco na sua forma amorfa durante a preparação. Além disso, Serrano; Gallagher; Healy (2015), discutem que a redução do tamanho das partículas leva a uma diminuição na intensidade e alargamento dos picos que podem dificultar a quantificação precisa do conteúdo cristalino em nanopartículas.

### 5.5.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho

A análise de FTIR foi realizada para avaliar a presença de grupos funcionais característicos nas nanocápsulas de PCL contendo TAC, bem como possíveis modificações no espectro devido a interações moleculares entre o fármaco e as formulações (ABRIATA *et al.*, 2019; ZANETTI *et al.*, 2019).

A Figura 24 mostra o espectro de FTIR do TAC puro, o qual mostrou uma banda de vibração de estiramento do grupo OH livre (3671 $cm^{-1}$) e de OH em ligação de hidrogênio intermolecular (3462 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento de carbono hibridizado $sp^2$ (3089 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento de carbono hibridizado $sp^3$ (2979, 2937, 2925 e 2864 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento O-$CH_3$ (2826 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento C = O de éster (1742 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento C = O de cetona (1723 e 1694 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento C = O de amida e de $H_2C$ = $CH_2$ (1640 $cm^{-1}$), demais sinais abaixo de 1500 $cm^{-1}$ deve-se as vibrações angulares e *fingerprint* da molécula. Sinais semelhantes aos atribuídos também foram encontrados na literatura (PONNAMMAL *et al.*, 2018; OBAIDAT *et al.*, 2017; FERRABOSCHI *et al.*, 2012; PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M., 2009; SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J., 2005; YAMASHITA *et al.*, 2003).

FIGURA 24 – Espectro de FTIR do Tacrolimus (TAC) – (2 $cm^{-1}$, 64 scans, pastilha com KBr)




Fonte: O autor

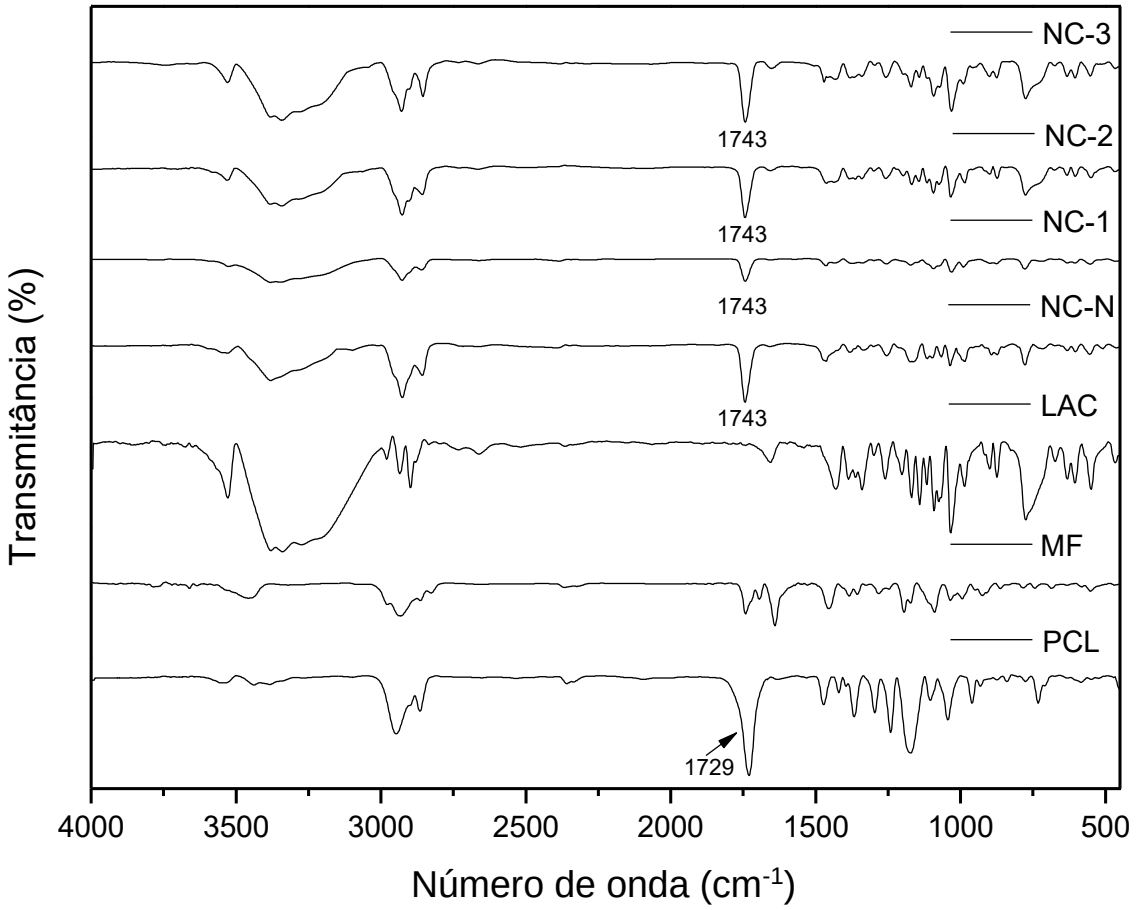
Os demais espectros de FTIR do PCL, da MF, da lactose monohidratada e das nanocápsulas com e sem fármaco liofilizadas com lactose como agente crioprotetor 10% estão apresentados na Figura 25. O espectro de FTIR do PCL mostrou bandas características do polímero como vibrações de estiramento de carbono hibridizado $sp^3$ (2948, 2899 e 2865 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento C = O de éster (1729 $cm^{-1}$), vibrações angulares de carbono hibridizado $sp^3$ (1473 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento simétrico C – O (1297 e 1241 $cm^{-1}$) e estiramento assimétrico (1175 $cm^{-1}$) e vibrações angulares de carbono hibridizado $sp^3$ (731 $cm^{-1}$). As bandas de absorção atribuídas a mistura física correspondem à sobreposição dos espectros de FTIR do fármaco puro e polímero, não havendo modificação das mesmas.

A lactose monohidratada possui bandas de vibrações de estiramento OH em ligação de hidrogênio intermolecular (3530 $cm^{-1}$) e OH polimérico (3300 $cm^{-1}$), vibrações de estiramento de carbono hibridizado $sp^3$ (2980, 2934, 2898 e 2879 $cm^{-1}$),

vibrações de estiramento C – O e estiramento assimétrico C – O – C de éter (1035 $cm^{-1}$) e vibrações angulares OH (775 $cm^{-1}$).

Com relação aos espectros das formulações de PCL contendo ou não TAC, foi possível observar em todos os espectros os sinais referentes a LAC utilizada para liofilizar e bandas pertencentes ao PCL, principalmente a banda de vibração de estiramento C = O de éster do polímero (1743 $cm^{-1}$) em região muito semelhante ao do polímero puro (1729 $cm^{-1}$), esse leve deslocamento provavelmente deve-se ao processo de formulação das nanocápsulas poliméricas. Não foi possível verificar sinais do fármaco em nenhum dos espectros das mesmas, sendo muito semelhantes ao da formulação controle sem adição de TAC.

FIGURA 25 – Espectros de FTIR do PCL, da Mistura Física (MF), da lactose (LAC) e das nanocápsulas poliméricas – (2 $cm^{-1}$, 64 scans, pastilha com KBr)




Fonte: O autor

Com o intuito de verificar se nos espectros das formulações realmente não aparece sinal do TAC, foi realizado o cálculo da intensidade da banda de vibração de

estiramento C – O (1038 $cm^{-1}$), que visualmente parece aumentar a intensidade com o aumento da concentração de TAC, de acordo com a área de cada banda. A Tabela 12 mostra os valores de intensidade.

TABELA 12 – Valores obtidos para a intensidade das bandas de vibração de estiramento C-O nas formulações

| Formulação | Intensidade* |
|---|---|
| **NC-N** | 0,98 |
| **NC-1** | 0,98 |
| **NC-2** | 1,01 |
| **NC-3** | 0,93 |

*$I=(A_{1038}/A_{1743})$
Fonte: O autor

Foi possível notar que os valores de intensidade são semelhantes entre as formulações e isso indica que o sinal de vibração de estiramento C-O pertence ao polímero e não ao fármaco.

Com isso, conclui-se que as bandas características do fármaco desapareceram e que não há interação físico-química significativa entre os componentes da formulação que promoveriam alteração na estrutura química do TAC, pois não ocorreram evidências de deslocamento considerável das bandas principais quando comparadas com aquelas nos espectros das substâncias isoladas. Assim, esses resultados indicam que o TAC pode ser completamente encapsulado e o polímero está servindo apenas como carreador.

### 5.5.3 Análise por Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica vibracional complementar ao FTIR, pois a informação resultante do espectro Raman é similar a informação do espectro de FTIR, sendo a principal diferença entre as técnicas a forma de excitar as ligações da estrutura molecular da amostra para ser detectado pelo espectrômetro. Por conta disso, as bandas que possuem alta intensidade no Raman muitas vezes são fracas no FTIR e vice-versa (KÄPPLER *et al.*, 2016).

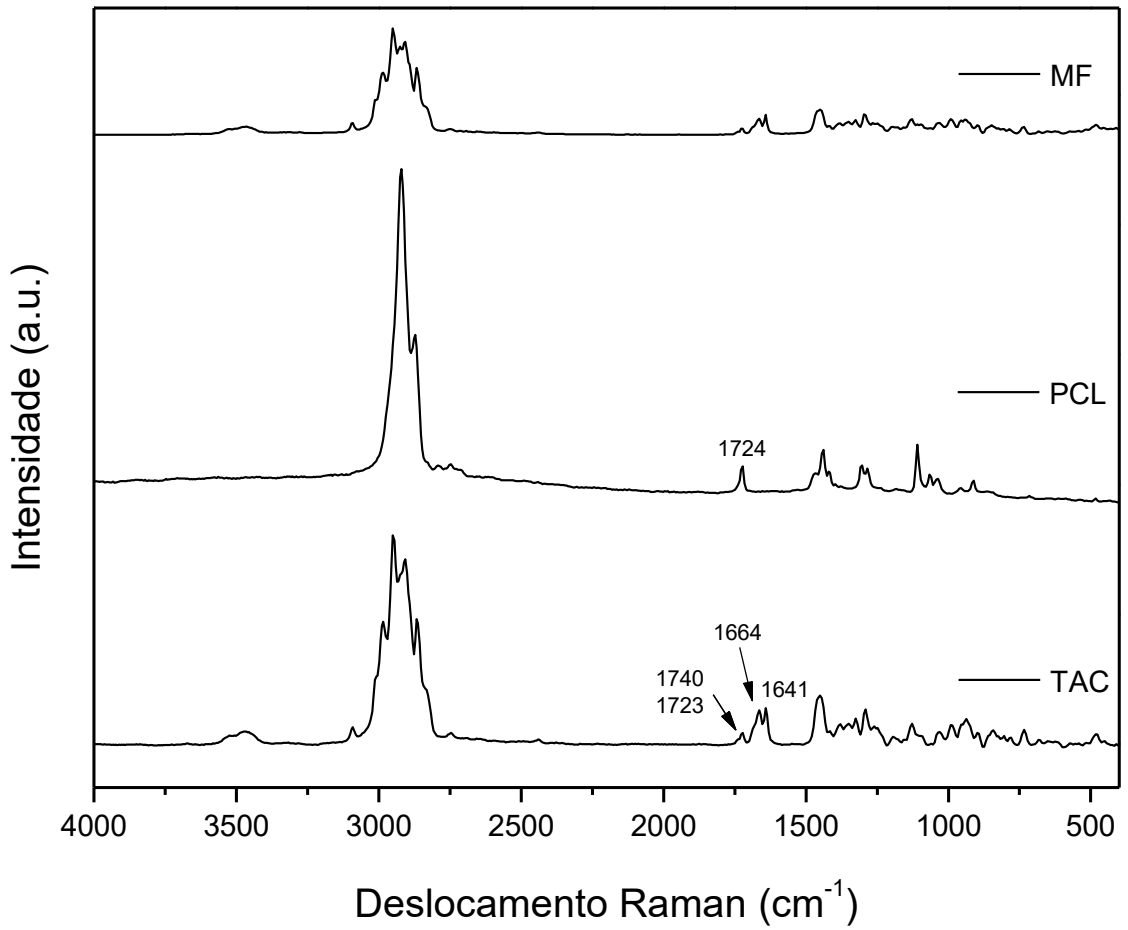
Assim como no FTIR o espectro Raman também é capaz de revelar detalhes sobre as propriedades e estrutura de materiais a nível molecular, além das possíveis

modificações no espectro devido a interações entre o fármaco e as formulações (ABRIATA *et al.*, 2019; ZANETTI *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2003).

