

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

GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO

SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO
TACROLIMUS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA: ESTUDO DE
ESTABILIDADE, PERFIL DE PERMEAÇÃO E EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

PONTA GROSSA
2022

GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO

SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO
TACROLIMUS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA: ESTUDO DE
ESTABILIDADE, PERFIL DE PERMEAÇÃO E EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

Tese apresentada para a obtenção do título de
doutor 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: Prof^a Dr^a Jessica Mendes Nadal

PONTA GROSSA

2022

C172 Camargo, Guilherme dos Anjos
Suspensão de nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) contendo tacrolimus como sistema de liberação cutânea: estudo de estabilidade, perfil de permeação e efeito anti-inflamatório / Guilherme dos Anjos Camargo. Ponta Grossa, 2022. 122 f.

Tese (Doutorado 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. Jessica Mendes Nadal.

1. Imunomodulador. 2. Doenças autoimunes cutâneas. 3. Lactona macrolídea. 4. Permeação cutânea. I. Farago, Paulo Vitor. II. Nadal, Jessica Mendes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

**Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

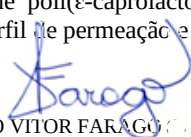
ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 04/2022 DO DOUTORANDO **GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO**, REALIZADA NO DIA 19 DE SETEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezoito dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às 13h30, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência do Professor Doutor PAULO VITOR FARAGO, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas do doutorando **GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO**, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN (UEPG/PR); ANDRESSA NOVATSKI (UEPG/PR); LETÍCIA CRUZ (UFSM/RS); e ELIANE APARECIDA CAMPESATTO (UFAL/AL). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: “**AVALIAÇÃO in vitro E in vivo DE NANOCÁPSULAS DE PCL CONTENDO TACROLIMUS PARA O USO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS**”. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADO a Tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

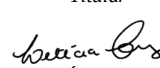
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim (X) não ()

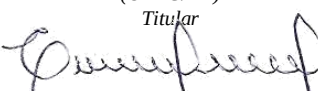
Novo título: Suspensão de nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) contendo tacrolimus como sistema de liberação cutânea: estudo de estabilidade, perfil de permeação e efeito anti-inflamatório


PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR)
Presidente


PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN
(UEPG/PR)
Titular


LETÍCIA CRUZ
(UFSM/RS)
Titular


ANDRESSA NOVATSKI
(UEPG/PR)
Titular


ELIANE APARECIDA CAMPESATTO
(UFAL/AL)
Titular

Ponta Grossa, 19 de setembro de 2022.

Dedico esse trabalho a minha avó e madrinha, Olga Passos dos Anjos, que durante a execução dessa tese nos deixou, mas sei que de onde estiver continua torcendo e me protegendo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força e presença durante a execução desse e tantos outros projetos durante minha vida. Agradeço por todo foco necessário para alcançar cada meta/objetivo almejado e traçado e por manter minha cabeça no lugar, mesmo quando imaginava que algo não seria possível.

Aos meus pais, Artur e Cleonice, por todo incentivo desde criança e por serem minha base firme e segura. Sei que posso sempre contar com o apoio de vocês independente da situação. Nunca mediram esforços para me ajudar a chegar até onde cheguei e serei sempre grato a vocês por ser quem sou.

Ao meu melhor amigo, Aleksander, por estar sempre ali quando mais precisava, me apoiando independente da hora e do momento. Você é uma das pessoas que mais acredita em mim e me estimula a dar sempre o meu melhor, porque sabe que serei capaz. Não sei o que faria sem seu apoio!

À minha amiga e agora afilhada, Evelyn, por ser extremamente necessária na minha vida. Já foram inúmeros objetivos traçados juntos e acredito que daqui para frente sigamos um caminho um pouco diferente, mas sempre seremos família e isso é o que importa. Obrigado por sempre acreditar em mim! Eu também acredito em você.

Aos meus demais amigos, Valter, Jéssica Mollina, Ana, Tamy, Camila e Leticia, por todos esses anos de convivência e parceria. Vocês são a família que Deus me deu e serei eternamente grato por isso. Às vezes temos que superar a distância física entre nós, mas nem isso é capaz de nos afastar. Obrigado por tudo!

Ao meu orientador, prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por toda ajuda, não somente nesse projeto, mas em tantos outros. Obrigado por todas as horas passadas corrigindo os artigos ou respondendo as revistas. Obrigado pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por abrir as portas do Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos e Farmácia Industrial para mim. Obrigado pelas

inúmeras dicas e conselhos, pode ter certeza de que levarei para vida e se hoje eu sou um profissional melhor é graças a você. O professor é essencial na nossa vida!

À minha querida coorientadora, prof^a. Dr^a Jessica Mendes Nadal, por toda paciência, parceria, incentivo e por acreditar em mim, às vezes até quando nem eu acreditava. Como sempre disse, a prof^a é minha maior inspiração e a certeza da especialidade que sigo hoje é graças a você. Obrigado por cada apoio, cada conselho, cada ajuda! Espero um dia ser um pouco que seja da profissional que é!

À prof^a Dr^a Fernanda Malaquias Barboza, por toda ajuda no decorrer desse projeto, principalmente durante a execução dos experimentos de quantificação, liberação e permeação. Obrigado por sempre poder contar com você a qualquer momento. Às vezes quando me sentia perdido, era a você que recorria e não media esforços para me ajudar. Muito obrigado por tudo!

À prof^a Dr^a Andressa Novatski, pelo suporte e ensinamentos durante os experimentos de caracterização, estabilidade e permeação. Obrigado por todo auxílio durante a escrita dos artigos, principalmente com o artigo de estabilidade que juntos corremos para poder conseguir publicá-lo, desde a execução dos experimentos, até a submissão e aceite. Não é à toa que a prof^a faz parte desse grupo de pesquisa tão incrível, pois seu auxílio é fundamental para todos nós! Obrigado!

Aos membros da banca da defesa, prof^{as} Dr^{as} Andressa Novatski, Eliane Aparecida Campesatto, Letícia Cruz e Patrícia Mathias Döll Boscardin por aceitarem o convite de compor a banca, pelo tempo destinado à correção do trabalho e todas as contribuições a serem realizadas.

Ao prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, a prof^a Dr^a Adriana Yuriko Koga e a Dr^a Bruna Carletto pela ajuda durante a execução dos ensaios *in vivo*. Com toda a certeza essa etapa não teria sido possível sem o auxílio de vocês. Obrigado prof^a Adriana por todos os dez dias corridos (incluindo sábados e domingos) e durante a pandemia para conseguirmos finalizar todos os grupos experimentais. Jamais esquecerei!

As colegas de laboratório, Adriana, Ana Paula, Bruna Carletto e Loanda que enfrentaram junto comigo todos os obstáculos diários da pesquisa. Rimos, choramos, desabafamos e comemoramos. Vocês deixaram o mundo UEPG muito mais leve e a vontade de vir todos os dias para o laboratório muito mais fácil. Serei eternamente grato!

À minha família, por estarem sempre presente em todos os momentos. Por todo apoio, ajuda, conforto, amizade e carinho. Obrigado por tudo. Amo vocês!

Ao meu coorientado, Leandro Ferreira, pela ajuda em todos os “perrengues” que passamos durante os experimentos, desde a espera de um equipamento que estava quebrado, até a procura de material para execução dos experimentos. Independente da área que escolha seguir, saiba que você será grande! Obrigado por me dar a oportunidade de participar da sua caminhada e espero que essa parceria continue por muitos anos. Voe alto!

À minha ex-coorientada, Amanda Roderjan Cray da Costa Filha, pelo tempo que passamos juntos durante a execução inicial desse projeto, mas que mesmo você seguindo outro caminho, nossa parceria continuou e com toda a certeza essa parceria se manterá por muito tempo. Você é incrível! Obrigado por toda ajuda na pesquisa e fora dela.

À prof^a Dr^a Barbara Celânia Fiorin, minha primeira mãezona científica e que até o doutorado continuamos trabalhando juntos com nossas queridas chalconas ou apenas sendo seu aluno na química orgânica que tanto amo. Sempre serei imensamente grato por tudo que fez por mim e nunca deixarei de mostrar essa gratidão. Você me abriu as portas para pesquisa lá em abril de 2013 e se hoje estou aqui, com certeza, foi por culpa sua também. Desculpa por não ter continuado na orgânica como pesquisa, mas eu acabei me encontrando em outro lugar. Obrigado por todo ensinamento, conselho e amizade! Você é luz!

À prof^a Dr^a Jane Manfron e o Dr. Vijayasankar Raman, pela oportunidade e auxílio na publicação de um dos artigos referentes ao meu trabalho. E à prof^a Jane por sempre me considerar parte da sua família científica, sempre fiquei muito feliz com o

apoio e por me sentir acolhido por você. Sou muito grato por ter alguém tão especial por perto e que posso contar. Obrigado!

À prof^a Dr^a Daniele Toniolo Dias e a acadêmica Betina Christi Semianko, pelo auxílio na execução do experimento de permeação utilizando a espectroscopia fotoacústica no Laboratório Multiusuário de Propriedades Termo-Ópticas (LAPTO) do Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais (C₂MMA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Obrigado por abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse realizar mais essa etapa do meu projeto. Isso só mostra o quanto ninguém faz ciência sozinho e que precisamos tanto dessas parcerias entre os diferentes grupos de pesquisa e as universidades.

Às laboratoristas, Luciane, Elizabete e Marilene, por serem nosso braço direito e nos socorrerem sempre que precisamos. Além disso, obrigado por essa amizade alcançada durante esses anos. Vocês são incríveis!

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

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

À Universidade Estadual de Ponta Grossa por ser minha segunda casa, às vezes até a primeira, durante todos esses quase 10 anos de ensino superior.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela oportunidade da bolsa de doutorado.

Aos demais que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho. Muito obrigado!

“Ninguém que deu o seu melhor se
arrependeu”

(George Halas)

RESUMO

O tacrolimus (TAC) é um medicamento de origem natural utilizado na aplicação tópica convencional para o controle de doenças autoimunes cutâneas, como a dermatite atópica, a psoríase e o vitiligo. No entanto, a aplicação direta do medicamento muitas vezes causa efeitos adversos significativos em alguns pacientes acarretando em uma menor adesão ao tratamento. Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação modificado pode ser utilizado para intensificar a permeação cutânea, reduzir a dose aplicada topicamente, diminuir os efeitos adversos e aumentar a biodistribuição do fármaco. A partir disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* e *in vivo* as nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo TAC desenvolvidas, caracterizadas e quantificadas previamente. O estudo da estabilidade das nanocápsulas de PCL foi conduzido utilizando a espectroscopia Raman. O mecanismo de liberação *in vitro* do fármaco foi estudado a partir do ensaio de liberação, avaliando a cinética de liberação por modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixson-Crowell. A permeação cutânea *in vitro* foi analisada utilizando células verticais de difusão de Franz e a técnica de espectroscopia fotoacústica. A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vivo* segundo o modelo da indução do edema de orelha em camundongos Balb/c machos. A análise dos resultados Raman demonstrou que o mecanismo de degradação das nanocápsulas ocorreu principalmente em domínios amorfos do PCL e resultou em um aumento da cristalinidade do polímero, concluindo que as nanopartículas tiveram uma estabilidade adequada em até 60 dias após a preparação. A liberação do fármaco em experimentos *in vitro* mostraram uma liberação controlada do TAC. O estudo da cinética de liberação mostrou uma cinética de ordem zero e de acordo com o modelo Korsmeyer-Peppas, foram observadas características de transporte anômalas. Segundo o estudo de permeação *in vitro* utilizando o modelo de células de Franz foi possível observar que tanto o fármaco livre como a formulação permaneceram retidas nas membranas, sendo o desejável para a aplicação tópica. O ensaio de permeação pela espectroscopia fotoacústica revelou que as nanocápsulas foram capazes de reduzir a permeação cutânea do TAC por todas as camadas da pele, melhorando a biodistribuição e acumulando a maior concentração das nanopartículas no estrato córneo, epiderme viável e na região dérmica. As nanocápsulas de PCL carregadas com TAC exibiram excelente atividade anti-inflamatória quando comparadas ao fármaco livre e, portanto, essas nanocápsulas podem ser usadas adequadamente como uma nova forma farmacêutica para o controle de doenças autoimunes cutâneas e 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: Doenças autoimunes cutâneas. Imunomodulador. Lactona macrolídea. Permeação cutânea.

ABSTRACT

Tacrolimus (TAC) is a drug of natural origin used in conventional topical application to control autoimmune skin diseases such as atopic dermatitis, psoriasis and vitiligo. However, topical application of the drug often causes significant adverse effects in some patients, leading to lower adherence to treatment. Thus, the development of modified delivery systems can be used to enhance skin permeation, reduce the dose applied topically, decrease adverse effects and increase drug biodistribution. Based on this, the aim of the present study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* TAC-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules developed, characterized and quantified previously. Stability studies of PCL nanocapsules was conducted using Raman spectroscopy. *In vitro* drug release mechanism was performed from *in vitro* drug release experiments, evaluating the release kinetics by mathematical models of zero order, first order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas and Hixson-Crowell. *In vitro* skin permeation was analyzed using vertical Franz diffusion cells and photoacoustic spectroscopy. Anti-inflammatory activity was evaluated *in vivo* according to the model of induction of ear edema in male Balb/c mice. Raman results showed that the mechanism of degradation of the nanocapsules occurred mainly in amorphous domains of the PCL and resulted in an increase in the crystallinity of the polymer, concluding that the nanoparticles had adequate stability up to 60 days after preparation. *In vitro* drug dissolution experiments showed a controlled release of TAC. The release kinetics showed zero-order kinetics. As per the Korsmeyer–Peppas model, anomalous transport features were observed. *In vitro* permeation study by Franz cell model demonstrates that pure TAC and TAC-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules remained retained in the membranes, which is desirable for topical application. Photoacoustic spectroscopy assay revealed that nanocapsules were able to reduce the cutaneous permeation of the TAC through skin layers, improving the biodistribution and accumulating the highest concentration of the nanoparticles in the stratum corneum, viable epidermis and in the dermal region. TAC-loaded PCL nanocapsules exhibited excellent anti-inflammatory activity when compared to the free drug. TAC-loaded PCL nanocapsules can be suitably used as a novel nano-based dosage form to control of cutaneous autoimmune diseases and 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: Cutaneous autoimmune diseases. Immunomodulator. Macrolide lactone. Skin permeation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1	NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE.....	17
3.1.1	Nanocápsulas Poliméricas.....	20
3.1.2	Poli(ϵ -caprolactona)	24
3.2	A PELE E SUAS CÉLULAS DE DEFESA.....	27
3.2.1	Doenças Autoimunes Cutâneas	31
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO TACROLIMUS	34
3.3.1	Efeito Imunomodulador do Tacrolimus na Pele	40
3.3.1.1	A supressão da ativação do nervo sensorial por tacrolimus	40
3.3.1.2	A supressão de IL-31 por tacrolimus	41
3.3.1.3	A resposta imune inata e adaptativa e o tacrolimus	41
3.3.1.4	A supressão da cronicidade por tacrolimus	42
3.3.1.5	A supressão da ativação de mastócitos, células dendríticas, basófilos e eosinófilos por tacrolimus	43
3.3.1.6	Efeitos do tacrolimus na função de barreira cutânea	44
3.4	TÉCNICAS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	45
3.4.1	Difusão por Células de Franz	46
3.4.2	Espectroscopia Fotoacústica.....	51
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	EQUIPAMENTOS.....	53
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	54
4.2.1	Fármaco.....	54
4.2.2	Polímero	54
4.2.3	Água Purificada	54

4.2.4	Solventes e Demais Reagentes.....	54
4.2.5	Materiais	55
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	55
4.4	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS	56
4.5	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	58
4.6	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS	59
4.6.1	Avaliação dos Perfis de Liberação.....	61
4.7	ESTUDO DA PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> POR DIFUSÃO EM CÉLULA ESTÁTICA DE FRANZ	61
4.8	ESTUDO DA PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> POR ESPECTROSCOPIA DE FOTOACÚSTICA.....	62
4.8.1	Espectroscopia Fotoacústica.....	62
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	64
4.9.1	Cuidados Éticos.....	64
4.9.2	Animais	64
4.9.3	Edema de Orelha Induzido Pela Aplicação Tópica do TPA.....	65
4.9.4	Avaliação do Edema de Orelha	67
4.9.5	Dosagem de Fibrinogênio.....	67
4.9.6	Análise Histológica	67
4.9.7	Análise Estatística	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	69
5.2	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS	78
5.2.1	Avaliação dos Perfis de Liberação.....	80

5.3	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> POR DIFUSÃO EM CÉLULA ESTÁTICA DE FRANZ	82
5.4	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	84
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	94
5.5.1	Análise do Edema e Peso das Orelhas	94
5.5.2	Dosagem de Fibrinogênio.....	97
5.5.3	Efeito das Nanocápsulas Poliméricas Contendo TAC nas Análises Histopatológicas e Acúmulo de Células Inflamatórias no Modelo de Indução da Inflamação por TPA	99
6	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS.....	108
	APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	117
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	121

1 INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes cutâneas são caracterizadas por uma inflamação crônica que podem ter um efeito devastador no bem-estar do paciente e na sua qualidade de vida. Os distúrbios autoimunes na pele incluem doenças bolhosas autoimunes, doenças vasculares do colágeno, alopecia areata e vitiligo. Além disso, está crescendo evidências de que os distúrbios mais comuns, como psoríase, dermatite atópica (DA), vitiligo e líquen plano também estão ligados aos processos autoimunes (SATOLLI; ROVESTI; FELICIANI, 2019, p. 89).