Sendo assim, a Figura 26 demonstra os espectros Raman do TAC puro, PCL pura e MF (TAC:PCL) e como nos FTIR foi possível observar as mesmas bandas de vibração de estiramento e *fingerprint* das moléculas, principalmente as vibrações de estiramento C = O do TAC (1723, 1740, 1664 e 1641 $cm^{-1}$) e do PCL (1724 $cm^{-1}$). A MF também mostrou uma sobreposição dos dois espectros.

Com isso, esses valores confirmam que fármaco e polímero podem estar presentes na formulação e que não ocorre reação química entre eles que seja capaz de modificar suas estruturas.

FIGURA 26 – Espectros Raman do TAC puro, PCL pura e MF (TAC:PCL)



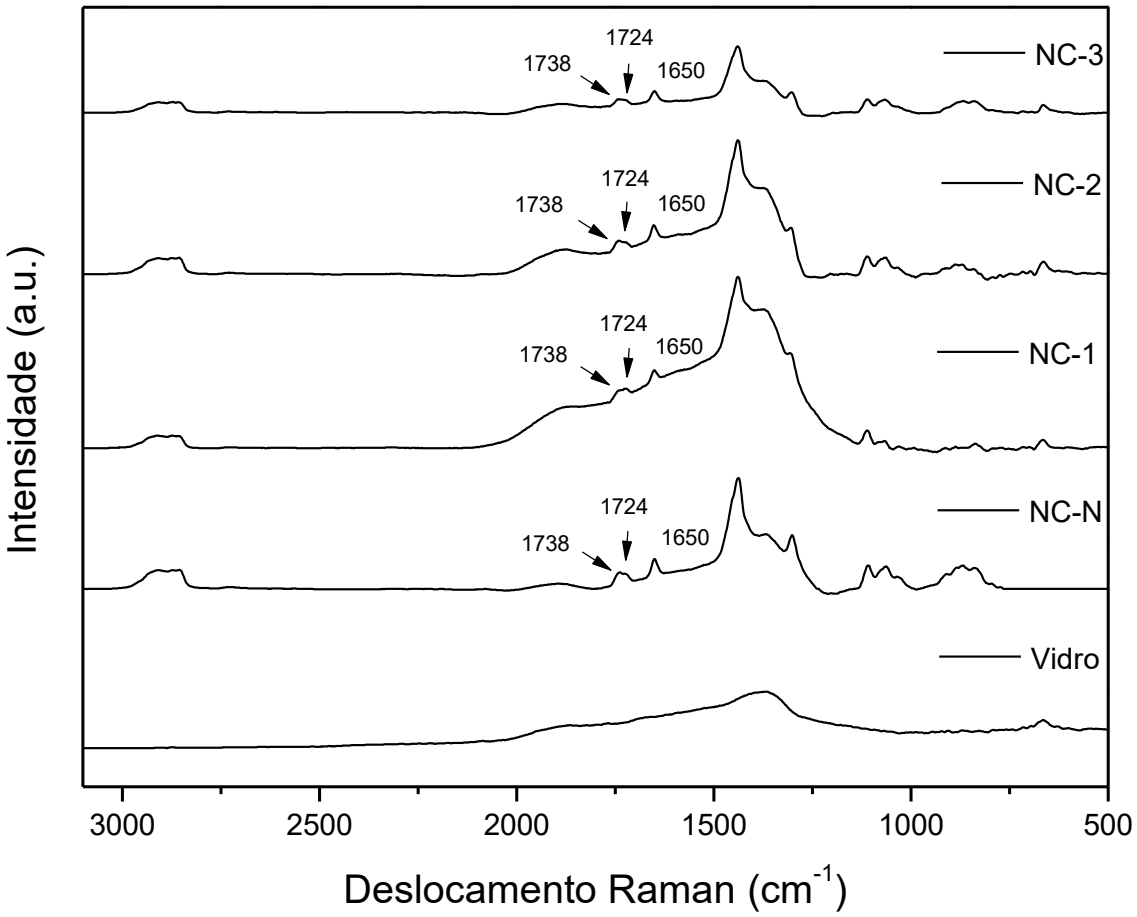

Fonte: O autor

A Figura 27 demonstra os espectros Raman das nanocápsulas com e sem fármaco, além do vidro, o qual foi utilizado como suporte para análise. Em todos os espectros foi possível verificar o sinal de vibração de estiramento C = O da carbonila

do PCL (1724 $cm^{-1}$), assim como observado no espectro do polímero isolado. Porém também foi possível notar a presença de outros dois sinais de vibração de estiramento C = O (1738 $cm^{-1}$) e HC = CH (1650 $cm^{-1}$) que possivelmente devem ser sinais do Tween 80®, tensoativo de fase aquosa utilizado na formulação e que fica na superfície das partículas após o preparo. Como o FTIR foi realizado com as amostras liofilizadas, provavelmente o tensoativo residual acabou secando junto com a água presente na amostra. Já o espectro Raman foi obtido das nanossuspensões, logo o Tween 80® continuou presente. A Figura 28 representa a estrutura química do tensoativo.

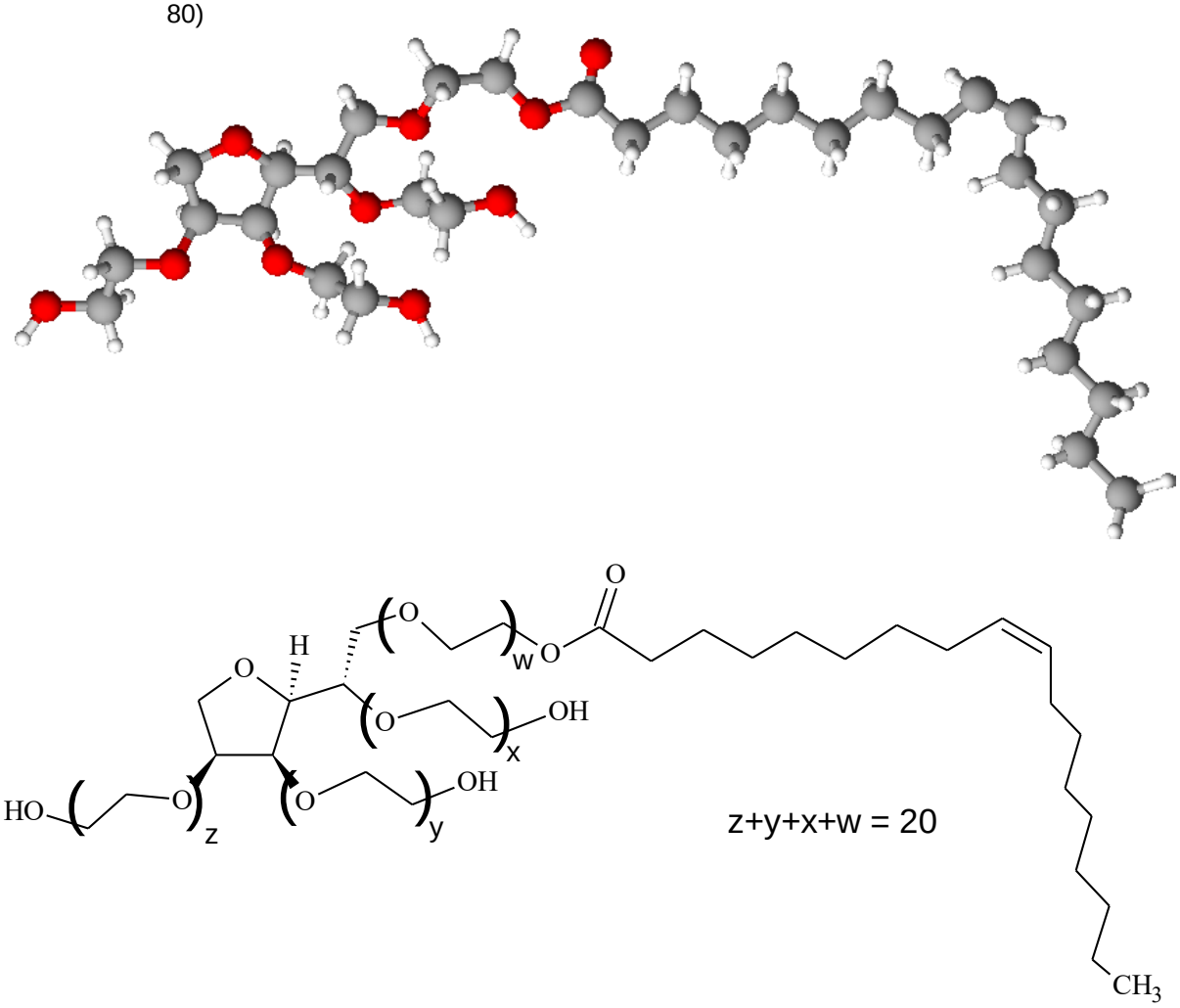
Portanto, por meio desta análise também foi possível notar que houve a encapsulação do TAC pelo método de preparo utilizado já que não se observou bandas características do TAC nos devidos espectros.

FIGURA 27 – Espectros Raman das nanocápsulas poliméricas (NC-N, NC-1, NC-2 e NC-3)




Fonte: O autor

FIGURA 28 – Estrutura tridimensional e química do tensoativo de fase aquosa Tween 80® (polissorbato 80)




Fonte: O autor

## 5.6 ANÁLISE TÉRMICA

Métodos termo-analíticos, como TG/DTG e DSC, têm grande importância na caracterização de sistemas de liberação de fármacos, já que os mesmos são capazes de investigar interações indesejáveis entre o fármaco e o material carreador e em diversos tipos diferentes de formulações. Além disso, outras informações também são capazes de apresentar, como a morfologia do polímero cristalino e o estado da dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a esses sistemas de liberação poliméricos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Essas análises, segundo Matos e Machado (2004), podem ser definidas como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em

função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada.

Na área de fármacos e medicamentos são técnicas muito adequadas para caracterização de fármacos, sólidos e excipientes; determinação da pureza de uma dada espécie a partir da avaliação do processo endotérmico de fusão; caracterização de polimorfos em fármacos empregando a associação das técnicas de TG/DTG e DSC; estudos de estabilidade térmica de produtos farmacêuticos aplicando-se métodos cinéticos isotérmicos e/ou não isotérmicos (dinâmicos); entre outros (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

### 5.6.1 Termogravimetria

A TG é uma técnica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante; a temperatura em que começam a se decompor e acompanhar o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, etc (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009; MATOS; MACHADO, 2004).

Enquanto na análise da DTG, as curvas são registradas a partir das curvas de TG e correspondem à derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt), que é registrada em função da temperatura ou do tempo (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009; MATOS; MACHADO, 2004). Os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofridas pela amostra e permitem obter dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas. As curvas de DTG indicam com exatidão, as temperaturas correspondentes ao início ($T_{onset}$) e término ($T_{endset}$) dos eventos, além do instante em que a velocidade de reação é máxima. Os picos agudos permitem distinguir claramente uma sucessão de reações que muitas vezes não podem ser claramente distinguidas nas curvas de TG e as áreas dos picos correspondem exatamente à perda ou ganho de massa e podem ser utilizadas em determinações tanto quantitativas como qualitativas (IONASHIRO; GIOLITO, 2004).

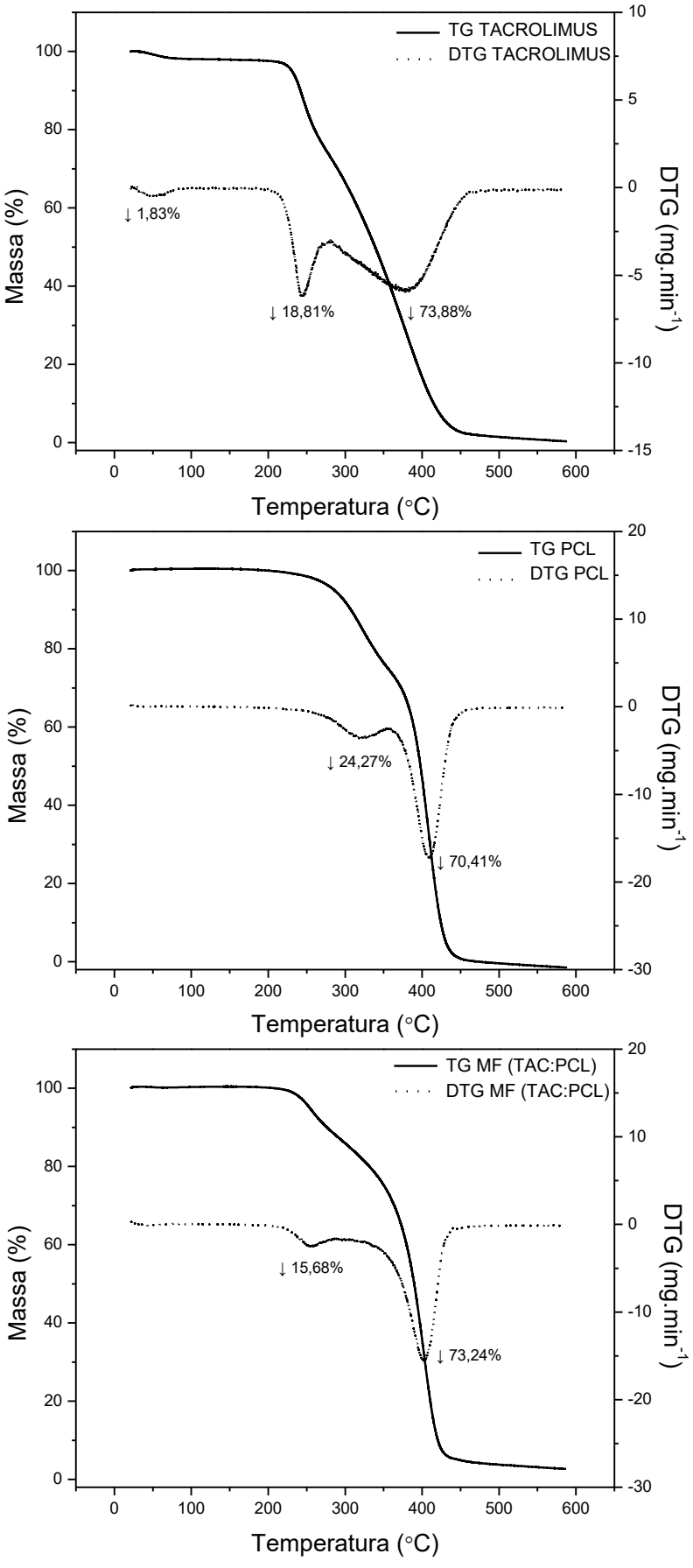
Com isso, as curvas de variação de massa em função de temperatura, permitem tirar conclusões sobre a estabilidade térmica da amostra, sobre a composição e estabilidade dos compostos intermediários e sobre a composição de resíduos (IONASHIRO; GIOLITO, 2004).

As curvas de TG e DTG obtidas para o TAC, PCL puro, MF (TAC:PCL), lactose utilizada como agente crioprotetor e das nanocápsulas, estão representados nas Figuras 29, 30 e 31. Em relação ao TAC é possível observar que o fármaco possui três eventos de degradação, de 270 até 460 ºC tem-se uma curva característica sendo constantemente degradado, indicando a sua instabilidade térmica nessa faixa de temperatura. O primeiro evento observado entre 25 e 87 ºC provavelmente deve-se a uma perda de umidade encontrada na amostra. O total de perda de massa ao término dos eventos foi de 94,53%, sendo o equivalente a 1,83, 18,81 e 73,88% em cada um deles.

O PCL possui dois eventos de degradação. A porcentagem total de massa perdida ao final foi de 94,69%, sendo 24,27 e 70,41% em cada um deles. A MF do fármaco e polímero também possuem dois eventos, que por sua vez, coincidem com as regiões térmicas de degradação dos compostos puros, que partem de 220 até aproximadamente 442 ºC, sendo o total de massa perdida de 88,91%. A lactose pura apresenta três eventos, um deles característico da perda de água, já que a mesma é monohidratada, ou seja, para cada molécula de lactose há uma molécula de água. Os outros eventos ocorrem em região térmica semelhante ao do fármaco e polímero, porém ainda ficando com mais de 30% de massa ao final dos eventos de degradação, demonstrando sua melhor estabilidade térmica.

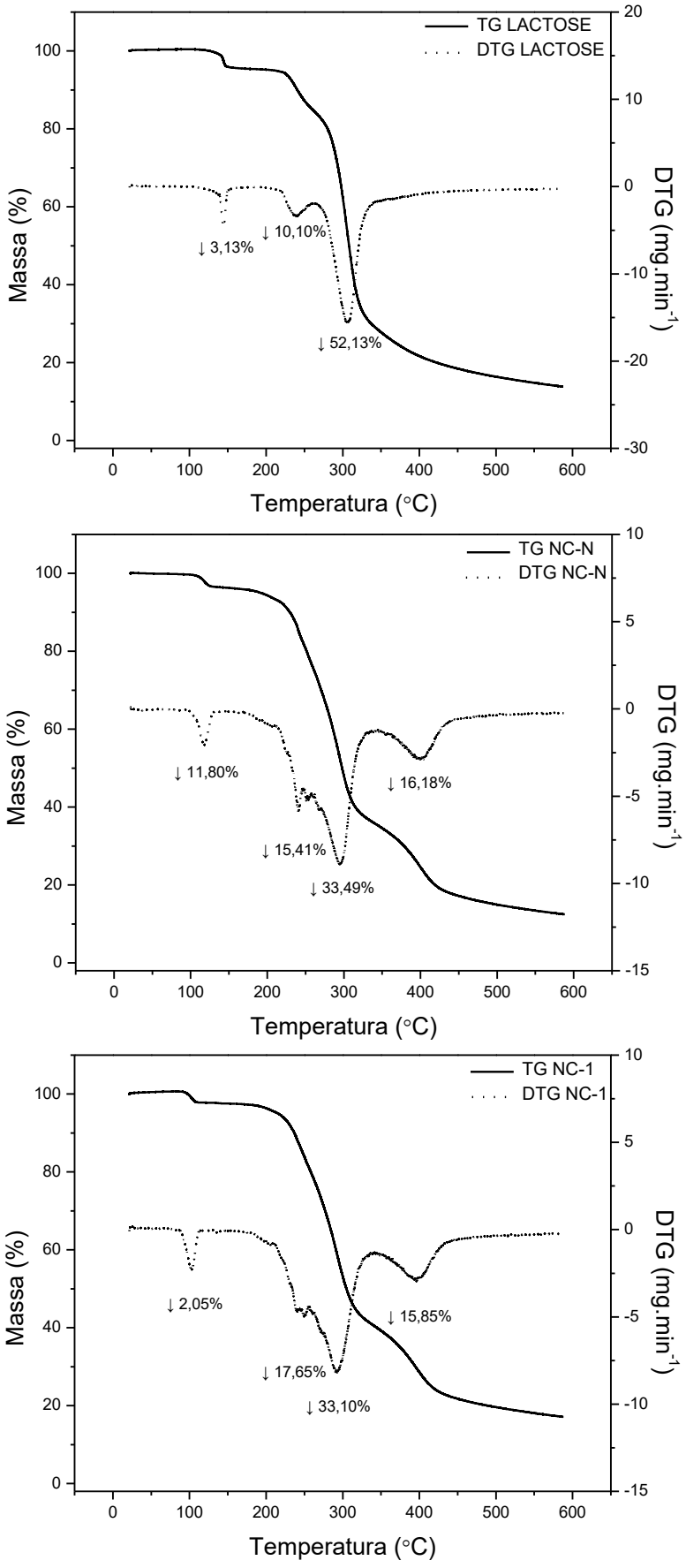
O TG e DTG das formulações demonstraram semelhanças independente da presença do fármaco e da concentração, com isso foi verificado a existência de quatro eventos de degradação em todas as amostras, sendo o primeiro idêntico ao da evaporação da água na lactose e o último evento típico da degradação do PCL, iniciando perto de 350 ºC. Os demais eventos devem-se a degradação de todos os componentes, na faixa entre 200 e 350 ºC. Por fim, foi possível observar que a nanoencapsulação do fármaco melhorou sua estabilidade térmica, já que o mesmo degradava constantemente nessa faixa de temperatura.

FIGURA 29 – Curvas de TG e DTG do TAC puro, PCL pura e MF (TAC:PCL)