Dentre os tratamentos farmacológicos tópicos para essas doenças destacam-se várias modalidades como os corticosteróides, a fototerapia, os análogos da vitamina D, o ácido salicílico, os retinóides e os imunossupressores, dentre eles, os inibidores de calcineurina, como o tacrolimus (CARR, 2013, p. 303; LEE *et al.*, 2010, p. 1057; MASON *et al.*, 2013, p. 800).

Tacrolimus (TAC), também conhecido como FK506, cuja fórmula molecular é $C_{44}H_{69}NO_{12}$, é uma lactona macrolídea hidrofóbica pertencente à classe dos inibidores de calcineurina, sendo produzido pela fermentação da bactéria *Streptomyces tsukubaensis* (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; MOREIRA; SILVA; CREMASCO, 2020, p. 1; NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 233; NISHIYAMA; IZUMI; OKUHARA, 1995, p. 65; SHOUGHY, 2017, p. 1; SHOUGHY; ALJASSAR; TABBARA, 2020, p. 1). O TAC atua inibindo a ativação de linfócitos T *helper* e seu uso tópico é principalmente para doenças autoimunes cutâneas, como vitiligo e DA (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 233; SHOUGHY, 2017, p. 1; SHOUGHY; ALJASSAR; TABBARA, 2020, p. 1).

O TAC foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e é encontrado como pomada em sua forma farmacêutica para uso dermatológico, nas concentrações de 0,03%, para crianças de 2 a 16 anos e a 0,1% para os demais pacientes (YU *et al.*, 2018, p. 129). No geral, as preparações tópicas de TAC possuem efeitos adversos significativos, como prurido, queimação e sensação de calor no local da aplicação no início do tratamento que levam a uma baixa adesão dos pacientes, com impacto na qualidade de vida (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 158).

Além disso, a alta massa molecular, alta hidrofobicidade e baixa solubilidade em água do TAC podem limitar sua capacidade de permear eficazmente pela pele.

Por isso, torna-se importante formular um sistema percutâneo de liberação do fármaco, utilizando a nanotecnologia farmacêutica, para que aumente a sua permeação em relação a sua pomada convencional e, conseqüentemente, reduza a dose e os efeitos adversos no tratamento das doenças (CAMARGO *et al.*, 2020, p. 2; YU *et al.*, 2018, p. 130). Ainda, espera-se que esse sistema de liberação tenha a capacidade de depositar mais fármaco, persista na pele por mais tempo e não cause danos (YU *et al.*, 2018, p. 130).

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade físico-química por espectroscopia Raman, verificar o perfil de permeação por células de difusão de Franz e espectroscopia fotoacústica – sendo inédito na literatura, além de estudar o efeito anti-inflamatório das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo TAC previamente desenvolvidas, caracterizadas e quantificadas durante a realização do mestrado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade físico-química, o perfil de permeação e estudar o efeito anti-inflamatório das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo TAC, previamente desenvolvidas, caracterizadas e quantificadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as nanocápsulas poliméricas a partir do poliéster biodegradável poli(ϵ -caprolactona) contendo o TAC, segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas por espectroscopia Raman durante 120 dias;
- Estimar o perfil de liberação *in vitro* das nanocápsulas de PCL utilizando os ensaios de liberação;
- Investigar, por meio de modelos matemáticos, a cinética e o mecanismo de liberação do fármaco;
- Estudar a permeação *in vitro* do fármaco, a partir das nanocápsulas poliméricas e empregando a membrana sintética Strat-M® com o uso do ensaio de permeação cutânea com células de difusão de Franz e a técnica de espectroscopia fotoacústica;
- Analisar a atividade anti-inflamatória *in vivo* do fármaco a partir das nanocápsulas poliméricas por meio do modelo de edema de orelha;
- Verificar a ação das nanocápsulas poliméricas contendo TAC sobre a migração celular por meio de análises histológicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE

Um dos objetivos principais de uma tecnologia voltada a área da saúde é de tornar mais acessível os cuidados médicos e farmacêuticos para toda a população, minimizando a variabilidade individual causada por vários fatores como a genética, o meio ambiente e o estilo de vida. A partir disso, foi demonstrado que cada indivíduo tem uma pré-disposição a desenvolver certas doenças, com diferentes consequências nas respostas farmacológicas e nos efeitos colaterais (CALABRETTA *et al.*, 2020, p. 2841).

Com isso, um trabalho multiprofissional é necessário para acarretar em um progresso na área médica, com avanços em novas técnicas diagnósticas, novas instrumentações e materiais, novas técnicas de alta performance, novas drogas e novos sistemas de liberação de ativos para terapia farmacológica (CALABRETTA *et al.*, 2020, p. 2841).

A nanomedicina é uma área interdisciplinar que trabalha em parceria com a nanociência, a nanoengenharia e a nanotecnologia e é esperado que essa ciência ajude a desenvolver melhores dispositivos, fármacos e outras tecnologias para diagnósticos precoces ou tratamento de uma vasta gama de doenças com alta especificidade, eficácia e personalização, com o objetivo principal de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2315).

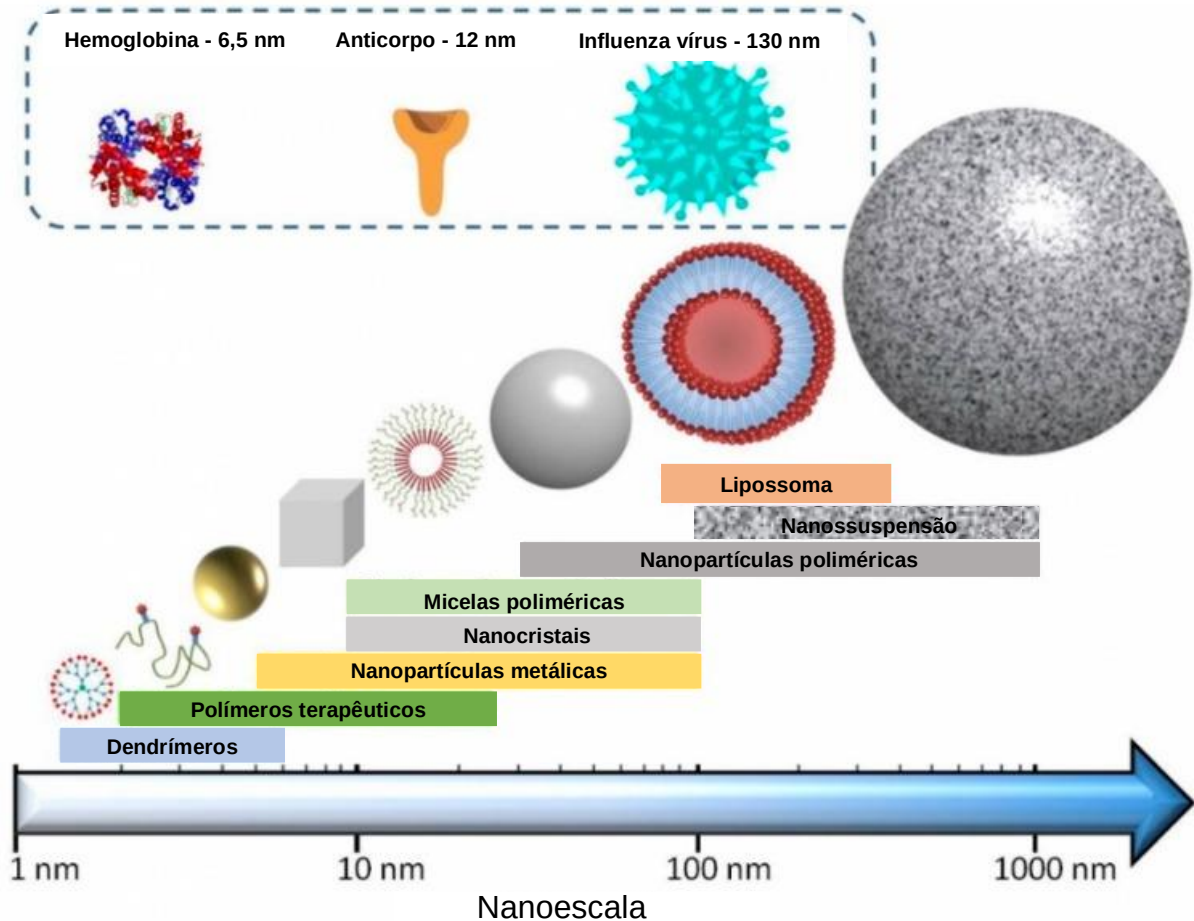
Nos últimos anos o desafio principal da nanomedicina consistiu em desenvolver uma nova tecnologia que alcançasse as inúmeras vantagens do considerado novo conceito de precisão médica na vida cotidiana (CALABRETTA *et al.*, 2020, p. 2841).

A nanotecnologia pode ser definida como a manipulação da matéria em relação ao seu tamanho variando de 0,1 a 1000 nanômetros (nm), ou seja, materiais na ordem de um milésimo da espessura de um fio de cabelo humano. Essa tecnologia é aplicada por conta das características químicas e físicas únicas dos materiais utilizados (SHAFIQUE; LUO, 2019, p. 1).

As propriedades exclusivas do tamanho nanométrico podem levar a várias melhorias, sendo o tamanho da partícula um importante fator que inevitavelmente

afeta as características dos materiais (SHAFIQUE; LUO, 2019, p. 1). A Figura 1 indica os sistemas nanométricos com a faixa de tamanho.

FIGURA 1 – Sistemas nanométricos e aproximação da faixa de tamanho



Fonte: Adaptado de WAHLICH, J. *et al.* Nanomedicines for the delivery of biologics. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2019.

A nanomedicina difere dos outros campos da medicina por envolver o desenvolvimento e aplicação de materiais e tecnologias na escala dos nanômetros. A maioria dos estudiosos associa a nanomedicina com formulações farmacêuticas, onde partículas leves ou pesadas em dimensão nanométrica são injetadas no corpo humano para diagnóstico ou tratamento. Contudo, esse campo de estudo abrange uma ampla gama de pesquisa e desenvolvimento (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2315).

A nanotecnologia tem um papel importante no campo da medicina justamente pela limitação e problemas encontrados nos fármacos e formulações convencionais. Sendo um dos empecilhos a dificuldade de remover partes dos sistemas pelo organismo, principalmente em casos de materiais não biodegradáveis, levando a uma toxicidade. Além disso, a maioria dos sistemas convencionais tem um alto efeito *burst*

imediatamente após administração da droga e a solubilidade em água de alguns fármacos tendem a ser baixas (FARJADIAN *et al.*, 2018, p. 2).

Existem propriedades em nanoescala para todos os tipos de materiais, independentemente de serem encontrados na natureza ou de forma sintética (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2315). O emprego de sistemas de liberação de ativos tem sido amplamente estudado e desenvolvido por conta de sua biocompatibilidade e a habilidade de liberar de forma controlada e/ou vetorizada (DENG *et al.* 2020, p. 1).

Geralmente um nanossistema tem um invólucro externo que protege no núcleo interno a molécula terapêutica ou a substância diagnóstica e esse invólucro pode ser produzido por polímeros, lipídeos ou metais (LANGER; WEISSLEDER, 2015, p. 135). Dentre os inúmeros sistemas nanotecnológicos para liberação de fármacos podem ser citados os nanocristais, as nanopartículas poliméricas, os lipossomas, as nanopartículas magnéticas, as micelas, os dendrímeros, os nanotubos de carbono, as nanopartículas metálicas e outros (FARJADIAN *et al.*, 2018, p. 4).

As nanopartículas são os componentes-chave da nanomedicina e conseqüentemente, uma grande variedade de nanopartículas existe. Muitos desses nanomateriais tem tamanhos e formatos independentes, assim como as propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas, e essas propriedades dependem de métodos para sintetizar, purificar e caracterizar (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2315).

Muitos pesquisadores notaram que uma pequena mudança no tamanho e formato pode afetar significativamente as propriedades das nanopartículas. Sínteses com precisão são, portanto, necessárias para produzir amostras com distribuições uniformes, a fim de correlacionar as funções observadas com características específicas da nanopartícula. A caracterização detalhada dessas partículas usadas para aplicação médica também são críticas porque é preciso conhecer e entender o que será injetado no corpo humano (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2315).

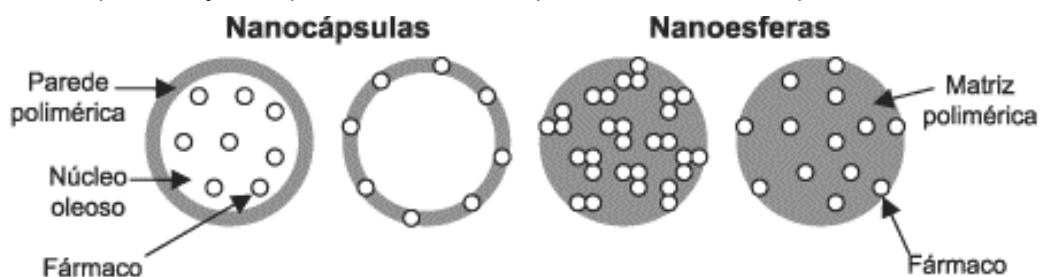
No geral, as nanopartículas na área da saúde estão sendo desenvolvidas para o tratamento de doenças, como sistema de liberação de ativos ou como componentes importantes das formulações. No caso dos sistemas de transporte de ativos baseados em nanopartículas, há uma capacidade única de atravessar as barreiras biológicas e com isso, penetrar, por exemplo, em tumores através dos vasos sanguíneos e ficarem retidas no local devido à má drenagem linfática no microambiente tumoral (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2316).

Para fazer uso da nanomedicina como tratamento das doenças é muito importante conseguir estabilizar os sistemas nanométricos com eficácia e segurança nos sistemas biológicos (PELAZ *et al.*, 2017, p. 2316).

3.1.1 Nanocápsulas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas, dependendo do método de preparo e da formulação (Figura 2). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Enquanto que as nanoesferas, que não apresentam óleo na composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (DENG *et al.*, 2020, p. 2; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, p. 726).

FIGURA 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

Essas nanopartículas são geralmente definidas como partículas sólidas coloidais com tamanho nanométrico, sendo comum encontrar na literatura partículas com tamanho entre 100 e 500 nm, afim de evitar uma depuração rápida após administração intravenosa, prolongar a meia-vida na circulação e, ao mesmo tempo, aumentar a probabilidade de atravessar várias barreiras biológicas e prevenir o acúmulo em capilares e/ou outros órgãos (DENG *et al.*, 2020, p. 1).

As nanopartículas poliméricas não conseguem apenas modular as propriedades farmacocinéticas de várias substâncias devido ao tamanho pequeno, mas também afetar a biocompatibilidade e a biodegradabilidade dos polímeros empregados para produzir essas partículas (DENG *et al.*, 2020, p. 1).

Nos últimos anos, as nanocápsulas poliméricas têm atraído maior interesse na administração de medicamentos devido a estrutura do núcleo encapsulado. Quando comparado com as nanoesferas, o núcleo oleoso poder aumentar efetivamente o encapsulamento de ativos, enquanto reduz o conteúdo da matriz polimérica das nanopartículas. Além disso, o ativo encapsulado pode ser isolado do ambiente do tecido pelo invólucro polimérico, evitando assim a degradação ou liberação precoce induzida pelo pH, temperatura, enzimas e outros fatores biológicos (DENG *et al.*, 2020, p. 1).

O invólucro também pode ser funcionalizado por moléculas inteligentes capazes de interagir com biomoléculas-alvo, permitindo a entrega dos fármacos com maior precisão. Essas vantagens acabam sendo o motivo do grande interesse e da aplicação das nanocápsulas no campo farmacêutico como transportador de fármacos e ativos cosméticos (DENG *et al.*, 2020, p. 1,2).

Em relação ao material polimérico utilizado para formar a matriz da nanocápsula, eles desempenham um papel crítico no desenvolvimento da mesma para carregar, proteger e liberar os ativos. As propriedades dos polímeros exercem influência significativa na estabilidade, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e na biodistribuição da nanocápsula como sistema de liberação de fármacos (DENG *et al.*, 2020, p. 2).

Os materiais poliméricos biocompatíveis têm sido amplamente considerados como candidatos apropriados para o desenvolvimento das nanopartículas poliméricas. Na maioria dos casos, esses polímeros devem ser biodegradáveis com o objetivo de liberar o ativo e eliminar o restante do sistema pelo organismo. Porém, polímeros não biodegradáveis, mas biocompatíveis – como o polietilenoglicol (PEG) e o álcool polivinílico (PVA) – também tem sido amplamente utilizado para contribuir na fabricação dessas partículas e eles podem ajudar na liberação de ativos por difusão, graças a sua hidrofiliabilidade (DENG *et al.*, 2020, p. 2).