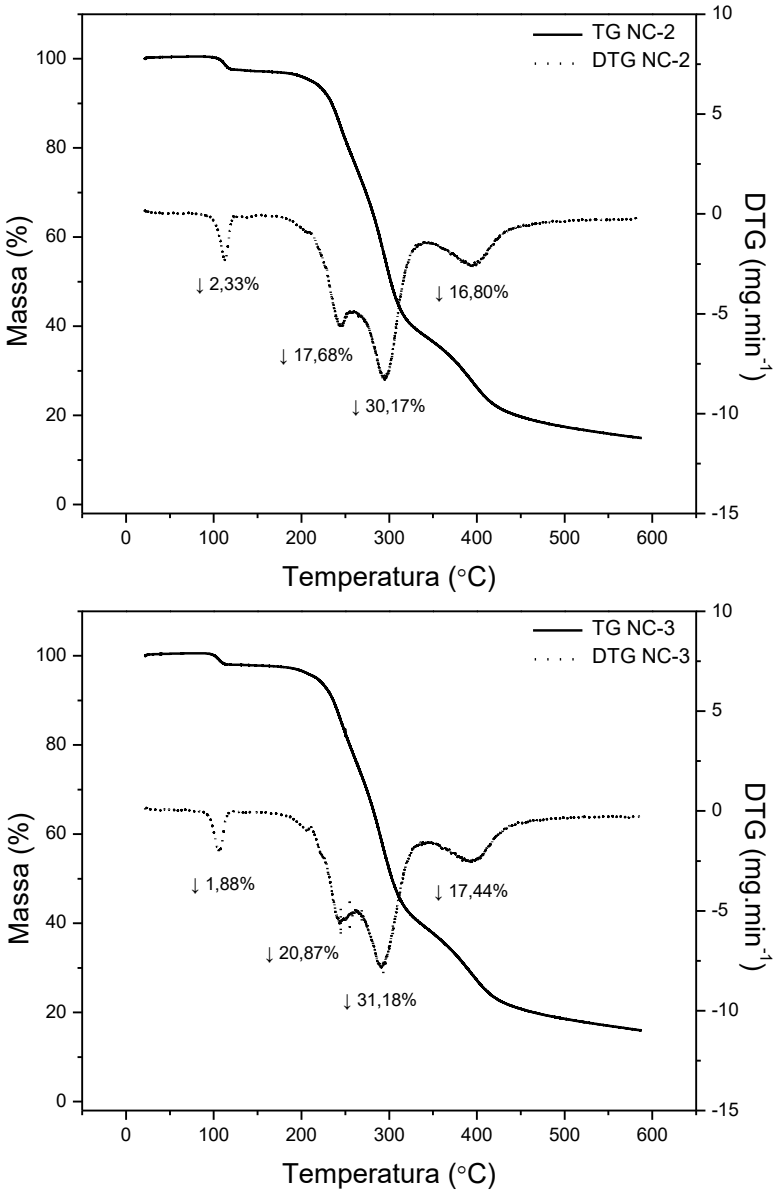

Fonte: O autor

FIGURA 30 – Curvas de TG e DTG da lactose pura, NC-N e NC-1




Fonte: O autor

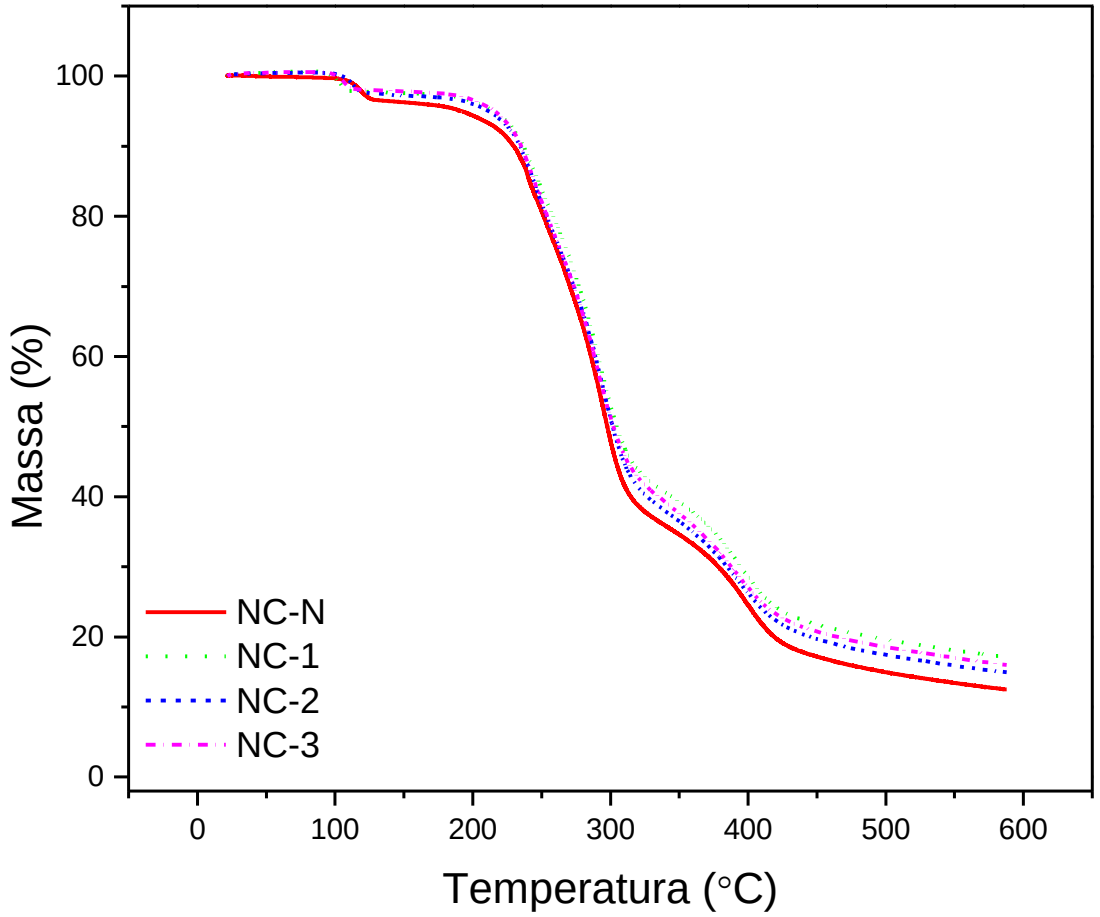
FIGURA 31 – Curvas de TG e DTG da NC-2 e NC-3




Fonte: O autor

Para um efeito comparativo e uma melhor visualização dos resultados obtidos na análise de TG, a Figura 32 demonstra as curvas das nanocápsulas, onde foi possível observar o comportamento semelhante das formulações e sua melhora na estabilidade térmica quando comparado ao TAC isolado.

FIGURA 32 – Curvas de TG das nanocápsulas poliméricas (NC-N, NC-1, NC-2 e NC-3)




Fonte: O autor

### 5.6.2 Calorimetria Diferencial Exploratória

DSC é uma técnica onde são medidas, em função de uma programação controlada de temperatura, a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte. O DSC é uma técnica derivada da análise térmica diferencial (DTA) e existem dois tipos, a com compensação de potência e a com fluxo de calor – o qual foi utilizado neste trabalho. Nessa técnica é possível acompanhar quantitativamente os efeitos do calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase ou reações de desidratação,

dissociação, decomposição, óxido-redução e etc. capazes de causar variações de calor. Geralmente as reações endotérmicas são as de transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição; enquanto que as exotérmicas são as demais (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009; IONASHIRO; GIOLITO, 2004).

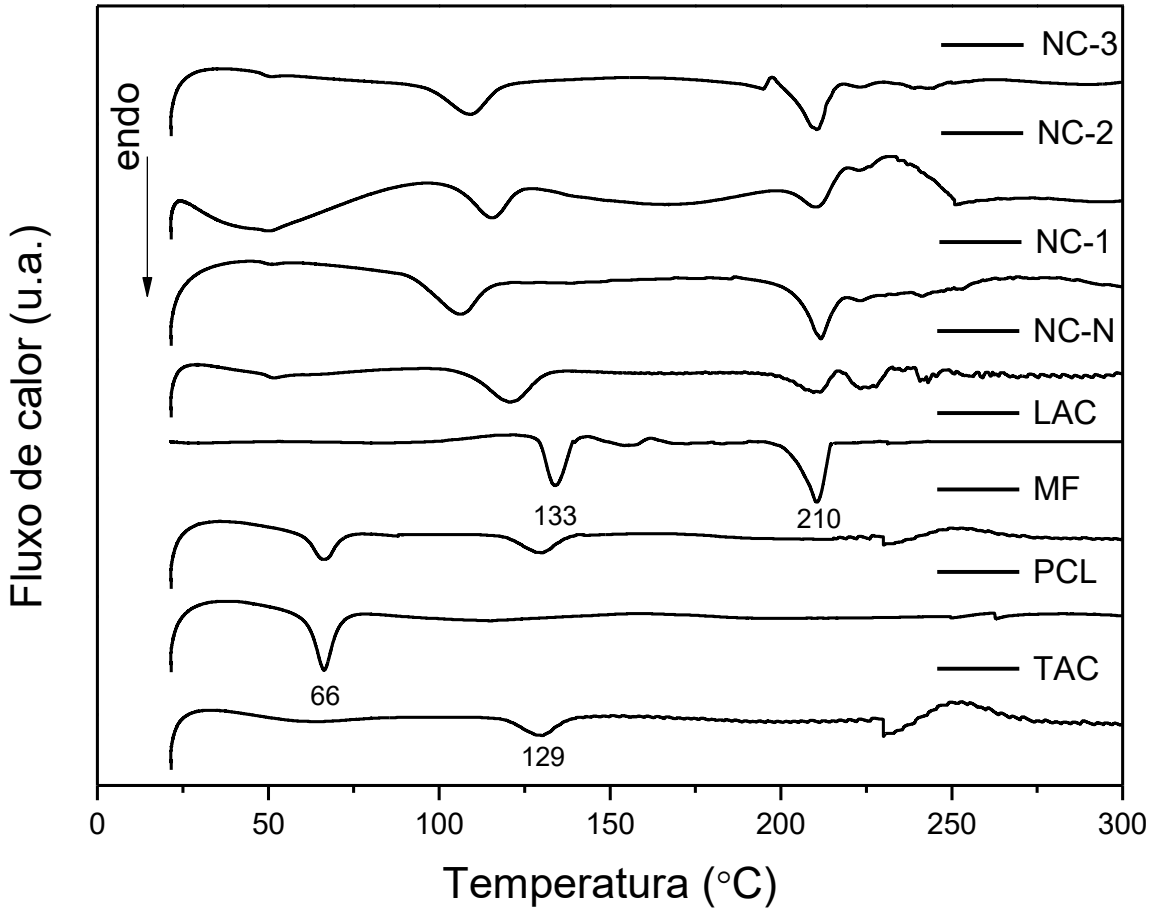
Assim como o TG/DTG, o DSC vem sendo muito utilizado nas ciências farmacêuticas para o desenvolvimento de diversos estudos – desde a caracterização dos fenômenos físicos e químicos, até mais especificamente, para avaliação da estabilidade térmica, determinação de entalpias de desidratação, estudos de cinéticas de degradação, estudos de pré-formulação farmacêutica visando a avaliação da interação fármaco/excipiente, entre outros (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

A Figura 33 mostra o DSC do TAC, PCL puro, MF, lactose e das nanopartículas poliméricas com e sem TAC. Na curva de DSC do TAC foi possível observar o evento endotérmico de fusão do mesmo em 129 ºC, indo de encontro com a literatura que diz que o ponto de fusão do TAC é entre 126 e 129 ºC (DANTAS *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016; BÖER *et al.*, 2013; POPLE; SINGH, 2010; SHIN *et al.*, 2010). Acima de 225 ºC é possível verificar a existência de uma rampa de evento exotérmico que provavelmente deve-se ao evento de degradação mais proeminente do mesmo. Em relação ao PCL há apenas o evento endotérmico de fusão em 66 ºC, próximo ao encontrado na literatura entre 59 e 64 ºC (FILIPOVIĆ *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018). A curva de DSC da MF demonstra a existência dos eventos de fusão do fármaco e PCL puros, como também a rampa de degradação do TAC em menor intensidade, podendo-se dizer que também não ocorre interação térmica entre o fármaco e seu carreador e, portanto, não havendo problema em utilizar ambos em um sistema de liberação controlada.

A lactose monohidratada possui dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro em 133 ºC – relacionado com a perda da água existente na sua estrutura e o segundo em 210 ºC – ao evento de fusão da mesma (ALTAMIMI *et al.*, 2019; MATTIAZZI *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018; GEHRCKE *et al.*, 2018; SARI *et al.*, 2017). Em relação ao DSC das formulações, foi possível verificar os dois eventos da lactose, tanto de fusão como desidratação. O deslocamento de sinal da perda de água nas curvas de DSC das nanocápsulas possivelmente deve-se à mudança na estrutura da lactose após o processo de liofilização, porém mantendo o evento de ponto de fusão em 210 ºC. Não foi possível observar sinais de eventos característicos do TAC, o que indica

a total amorfização do mesmo pelo processo de nanoencapsulação (MATTIAZZI *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018; GEHRCKE *et al.*, 2018; SARI *et al.*, 2017).

FIGURA 33 – Curvas de DSC do tacrolimus puro (TAC), do PCL, mistura física (MF) PCL:tacrolimus, lactose e das nanocápsulas poliméricas (NC-N, NC-1, NC-2 e NC-3)




Fonte: O autor

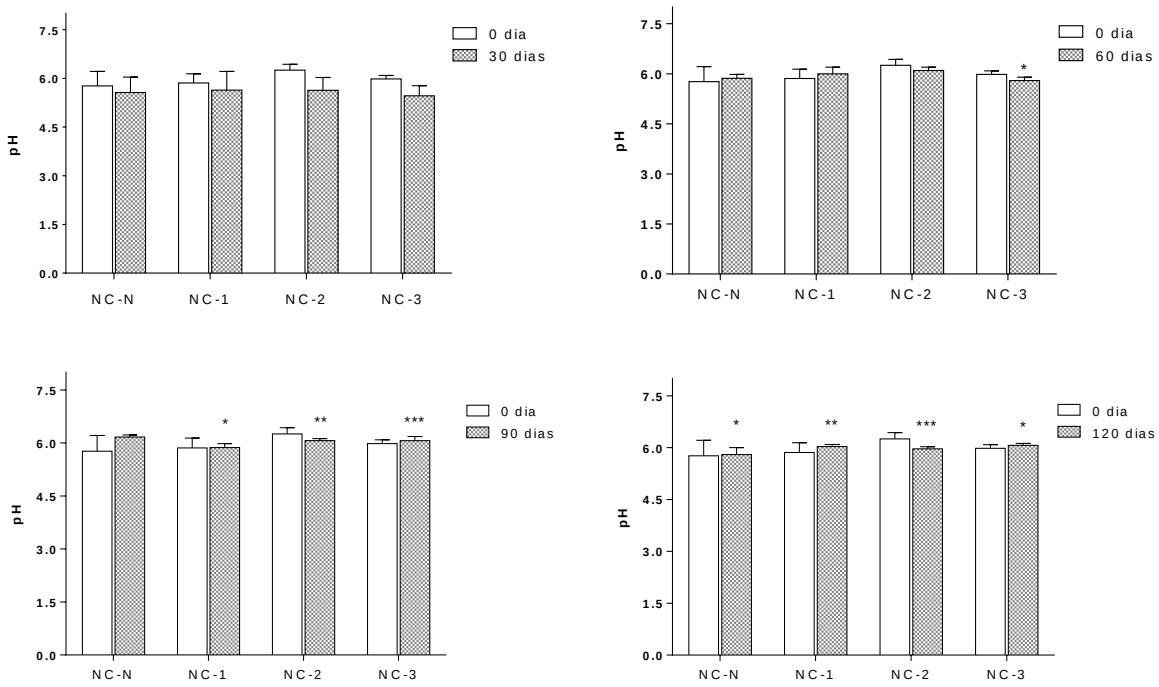
## 5.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

Segundo Schafazick *et al.* (2003), as suspensões coloidais demoram a iniciar o processo de separação de fases, isso porque a sedimentação é lentificada com o movimento browniano das nanopartículas e isso faz com que a estabilidade da suspensão dure por meses. Porém, com o tempo, pode ocorrer aglomeração e sedimentação das partículas e por esse motivo o estudo da estabilidade físico-química acaba sendo fundamental, já que vários fatores podem influenciar na diminuição da mesma, como adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e/ou presença de tensoativos adsorvidos. É necessário enfatizar que o estudo da

estabilidade é relevante para confirmar a importância de se armazenar a formulação adequadamente, já que qualquer alteração pode acelerar esse processo e com isso diminuir a estabilidade do polímero, do fármaco ou qualquer outra matéria-prima e, consequentemente, liberar o fármaco prematuramente. Por esse motivo, fez-se indispensável a avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas contendo TAC armazenadas em temperatura ambiente.

A Figura 34 mostra os gráficos das análises de pH realizadas nos 120 dias. Foi possível verificar a diferença significativa nas formulações acima de 90 dias da preparação, com exceção da NC-3 que alterou com 60 dias, tendo sua justificativa provavelmente na hidrólise dos triglicerídeos de cadeia média que compõem o núcleo ou do tensoativo que são desprendidos da fase oleosa quando ocorre agregação do polímero. Outros fatores também podem incluir a hidrólise das ligações ésteres do PCL, que mantém a acidificação do meio devido a liberação de grupos carboxílicos dos monômeros, ou até mesmo a liberação do fármaco livre (ZANETTI *et al.*, 2019; BALEST, 2013; MELO *et al.*, 2010; KÜLKAMP *et al.*, 2009).

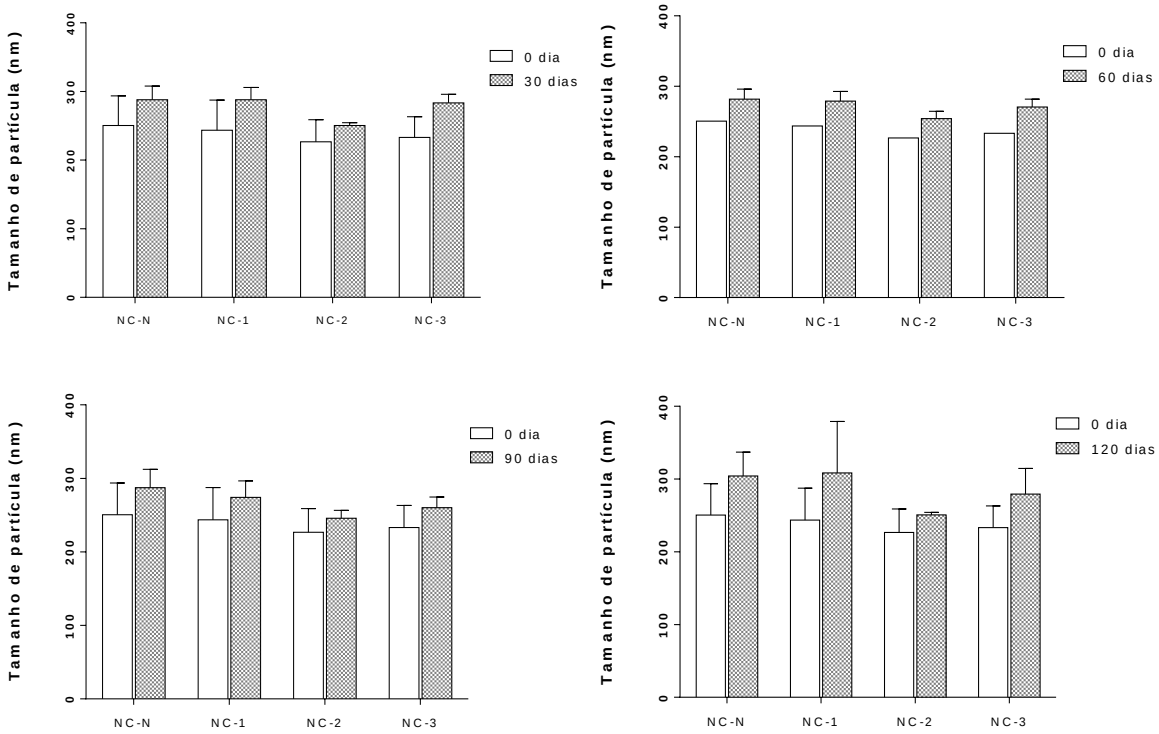
FIGURA 34 – Valores de pH, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias




Nanocápsulas controle (NC-N); nanocápsulas de tacrolimus 0,1 mg/mL (NC-1); nanocápsulas de tacrolimus 1 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de tacrolimus 5 mg/mL (NC-3). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
Fonte: O autor

Em relação ao tamanho de partícula, a Figura 35 mostra que não houve diferença significativa, indicando que as nanocápsulas não são modificadas ao longo do tempo, sugerindo assim, que não houve coalescência e nem degeneração das amostras (ZANETTI *et al.*, 2019).

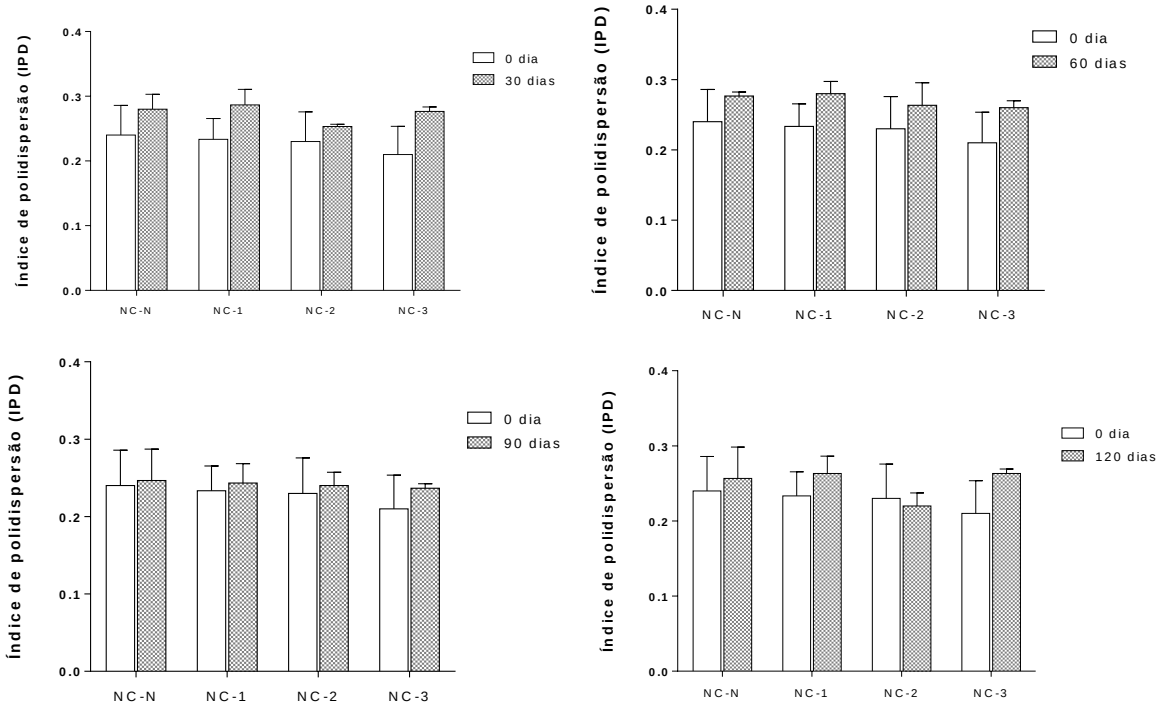
FIGURA 35 – Valores de tamanho de partícula, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias




Nanocápsulas controle (NC-N); nanocápsulas de tacrolimus 0,1 mg/mL (NC-1); nanocápsulas de tacrolimus 1 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de tacrolimus 5 mg/mL (NC-3). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
Fonte: O autor

O IPD, Figura 36, permaneceu com o valor aceitável, abaixo de 0,3, satisfatório para uso tópico e demonstrando que as amostras permanecem em uma distribuição unimodal de seus diâmetros médios, indicando que ao longo do tempo, as amostras continuaram dispersas sem ocorrer agregação ou floculação (ZANETTI *et al.*, 2019; DIYANAT *et al.*, 2019; VÁSQUEZ MARCANO *et al.*, 2018; BALEST, 2013; LARA, 2009).

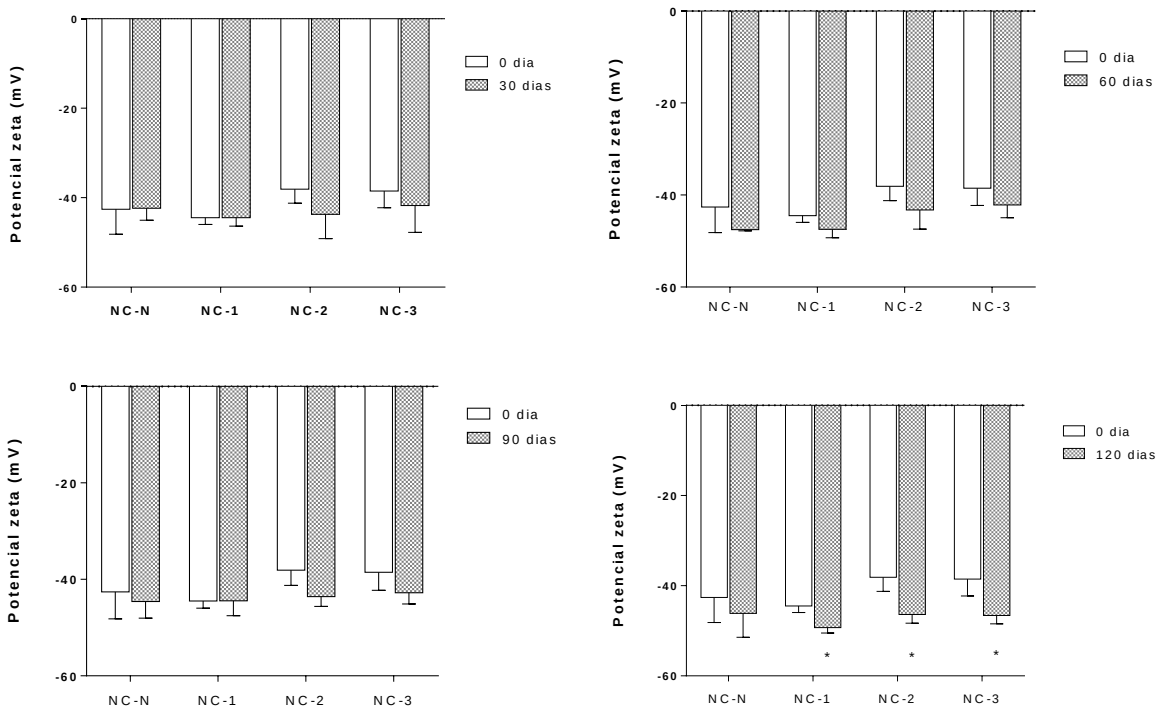
FIGURA 36 – Valores de índice de polisdispersão, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias




Nanocápsulas controle (NC-N); nanocápsulas de tacrolimus 0,1 mg/mL (NC-1); nanocápsulas de tacrolimus 1 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de tacrolimus 5 mg/mL (NC-3). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
Fonte: O autor

Por fim, o potencial zeta das amostras sofreu mudanças significativas após 120 dias de armazenamento – Figura 37. Os valores encontrados foram maiores aos analisados no tempo zero, confirmando a possível hidrólise da cadeia polimérica que expôs os grupos carboxílicos na superfície acarretando no aumento do valor negativo da mesma, assim como também a presença do TAC, já que na nanocápsula sem fármaco não houve alteração significativa. Balest (2013), observou o aumento significativo nas nanocápsulas de PCL produzidas logo após 30 dias de armazenamento, também confirmando esse aumento por conta da hidrólise do polímero.

FIGURA 37 – Valores de tamanho de partícula, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias




Nanocápsulas controle (NC-N); nanocápsulas de tacrolimus 0,1 mg/mL (NC-1); nanocápsulas de tacrolimus 1 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de tacrolimus 5 mg/mL (NC-3). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001
Fonte: O autor

Vale completar que durante todo o estudo da estabilidade todas as nanossuspensões mantiveram-se com o mesmo aspecto leitoso inicial característico de nanocápsulas em suspensão coloidal, apresentando boa estabilidade físico-química sem ocorrer cremagem, sedimentação ou floculação (BALEST, 2013; LARA, 2008). Porém, apesar disso e pelo teste de estabilidade físico-química fica praticamente a certeza de que as nanopartículas permanecem inalteradas até 90 dias após o seu preparo, sendo esse o tempo máximo de utilização com confiabilidade nos resultados.

# 6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, nanocápsulas poliméricas contendo TAC, formuladas a partir do PCL (NC-1, NC-2 e NC-3), foram obtidos com sucesso pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado.