Para satisfazer os diferentes requisitos de aplicação, vários polímeros foram empregados para a formulação de nanocápsulas e eles podem ser classificados em polímeros naturais ou sintéticos, de acordo com sua fonte primária (DENG *et al.*, 2020, p. 2). Os polímeros mais empregados são o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), além da utilização de polissacarídeos como quitosana e alginato, e demais polímeros atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis (SOUTO *et al.*, 2019, p. 10).

O núcleo das nanocápsulas pode ser oco ou de fase líquida ou sólida, tornando-o capaz de transportar diferentes tipos de ativos. As nanocápsulas podem apresentar um núcleo oleico ou aquoso. O oleico é altamente adequado para o encapsulamento de moléculas hidrofóbicas, enquanto que o aquoso para ativos hidrofílicos. Esse óleo pode ser derivado de óleo vegetal, como óleo de soja, óleo de palma, ou de ácidos graxos, como os triglicerídeos de cadeia média (DENG *et al.*, 2020, p. 4).

A fase oleosa possui composição ideal para o desenvolvimento das nanocápsulas, devido a capacidade de dissolver ativos lipofílicos e por sua biossegurança, além de ser meio de dissolução, o óleo também pode fornecer simultaneamente uma funcionalidade terapêutica, como por exemplo, o óleo de eugenol com propriedade anti-inflamatória e anestésica (DENG *et al.*, 2020, p. 4; VILELA *et al.*, 2021, p. 661).

Existem três métodos clássicos para formação das nanocápsulas poliméricas: o método de deposição interfacial do polímero pré-formado, o método de nanoemulsão e o método camada a camada, os quais não houveram alteração técnica significativa durante as últimas décadas e as três estratégias existentes já atenderam aos mais diversos requisitos para fabricação de nanocápsulas (DENG *et al.*, 2020, p. 5).

O método de deposição interfacial ou nanoprecipitação foi amplamente utilizado para desenvolver as nanocápsulas. O método foi criado por Fessi *et al.* em 1989, onde utiliza métodos de deposição interfacial para preparar as partículas a partir de uma fase orgânica e outra aquosa (DENG *et al.*, 2020, p. 5).

Em síntese, a fase orgânica é preparada dissolvendo o óleo com os demais componentes lipofílicos em solventes orgânicos apropriados, como a acetona ou o etanol, e subsequente são adicionados através de uma agulha fina em gotejamento lento e constante na fase aquosa. O polímero utilizado pode ser dissolvido na fase aquosa ou orgânica, dependendo da afinidade do polímero pelo solvente e um ou mais surfactantes podem ser adicionados para melhorar a estabilidade da nanocápsula. Em seguida, a suspensão aquosa é obtida pela remoção do solvente orgânico por difusão ou evaporação (DENG *et al.*, 2020, p. 5).

As características das nanocápsulas podem ser influenciadas principalmente pela concentração dos polímeros, método de injeção da fase orgânica, razão de volume entre a fase orgânica e a fase aquosa e também a natureza dos materiais.

Esse método foi utilizado intensamente na última década devido à operação simples, sem força externa aplicada e a extensa aplicabilidade para vários ativos (DENG *et al.*, 2020, p. 5).

Em relação ao método de nanoemulsão, são utilizados instrumentos de alta energia para pré-formar a nanoemulsão de diferentes maneiras, como a difusão, a evaporação ou a coacervação dos monômeros. Para a preparação da nanoemulsão, a fase orgânica é emulsionada na fase aquosa na presença de um surfactante sob uma energia suporte constante como a sonicação ou a homogeneização (DENG *et al.*, 2020, p. 6).

Por fim, o terceiro método, camada a camada, tem sido abordado como promissor para a fabricação das nanocápsulas compostas por multicamadas. O método permite que as propriedades de direcionamento e liberação sejam controladas modulando a composição e a espessura da matriz polimérica que recobre o núcleo. O mecanismo de formulação por esse método geralmente usa a atração eletrostática para obter a deposição sequencial de polycations e polianions em volta do núcleo, seguido pela escarificação do mesmo (DENG *et al.*, 2020, p. 8).

Com isso, as inovações na formulação das nanocápsulas são mais focadas na utilização criativa dos materiais, a fim de satisfazer diferentes propósitos das aplicações de administração de medicamentos. Várias novas nanocápsulas criadas usando materiais com diferentes desempenhos pode fornecer múltiplas capacidades de carga e/ou liberação das substâncias ativas, tudo depende do propósito do sistema (DENG *et al.*, 2020, p. 5).

Atualmente foi possível encontrar na literatura vários estudos utilizando nanocápsulas poliméricas com diversos tipos de polímeros, como por exemplo, o de Gomes *et al.* (2019), onde desenvolveram nanocápsulas de uma blenda de PCL-PEG para avaliar a atividade antiplaquetária de longa duração do cilostazol; Carletto *et al.* (2021), avaliaram as nanocápsulas de PLA carregadas de ácido ursólico na redução dos danos causados pela deficiência de estrogênio na cicatrização de feridas; Rudnik *et al.* (2020), desenvolveram nanocápsulas de PCL contendo curcumina e metotrexato com objetivo de aumentar a citotoxicidade contra células de câncer de pulmão e Baroni *et al.* (2021), verificaram a redução da expressão de TNF- α no peritônio de ratos após a infusão de solução de diálise peritoneal por nanocápsulas de PCL carregadas de sinvastatina.

3.1.2 Poli(ϵ -caprolactona)

Os poliésteres alifáticos e os seus copolímeros são polímeros sintéticos muito comuns e são extensivamente estudados e utilizados como sistema de liberação de ativos, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Como já citado, os mais utilizados são o PLA, o PCL, o PLGA e seus copolímeros, sendo o PCL capaz de fornecer um período de degradação muito mais longo que os demais. Portanto, o PCL é mais adequado para medicamentos como sistema de liberação a longo prazo ou aplicações médicas. Além disso, o PCL tem um custo menor que o PLA e o PLGA, o que acaba sendo também uma vantagem (DENG *et al.*, 2020, p. 3).

O PCL é um polímero biodegradável cujo o uso inclui o desenvolvimento de curativos, dispositivos contraceptivos, dispositivos de fixação e sistemas de liberação de ativos. O PCL tem sido utilizado para o tratamento de diversas doenças, carreando proteínas, peptídeos, vacinas e outras moléculas bioativas. Em alguns usos na terapêutica como carreador encontram-se a possibilidade de levar ativos que sejam capazes de diminuir a inflamação localizada ao mesmo tempo que ocorre regeneração tecidual ou carrear fatores bioativos antes da implantação para promover o crescimento celular (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 1,2).

O PCL também tem sido empregado na engenharia de tecidos devido a sua vantagem nas propriedades viscoelástica e reológica. O osso, a cartilagem, o sistema cardiovascular, os vasos sanguíneos, os nervos, os tendões e os ligamentos também são áreas onde o PCL tem sido extensivamente aplicado visando reparação e substituição dos tecidos (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 2).

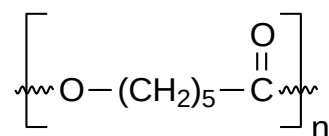
O PCL é um polímero semicristalino e possui temperatura de transição vítrea entre -65 a -60 °C, temperatura de fusão entre 59 a 64 °C e temperatura de decomposição acima de 350 °C, dependendo da cristalinidade particular do polímero submetido a análise. Esse ponto de fusão baixo permite uma boa mistura com outros polímeros e com isso, facilita a criação de outras estruturas poliméricas para uso como em sistema de liberação de ativos (BOSE *et al.*, 2019, p. 17; ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 6; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015, p. 966; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010, p. 1218).

A cristalinidade desse polímero varia de acordo com seu peso, diminuindo à medida que a massa molecular é aumentada. Ele é solúvel em diversos solventes orgânicos como o clorofórmio, o diclorometano, o tetracloreto de carbono, o benzeno,

o tolueno, o ciclohexano, e o 2-nitropropano à temperatura ambiente; levemente solúvel em acetona, acetato de etila, dimetilformaldeído e acetonitrila (LABET; THIELEMANS, 2009, p. 3484).

Quimicamente o PCL, Figura 3, é composto por unidades repetidas linearmente de hexanoato, cuja fórmula molecular é $(C_6H_{10}O_2)_n$, também conhecido como polímero de 6-caprolactona. Como mencionado, o PCL pode ser copolimerizado com outros polímeros, permitindo a modificação de suas propriedades físicas, químicas e mecânicas com grande versatilidade. Além disso, a copolimerização afeta as propriedades como cristalinidade, solubilidade, degradação e permeabilidade, dependendo das razões empregadas, resultando em polímeros feitos sob medida para a entrega de ativos (ABAMOR *et al.*, 2018, p. 1018; ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 6; HIVECHI; BAHRAMI; SIEGEL, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2018, p. 929).

FIGURA 3 - Estrutura química do monômero de PCL



Fonte: O autor

Esse polímero é tipicamente obtido por processos de polimerização usando um monômero e um iniciador. Na reação, o monômero e o iniciador são misturados sob atmosfera de nitrogênio a altas temperaturas, levando à formação dos polímeros. Depois o polímero obtido é resfriado, dissolvido em um solvente orgânico e purificado para remover as moléculas que não reagiram. O polímero restante é então liofilizado e armazenado para usos adicionais, que incluem a obtenção de nanopartículas, micropartículas e demais estruturas poliméricas (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 1).

A FDA aprovou o uso do PCL em humanos devido aos estudos científicos do polímero que provaram a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Os ensaios toxicológicos mostraram que o mesmo não é mutagênico e é inócuo em vários modelos animais, sendo que em alguns estudos *in vivo* usando implantes de PCL foi possível observar que o polímero passa por uma degradação hidrolítica, na ausência de enzimas, por clivagem dos grupos ésteres até sua massa molecular ser suficientemente baixa para permitir maior degradação celular (ABAMOR *et al.*, 2018, p. 1018; ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 4; HIVECHI; BAHRAMI; SIEGEL, 2019, p. 929; SIQUEIRA *et al.*, 2018, p. 929).

O processo de degradação é geralmente muito lento, cerca de 2 a 3 anos e envolve sua conversão final em ácido ϵ -hidroxicapróico que é completamente metabolizado pelo corpo humano. Por conta disso, o PCL também é considerado um polímero bioabsorvível, implicando em uma enorme vantagem para aplicações médicas. Esses recursos, junto com a alta permeabilidade de muitos agentes terapêuticos de massa molecular relativamente baixa (menos de 400 Da) acarreta no PCL ser adequado para o desenvolvimento de sistemas de liberação de ativos (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 4; NADAL *et al.*, 2019, p. 2).

Por muitos anos, o principal impedimento para a completa aplicação do PCL em sistemas nanoparticulados tem sido por conta da sua baixa degradação, embora o comportamento de degradação tenha sido estabelecido principalmente em implantes em modelos *in vivo*. Apesar desses resultados serem verdadeiros para implantes não significa que o mesmo comportamento seja esperado em materiais nanoparticulados, justamente por toda mudança físico-química que ocorre em nanomateriais (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 5).

Espera-se que as taxas de degradação estejam intimamente relacionadas a área superficial do material e a presença de enzimas. A diminuição do tamanho do material implica em um incremento na área superficial, onde maiores taxas de degradação são esperadas para partículas menores quando o processo enzimático está envolvido (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 5).

Isto é explicado com base na ideia de que o efeito enzimático é exercido na superfície do material, uma vez que a difusão na matriz polimérica hidrofóbica é difícil, envolvendo um processo de degradação geralmente dividido em duas etapas: adsorção enzimática inicial e hidrólise subsequente que permite a degradação dos polímeros (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 5).

A taxa de degradação também depende da massa molar do PCL e da sua cristalinidade, onde já foi observado que a degradação ocorre preferencialmente em regiões amorfas e, portanto, graus mais altos de cristalinidade estariam associados a menores taxas de degradação. Assim como massas moleculares mais altas também implicam em degradações mais lentas, já que moléculas poliméricas maiores precisam de mais cadeias para produzir oligômeros solúveis em água curtos os suficientes para permitir uma erosão (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 5).

Na literatura foi possível encontrar trabalhos utilizando o PCL para o desenvolvimento de sistemas de liberação de ativos, como exemplo de Rabha *et al.*

(2021), que sintetizaram, caracterizaram e avaliaram o efeito de nanopartículas de PCL-plurônico contendo diosgenina sobre células do câncer cerebral; Balcucho; Narváez e Castro-Mayorga (2020), estudaram curativos antimicrobianos e biocompatíveis de PCL e nanopartículas de óxido de cobre contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e Park *et al.* (2019), desenvolveram uma nanoemulsão de PCL-PEG carregada com cloro e6 para a terapia fotodinâmica e administração de medicamentos *in vivo*.

3.2 A PELE E SUAS CÉLULAS DE DEFESA

A pele é o maior órgão do corpo humano, contendo aproximadamente 2 m², e atua como uma barreira de proteção contra os agentes externos – a poluição, os microrganismos, a radiação ultravioleta, entre outros – sendo, então, a primeira linha de defesa do organismo. Além disso, a pele executa várias funções como termorregulação, retenção hídrica, proteção imunológica, cicatrização e metabólica (KAUR *et al.*, 2019, p. 2; WOODBY *et al.*, 2020, p. 236).

A pele é composta por duas camadas: a epiderme e a derme, e o tecido subcutâneo como tecido de sustentação. A epiderme é uma bainha de células com 0,2 mm de espessura de queratinócitos, que estão em diferentes estágios de diferenciação, juntamente com os melanócitos, as células imunológicas, as nervosas e as células-tronco epidérmicas confinadas à camada proliferativa basal (KAUR *et al.*, 2019, p. 2; WOODBY *et al.*, 2020, p. 236).

A epiderme é dividida em quatro camadas: a camada córnea (composta de corneócitos mortos), a camada granulosa, a camada espinhosa e a camada basal, onde contêm as células transitoriamente amplificadoras que podem sofrer diferenciação. O tipo de organização “tijolos e argamassa” dos queratinócitos na epiderme atua como uma barreira que separa o ambiente interno do externo, juntamente com a regulação hídrica (KAUR *et al.*, 2019, p. 2; WOODBY *et al.*, 2020, p. 236).

Durante o processo de queratinização os queratinócitos se retiram do ciclo celular e começam a expressar marcadores dependentes da diferenciação, ou seja, a queratina, que eventualmente acabam tornando-se corneócitos anucleados e densamente queratinizados. Essas células são mantidas juntas no estrato córneo de múltiplas camadas por uma matriz extracelular (MEC) carregada de lipídeos, que

desempenha a função de barreira da pele, sendo essa função a responsável de evitar a perda de água transepidermal e com isso, controlar o balanço hidroelétrico (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 18; WOODEBY *et al.*, 2020, p. 236).

A derme é composta por um tecido conjuntivo espesso e encontra-se entre a epiderme e o tecido subcutâneo e consiste em um estrato reticular e um papilar. O estrato papilar é a camada superior, rica em fibras finas de colágeno e a camada inferior, derme reticular, consiste em fibras de colágeno espessas. Incorporadas à derme estão estruturas como as terminações nervosas, as glândulas sebáceas, os folículos capilares e os vasos sanguíneos e linfáticos. Os fibroblastos são os principais tipos de células na derme e estão envolvidos na secreção de colágeno, elastina e glicosaminoglicanos. Outras células, como as células endoteliais, as nervosas e as dendríticas, também estão presentes na derme (KAUR *et al.*, 2019, p. 1; WOODEBY *et al.*, 2020, p. 236).

A derme é responsável por transmitir as propriedades sensoriais e mecânicas da pele. Entre a camada basal e a matriz extracelular encontra-se a junção dermoepidérmica, responsável pela difusão de nutrientes para epiderme e comunicação entre as células via sinalização parácrina para manter a homeostase. A matriz extracelular é especializada e é constituída por colágenos tipo I, III, IV e VII, lamininas e fibrilina (KAUR *et al.*, 2019, p. 2).

Um dos sistemas também presente na pele é o sistema imunológico e ele é responsável por criar um balanço permanente entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória. Na superfície da pele também há uma infinidade de bactérias que formam a microbiota cutânea e também tem o papel de proteção contra invasão de patógenos (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 18,19).

A pele possui um mecanismo poderoso para reparar sua integridade após traumas ou agressões por radiação ultravioleta ou outros agentes químicos, como os fármacos e os ativos cosméticos. Cabe também ao sistema imune a função de reparo dessa pele lesionada. Qualquer perturbação da microbiota da pele e/ou do mecanismo de reparo da pele leva a processos inflamatórios cutâneos, assim como ao desequilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios e a ocorrência de doenças dermatológicas inflamatórias e alérgicas. O conceito do sistema imunológico da pele pode ser visto como uma relação complexa entre as células imunes, as células epiteliais e o ambiente externo (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 18,19).

Dentre as células imunológicas presentes na pele temos as células mieloides residentes que incluem as células de Langerhans, as células dendríticas dérmicas, os macrófagos, os mastócitos e os eosinófilos. Os neutrófilos são raramente encontrados na pele saudável e, portanto, não são células residentes. No entanto, os neutrófilos povoam a pele em condições inflamatórias e após uma ferida (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 6).