Os sistemas nanoparticulados apresentaram um formato esférico com superfície lisa e regular e tamanho médio adequado diante da proposta de permeação pelas camadas da pele, além de apresentarem-se homogeneamente dispersas e estáveis. O XRD confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se predominantemente em dispersão molecular no núcleo oleoso das nanocápsulas.

As análises espectroscópicas por FTIR e Raman confirmaram que não houve reação química que mudasse a estrutura química do fármaco ou polímero, indicando que ambos não interagem significativamente. A análise térmica por TG/DTG e DSC também indicaram que não há interação térmica entre ambos e que a nanoencapsulação melhorou a estabilidade térmica do fármaco.

Os ensaios para verificar a estabilidade físico-química dos sistemas nanoparticulados mostraram que todas as formulações se mantiveram estáveis até o período de 90 dias e, portanto, permanecem resultando em valores confiáveis nesse tempo.

O método desenvolvido por UHPLC-PDA foi seletivo, linear, preciso, exato e robusto para uma rápida determinação do fármaco e pode ser utilizado para estudos da estabilidade e quantificação do TAC. O estudo da degradação forçada foi de encontro com a literatura quando verificado por UHPLC-PDA que afirma que o fármaco é instável em meio alcalino e mais estável em meio ácido, porém pelo UPLC-MS/MS, foi possível observar que o TAC é degradado em ambos os meios, sendo que no meio alcalino apresenta maior susceptibilidade à degradação.

As formulações apresentaram alta eficiência de encapsulação e o método analítico empregado mostrou-se capaz de quantificar o TAC nanoencapsulado no sistema polimérico desenvolvido, fornecendo resultados confiáveis.

## REFERÊNCIAS

A-ELBASIT, I. E. M.; IMRAN, M.; NAYEEM, N. Biochemical investigation and development of HPLC method for tacrolimus. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1–7, 2018.

ABAMOR, E. S.; TOSYALI, O. A.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. Nigella sativa oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. **IET Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1018–1026, 2018.

ABRIATA, J. P.; TURATTI, R. C.; LUIZ, M. T.; RASPANTINI, G. L.; TOFANI, L. B.; DO AMARAL, R. L. F.; SWIECH, K.; MARCATO, P. D.; MARCHETTI, J. M. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 96, p. 347–355, 2019.

AJIBOYE, A. L.; TRIVEDI, V.; MITCHELL, J. C. Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1790–1796, 2018.

ALTAMIMI, M. J.; WOLFF, K.; NOKHODCHI, A.; MARTIN, G. P.; ROYALL, P. G. Variability in the α and β anomer content of commercially available lactose. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 555, p. 237–249, 2019.

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

BALEST, A. P. **Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BARIL, M. B.; FRANCO, G. F.; VIANA, R. S.; ZANIN, S. M. W. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão Acadêmica**. v. 13, n. 1, p. 1-10, jan./mar. 2012.

BHATIA, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In: BHATIA, S. **Natural Polymers Drug Delivery Systems**. 1. ed. Springer, 2016. p. 33-93.

BHATTACHARYA, D.; GHOSH, B.; MUKHOPADHYAY, M. Development of nanotechnology for advancement and application in wound healing: A review. **IET Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 778–785, 2019.

BINKHATHLAN, Z.; BADRAN, M. M.; ALOMRANI, A.; ALJUFFALI, I. A.; ALGHONAIM, M.; AL-MUHSEN, S.; HALWANI, R.; ALSHAMSAN, A. Reutilization of Tacrolimus Extracted from Expired Prograf® Capsules: Physical, Chemical, and

Pharmacological Assessment. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 978–987, 2016.

BÖER, T. M.; MARQUES, M. R.; CARDOSO, S. G. Determination of tacrolimus in pharmaceutical formulations by validated spectrophotometric methods. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 135–141, 2008.

BÖER, T. M.; PROCÓPIO, J. V. V.; NASCIMENTO, T. G. Do; MACÊDO, R. O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC-MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 73, p. 18–23, 2013.

BOHOLM, Å.; LARSSON, S. What is the problem? A literature review on challenges facing the communication of nanotechnology to the public. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 21, n. 4, 2019.

BOSE, R. J.; KIM, M.; CHANG, J. H.; PAULMURUGAN, R.; MOON, J. J.; KOH, W. G.; LEE, S. H.; PARK, H. Biodegradable polymers for modern vaccine development. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 77, p. 12–24, 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Aprova o "**Critérios para a validação de métodos analíticos"**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros , Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. [s. l.], v. 2, p. 127–139, 2011.

BUCKTON, G. Ciência de partículas e tecnologia de pós. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. cap. 45. p. 1513-1545.

BUIJSCH, R. O. **Pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in renal transplant patients**. 2007. Tese (Doutorado) – Universidade de Maastricht, Países Baixos, 2007.

BUSATTO, S.; PHAM, A.; SUH, A.; SHAPIRO, S.; WOLFRAM, J. Organotropic drug delivery: Synthetic nanoparticles and extracellular vesicles. **Biomedical Microdevices**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2019.

CANEVAROLO Jr., S. V. **Ciência dos polímeros:** um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2002. 282 p.

CARLETTO, B.; BERTON, J.; FERREIRA, T. N.; DALMOLIN, L. F.; PALUDO, K. S.; MAINARDES, R. M.; FARAGO, P. V.; FAVERO, G. M. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 144, p. 65–72, 2016.

CARTER, P.; NARASIMHAN, B.; WANG, Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases.

**International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 555, p. 49–62, 2019.

CÉSAR, A.; AZEVEDO, F.; MOTA, A. Gravidez, Aleitamento e Fármacos em Dermatologia : Tratamento Tópico. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, [s. l.], v. 75, p. 19–26, 2017.

CHAN, D. S.; FNAIS, N.; IBRAHIM, I.; DANIEL, S.; MANOUKIAN, J. Exploring polycaprolactone in tracheal surgery: A scoping review of in-vivo studies. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 123, p. 38–42, 2019.

CISMARU, L.; POPA, M. Polymeric nanoparticles with biomedical applications. **Revue Roumaine de Chimie**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 433–442, 2010.

CLEBSCH, A. B.; WATANABE, M. Abordagem da nanociência e nanotecnologia a partir da escala. **Novas tecnologias na educação**. v. 15, n. 1, p. 1-10, jul. 2017.

COIMBRA, A. B. **Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

COTY, J. B.; VAUTHIER, C. Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 275, p. 254–268, 2018.

CUFFINI, S. L.; PITALUGA-Jr, A.; TOMBARI, D. Polimorfismo em Fármacos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 72-95.

DANTAS, I. L.; BASTOS, K. T. S.; MACHADO, M.; GALVÃO, J. G.; LIMA, A. D.; GONSALVES, J. K. M. C.; ALMEIDA, E. D. P.; ARAÚJO, A. A. S.; DE MENESES, C. T.; SARMENTO, V. H. V.; NUNES, R. S.; LIRA, A. A. M. Influence of stearic acid and beeswax as solid lipid matrix of lipid nanoparticles containing tacrolimus. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 132, n. 3, p. 1557–1566, 2018.

DE SOUZA, C. A. G.; SIQUEIRA, S. M. C.; DE AMORIM, A. F. V.; DE MORAIS, S. M.; GONÇALVES, T.; GOMES, R. N.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S. Encapsulação do ácido L-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: Preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 877–883, 2015.

DHANI, R.; GOBINATH, M.; PATRO, S.; LAVANYA, T.; RAJESH, A.; DIVYA, G.; YAMINI, C.; PRAVALLIKA, R. Analytical Method Development and Validation by RP-HPLC Method in Bulk and Tablet Dosage form of Tacrolimus and Guggulsterone. **Asian Journal of Chemical and Open Access**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 69–77, 2016.

DHEER, D.; JYOTI; GUPTA, P. N.; SHANKAR, R. Tacrolimus: An updated review on delivering strategies for multifarious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 114, p. 217–227, 2018.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Impactos da nanotecnologia na saúde: Produção de medicamentos. **Química Nova**. v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DING, C.; TONG, L.; FENG, J.; FU, J. Recent advances in stimuli-responsive release function drug delivery systems for tumor treatment. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 12, 2016.

DIYANAT, M.; SAEIDIAN, H.; BAZIAR, S.; MIRJAFARY, Z. Preparation and characterization of polycaprolactone nanocapsules containing pretilachlor as a herbicide nanocarrier. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 21579–21588, 2019.

EL-BATAWY, M. M. Y.; BOSSEILA, M. A. W.; MASHALY, H. M.; HAFEZ, V. S. G. A. Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 76–87, 2009.

FENG, B.; WANG, S.; HU, D.; FU, W.; WU, J.; HONG, H.; DOMIAN, I.; J.; LI, F.; LIU, J. Bioresorbable electrospun gelatina/polycaprolactone nanofibrous membrane as a barrier to prevent cardiac postoperative adhesion. **Acta Biomaterialia**. v. 83, p. 211-220, 2019.

FERRABOSCHI, P.; COLOMBO, D.; DE MIERI, M.; GRISENTI, P. Evaluation, synthesis and characterization of tacrolimus impurities. **Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 65, n. 7, p. 349–354, 2012.

FERREIRA, L. M.; CERVI, V. F.; SARI, M. H. M.; BARBIERI, A. V.; RAMOS, A. P.; COPETTI, P. M.; DE BRUM, G. F.; NASCIMENTO, K.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; SAGRILLO, M. R.; NOGUEIRA, C. W.; CRUZ, L. Diphenyl diselenide loaded poly(ε-caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 91, p. 1–9, 2018.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FILIPOVIĆ, N.; VESELINOVIĆ, L.; RAŽIĆ, S.; JEREMIĆ, S.; FILIPIČ, M.; ŽEGURA, B.; TOMIĆ, S.; ČOLIĆ, M.; STEVANOVIĆ, M. Poly (ε-caprolactone) microspheres for prolonged release of selenium nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 96, p. 776–789, 2019.

FIORENTINI, S. F.; KHURRAM, D. Therapeutic effects of topical 0.03% Tacrolimus ointment in children with refractory vernal keratoconjunctivitis in Middle East. **Saudi Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 117–120, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINSTRATION. Guidance for industry: Considering Whether and FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Disponível

em: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm> Acesso em: 07 jan. 2019.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**. [s. l.], v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

FREIRE, N. F. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus)***. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2017.

GABRIEL, D.; MUGNIER, T.; COURTHION, H.; KRANIDIOTI, K.; KARAGIANNI, N.; DENIS, M. C.; LAPTEVA, M.; KALIA, Y.; MÖLLER, M.; GURNY, R. Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 242, p. 16–24, 2016.

GAO, X.; WANG, B. L.; WEI, X. W.; RAO, W.; AI, F.; ZHAO, F.; MEN, K.; YANG, B.; LIU, X.; HUANG, M.; GOU, M.; QIAN, Z. Y.; HUANG, N.; WEI, Y. Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, p. 971–982, 2013.

GARCIA, S. C.; LOPES, L. dos S.; SCHOTT, K. L.; BECK, S. T.; POMBLUM, V. J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 393–401, 2004.

GEHRCKE, M.; SARI, M. H. M.; FERREIRA, L. M.; BARBIERI, A. V.; GIULIANI, L. M.; PRADO, V. C.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; NOGUEIRA, C. W.; CRUZ, L. Nanocapsules improve indole-3-carbinol photostability and prolong its antinociceptive action in acute pain animal models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 111, p. 133–141, 2018.

GOMES, G. S.; MACIEL, T. R.; PIEGAS, E. M.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; FREDDO, R. J.; ÁVILA, D. S. De; GUNDEL, A.; HAAS, S. E. Optimization of Curcuma Oil/Quinine-Loaded Nanocapsules for Malaria Treatment. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 551–564, 2018.

GOMES, M. L. S.; DA SILVA NASCIMENTO, N.; BORSATO, D. M.; PRETES, A. P.; NADAL, J. M.; NOVATSKI, A.; GOMES, R. Z.; FERNANDES, D.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W. Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 94, p. 694–702, 2019.

GOLÇALVES, M. C. Microscopia Eletrônica de Varredura. In: CANEVAROLO Jr,, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artliber, 2003. cap. 8. p. 165-176.

GONTIJO, B.; PIRES, M. C.; CESTARI, T. F.; LA SCALA, C. S. K.; DUARTE, I. A. G.; TAKAOKA, R.; AUN, W. T.; DE SOUZA, J. A.; CESTARI, S. S. D. C. P.; DE OLIVEIRA, Z. N. P. Avaliação da eficácia e segurança do tacrolimo pomada 0, 03%

no tratamento da dermatite atópica em pacientes pediátricos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 511–519, 2008.