As células mieloides residentes na pele contribuem para a homeostase da mesma secretando os fatores de crescimento necessários para a sobrevivência dos queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. Além disso, eles mantêm as ótimas funções do tecido por fagocitose, células apoptóticas e integridade dos vasos sanguíneos (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 6).

Em condições inflamatórias, as células mieloides respondem imediatamente e produzem mediadores pró-inflamatórios que conduzem a ativação de células na vizinhança local e a infiltração do local afetado por células imunes periféricas. Essas células na pele também servem como ligação entre o inato e o adaptativo imunológico (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 6).

As células de Langerhans são células dendríticas que apresentam antígenos e desempenham um papel na imunidade a longo prazo. Elas foram descobertas em 1970 por Ralph Steinman e Zanvil Cohn e estão envolvidas na geração de linfócitos CD8⁺ e na transformação de linfócitos CD4⁺ em vários subtipos celulares (Th1, Th2, Th17). As células dendríticas tem um papel protetor e supressor dos distúrbios da pele e são encontradas na epiderme. Estas células tem origem mieloide e apresentam características próximas dos monócitos. Ao nível da pele, as células dendríticas são inseridas entre os queratinócitos e criam junções estreitas entre eles (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 6).

Os macrófagos são encontrados na camada dérmica da pele e requerem IL-34 para a sobrevivência. Uma das fontes de macrófagos é derivada de embriões progenitores que semeiam a pele no pré-natal e se renovam de maneira semelhante às células de Langerhans. A segunda e principal fonte de macrófagos dérmicos são os monócitos circulantes que amadurecem quando chegam na pele. Essa população se renova a cada 10 dias quase inteiramente (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 8).

Os macrófagos removem células mortas e também são responsáveis pela regeneração homeostática do cabelo. Eles podem ser localizados nas vênulas pós-capilares da pele e secretam quimiocinas que dirigem o recrutamento de neutrófilos.

No entanto, a depleção de macrófagos não se traduz em uma redução de neutrófilos na pele em feridas, indicando que os macrófagos dérmicos são dispensáveis para a infiltração de neutrófilos (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 8).

Os mastócitos são células imunes da linhagem mieloide que se encontram abaixo dos epitélios de superfície e desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 7). São comumente encontrados na derme e entram na pele a partir da medula óssea como progenitores e amadurecem localmente em resposta a estímulos. Nos humanos os mastócitos são encontrados em todas as áreas da pele, mas são mais numerosos nos braços e nas pernas (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 9).

A densidade de mastócitos na derme papilar aumenta com a idade e são mais frequentemente localizadas na proximidade das fibras nervosas que tem sido associada à redução da quantidade de remodelação da matriz extracelular na pele observada nas fases posteriores da vida (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 9).

Os mastócitos contêm grânulos contendo mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, os proteoglicanos, a serotonina, a triptase e as quinases. São classicamente conhecidos por seu envolvimento em reações alérgicas, pois produzem e liberam grandes quantidades de histamina quando seus receptores $Fc\epsilon$ são reticulados via complexos de antígeno IgE (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 9).

Por fim, os eosinófilos são células residentes na pele, mas pouco se sabe sobre seu papel na homeostase do tecido. Os grânulos eosinofílicos são carregados com proteínas potentes e tóxicas, além de uma variedade de citocinas e quimiocinas pré-formadas e liberadas em resposta a estímulos apropriados (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 10).

O lançamento de seu conteúdo granular é mediado por um processo conhecido como degranulação fragmentada e esse processo denota a degranulação em pequenas porções, de modo a não comprometer a viabilidade da célula. Como os mastócitos, os eosinófilos também produzem todos os tipos de leucotrienos e prostaglandinas, sendo este essencial para a infiltração eosinofílica da pele em reações de hipersensibilidade, como na DA (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 10).

O papel dos eosinófilos nas dermatoses ou doenças da pele associadas à eosinofilia, como dermatite alérgica de contato e urticária são bem elucidadas. Nas dermatoses eosinofílicas, uma extensa degranulação eosinofílica na pele resulta em dano tecidual (NGUYEN; SOULIKA, 2019, p. 10).

3.2.1 Doenças Autoimunes Cutâneas

Os distúrbios autoimunes são um grupo de condições em que estruturas ou danos funcionais às células, aos tecidos, aos órgãos ou aos sistemas orgânicos são produzidos por uma correlação de células ou anticorpos imunologicamente competentes contra o componente normal do corpo (GANAPATHY *et al.*, 2017, p. 14). Isso ocorre como resultado da interação entre vários fatores genéticos, ambientais e endócrinos no sistema imunológico pelos possíveis mecanismos:

1. descarga no tecido de autoanticorpos específicos via iniciação de complementos que levam a citólise das células alvo;
2. ligação automática de anticorpos a mediadores solúveis resultantes na deposição de complexos imunes;
3. auto ataque mediado por anticorpos no sistema imune natural, resultando em fagocitose, citotoxicidade e anticorpos de imunidade celular mediada;
4. autoanticorpo contra antígenos estranhos e epítomos e auto antígeno que imitam o antígeno estranho resultando em dano celular; e
5. ação de autoanticorpos nas estruturas da superfície celular resultando na estimulação/obstrução da estrutura alvo (GANAPATHY *et al.*, 2017, p. 14).

Essas doenças são caracterizadas por uma recidiva crônica que podem ter um efeito devastador no bem-estar do paciente e na sua qualidade de vida (SATOLLI; ROVESTI; FELICIANI, 2019, p. 89).

As doenças autoimunes progridem do estágio de ativação para a lesão crônica através de um aumento no número de neo-antígenos direcionados por linfócitos e anticorpos. Isso ainda aciona todas as células adjacentes para exibir mais epítomos que propagam a lesão, resultando em mais danos nos tecidos (GANAPATHY *et al.*, 2017, p. 14).

Os distúrbios autoimunes na pele incluem as doenças bolhosas autoimunes, as doenças vasculares do colágeno, a alopecia areata e o vitiligo. Além disso, está crescendo evidências de que os distúrbios mais comuns, como a psoríase, a DA e o líquen plano também estão ligados aos processos autoimunes (SATOLLI; ROVESTI; FELICIANI, 2019, p. 89).

A patogênese mais apoiada atualmente por estudos é sobre a associação genômica ampla (GWAS), que sugere que o agrupamento de genes associado à função de barreira e à inflamação por Th2 funcionam como genes de suscetibilidade a essas doenças (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 233).

A psoríase é uma doença hiperproliferativa crônica da pele com sintomas típicos que incluem placas espessadas, vermelhas e com crostas que afeta aproximadamente 2% da população em geral. Essa doença possui um imenso impacto sobre a vida dos pacientes e as comorbidades comuns com a psoríase incluem a doença cardíaca coronariana, a depressão, a doença cerebrovascular e a síndrome metabólica, e, portanto, a triagem com essas comorbidades em pacientes com psoríase é essencial (SATOLLI; ROVESTI; FELICIANI, 2019, p. 96).

A qualidade de vida prejudicada afeta negativamente na psique dos pacientes e inicia um mecanismo que pode levar à depressão, a ansiedade, a disfunção social e a perda de confiança. A carga psicossocial da doença pode se tornar mais um fardo físico e, portanto, a qualidade de vida melhora se esses fatores psicológicos também são tratados adequadamente (SATOLLI; ROVESTI; FELICIANI, 2019, p. 96).

A psoríase é uma doença autoimune mediada por células T, caracterizada pela proliferação de queratinócitos e proteínas pró-inflamatórias que são reguladas positivamente na doença e agem como quimioatraentes para as células imunes. A hipótese mais aceita é de que as células T efetoras se acumulam nos linfonodos e, finalmente, migram para a pele através do sangue. Além disso, a pele psoriática mostra-se como outra fonte de células T inflamatórias. Em pacientes com a doença, várias citocinas pró-inflamatórias estão em concentração plasmática mais alta como, a IL-6, a IL-2, a IL-10, o IFN- γ , a IL-17, a IL-21, a IL-22, a IL-23 e a IL-9, enquanto baixas concentrações foram encontradas para a IL-4 e a IL-27 (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 21).

A DA é uma doença inflamatória crônica da pele afetando de 15 a 30% das crianças nos países industrializados e ela é caracterizada como uma doença inflamatória cutânea crônica do tipo Th2 associada a hiperreatividade a gatilhos ambientais. A DA tem um fenótipo característico, com lesões cutâneas tipicamente distribuídas, que muitas vezes tornam seu diagnóstico simples e nítido (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 21).

Outro nome para DA é eczema e além da inflamação, vermelhidão, coceira e secura da pele, também é possível observar uma hiperplasia epidérmica, infiltrados

de células T e células dendríticas, além do aumento da produção de mediadores inflamatórios com aumento dos níveis séricos de IgE (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 9).

S. aureus é encontrado em mais de 90% dos pacientes com essa lesão e as lesões exsudativas agudas da pele podem conter mais de 10 milhões desses microrganismos por centímetro quadrado e esse aumento no número já foi encontrado mesmo na pele integra e no vestíbulo nasal ou áreas intertriginosas (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 21).

Coçar é um fator muito importante levando a uma perturbação da função barreira da pele e com isso expondo as moléculas da MEC conhecidas por atuar como adesinas para o *S. aureus* como a fibronectina, o colágeno, o fibrinogênio, a elastina e a laminina. Além disso, a ligação bacteriana parece ser maior nos locais da pele com a inflamação mediada por Th2 e o respectivo meio de citocinas, devido à indução de uma produção aprimorada dessas adesinas e a regulação negativa de peptídeos antimicrobianos necessários para controlar a proliferação da bactéria (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 21).

Outra doença autoimune cutânea é o vitiligo, um distúrbio desfigurante que também influencia negativamente na autoestima e na qualidade de vida dos pacientes. A característica desta doença é que os melanócitos epidérmicos são direcionados e destruídos de várias maneiras e a consequência é o aparecimento de despigmentação irregular na pele. Numerosos estudos mostraram que os melanócitos de pacientes com vitiligo têm defeitos intrínsecos que reduzem sua capacidade de gerenciar estresses celulares (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 21).

Os fatores patogênicos do vitiligo incluem infiltrados de linfócito T CD8+ e Th 1 na pele lesionada, com o aumento da expressão de IFN- γ , fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator de crescimento transformador β (TGF- β) diminuído e autoanticorpos circulantes contra a tirosina hidroxilase. Além disso, vários estudos encontraram alta prevalência de estresse psicológico antecedente em pacientes com vitiligo, sugerindo que estresses específicos podem desencadear ou exacerbar a doença (MARANDUCA *et al.*, 2020, p. 21).

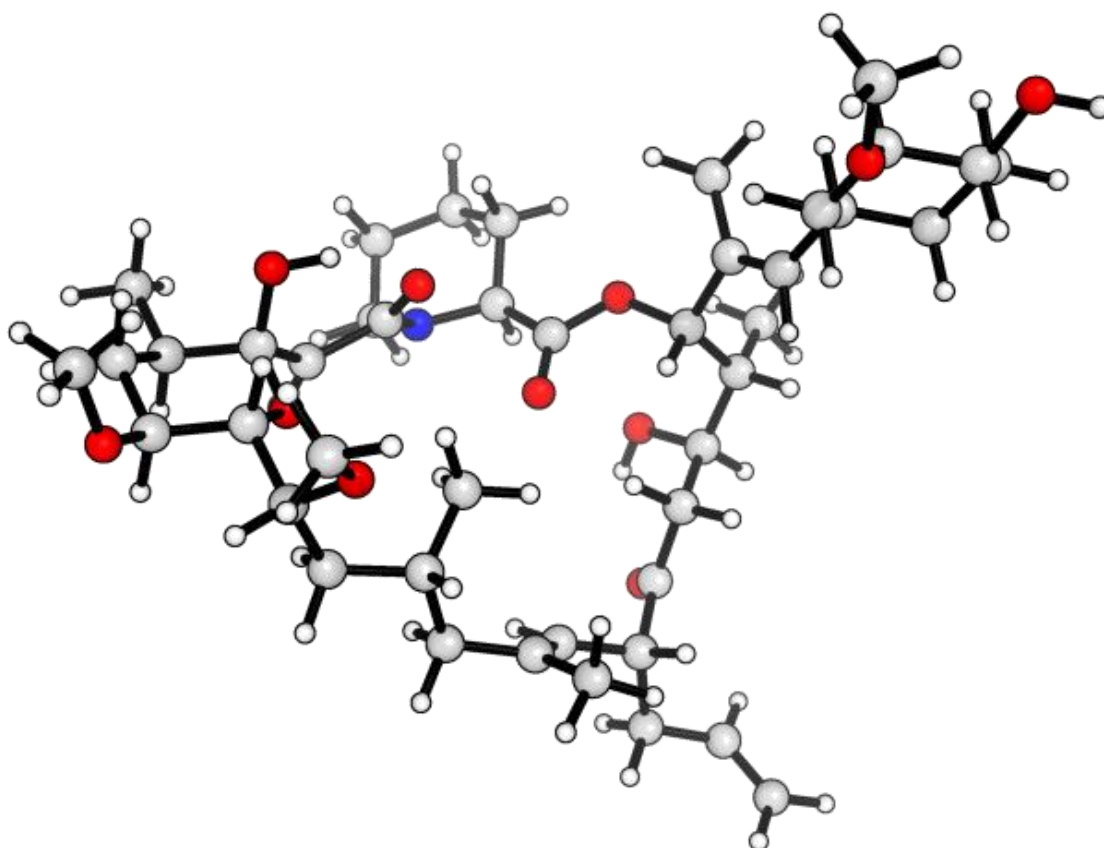
Dentre os tratamentos farmacológicos tópicos para essas doenças destacam-se várias modalidades como os corticosteróides, a fototerapia, os análogos da vitamina D, o ácido salicílico, os retinóides e os imunossupressores, dentre eles, os inibidores de calcineurina, como o tacrolimus (CARR, 2013, p. 303; KANDIKATTU;

VENKATESHAIAH; MISHRA, 2019, p. 12; LEE *et al.*, 2010, p. 1057; MASON *et al.*, 2013, p. 800).

3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO TACROLIMUS

O tacrolimus (TAC), também conhecido como FK506, cuja fórmula molecular é $C_{44}H_{69}NO_{12}$ e a estrutura química tridimensional está representada na Figura 4, é uma lactona macrolídea hidrofóbica descoberta em 1983 por Fujisawa em seu laboratório de pesquisa com produtos naturais, principalmente de origem microbiana. É pertencente a classe dos inibidores de calcineurina, sendo produzido pela fermentação da bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, isolado de uma cepa encontrada no solo coletado perto do Monte Tsukuba (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; MOREIRA; SILVA; CREMASCO, 2020, p. 1; NAKAHARA *et al.*, 2017; p. 233; NISHIYAMA; IZUMI; OKUHARA, 1995, p. 65; SHOUGHY, 2017, p. 1; SHOUGHY; ALJASSAR; TABBARA, 2020, p. 1).

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



Fonte: O autor

Esse fármaco foi um dos primeiros imunossuppressores macrolídeos descobertos e com potentes efeitos imunossuppressores *in vitro*. O TAC, assim como a ciclosporina, inibe a calcineurina, levando a supressão da ativação das células T, porém o TAC possui um efeito imunossupressor 10 a 100 vezes mais potente que a ciclosporina, com diminuição da vasoconstrição e efeito fibrinogênico (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; MOREIRA; SILVA; CREMASCO, 2020, p. 1).

O TAC atua inibindo a ativação de ambos os fenótipos do linfócito T helper (Th1 e Th2) e o seu uso sistêmico é amplamente utilizado para profilaxia de rejeição após transplante de órgãos sólidos e seu uso tópico é principalmente para doenças autoimunes cutâneas (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 233; SHOUGHY, 2017, p. 1; SHOUGHY; ALJASSAR; TABBARA, 2020, p. 1).

A produção de Th1 leva a liberação de IFN- γ e IL-2, enquanto que a produção de Th2 produz as citocinas IL-4 e IL-5 que são eficientemente inibidas pelo TAC. O fármaco também suprime a liberação de histamina dos mastócitos. Uma resposta alérgica mediada por citocinas do Th2 pode estar envolvida com o início e a progressão de doenças autoimunes cutâneas, e o coçar das feridas devido ao prurido severo levam a uma lesão que destrói a função de barreira da pele, resultando em um ciclo vicioso que agrava ainda mais os sintomas (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 233).

Sobre as suas propriedades físico-químicas foi possível encontrar a alta massa molecular de 822 Da, pKa 1 = 2,94; pKa 2 = 9,95; pKa 3 = 14,07, log *P* de 3,96 $\pm$ 0,83 e ponto de fusão na faixa entre 126-129 °C. Ele é um fármaco insolúvel em água (4-12 μ g/mL), levemente solúvel em hidrocarbonetos saturados e altamente solúvel em lipídios e solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona e propilenoglicol. Apresenta-se isoladamente na forma de cristais brancos e como forma farmacêutica é possível encontrar como cápsula, injetável e pomada para aplicação tópica (CAMARGO *et al.*, 2020, p. 1,2; MOREIRA; SILVA; CREMASCO, 2020, p. 1; PUBCHEM, 2022).

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 (AusPAR, 2010, p. 5; CÉSAR; AZEVEDO; MOTA, 2017, p. 20).

Sobre a sua farmacocinética, o fármaco é absorvido no intestino delgado e o tempo de meia-vida é em média de 5 a 7 horas, com seu pico de concentração máxima no sangue e plasma atingindo em aproximadamente de 1 a 8 horas. Por ser altamente

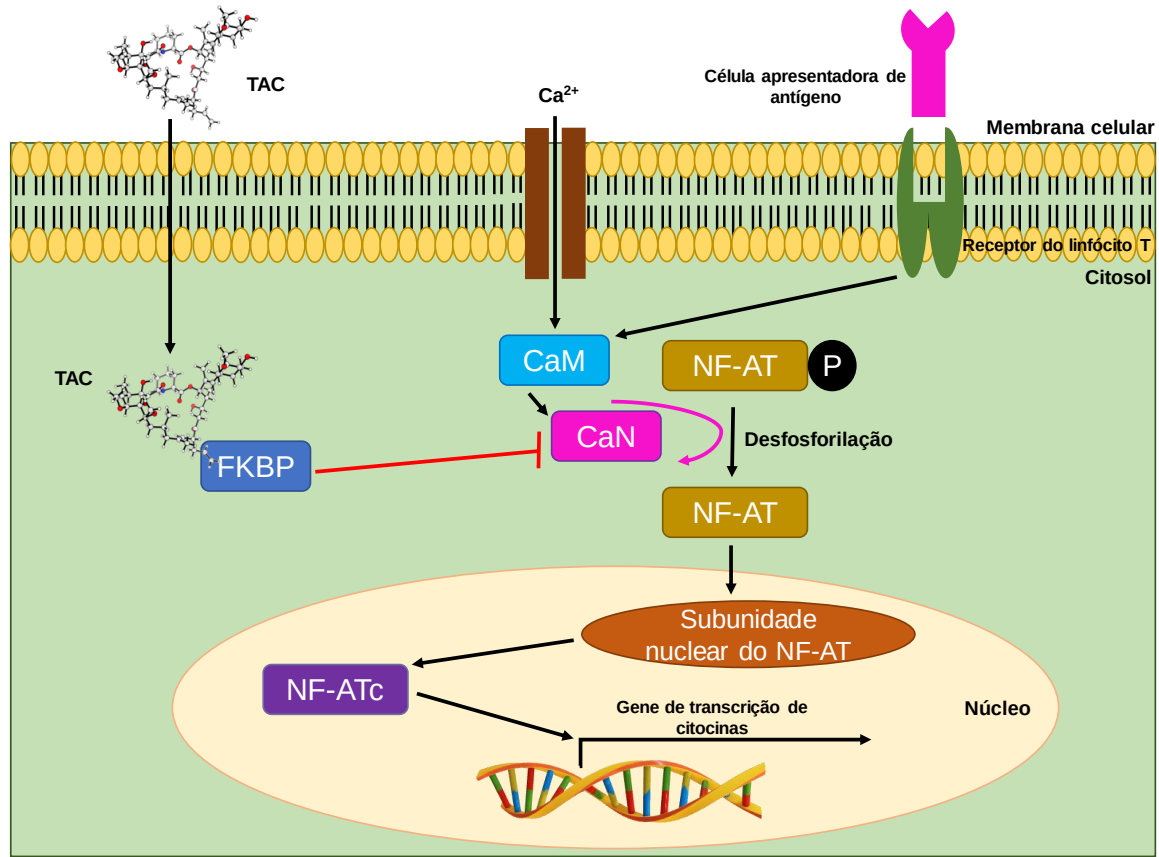
lipofílico a sua distribuição ocorre por todos os tecidos. No sangue a maior parte do fármaco é absorvido pelos eritrócitos e no plasma o TAC se liga a albumina e a α -1 glicoproteína ácida (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 6; MOREIRA, 2008, p. 10).

É extensamente metabolizado no fígado, pelas enzimas do citocromo P450 CYP3A, ocorrendo primeiramente reação de desmetilação e hidroxilação, seguida de oxidação. Menos de 1% de sua composição original é excretada inalterada pela urina e bile. O TAC tópico é minimamente absorvido em pacientes com pele normal, mas uma absorção clinicamente significativa foi relatada quando usado em pacientes com doenças cutâneas (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 6; MOREIRA, 2008, p. 10).

A respeito da farmacodinâmica, os antígenos se ligam a receptores das células T aumentando o influxo de cálcio. Esse cálcio intracelular aumentado se liga à calmodulina (CaM) e ativa a calcineurina (CaN) que desfosforila o fator nuclear de células T ativadas (NF-AT). A forma desfosforilada do NF-AT citoplasmático transloca-se do citosol para o núcleo e forma um complexo com a subunidade nuclear do NF-AT (NF-ATc), podendo ligar-se à região promotora de vários genes de citocinas e induzir a transcrição gênica (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 8; MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; SHOUGHY, 2017, p. 1; SISTI; SISTI; ORANGES, 2016, p. 187).

Com isso, ao penetrar pela membrana celular, o TAC liga-se ao seu receptor intracelular formando um complexo com a proteína de ligação FK (FKBP) e bloqueia a função do cálcio e da fosfatase dependente de calmodulina, a calcineurina (CaN). Essa interação resulta na supressão da transcrição do gene da citocina dependente de NF-AT e imunossupressão. Assim, o TAC inibe a transcrição de citocinas e suprime a proliferação de células T. O fármaco também causa a diminuição da transcrição e liberação de outros derivados de citocinas dessas células, incluindo a IL-3, a IL-4, a IL-8, o TNF- α , o INF- γ e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Além disso, também foi relatado que a exocitose de células T citotóxicas é inibida pelo TAC (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 8; MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154; SHOUGHY, 2017, p. 1; SISTI; SISTI; ORANGES, 2016, p. 187). A Figura 5 esquematiza o mecanismo de ação do TAC na célula.

FIGURA 5 – Bloqueio da transdução de sinal mediada pelo receptor de linfócitos T por TAC



Fonte: O autor

Notas: TAC – tacrolimus/FKBP – proteína de ligação FK/CaM – calmodulina/CaN – calcineurina/NF-AT – fator nuclear de células T ativadas/NF-ATc – complexo com a subunidade nuclear do NF-AT

O TAC foi aprovado pelo FDA e pela ANVISA e é encontrado como pomada em sua forma farmacêutica para uso dermatológico, nas concentrações de 0,03%, para crianças de 2 a 16 anos, a 0,1% para os demais pacientes (YU *et al.*, 2018, p. 129). Devido a um mecanismo de ação mais seletivo que não altera a síntese de colágeno, os inibidores de calcineurina tópicos podem ser utilizados como agentes poupadores de corticosteróides (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 154).

No geral, as preparações tópicas de TAC foram bem toleradas por pacientes com doenças autoimunes da pele, porém foi relatado efeitos adversos significativos, como prurido, queimação e sensação de calor no local da aplicação no início do tratamento (MALECIC; YOUNG, 2016, p. 158).

Essa irritação local provavelmente ocorra por conta da ativação dos nociceptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV-1) distribuídos pelos terminais dos neurônios sensoriais, que é um mecanismo de ação conhecido do medicamento. A atenuação da irritação da pele ao longo do tempo tem uma base

fisiológica porque as aplicações repetidas demonstraram dessensibilizar a ativação neuronal sensorial subsequente e, eventualmente, anular a resposta irritante (OHTSUKI; MORIMOTO; NAKAGAWA, 2018, p. 938).

Mas ao contrário dos corticosteróides, o TAC não está associado a atrofia da pele, estrias ou talangectasia e, portanto, pode ser mais apropriado para o uso em áreas cutâneas mais suscetíveis a esses efeitos. Contudo, mesmo essa sendo uma vantagem do uso do TAC, os efeitos adversos acabam afetando na adesão dos pacientes ao tratamento, levando os mesmos a uma suspensão da terapia (CAMARGO *et al.*, 2020, p. 2; MALECIC; YOUNG, 2016, p. 158).

A alta massa molecular, a alta hidrofobicidade e a baixa solubilidade em água do TAC podem limitar sua capacidade de permear eficazmente pela pele. Assim, torna-se importante formular um sistema percutâneo de liberação do fármaco que aumente a sua permeação em relação a sua pomada convencional e, conseqüentemente, reduza a dose e os efeitos adversos no tratamento das doenças (CAMARGO *et al.*, 2020, p. 2; YU *et al.*, 2018, p. 130).

Estudos recentes com nanotecnologia e utilizando pele humana demonstraram que com o uso dessa técnica ocorre maior deposição do fármaco na camada dérmica e essa penetração mais profunda acarreta no aumento da sua ação terapêutica e reduz os efeitos adversos (DHEER *et al.*, 2018, p. 223). 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 (YU *et al.*, 2018, p. 130).

Com relação as doenças autoimunes da pele, o TAC é amplamente utilizado principalmente para tratamento da psoríase, vitiligo e DA. Para a DA, o TAC provou ser notavelmente eficaz no tratamento dos distúrbios cutâneos imunomediados. A eficácia da pomada a 0,1% é equivalente à de um corticosteróide da classe mais forte com base em ensaios clínicos e randomizados e foi o tratamento preferencial a longo prazo para impedir a ruptura da barreira cutânea (YU *et al.*, 2018, p. 130).

Além do mecanismo de ação já citado, o TAC também pode se ligar aos receptores dos esteroides na superfície celular, inibir a liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos e inativar as células de Langerhans (YU *et al.*, 2018, p. 130).

O TAC tem se mostrado uma terapia eficaz e uma alternativa para corticosteróides em crianças e adultos. Na DA foi demonstrado que o TAC suprime a ativação de células Th1/Th2, a degranulação de mastócitos, a liberação de neurotransmissor sensorial primário, a dessensibilização do receptor TRPV-1, a supressão da produção de IL-31 e IL-33, a supressão do comprometimento do equilíbrio TLR2/TLR1 e a produção de periostina que reduz a coceira, o comportamento de coçar e a preservação da redução do cristal líquido lamelar (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 9).

No vitiligo o TAC apresentou além do efeito imunomodulador, inibidor da IL-2 e IFN- γ , o efeito de reduzir o estresse antioxidante sistêmico que promove o controle da doença e repigmentação em pacientes com vitiligo. Em alguns estudos o fármaco teve melhores taxas de repigmentação em comparação com o placebo, especialmente na face, com o pigmento aparecendo dentro dos primeiros quatros meses de tratamento. Os inibidores de calcineurina são geralmente seguros para essa doença, podendo ser utilizados em áreas sensíveis como o rosto, o pescoço e as áreas intertriginosas e em crianças por longos períodos quando usadas de forma intermitente (VOJVODIC *et al.*, 2020, p. 14).

Sobre a psoríase, a inflamação está relacionada a uma resposta imune exacerbada, onde o medicamento imunossupressor é uma estratégia terapêutica válida e o TAC também se provou útil para o tratamento dessa doença. Nesse caso o fármaco inibe a produção em massa de linfocinas envolvidas na produção de IL-2 e, portanto, acarreta na imunossupressão, impedindo a ativação de linfócitos T, já que essas células ativadas são necessárias para o desenvolvimento e persistência das lesões da psoríase (WAN *et al.*, 2017, p. 1486).

Porém alguns estudos demonstraram que a aplicação tópica da pomada de TAC era apenas eficaz sob oclusão ou em algumas regiões específicas do corpo em que a pele era mais fina e mais permeável, como a face e as áreas intertriginosas. A fraca eficácia para terapia foi atribuída à sua alta hidrofobicidade e alto peso molecular, que impedem que o fármaco permeie a pele. Com isso, faz-se novamente necessário o desenvolvimento de um sistema de liberação percutâneo para melhorar a eficácia do medicamento (WAN *et al.*, 2017, p. 1486).

Na literatura foi possível verificar a existência de vários sistemas de liberação para o TAC e uso tópico, como Savic *et al.* (2017), que desenvolveram, caracterizaram e avaliaram a permeação cutânea *in vitro* e *in vivo* de microemulsões à base de lecitina

carregadas com TAC; Yu *et al.* (2018), criaram nanopartículas de quitosana contendo TAC combinada com nicotinamida para aumentar a administração percutânea e a eficácia do tratamento para DA; Gabriel *et al.* (2016), verificaram a melhoria da entrega tópica do TAC por meio de uma formulação de hidrogel para o tratamento de psoríase; Zhuo; Abourehab e Hussain (2018), analisaram a eficácia do direcionamento dérmico e de anti-dermatite de nanopartículas carregadas de TAC e ácido hialurônico.

3.3.1 Efeito Imunomodulador do Tacrolimus na Pele

3.3.1.1 A supressão da ativação do nervo sensorial por tacrolimus

Os nervos sensoriais da pele são distribuídos na junção dermoepidérmica e no compartimento dérmico. No caso de peles lesionadas, as fibras nervosas sensoriais se estendem amplamente na epiderme e acredita-se que sejam altamente suscetíveis a estimulação (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

Alguns estudos apontaram a possibilidade de que o TAC pode atuar diretamente nesses nervos e inibir a sua ativação. Exames imuno-histológicos dos níveis da expressão da substância P, fator de crescimento do nervo e neurotrofina-3 na lesão de peles com DA pré e pós aplicação de TAC tópico foram realizados e verificaram que a expressão de peptídeos derivados dos nervos sensoriais diminuiu significativamente após o tratamento (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

A administração tópica do TAC causa dessensibilização da liberação da substância P das células nervosas sensoriais inibindo o influxo de cálcio nessas células através da fosforilação do receptor TRPV-1. Sugere-se que a irritação da pele causada pela aplicação de TAC tópico pode ser atribuída a ação direta do TAC nos nervos sensoriais, uma vez que uma quantidade notável de influxo de cálcio nas células nervosas foi observada logo após a aplicação do fármaco. Portanto, conclui-se que o efeito colateral sensorial do TAC e seu efeito antipruriginoso são devidos aos seus efeitos diretos nas terminações nervosas cutâneas (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

3.3.1.2 A supressão de IL-31 por tacrolimus

Muitos estudos mostraram que a IL-31 derivado de células Th2 atua como mediadores do prurido em doenças autoimunes cutâneas, já que níveis elevados da citocina no soro de pacientes doentes estão significativamente correlacionados com a gravidade e os sintomas clínicos. Os receptores de IL-31 foram relatados como colocalizados com o TRPV-1 e o receptor de potencial transitório A1 (TRPA1) em células nervosas sensoriais (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

Foi relatado também que o TAC inibiu lesões na pele em pacientes doentes por meio de regulação negativa de IL-31 em níveis cutâneos. Além disso, os níveis cutâneos de IL-31 foram forte e significativamente correlacionados com o número de fibras nervosas. Estudos sugeriram que o TAC pode aliviar a coceira não apenas por dessensibilização do nervo sensorial, mas também diminuindo os níveis de IL-31 (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

3.3.1.3 A resposta imune inata e adaptativa e o tacrolimus

A imunidade inata é mediada por eosinófilos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos, células NK e NKT, ao passo que, o sistema complemento, a proteína C reativa, os peptídeos antimicrobianos e a lectina ligadora de manose (MBL) medeiam a imunidade inata humoral. Enquanto que as células T são responsáveis pela imunidade celular adaptativa, as células B desempenham papel na imunidade adaptativa humoral e os anticorpos possuem função imunológica em resposta a alérgenos para controlar reações imunológicas (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 6,7).

Acredita-se que a inflamação alérgica seja induzida pela produção de anticorpos IgE e pela infiltração local de células inflamatórias ativadas, como os eosinófilos e as células Th2, que geram um meio rico em citocinas e ainda aceleram a resposta imune adquirida. Contudo, as alergias do tipo inata são atribuídas principalmente pela produção de IL-18, IL-25 e IL-33 ou linfopoietina estromal tímica (TSLP), que não requerem a produção de anticorpos IgE (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 7; NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

As células linfoides inatas (ILC) são categorizadas em três subconjuntos: as ILC1, as ILC2 e as ILC3 e elas desempenham um papel crítico na resposta alérgica

do tipo inata. Entre elas, as células ILC2 são particularmente importantes, pois induzem a graves inflamações alérgicas pela liberação de grandes quantidades de IL-5 e IL-13 em resposta a IL-25, IL-33 e TSLP, onde já foi relatado que essas substâncias estão envolvidas na patogênese de doenças autoimunes cutâneas, como DA (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

Um dos estimulantes da resposta alérgica inata na pele é a própria microbiota da superfície e o *S. aureus*. A enterotoxina estafilocócica tipo B (SEB) é um superantígeno potente que induz a proliferação das células T e produção de IL-33, bem como IL-31. O TAC inibe a proliferação de células T induzida por SEB de maneira dose-dependente, o que leva a uma supressão da colonização por *S. aureus* em pessoas com doenças autoimunes cutâneas tratadas com TAC tópico (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 234).

Além disso, receptores *toll-like* (TLRs) encontrados na pele funcionam como sensores para substâncias microbianas e o polimorfismo do TLR tipo 2 está associado a forma grave da DA. Foi relatado que nesse caso a expressão de TLR1 está aumentada enquanto que a expressão do TLR2 está diminuída, com isso, o TAC tópico normaliza esse desequilíbrio de TLR1/TLR2 por regulação negativa da expressão do receptor tipo 1 e regulação positiva do receptor tipo 2 que eventualmente aumenta o efeito antibacteriano na pele (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 235).