GRANATA, G.; STRACQUADANIO, S.; LEONARDI, M.; NAPOLI, E.; CONSOLI, G. M. L.; CAFISO, V.; STEFANI, S.; GERACI, C. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 269, n. March, p. 286–292, 2018.

GUERRERO-ARELLANO, H. E. La Nanotecnologia farmacêutica es una realidad. **Revista Científica Domínio de Las Ciências**, [s. l.], v. 3, p. 526–538, 2017.

HANEMANN, T.; SZABÓ, D. V. Polymer-Nanoparticle Composites: From Synthesis to Modern Applications. **Materials**. v. 3, p. 3468-3517, 2010.
HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters: the irrigants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L. **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 31, p. 377-467, 1974.

HEO, J. Y.; NOH, J. H.; PARK, S. H.; JI, Y. B.; JU, H. J.; KIM, D. Y.; LEE, B.; KIM, M. S. An injectable click-crosslinked hydrogel that prolongs dexamethasone release from dexamethasone-loaded microspheres. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1–19, 2019.

HERNANDEZ-PATLAN, D.; SOLIS-CRUZ, B.; CANO-VEGA, M. A.; BEYSSAC, E.; GARRAIT, G.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; LOPEZ-ARELLANO, R.; TELLEZ, G.; RIVERA-RODRIGUEZ, G. R. Development of Chitosan and Alginate Nanocapsules to Increase the Solubility, Permeability and Stability of Curcumin. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 132–140, 2019.

HIVECHI, A.; BAHRAMI, S. H.; SIEGEL, R. A. Drug release and biodegradability of electrospun cellulose nanocrystal reinforced polycaprolactone. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 94, p. 929–937, 2019.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: Text and methodology**. Q2(R1). London: ICH, 2005 (ICH Harmonised Tripartite Guideline).

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **Fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial**. 1. ed. São Paulo: Giz Editorial, 2004. 82 p.

IYISAN, B.; LANDFESTER, K. Modular Approach for the Design of Smart Polymeric Nanocapsules. **Macromolecular Rapid Communications**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–25, 2019.

JAIN, A.; DOPPALAPUDI, S.; DOMB, A. J.; KHAN, W. Tacrolimus and curcumin co-loaded liposphere gel: Synergistic combination towards management of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 243, p. 132–145, 2016.

JAIN, S.; ADDAN, R.; KUSHWAH, V.; HARDE, H.; MAHAJAN, R. R. Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid based Tacrolimus

loaded nanoformulations. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 562, p. 96–104, 2019.

JANMOHAMMADI, M.; NOURBAKHSH, M. S. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [s. l.], v. 68, n. 9, p. 527–539, 2019.

JUSTUS, B.; NADAL, J. M.; ALMEIDA, M. A.; JANZEN, M. E. S.; BUDEL, J. M.; ESMERINO, L. A.; ZAWADZKI, S. F.; DE PAULA, J. P.; FARAGO, P. V. Benzoyl Peroxide-Loaded PCL Microparticles: Physicochemical Characterization and In Vitro Antibacterial and Permeation Studies. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1710–1717, 2015.

KALITA, S.; DEVI, B.; KANDIMALLA, R.; SHARMA, K. K.; SHARMA, A.; KALITA, K.; KATAKI, A. C.; KOTOKY, J. Chloramphenicol encapsulated in poly-ε-caprolactone-pluronic composite: Nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, p. 2971–2984, 2015.

KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J.; FAROKHZAD, O. C. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

KÄPPLER, A.; FISCHER, D.; OBERBECKMANN, S.; SCHERNEWSKI, G.; LABRENZ, M.; EICHHORN, K. J.; VOIT, B. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 408, n. 29, p. 8377–8391, 2016.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], 2017.

KIM, H.; GRIFFITH, T. S.; PANYAM, J. Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanoparticles as Delivery Platforms for TLR7/8 Agonist-Based Cancer Vaccine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 370, n. 3, p. 715–724, 2019.

KIM, S. Y. Application of the three-dimensionally printed biodegradable polycaprolactone (PCL) mesh in repair of orbital wall fractures. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 1065–1071, 2019.

KITA, T.; UCHIDA, K.; KATO, K.; SUZUKI, Y.; TOMINAGA, M.; YAMAZAKI, J. FK506 (tacrolimus) causes pain sensation through the activation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels. **Journal of Physiological Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 305–316, 2019.

KONG, N.; DENG, M.; SUN, X. N.; CHEN, Y. D.; SUI, X. B. Polydopamine-functionalized CA-(PCL-ran-PLA) nanoparticles for target delivery of docetaxel and chemo-photothermal therapy of breast cancer. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 1–14, 2018.

KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Stabilization of

lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: A review. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.

LAN, C. C. E.; WU, C. S.; CHEN, G. S.; YU, H. S. FK506 (tacrolimus) and endothelin combined treatment induces mobility of melanoblasts: New insights into follicular vitiligo repigmentation induced by topical tacrolimus on sun-exposed skin. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 164, n. 3, p. 490–496, 2011.

LAPTEVA, M.; MONDON, K.; MÖLLER, M.; GURNY, R.; KALIA, Y. N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: A targeted approach for the treatment of psoriasis. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 2989–3001, 2014.

LARA, V. C. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne***.* 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

LIENDO, V. L.; VOLA, M. E.; BARREIRO, T. P.; WAKAMATSU, T. H.; GOMES, J. álv aro P.; DOS SANTOS, M. S. Topical tacrolimus for the treatment of severe allergic keratoconjunctivitis in children. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 211–214, 2017.

LIU, D.; WU, Q.; CHEN, W.; LIN, H.; ZHU, Y.; LIU, Y.; LIANG, H.; ZHU, F. M. A novel FK506 loaded nanomicelles consisting of amino-terminated poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L)-lactic acid and hydroxypropyl methylcellulose for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 562, p. 1–10, 2019.

LIU, J.; ZENG, Y.; SHI, S.; XU, L.; ZHANG, H.; PATHAK, J. L.; PAN, Y. Design of polyaspartic acid peptide-poly (ethylene glycol)-poly (ε-caprolactone) nanoparticles as a carrier of hydrophobic drugs targeting cancer metastasized to bone. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 12, p. 3561–3575, 2017.

LIU, Y. C.; NG, X. W.; TEO, E. P. W.; ANG, H. P.; LWIN, N. C.; CHAN, N. S. W.; VENKATRAMAN, S. S.; WONG, T. T.; MEHTA, J. S. A biodegradable, sustained-released, tacrolimus microfilm drug delivery system for the management of allergic conjunctivitis in a mouse model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 675–684, 2018.

MALEKI, A.; KARIMPOUR, A.; MALEKI DIZAJ, S. The role of mechanical engineering in the development of nano drug delivery systems; a review. **International Journal of Nano Dimension**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–6, 2018.

MARCHETTI, J. M.; SARAIVA, J. Sistemas de Liberação: Estratégias para Medicamentos Eficazes. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 72-95.

MARKWALTER, C. E.; PAGELS, R. F.; WILSON, B. K.; RISTROPH, K. D.; PRUD'HOMME, R. K. Flash nanoprecipitation for the encapsulation of hydrophobic and hydrophilic compounds in polymeric nanoparticles. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 2019, n. 143, p. 1–13, 2019.

MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B. Análise Térmica - Termogravimetria. In: JUNIOR, S. V.C. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2003. p. 210-228.

MATOS, J. R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise Térmica aplicada a Fármacos e Medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 32-65.

MATTIAZZI, J.; MARCONDES SARI, M. H.; BRUM, T. de B.; ARAÚJO, P. C. O.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; NOGUEIRA, C. W.; CRUZ, L. 3,3′-Diindolylmethane nanoencapsulation improves its antinociceptive action: Physicochemical and behavioral studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 181, p. 295–304, 2019.

MEHTA, M.; DEEKSHA; TEWARI, D.; GUPTA, G.; AWASTHI, R.; SINGH, H.; PANDEY, P.; CHELLAPPAN, D. K.; WADHWA, R.; COLLET, T.; HANSBRO, P. M.; KUMAR, S. R.; THANGAVELU, L.; NEGI, P.; DUA, K.; SATIJA, S. Oligonucleotide therapy: An emerging focus area for drug delivery in chronic inflammatory respiratory diseases. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 308, p. 206–215, 2019.

MEI, S.; WANG, J.; CHEN, D.; ZHU, L.; ZHAO, M.; TIAN, X.; HU, X.; ZHAO, Z. Simultaneous determination of cyclosporine and tacrolimus in human whole blood by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and comparison with a chemiluminescence microparticle immunoassay. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 1087–1088, p. 36–42, 2018.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli(l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.

MOREIRA, M. **Estudo da ação do imunossupressor tacrolimus na pancreatite aguda experimental induzida pela arginina**. 2008, 51 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008

NADAL, J. M.; DA GRAÇA TOLEDO, M.; PUPO, Y. M.; PADILHA DE PAULA, J.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W. A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: Development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency. **Journal of Analytical Methods in**

**Chemistry**, [s. l.], v. 2015, p. 7–11, 2015.

NAGAVARMA, B. V. N.; YADAV, H. K. S.; AYAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles – a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research,** [s. l.], v. 5, p. 16-23 2012.

NAKHLBAND, A.; ESKANDANI, M.; OMIDI, Y.; SAEEDI, N.; GHAFFARI, S.; BARAR, J.; GARJANI, A. Combating atherosclerosis with targeted nanomedicines: Recent advances and future prospective. **BioImpacts**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 59–75, 2018.

NAM, S. H.; JI, X. Y.; PARK, J. S. Investigation of tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers for topical drug delivery. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 956–960, 2011.

OBAIDAT, R. M.; TASHTOUSH, B. M.; AWAD, A. A.; AL BUSTAMI, R. T. Using Supercritical Fluid Technology (SFT) in Preparation of Tacrolimus Solid Dispersions. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 481–493, 2017.

PARASHAR, P.; RATHOR, M.; DWIVEDI, M.; SARAF, S. A. Hyaluronic acid decorated naringenin nanoparticles: Appraisal of chemopreventive and curative potential for lung cancer. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2018.

PATEL, P.; PANCHAL, S.; MEHTA, T.; SOLANKI, S.; PATEL, C. Reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for determination of Tacrolimus in bulk and pharmaceutical formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 220–222, 2011.

PEÑALOZA, J. P.; MÁRQUEZ-MIRANDA, V.; CABAÑA-BRUNOD, M.; REYES-RAMÍREZ, R.; LLANCALAHUEN, F. M.; VILOS, C.; MALDONADO-BIERMANN, F.; VELÁSQUEZ, L. A.; FUENTES, J. A.; GONZÁLEZ-NILO, F. D.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; OTERO, C. Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of PHBV nanoparticles for targeted delivery in epithelial cell lines. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–15, 2017.

PENSI, D.; DE NICOLÒ, A.; PINON, M.; PISCIOTTA, C.; CALVO, P. L.; NONNATO, A.; ROMAGNOLI, R.; TANDOI, F.; DI PERRI, G.; D'AVOLIO, A. First UHPLC–MS/MS method coupled with automated online SPE for quantification both of tacrolimus and everolimus in peripheral blood mononuclear cells and its application on samples from co-treated pediatric patients. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 187–195, 2017.

PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, A. M.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Use of FTIR, FT-Raman and 13C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, [s. l.], v. 20, n. 4–6, p. 223–228, 2003.

PEREIRA, U.; BOULAIS, N.; LEBONVALLET, N.; PENNEC, J. P.; DORANGE, G.; MISERY, L. Mechanisms of the sensory effects of tacrolimus on the skin. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 70–77, 2010.

PERRIE, Y. Nanotecnologia farmacêutica e nanomedicamentos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. cap. 45. p. 1513-1545.

PETERKA, T. R.; LUŠIN, T. T.; BERGLES, J.; HAM, Z.; GRAHEK, R.; URLEB, U. Forced degradation of tacrolimus and the development of a UHPLC method for impurities determination. **Acta Pharmaceutica**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 363–380, 2019.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PIRES, P. A. R. Espalhamento da Luz. In: CANEVAROLO Jr,, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artliber, 2003. cap. 4. p. 83-94.

PONNAMMAL, P.; KANAUJIA, P.; YANI, Y.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Orally disintegrating tablets containing melt extruded amorphous solid dispersion of tacrolimus for dissolution enhancement. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2018.

POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 398, n. 1–2, p. 165–178, 2010.

POZAS, M. de los Á. Interdisciplina, aprendizaje y producción de conocimiento en el laboratorio: el caso de la nanotecnología. **Estudios Sociológicos de El Colegio de México**, [s. l.], v. 34, n. 102, p. 665–682, 2016.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. IR Spectroscopy. In: PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds**. 4. ed. Berlim: Springer-Verlag, 2009. p. 269-336.

QI, Y.; ZHU, N.; ZHAI, Y.; DING, Y. The mutually beneficial relationship of patents and scientific literature: topic evolution in nanoscience. **Scientometrics**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 893–911, 2018.

RANCAN, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, [s. l.], v. 7, p. 23–34, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIGON, C.; GIULIANI, L. M.; STANGARLIN, M. F. L.; MATTIAZZI, J.; GOMES, F. P.; PEGORARO, N. S.; CRUZ, L.; FERREIRA, L. M. Sistemas Nanoestruturados Contendo Óleo De Linhaça: Desenvolvimento Tecnológico E Caracterização Físico-Química De Nanoemulsões E Nanocápsulas Poliméricas. **Saúde (Santa Maria)**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 153, 2017.

ROSTAMI, A.; SAZGARNIA, A. Gold nanoparticles as cancer theranostic agent.

**Nanomedicine Journal**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 147–160, 2019.

SALLUSTIO, B. C.; NOLL, B. D.; MORRIS, R. G. Comparison of blood sirolimus, tacrolimus and everolimus concentrations measured by LC-MS/MS, HPLC-UV and immunoassay methods. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 2–3, p. 231–236, 2011.

SARI, M. H. M.; FERREIRA, L. M.; ANGONESIZBOROWSKI, V.; ARAUJO, P. C. O.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; CRUZ, L.; NOGUEIRA, C. W. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenideincorporation into polymeric nanocapsules improves its antinociceptive action: Physicochemical and behavioral studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 157, p. 464–472, 2017.

SAVIĆ, V.; TODOSIJEVIĆ, M.; ILIĆ, T.; LUKIĆ, M.; MITSOU, E.; PAPADIMITRIOU, V.; AVRAMIOTIS, S.; MARKOVIĆ, B.; CEKIĆ, N.; SAVIĆ, S. Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 529, n. 1–2, p. 491–505, 2017.

SCHAFFAZICK, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SEGER, C.; TENTSCHERT, K.; STÖGGL, W.; GRIESMACHER, A.; RAMSAY, S. L. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 526–534, 2009.

SERRANO, D.; GALLAGHER, K.; HEALY, A. Emerging Nanonisation Technologies: Tailoring Crystalline Versus Amorphous Nanomaterials. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 22, p. 2327–2340, 2015.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B. Polímeros Sintéticos biodegradáveis: Matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polimeros**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 286–292, 2011.

SHAABAN, M. I.; SHAKER, M. A.; MADY, F. M. Imipenem/cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.

SHI, C.; LIU, P.; HE, Y.; LIU, Y.; FENG, X.; FU, D. Drug-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres as treatment for allergic contact dermatitis in mice model. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 445–455, 2017.

SHI, Y.; LAMMERS, T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. **Accounts of Chemical Research**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1543–1554, 2019.

SHIN, S. B.; CHO, H. Y.; KIM, D. D.; CHOI, H. G.; LEE, Y. B. Preparation and

evaluation of tacrolimus-loaded nanoparticles for lymphatic delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 164–171, 2010.

SIEGL, C.; KÖNIG-SCHUSTER, M.; NAKOWITSCH, S.; KOLLER, C.; GRAF, P.; UNGER-MANHART, N.; SCHINDLEGGER, Y.; KIRCHOFF, N.; KNECHT, C.; PRIESCHL-GRASSAUER, E.; SIPOS, W. Pharmacokinetics of topically applied tacrolimus dissolved in Marinosolv, a novel aqueous eye drop formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 134, p. 88–95, 2019.

SILVA, M. C. P. **Micro/nanopartículas poliméricas e biodegradáveis de mesocarpo de babaçu: ação imunomoduladora na polarização de macrófagos e efeito anti-leishmania**. 2017, 91 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2017.

SILVA, M. F.; CICILIATTI, M. A.; HECHENLEITNER, A. A. W.; PEÑALVA, R.; AGÜEROS, M.; IRACHE, J. M.; DE OLIVEIRA, A. J. A.; FAROOQI, A. A.; PINEDA, E. A. G. Superparamagnetic maghemite loaded poly (ε-caprolactone) nanocapsules: Characterization and synthesis optimization. **Revista Materia**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 40–52, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Infrared Spectrometry. In: SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Danvers: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 72-126.

SIQUEIRA, D. D.; LUNA, C. B. B.; MORAIS, D. D. de S.; DE ARAÚJO, E. M.; DE FRANÇA, D. C.; WELLEN, R. M. R. Effect of the reactional variables on the synthesis of a functionalized biodegradable polymer: PCL-g-MA. **Revista Materia**, [s. l.], v. 23, n. 4, 2018.

SKAK, N; HANSEN, L. **Stabilized Tacrolimus Composition**. Veloxis Pharmaceuticals A/S 2970. Depositante: Europaisches Patentamt. n. EP 2 575 769 B1 Depósito: 17 fev. 2011. Data de concessão: 15 jun. 2016.

SMITH, W. R.; HUDSON, P. W.; PONCE, B. A.; RAJARAM MANOHARAN, S. R. Nanotechnology in orthopedics: A clinically oriented review. **BMC Musculoskeletal Disorders**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–10, 2018.
SOLOMONS T. W. Graham; Fryhle, Craig B. **Química Orgânica**, v. 1 e 2, 9 ed. LTC, 2009.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 70, n. 1–2, p. 1–20, 2001.

SOUMYA, S.; SAHU, D. A review on novel drug delivery system: Microsponges. **International Journal of Drug Delivery Technology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 298–303, 2017.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas

Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. **Polimeros**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 96–100, 2012.

SUN, Q.; BARZ, M.; DE GEEST, B. G.; DIKEN, M.; HENNINK, W. E.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T.; SHI, Y. Nanomedicine and macroscale materials in immuno-oncology. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 351–381, 2019.

TAYLOR, P. J.; FRANKLIN, M. E.; TAI, C. H.; PILLANS, P. I. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Is it truly a routine test? **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 883–884, p. 108–112, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, **Tacrolimus**. 37 ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 1-3, 2013.

UPADHYAY, V.; SHAH, P. A.; SHAH, J. V; SHRIVASTAV, P. S. Quantitation of Sirolimus in Human Whole Blood by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for a Bioequivalence Study. **Journal of Modern Drug Discovery and Drug Delivery Research**, [s. l.], p. 1–10, 2014.

VÁSQUEZ MARCANO, R. G. del J.; TOMINAGA, T. T.; KHALIL, N. M.; PEDROSO, L. S.; MAINARDES, R. M. Chitosan functionalized poly (ε-caprolactone) nanoparticles for amphotericin B delivery. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 202, p. 345–354, 2018.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C.; P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.; M.; O.; GUTERRES, S.; S.; POHLMANN, A.; R. **Formulation of lipid core nanocapsules**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v. 375, p. 200-208, 2011.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros:** ciência e tecnologia. v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WAHLICH, J.; DESAI, A.; GRECO, F.; HILL, K.; JONES, A. T.; MRSNY, R. J.; PASUT, G.; PERRIE, Y.; SEIB, F. P.; SEYMOUR, L. W.; UCHEGBU, I. F. Nanomedicines for the delivery of biologics. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1–14, 2019.

WAN, T.; PAN, J.; LONG, Y.; YU, K.; WANG, Y.; PAN, W.; RUAN, W.; QIN, M.; WU, C.; XU, Y. Dual roles of TPGS based microemulsion for tacrolimus: Enhancing the percutaneous delivery and anti-psoriatic efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 528, n. 1–2, p. 511–523, 2017. a.

WAN, T.; PAN, W.; LONG, Y.; YU, K.; LIU, S.; RUAN, W.; PAN, J.; QIN, M.; WU, C.; XU, Y. Effects of nanoparticles with hydrotropic nicotinamide on tacrolimus: Permeability through psoriatic skin and antipsoriatic and antiproliferative activities.

**International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 12, p. 1485–1497, 2017. b.

WANG, Y.; HAN, X.; WANG, J.; WANG, Y. Preparation, characterization and in vivo evaluation of amorphous tacrolimus nanosuspensions produced using CO 2 - assisted in situ nanoamorphization method. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 505, n. 1–2, p. 35–41, 2016.

WOLINKSY; COLSON; GRINSTAFF. WATER. Local Drug Delivery Strategies for Cancer Treatment: Gels, Nanoparticles, Polymeric Films, Rods, and Wafers. **J. Control Release**, [s. l.], v. 159, n. 1, p. 3333, 2012.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

WU, Q.; LIU, D.; ZHANG, X.; WANG, D.; DONGYE, M.; CHEN, W.; LIN, D.; ZHU, F.; CHEN, W.; LIN, H. Development and effects of tacrolimus-loaded nanoparticles on the inhibition of corneal allograft rejection. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 290–299, 2019.

XU, J. L.; FENG, Y. D.; SONG, G. X.; GONG, Q. X.; YIN, L.; HU, Y. Y.; LUO, D.; YIN, Z. Q. Tacrolimus reverses UVB irradiation-induced epidermal langerhans cell reduction by inhibiting TNF-α secretion in keratinocytes via regulation of NF-κB/p65. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 1–9, 2018.

YAMAMOTO, K.; KLOSSEK, A.; FUCHS, K.; WATTS, B.; RAABE, J.; FLESCH, R.; RANCAN, F.; PISCHON, H.; RADBRUCH, M.; GRUBER, A. D.; MUNDHENK, L.; VOGT, A.; BLUME-PEYTAVI, U.; SCHRADE, P.; BACHMANN, S.; GURNY, R.; RÜHL, E. Soft X-ray microscopy for probing of topical tacrolimus delivery via micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 139, p. 68–75, 2019.

YAMASHITA, K.; NAKATE, T.; OKIMOTO, K.; OHIKE, A.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 267, n. 1–2, p. 79–91, 2003.

YIN, Z.; XU, J.; LUO, D. Efficacy and tolerance of tacrolimus and pimecrolimus for atopic dermatitis: A meta-analysis. **Journal of Biomedical Research**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 385–391, 2011.

YU, K.; WANG, Y.; WAN, T.; ZHAI, Y.; CAO, S.; RUAN, W.; WU, C.; XU, Y. Tacrolimus nanoparticles based on chitosan combined with nicotinamide: Enhancing percutaneous delivery and treatment efficacy for atopic dermatitis and reducing dose. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 129–142, 2018.

ZAINAL-ABIDIN, M. H.; HAYYAN, M.; NGOH, G. C.; WONG, W. F. From nanoengineering to nanomedicine: A facile route to enhance biocompatibility of graphene as a potential nano-carrier for targeted drug delivery using natural deep eutectic solvents. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 195, p. 95–106, 2019.

ZANETTI, M.; MAZON, L. R.; DE MENESES, A. C.; SILVA, L. L.; DE ARAÚJO, P. H. H.; FIORI, M. A.; DE OLIVEIRA, D. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 97, p. 198–207, 2019.

ZAVISOVA, V.; KONERACKA, M.; GABELOVA, A.; SVITKOVA, B.; URSINYOVA, M.; KUBOVCIKOVA, M.; ANTAL, I.; KHMARA, I.; JURIKOVA, A.; MOLCAN, M.; OGNJANOVIĆ, M.; ANTIĆ, B.; KOPCANSKY, P. Effect of magnetic nanoparticles coating on cell proliferation and uptake. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 472, p. 66–73, 2019.

ZHANG, Y.; ZHANG, P.; ZHU, T. Ovarian carcinoma biological nanotherapy: Comparison of the advantages and drawbacks of lipid, polymeric, and hybrid nanoparticles for cisplatin delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 475–483, 2019.

ZHIDEBEKKYZY, A.; KUPESHOVA, S.; YESMURZAYEVA, A. Project management in nanotechnology: A systematic literature review. **Montenegrin Journal of Economics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 227–244, 2019.

ZHUO, F.; ABOUREHAB, M. A. S.; HUSSAIN, Z. Hyaluronic acid decorated tacrolimus-loaded nanoparticles: Efficient approach to maximize dermal targeting and anti-dermatitis efficacy. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 197, p. 478–489, 2018.