3.3.1.4 A supressão da cronicidade por tacrolimus

Nas doenças autoimunes cutâneas, o coçar repetidamente transforma as lesões eritematosas agudas em liquenificados crônicos intratáveis. Essas lesões liquenificadas e espessadas são decorrentes de acantose epidérmica e fibrose dérmica. O TAC é capaz de diminuir significativamente a proliferação de fibroblastos e sua produção de colágeno tipo I, ambos estimulados pelo TGF- β 1 (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 235).

Alguns autores avaliaram e quantificaram o perfil de infiltração de células inflamatórias na pele lesada antes e após o tratamento com TAC tópico e perceberam que o número de linfócitos CD3+, CD4+ ou CD8+, eosinófilos e neutrófilos diminuiu significativamente na aplicação do TAC em comparação a outros fármacos. Além disso, perceberam que houve a redução significativa do número de células

inflamatórias que expressam IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α e IL-12 e esses resultados coincidem com o fato de que o TAC inibe não apenas IFN- γ , IL-4 e a produção de IL-17 por células T CD4⁺ de memória humana, mas também a diferenciação de células T *naive* em células de memória Th1, Th2 e Th17 (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 235).

3.3.1.5 A supressão da ativação de mastócitos, células dendríticas, basófilos e eosinófilos por tacrolimus

Estudos anteriores relataram que o TAC suprime a liberação de histamina pelos mastócitos estimulados com anticorpos anti-IgE. A indução do ligante de quimiocinas C-C (CCL) 1, CCL3, CCL4 e CCL18 de mastócitos ativados por anti-IgE também é significativamente inibida por TAC e aumentada por dexametasona. Além disso, a combinação com esteroides pode ser mais eficaz do que separados para o tratamento dessas doenças em que as quimiocinas derivadas de mastócitos desempenham um papel importante. Os mastócitos também desempenham um papel fundamental na promoção de inflamações alérgicas em resposta a toxina δ produzida por *S. aureus*. No entanto, ainda não se sabe se o TAC inibe a ativação de mastócitos induzidos pela bactéria (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 7; NAKAHARA, 2017, p. 235).

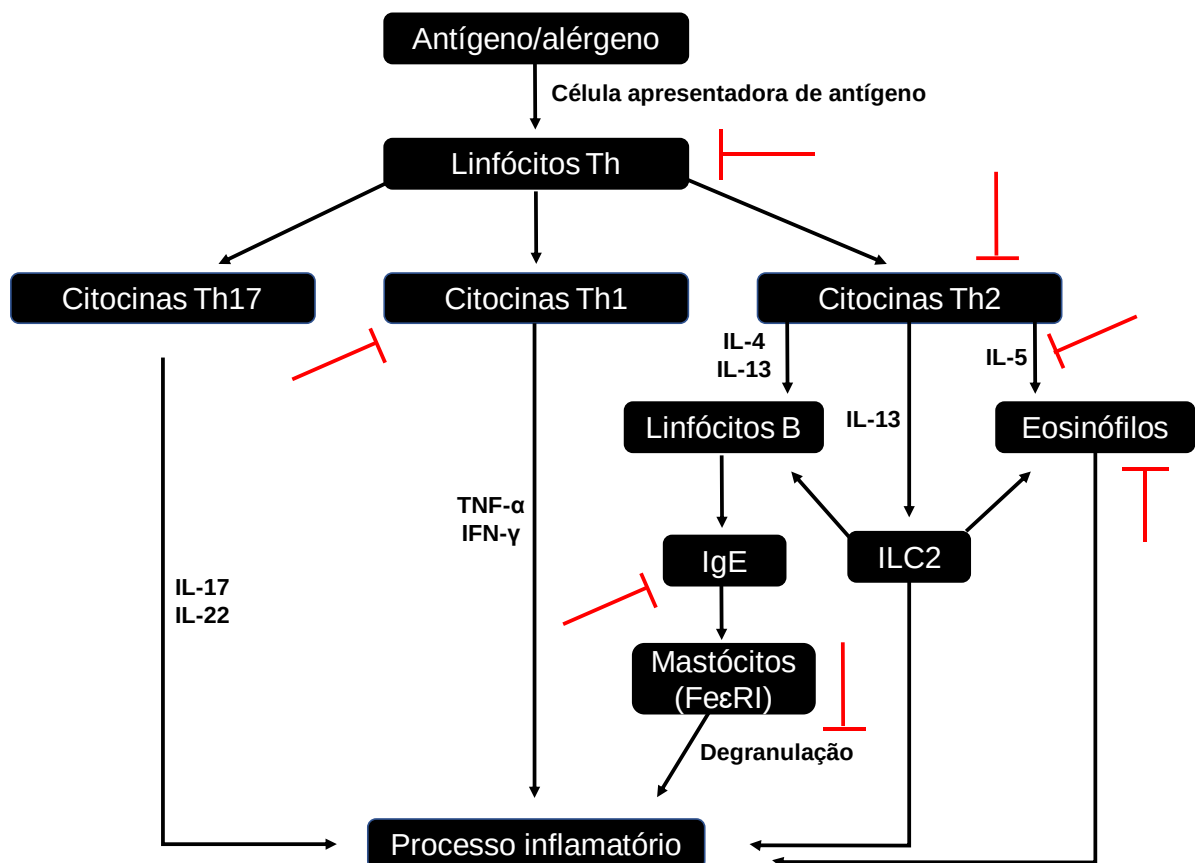
O TAC também inibe a produção de citocinas após a ativação de células T e diminui a expressão do receptor de IgE de alta afinidade (Fc ϵ RI) em células dendríticas da pele com doenças autoimunes. Além do mais, o TAC inibe a liberação de histamina dependente de IgE de mastócitos e basófilos (KANDIKATTU; MISHRA, 2018, p. 7).

3.3.1.6 Efeitos do tacrolimus na função de barreira cutânea

Em doenças cutâneas a disfunção da barreira cutânea é causada por uma etiologia complexa, incluindo mutações do gene ou inibição da expressão da filagrina por citocinas liberadas por Th2 e lesões mecânicas por arranhões, sendo necessária, portanto, a aplicação tópica de emolientes para o tratamento dessas doenças. O TAC melhora significativamente a disfunção da barreira cutânea como a perda de água transepidermal e os valores de hidratação da pele, além de aumentar de forma significativa as lamelas lipídicas intercelulares (NAKAHARA *et al.*, 2017, p. 235,236).

A Figura 6 resume alguns pontos dos mecanismos de ação do TAC em doenças autoimunes cutâneas.

FIGURA 6 – Resumo dos mecanismos de ação do TAC em doenças autoimunes cutâneas



Fonte: O autor

3.4 TÉCNICAS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Sabe-se que um conjunto complexo de estruturas e mecanismos se combinam para criar a barreira da pele, e a compreensão de como esses mecanismos funcionam pode permitir que produtos sejam projetados para superá-la. Estudiosos já observaram que cosméticos e medicamentos podem ser multifuncionais, proporcionando benefícios não apenas na superfície da pele, mas em camadas mais profundas (MACHADO *et al.*, 2017, p. 743).

A epiderme como a camada mais externa da pele tem como principal função a de proteção e manter a função barreira, como já mencionado anteriormente, e essa função acaba sendo afetado por vários fatores como a idade, a etnia e o gênero. Além disso, os distúrbios da pele acarretam em perturbações no manto ácido resultando em um pH mais elevado da superfície – acima da faixa entre 4,0 e 6,0 – que pode contribuir para a ocorrência das doenças tópicas (MACHADO *et al.*, 2017, p. 744).

Como o estrato córneo é a linha de frente com o meio externo, ele acaba sendo alvo de vários ativos cutâneos, mas não o único. Anexos cutâneos, como os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas e sebáceas também são alvos terapêuticos, sendo as glândulas objetos interessantes por justamente atingirem a derme profunda e a superfície da pele (MACHADO *et al.*, 2017, p. 744).

Para melhorar essa permeação cutânea toda a formulação deve ser muito bem planejada, pensando nos veículos, na forma farmacêutica, nos surfactantes, nos agentes promotores de permeação e outros fatores. Mas ultimamente algo que tem sido de grande interesse para melhorar a permeação são os nanomateriais por conta do seu tamanho, formato e propriedades físico-químicas, e para isso, como já dito, existem inúmeros dispositivos de liberação modificada capazes de superar a barreira cutânea e alcançar os sítios alvos (MACHADO *et al.*, 2017, p. 744).

A extensão da penetração na pele de uma substância pode depender da via de absorção e existem três caminhos que podem estar envolvidos na permeação transdérmica de compostos: 1) os anexos cutâneos; 2) os lipídeos intercelulares no estrato córneo e 3) os corneócitos. O número de substâncias que podem atravessar o estrato córneo sob condições passivas é muito limitado, e, portanto, facilitadores de permeação são empregados para promover a penetração ativa (MACHADO *et al.*, 2017, p. 745,746).

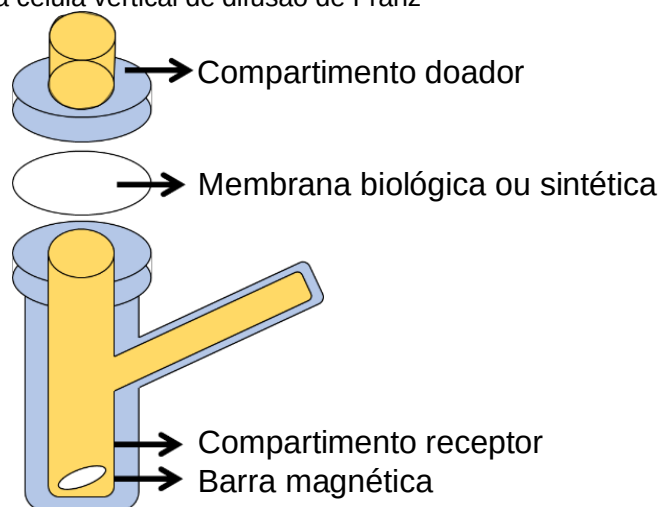
Estes permeadores podem ser produtos químicos ou substâncias que tem a capacidade de alterar as propriedades da pele. Os mecanismos para tais mudanças incluem: 1) interrupção da estrutura da bicamada lipídica; 2) extração dos lipídeos do estrato córneo; 3) aumentar a solubilidade ativa e particionamento no estrato córneo; 4) alteração da hidratação do estrato córneo e 5) interação com a queratina dos corneócitos (MACHADO *et al.*, 2017, p. 745,746).

A avaliação da permeação percutânea de moléculas é uma das etapas mais importantes na avaliação da segurança e/ou eficácia de cosméticos e medicamentos tópicos. A permeação percutânea é geralmente avaliada *in sílico*, *in vitro*, *ex vivo* e/ou *in vivo* em modelos animais e humanos. Dentre os métodos *in vitro/ex vivo* (dependendo da membrana utilizada) podemos destacar o método clássico de difusão por células de Franz e a técnica física de espectroscopia fotoacústica (MACHADO *et al.*, 2017, p. 746; NADAL *et al.*, 2019, p. 3).

3.4.1 Difusão por Células de Franz

A célula vertical de difusão de Franz é um dos sistemas mais amplamente utilizados para estudos de permeação cutânea *in vitro/ex vivo*. Essa célula possui um compartimento superior doador e um compartimento inferior receptor, onde os compartimentos são separados por uma membrana permeável e a amostra é aplicada na superfície da membrana no compartimento doador. O material passa através da membrana para o compartimento receptor, que contém um meio que é agitado continuamente. Em tempos pré-determinados as amostras são coletadas do receptor em uma abertura lateral e analisado em método analítico adequado (GARCIA *et al.*, 2018, p. 1; MACHADO *et al.*, 2017, p. 746). A Figura 7 esquematiza a célula vertical de difusão de Franz.

FIGURA 7 – Estrutura simplificada da célula vertical de difusão de Franz



Fonte: O autor

Além disso, a droga restante na membrana pode ser extraída e medida no final do período experimental. Considerações do método incluem a escolha da célula de difusão e a membrana, a escolha do fluido receptor, os tempos de amostragem e o protocolo de aplicação de medicamentos. Os parâmetros experimentais como as condições de agitação, se a membrana é artificial ou biológica, a temperatura, a frequência de amostragem e outros, influenciarão na avaliação da permeação e contribuirão para a variabilidade (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2).

No projeto original a célula de Franz era estática e tinha uma única porta de amostragem sem interrupções. Anos depois, várias modificações foram subsequentemente feitas ao *design* original, onde a parte central da câmara receptora pode ser fechada em uma camisa de água para controle de temperatura e um segundo braço lateral foi adicionado para permitir a operação de fluxo contínuo. O compartimento doador pode ser selado e a célula pode ser fabricada em uma variedade de diâmetros de área de superfície ativa (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2; MACHADO *et al.*, 2017, p. 746).

Em ambas as células – estática ou fluxo contínuo – o meio do compartimento receptor é mantido a um nível adequado de temperatura para fornecer uma temperatura superficial da membrana de 32 ± 2 °C, imitando as condições da pele conforme exigido pela Farmacopéia Americana (USP). Além disso, o fluido receptor deve ser escolhido para garantir a solubilidade do ativo, mas não sendo um fator limitante na difusão (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2).

No caso de ativos polares, o líquido receptor é geralmente um agente fisiológico, já para compostos de solubilidade limitada, modificadores de fluidos como etanol (até 70%), éter oleílico de polietileno (20) (6%), ciclodextrina (0,1%) ou albumina bovina sérica pode ser utilizada e é de crítica importância que o fluido receptor não modifique as propriedades de barreira da membrana, pois isso invalidaria os resultados (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2; SHESHALA *et al.*, 2019, p. 163).

Esses modelos *in vitro/ex vivo* usam membranas biológicas, reconstruídas ou artificiais e são úteis como procedimentos para determinação de parâmetros de permeação da pele, como o fluxo, os coeficientes de partição e os coeficientes de difusão (MACHADO *et al.*, 2017, p. 747). Como exemplo, podemos citar a pele proveniente da orelha de suínos, do dorso de ratos ou a pele humana após cirurgias plásticas, como abdominoplastia. Entre as sintéticas temos a membrana artificial líquida utilizada no ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela à pele (PAMPA) e a Strat-M® (NEUPANE *et al.*, 2020, p. 11-13).

Ao usar a pele como membrana, deve-se ter em mente que além de medir o fármaco que penetra no receptor ao longo tempo também deve-se medir a droga remanescente na membrana. A pele deve ser retirada da célula de difusão, cuidadosamente limpa e o estrato córneo removido por um procedimento de *tap stripping*, onde uma fita é colada na superfície da pele e retirada até vinte vezes, seguida da extração da droga. O restante das camadas da epiderme e derme (se presente) também são submetidos a um processo de extração do ativo. As amostras são quantificadas por método analítico adequado que fornecerá especificidade e sensibilidade (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2).

Com esta técnica, é possível estimar não apenas a quantidade de droga permeada, mas também a quantidade de droga retida na pele, contribuindo para o *design* do sistema de administração tópica/transdérmica de medicamentos. A concentração de fármaco no estrato córneo e epiderme/derme são indicações de administração tópica, enquanto que a concentração na solução receptora é uma indicação de entrega transdérmica (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2).

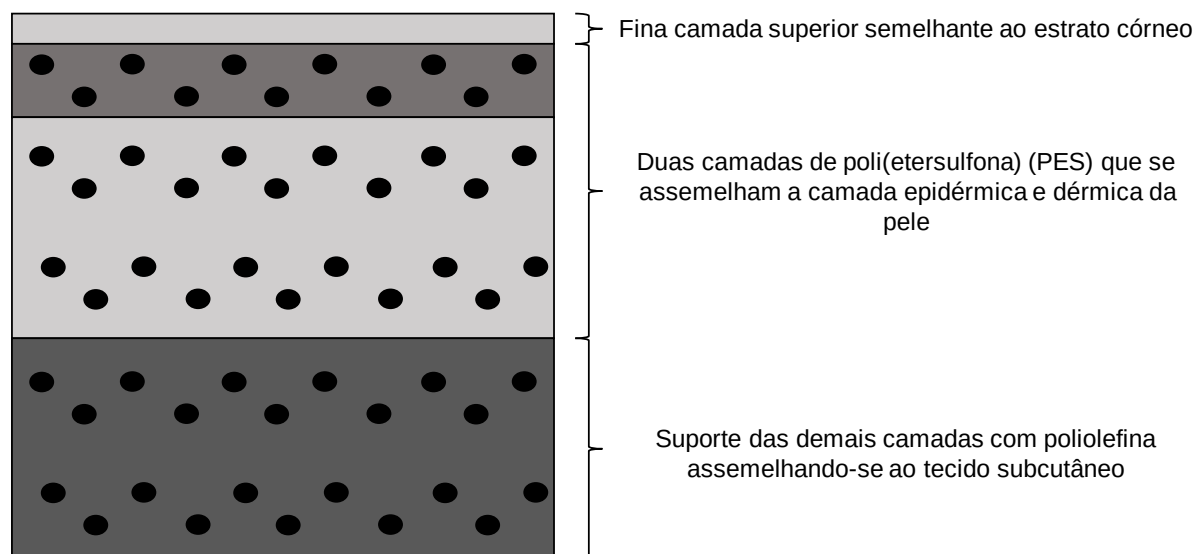
Dependendo das propriedades físico-químicas do composto, é provável que aconteça da maior quantidade recuperada na pele ao final do experimento penetre em tecidos mais profundos e/ou seja absorvido pela circulação cutânea ao longo do tempo. Com uma exceção para compostos muito lipofílicos que podem ser retidos no

estrato córneo, com particionamento muito baixo para as camadas epidérmicas mais aquosas (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2).

As membranas sintéticas para estudos de permeação *in vitro* foram originalmente desenvolvidas para serem usadas como uma alternativa ao uso de modelos de pele humana já que a determinação da permeação de fármacos usando métodos *ex vivo* possui várias desvantagens que dificultam os dados de reprodutibilidade da triagem de candidatos a medicamentos/cosméticos, incluindo: as variações da espessura da pele de doadores, os estados de pele doentes, as condições de armazenamento, a complexidade da preparação da membrana, a densidade dos folículos, a idade do doador e os altos custos laboratoriais, enquanto que as membranas sintéticas não possuem esses problemas e sim algumas vantagens, como: a espessura controlada da membrana, o menor tempo de preparação da membrana, o baixo espaço de armazenamento e custo relativamente baixo (HAQ *et al.*, 2018a, p. 432).

Dentre as inúmeras membranas sintéticas para utilizar em testes *in vitro* de permeação cutânea temos a Strat-M® e ela foi projetada com a intenção de compartilhar características estruturais e químicas encontradas na epiderme humana, como as camadas e os lipídeos. A espessura de cada membrana Strat-M® é de aproximadamente 300 micrômetros (μm), compreendendo uma camada superior suportada por duas camadas de poli(étersulfona) porosa (PES) sobre uma única camada suporte de tecido de poliolefina, como representado na Figura 8 (HAQ *et al.*, 2018a, p. 433; HAQ *et al.*, 2018b, p. 59).

FIGURA 8 – Estrutura simplificada das multicamadas da membrana Strat-M®



Fonte: O autor

As camadas da membrana são cada vez mais porosas e abertas e também cada vez maiores na espessura para imitar as diferentes camadas da pele humana (epiderme, derme e tecido subcutâneo). A membrana porosa foi desenvolvida com uma mistura própria de lipídios sintéticos já que a pele possui vários lipídios como, os fosfolipídios e as ceramidas, que conferem o caráter hidrofóbico da pele. Esta membrana sintética contém uma combinação de lipídios (as ceramidas, o colesterol, os ácidos graxos livres, e outros componentes) em uma proporção específica do estrato córneo humano (HAQ *et al.*, 2018a, p. 433).

A Strat-M® tem o objetivo de ser uma membrana econômica para testes e para a otimização de formulações farmacêuticas com boa reprodutibilidade afim de aumentar a confiança durante a fase inicial do medicamento/formulação em desenvolvimento (HAQ *et al.*, 2018a, p. 433).

Haq *et al.* (2018a, p. 433), demonstrou que a Strat-M® tem potencial para ser usada como uma triagem precoce para selecionar o melhor desempenho para formulações transdérmicas contendo nicotina. As membranas compartilharam um comportamento semelhante de permeabilidade ao medicamento quando comparado a um modelo de pele humana *ex vivo*. Com isso, concluíram que as membranas sintéticas podem ser usadas como uma ferramenta de triagem para escolher as formulações de melhor desempenho e avaliar os sistemas transdérmicos em comparação com a pele de cadáver humano.

3.4.2 Espectroscopia Fotoacústica

A técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS) foi descoberta por Tyndall, Röntgen e Alexander Graham Bell em 1881, enquanto Graham Bell trabalhava com Charles Summer Tainter no fotofone. Bell descobriu que o selênio e outros materiais sólidos emitiam som quando iluminados por uma luz modulada, que foi conseguida passando-a através de um disco rotativo com orifícios. Bell, usando o espectrofotômetro, descobriu que a intensidade do som emitido dependia do comprimento de onda ou da cor da luz incidente e que, portanto, o efeito devia ser atribuído a um processo de absorção óptica (HERNÁNDEZ-AGUILAR *et al.*, 2019, p. 2).

Cinquenta anos após sua descoberta, o efeito da PAS foi usado em estudos de gases. Desde então, tornou-se uma técnica bem estabelecida para análise de gases, utilizada nas áreas do meio ambiente e alimentícia. No entanto, o efeito da PAS nos sólidos foi aparentemente ignorado por 90 anos até 1973, quando Rosencwaig começou seu estudo. Provavelmente esse atraso foi devido à falta de detectores de som sensíveis e a uma luz de alta potência (HERNÁNDEZ-AGUILAR *et al.*, 2019, p. 2).

Segundo Astrath (2011, p. 19), o efeito fotoacústico consiste na geração de uma onda acústica que pode ser observada quando a luz modulada é absorvida pela amostra em uma célula fechada contendo gás, que pode ser o próprio ar. A incidência da luz e sua consequente absorção resultam em excitação dos níveis de energia da amostra e como consequência ocorrerá um relaxamento, que se não for radiativo, induzirá a geração de calor no material.

Ao usar essa energia modulada, este aquecimento torna-se periódico, gerando uma onda de pressão no gás em contato com a amostra. Um microfone acoplado na câmara fotoacústica detecta esta variação da pressão, produzindo o sinal fotoacústico e sua intensidade depende da frequência de modulação da luz incidente. Portanto, o sinal fotoacústico é o resultado da interação da radiação com a matéria e sua natureza é definida pelas propriedades ópticas e térmicas das amostras. A obtenção de espectros de absorção ópticas gerados a partir do sinal caracteriza a PAS (ASTRATH, 2011, p. 19).

Embora ainda não seja um método de rotina na indústria farmacêutica, a PAS já demonstrou ser uma técnica valiosa para avaliar a penetração e distribuição de

substâncias por toda a pele *in vitro* e *in vivo* e tem sido amplamente utilizada como alternativa para determinar a permeação percutânea de substâncias aplicadas topicamente (ROCHA *et al.*, 2007, p. 133; SEHN *et al.*, 2009, p. 116; TRUITE *et al.*, 2007, p. 1529).

Além disso, a PAS é um método que permite a realização de experimentos que determinam o perfil de penetração do medicamento ao longo da espessura da pele em profundidades de até 200 μm (NADAL *et al.*, 2019, p. 3).

O primeiro relato do uso da PAS no estudo de pele foi a avaliação da penetração de dimetilsulfóxido (DMSO) em pele de porco *ex vivo* (TRUITE *et al.*, 2007, p. 1530). Outro trabalho também aplicou esse método em um grupo de voluntários para avaliar *in vivo* as taxas de penetração dos filtros solares através da pele e agentes antifúngicos através da unha. Os resultados mostraram a capacidade da técnica de quantificar a taxa de penetração das substâncias, permitindo obter informações sobre a eficiência dos promotores de penetração utilizados também em formulações (ROCHA *et al.*, 2009, p. 133). O uso dessa técnica na pesquisa com pele também foi expandido para aplicações terapêuticas, evidenciando a importância deste método para esta área (SEHN *et al.*, 2009, p. 116; TRUITE *et al.*, 2007, p. 1530).

Nadal *et al.* (2019), avaliaram por meio da PAS e utilizando a membrana sintética Strat-M® que a microencapsulação de adapaleno diminuiu a difusão transmembrana *in vitro* do fármaco concluindo que a formulação poderia ser utilizada em outros produtos inovadores para o tratamento de peles acneicas. Por fim, destacaram a característica particular da espectroscopia fotoacústica em estimar a permeação de ativos através de membranas sintéticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Câmera CCD (Horiba Scientific, modelo Synapse, Palaiseau, França);
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a detector de fotodiodos (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quito, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro micro-Raman confocal (modelo LabRam HR800, Horiba-Jobin Yvon, Palaiseau, França);
- Espectroscópio fotoacústico – Lâmpada de xenônio de 1000 W (66926 da Newport Corporation/Oriel);
- Espectroscópio fotoacústico – Chopper (SR540 Stanford Research System);
- Espectroscópio fotoacústico – Amplificador *lock-in* de duas fases (SR830 da Stanford Research System);
- Espectroscópio fotoacústico – Monocromador (74100 da Newport Corporation/Oriel);
- Espectroscópio fotoacústico – Microfone (4953 da Brüel & Kjaer);
- Espectroscópio fotoacústico – Pré-amplificador (2669-L da B&K) e canal de condicionamento (2690-A-0S1 da B&K);
- Evaporador rotatório (FISATOM, modelo 801, Diadema, Brasil);
- Liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil);
- Microscópio óptico (Olympus AX70, Waltham, Massachusetts, EUA);
- Paquímetro digital (Stainless Hardened, Mtx);
- pHmetro digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Refratômetro (BRIX ACUCAR, modelo RM-T90 ATC, Ribeirão Preto, Brasil);
- Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, EUA);

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

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

4.2.2 Polímero

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

4.2.3 Água Purificada

- Água purificada pelo processo de destilação (H₂O 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 ((CH₃)₂CO) (Synth, Diadema, Brasil);
- Ácido Fórmico (CH₂O₂) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Metanol (CH₃OH) grau HPLC (Hexis Científica, Phillipsburg, Estados Unidos);
- Metanol (CH₃OH) (Synth, Diadema, Brasil);
- Monooleato de sorbitano etoxilado 20 (polissorbato 80, Tween® 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span® 80, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Propilenoglicol (C₃H₈O₂) (Synth S/A, Diadema, Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

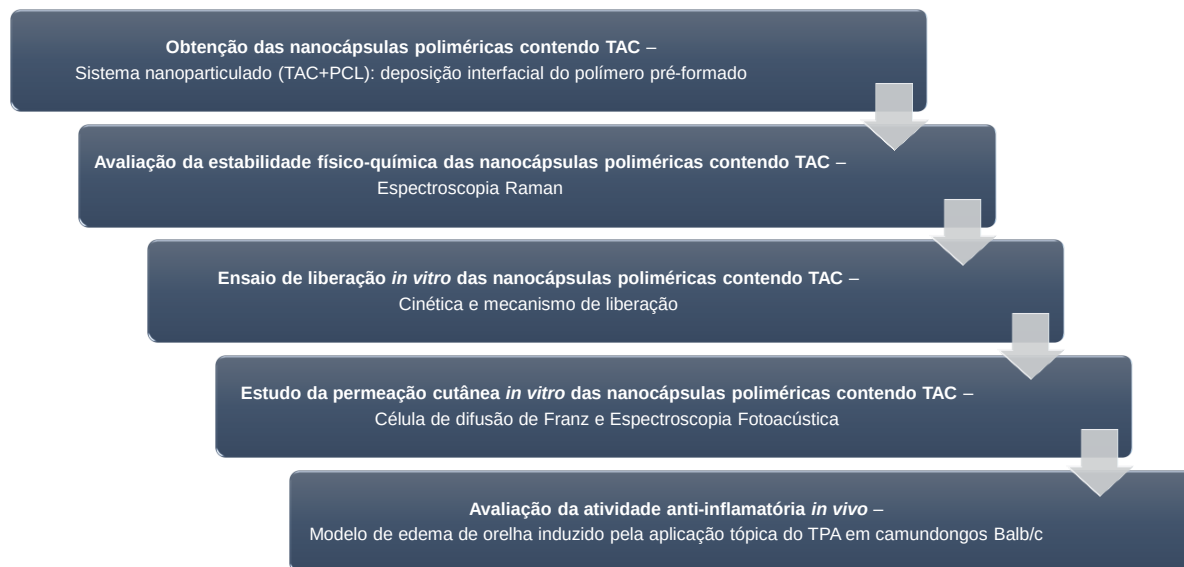
4.2.5 Materiais

- Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,20 μm de abertura dos poros (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha);
- Membrana de diálise de celulose de peso molecular *cut-off* (MWCO) 12-14 kDa; poros de 2,4 nm, D9652 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Membrana sintética Strat-M® de 25 mm (Millipore, Merck, Billerica, Massachusetts, USA).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente trabalho teve início com a obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo TAC. Consequente, houve a realização dos experimentos de estabilidade físico-química durante 120 dias utilizando a técnica de espectroscopia Raman. Após isso, realizou-se o ensaio de liberação *in vitro* das nanocápsulas de PCL, resultando na cinética e no mecanismo de liberação do fármaco. Posteriormente, verificou-se a permeação cutânea *in vitro* das nanocápsulas e do TAC livre utilizando as técnicas de difusão por célula estática de Franz e espectroscopia fotoacústica. Por fim, a formulação foi estudada quanto a atividade anti-inflamatória *in vivo* por meio do modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA na orelha de camundongos machos Balb/c. As etapas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 9.

FIGURA 9 – Fluxograma das etapas da pesquisa



Fonte: O autor

4.4 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir do polímero PCL contendo TAC foram preparadas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por Fessi *et al.* (1989) p. 82, cuja formulação encontra-se na Tabela 1.

TABELA 1 – Formulações das nanocápsulas poliméricas contendo TAC, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado

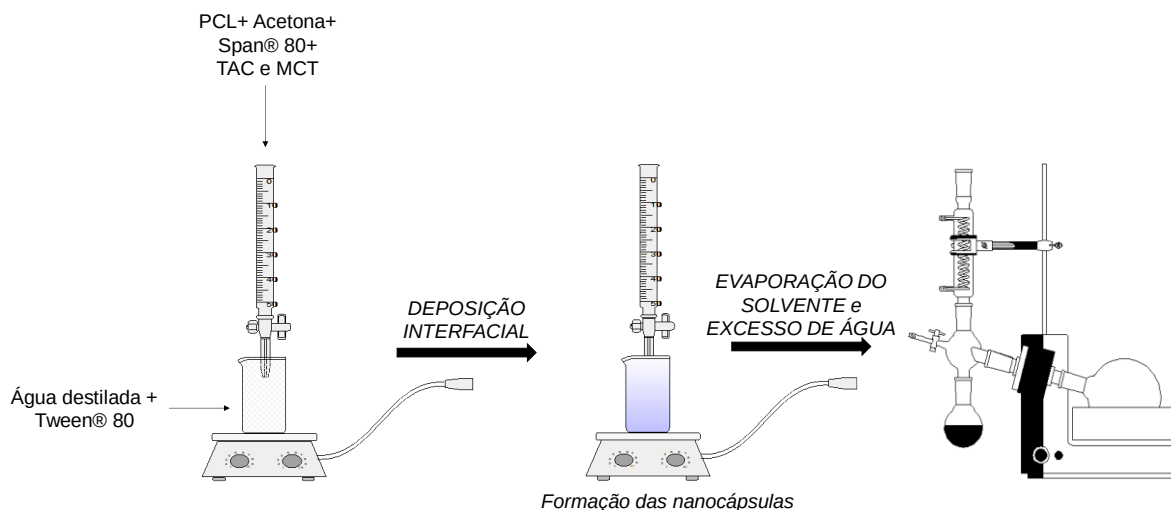
Composição	Formulação			
	NC-N	NC-1	NC-2	NC-3
	(0 mg/mL)	(0,1 mg/mL)	(1 mg/mL)	(5 mg/mL)
Fase aquosa				
Tween 80® (g)	0,077	0,077	0,077	0,077
Água ultrapura (mL)	53	53	53	53
Fase orgânica				
TAC (g)	–	0,001	0,01	0,05
PCL (g)	0,1	0,1	0,1	0,1
Span 80® (g)	0,077	0,077	0,077	0,077
MCT* (g)	0,3	0,3	0,3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

Fonte: O autor

*MCT: Triglicerídeos de cadeia média

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 (Figura 10), atingindo um volume final de 10 mL e concentração de TAC de 0,1, 1 e 5 mg/mL (NC-1, NC-2 e NC-3, respectivamente). Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NC-N), como controle negativo.

FIGURA 10 – Esquema do método de obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo TAC preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado



Fonte: O autor

As nanocápsulas poliméricas foram devidamente caracterizadas e avaliadas quanto à eficiência de encapsulação em estudo prévio, o qual obtiveram resultados satisfatórios (CAMARGO, 2020).

4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e protegidas da luz em frascos de vidro âmbar. As mesmas foram monitoradas durante 120 dias de armazenamento, analisando os resultados mensalmente em espectrômetro Raman.

Os espectros Raman foram registrados usando um espectrômetro micro-Raman confocal (modelo LabRam HR800, Horiba-Jobin Yon, Palaiseau, França) equipado com um laser de diodo a 785 nm. Utilizou-se uma lente objetiva de 50x (NA = 0,8) e um orifício confocal ajustável. A dispersão Raman foi detectada usando uma câmera CCD (Horiba Scientific, modelo Synapse, Palaiseau, França).

O desempenho instrumental foi calibrado com linha fonônica de silício a 520 cm^{-1} . Cada amostra foi medida com 15 segundos de aquisição e 30 varreduras. Todos os resultados foram obtidos a partir de uma alíquota da nanossuspensão colocada em uma lâmina de quartzo com a amostra sendo seca em temperatura ambiente.

Três faixas de espectros Raman foram escolhidas para uma análise detalhada a fim de avaliar as diferenças no grau de cristalinidade. O tratamento matemático usado para identificar as variações no espectro, que poderia estar relacionado com a fase amorfa/cristalina, foi uma deconvolução gaussiana. O centro de cada banda foi baseado segundo o encontrado na literatura para lactonas macrolídeas e PCL. A largura e a área foram ajustadas usando um procedimento de minimização por função de ajuste de pico do *software* Origin Pro (versão 2020).

Os resultados obtidos pela espectroscopia Raman foram comparados com estudos anteriormente realizados (CAMARGO, 2020, p. 91-96), onde verificou-se a estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas contendo TAC avaliando o pH, o tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta também por 120 dias e armazenadas a temperatura ambiente e protegidas da luz.

4.6 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS

Os estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos utilizando células verticais estáticas de difusão de Franz (BAO *et al.*, 2017, p. 6; SANTOS-SILVA *et al.*, 2019, p. 11), com um compartimento receptor de 12 mL, com área disponível para a difusão de 1,77 cm² – FIGURA 11, e para a realização dos experimentos foram utilizadas membranas de diálise de celulose (peso molecular *cut-off* (MWCO) 12-14 kDa; poros de 2,4 nm, D9652, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as quais foram previamente hidratadas no meio receptor de etanol 70% por 24 horas (SHESHALA *et al.*, 2019, p. 163).

FIGURA 11 – Células verticais estáticas de difusão de Franz utilizadas para os experimentos



Fonte: O autor

Posteriormente, essas membranas foram colocadas entre os compartimentos doador e receptor das células verticais. No compartimento doador, 1 mL da solução contendo cada amostra a ser testada (TAC em propilenoglicol ou NC-2) foi colocada em uma concentração equivalente a 0,1% (m/v) de TAC. A suspensão de nanocápsulas (formulação NC-2) foi utilizada imediatamente após sua preparação e não exigiu qualquer procedimento de ressuspensão.

O meio receptor foi totalmente preenchido com etanol 70% (12 mL) para garantir a condição *sink*. O sistema foi mantido sob agitação constante a 32 ± 2 °C e ocluído para evitar a evaporação das amostras.

Foram retiradas alíquotas de 2 mL da fase receptora em tempos previamente determinados e para manter o volume constante, a cada coleta foi repostado ao sistema o mesmo volume retirado da solução receptora (BAO *et al.*, 2017; SANTOS-SILVA *et al.*, 2019). O estudo foi conduzido em sextuplicada.

As amostras obtidas nas alíquotas foram analisadas por UHPLC-PDA, frente à método analítico anteriormente desenvolvido e validado (CAMARGO *et al.*, 2021). A massa de fármaco acumulada no compartimento receptor em cada tempo foi calculada levando em consideração o volume total da célula, a quantidade total de fármaco retirada nas coletas e a área efetiva para liberação na célula.

4.6.1 Avaliação dos Perfis de Liberação

Para determinar a cinética de liberação das nanocápsulas, os resultados *in vitro* foram ajustados aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixson-Crowell. O ajuste dos dados experimentais ao modelo foi realizado por linearização e o R^2 ajustado foi usado como critério de seleção do modelo.

4.7 ESTUDO DA PERMEAÇÃO *IN VITRO* POR DIFUSÃO EM CÉLULA ESTÁTICA DE FRANZ

Para a realização da avaliação da permeação *in vitro* foram utilizadas membranas sintéticas Strat-M® de 25 mm (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) devido à sua alta similaridade com a pele humana. Com isso, estas membranas permitiram que a avaliação da permeação cutânea fosse realizada sem a necessidade da utilização de material biológico. A membrana não necessitou de tratamento prévio e foram utilizadas com o lado brilhante voltado para o compartimento doador, como indicado pelo fabricante.

O estudo de permeação cutânea foi executado da mesma maneira que o ensaio de liberação *in vitro* anteriormente mencionado e utilizando os mesmos tempos de retirada das alíquotas.

4.8 ESTUDO DA PERMEAÇÃO *IN VITRO* POR ESPECTROSCOPIA DE FOTOACÚSTICA

Para a realização dos testes de PAS, no sentido de elucidar a permeação cutânea frente a membrana Strat-M®, foram utilizados como amostras o TAC puro, o PCL puro, a mistura física (MF) (TAC:PCL 1:1) e as suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N, NC-2 e NC-3).

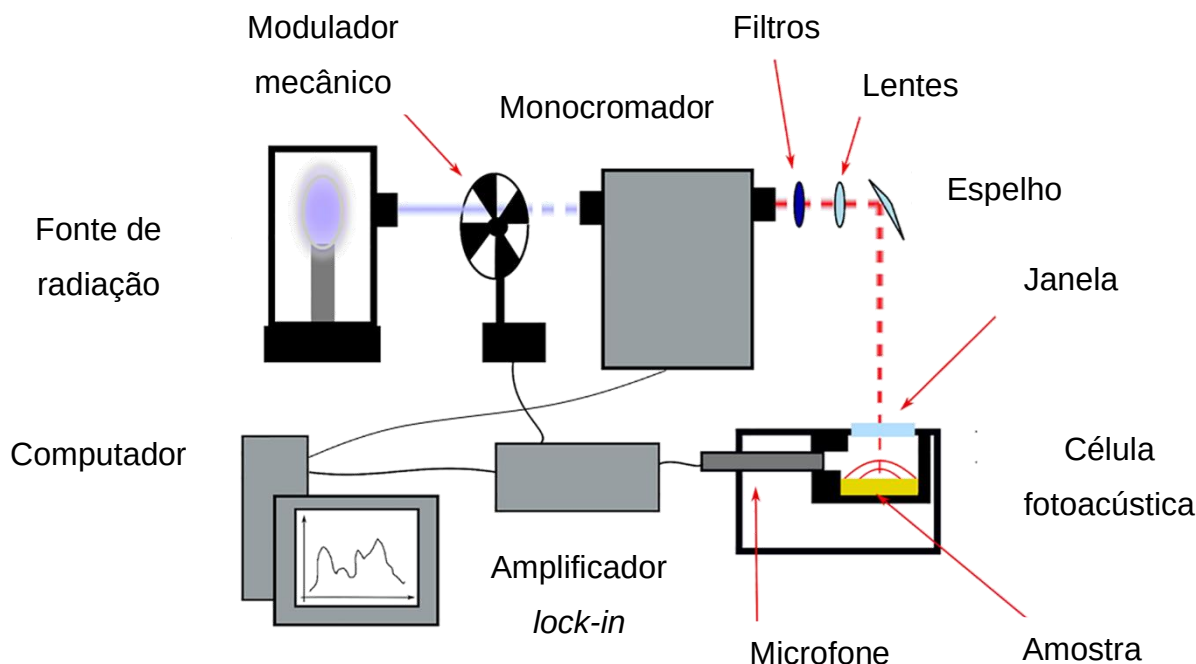
4.8.1 Espectroscopia Fotoacústica

As medidas fotoacústicas foram realizadas em função do tempo referente a absorção do TAC frente a membrana (Strat M®), que neste caso também foi responsável por mimetizar as características da pele em suas duas camadas mais superficiais (epiderme e derme) e o tecido subcutâneo mais profundo.

Realizou-se testes de permeação em dois tempos diferentes para cada amostra, em 15 minutos e em 3 horas após a passagem pela membrana e delimitou-se quatro frequências diferentes de análise (5, 23, 51 e 203 Hz) (NADAL *et al.*, 2019, p. 6,7). As membranas foram testadas invertidas (com o lado brilhante da Strat-M® para baixo) com iluminação da parte interna e com o intuito de evitar qualquer interferência das amostras durante a leitura.

Na técnica, conforme apresentado na Figura 12, foi utilizado uma lâmpada de Xenônio (Xe) com potência de 1000 W (66926 da Newport Corporation/Oriel) e abrangendo comprimentos de onda específicos entre o ultravioleta (UV) e o infravermelho (IF) do espectro eletromagnético. A luz proveniente desta lâmpada foi modulada por um *chopper* (SR540 Stanford Research System), com modulação da frequência de 4 Hz até 3,4 kHz, conforme as dimensões da pá giradora utilizada na modulação.

FIGURA 12 – Montagem experimental da técnica de fotoacústica utilizada no laboratório multiusuário de propriedades termo-ópticas (LAPTO) – UTFPR



Fonte: Adaptado de NADAL, J. M. *et al.* Adapalene-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles: Physicochemical characterization and in vitro penetration by photoacoustic spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1-20, 2019.

A lâmpada de Xe emite de modo contínuo o sinal de luz, com diferentes intensidades de comprimentos de onda e, portanto, fez-se necessário a normalização de todos os espectros fotoacústicos pelo espectro de emissão da mesma. Com isso, todos os espectros obtidos foram normalizados pelo espectro de um carvão puro, pois este material absorve toda radiação incidente na faixa de comprimentos de onda de interesse.

O sinal proveniente do modulador foi fornecido para um canal de amplificação (amplificador *lock-in*, SR830 da Stanford Research System), e a luz modulada foi então difratada em um comprimento de onda selecionado por um monocromador (74100 da Newport Corporation/Oriel) que possui grades para visualização de comprimentos de onda na grandeza do UV/Vis, infravermelho próximo (IVP) e infravermelho médio (IVM).

A luz modulada percorreu um caminho através de uma fenda estreita (tamanho de 3 mm) sendo então direcionada por um espelho côncavo revestido com alumínio (distância focal efetiva 5 cm) e colimada por duas lentes biconvexas de quartzo (distância focal efetiva 10 e 15 cm) até a amostra dentro da célula fotoacústica.

A célula fotoacústica possui um microfone (4953 da Brüel & Kjaer) que foi capaz de gerar 50 mV/Pa com pré-amplificador (2669-L da B&K) e canal de

condicionamento (2690-A-0S1 da B&K). O microfone também estava conectado ao canal de referência do amplificador *lock-in* detectando assim, a intensidade e a fase do sinal fotoacústico. A célula fotoacústica projetada em alumínio possuía uma janela óptica para a entrada de luz e o microfone foi acoplado em seu interior.

Os dados obtidos referente ao sinal da amostra foram conduzidos a análise por meio de software específico que utiliza o algoritmo Levenberg Marquardt. Todo o experimento foi realizado no laboratório multiusuário de propriedades termo-ópticas (LAPTO) do Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais (C²MMA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) de Ponta Grossa.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

4.9.1 Cuidados Éticos

Este protocolo experimental foi previamente submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG), sob o número de registro 0069285/2019.

4.9.2 Animais

Foram utilizados 50 camundongos albinos machos da espécie *Mus musculos* (Balb/c) (25-35 g) de aproximadamente 90 dias. Os animais foram mantidos no Núcleo Avançado de Estudos da Vida da Universidade Estadual de Ponta Grossa (NAEVI-UEPG), em temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h controlado automaticamente e com livre acesso à água e ração.

Os animais foram conduzidos ao laboratório de experimentação pelo menos uma hora antes do início dos experimentos e os testes foram desenvolvidos com 5 grupos experimentais, divididos conforme o Quadro 1, sendo que de acordo com o planejamento estatístico, foi definida a necessidade da utilização de 10 animais por grupo.

QUADRO 1 – Esquema de tratamento dos grupos

Grupo	Tratamento
G1 (n=10)	Animais que não receberam tratamento (Grupo Basal)
G2 (n=10)	Animais tratados apenas com o indutor inflamatório (TPA) (Grupo Controle Inflamatório - GCI)
G3 (n=10)	Animais tratados com TPA e as nanocápsulas de PCL sem fármaco (0,44 mL/animal ^{1,3}) (Grupo NC-N)
G4 (n=10)	Animais tratados com TPA e o tacrolimus na concentração de 0,1% (m/v) (0,4 mL/animal ¹) (Grupo TAC)
G5 (n=10)	Animais tratados com TPA e as nanocápsulas de PCL contendo tacrolimus na concentração de 1 mg/mL (0,44 mL/animal ^{1,2,3}) (Grupo NC-2)

Fonte: O autor

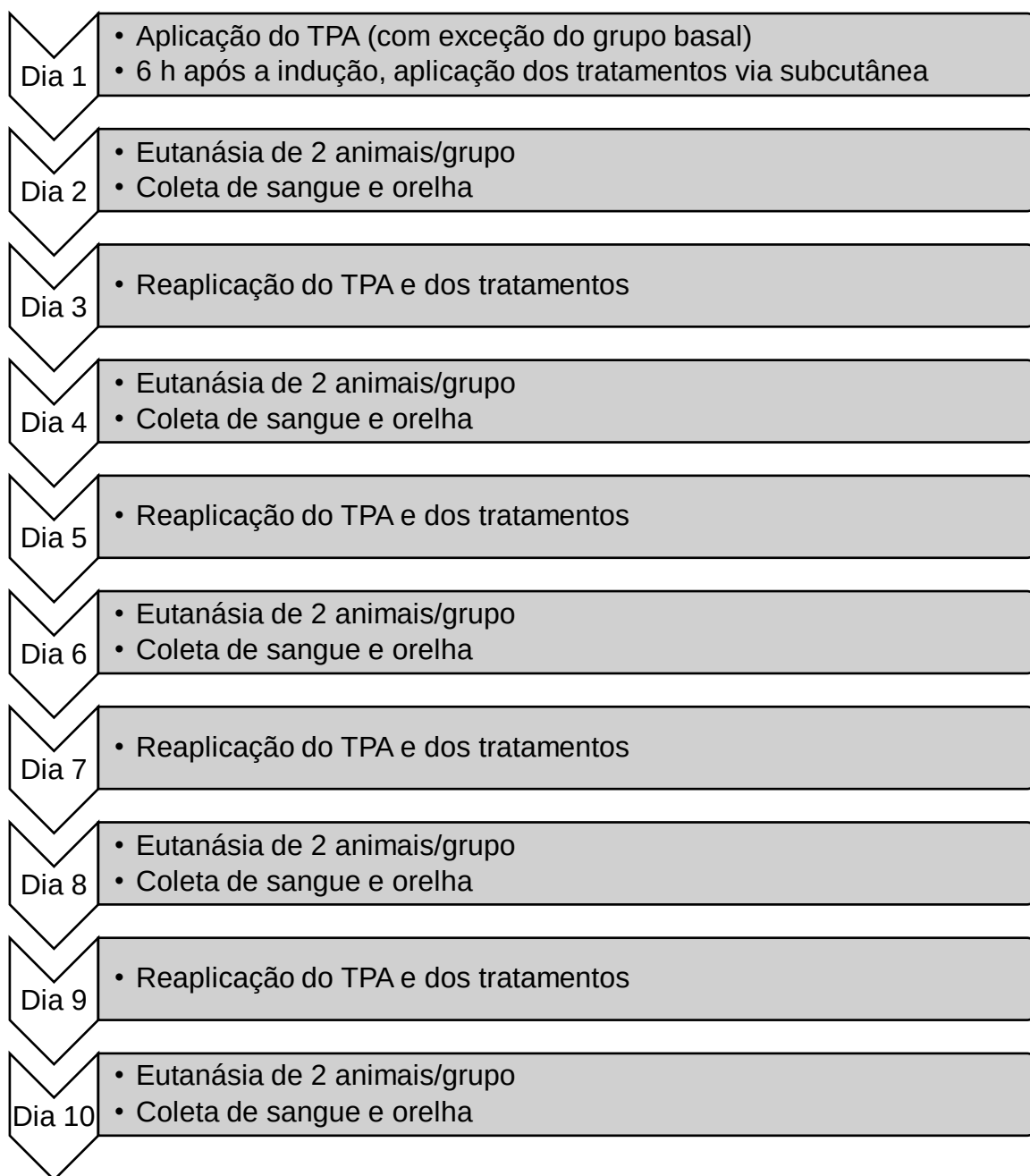
Notas: ¹Esses volumes foram determinados de acordo com o peso médio de cada grupo de camundongos. ²A eficiência de encapsulação do fármaco foi considerada para as suspensões de nanocápsulas de PCL contendo TAC. ³O mesmo volume foi administrado para os grupos NC-2 e NC-N.

4.9.3 Edema de Orelha Induzido Pela Aplicação Tópica do TPA

O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 µg de acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA) em 20 µL de acetona na orelha direita dos camundongos (BOSCARDIN, 2012, p. 54). O fármaco solubilizado em propilenoglicol e as suspensões de nanocápsulas com e sem TAC foram administrados por via subcutânea, após o tratamento com TPA, de acordo com o esquema de tratamento abaixo (Figura 13) (SHI *et al.*, 2017, p. 448). A administração subcutânea foi desejada por conta da solubilidade do PCL no veículo de aplicação do TPA.

Como controle positivo foi utilizado o próprio fármaco (G4) e como controle negativo o grupo onde foi aplicado apenas o TPA (G2).

FIGURA 13 – Esquema de tratamento e eutanásia dos grupos



Fonte: O autor

Em todos os grupos, círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos foram coletados, onde a espessura e o peso da orelha foram avaliados e posteriormente separados para a análise histológica.

4.9.4 Avaliação do Edema de Orelha

A avaliação do edema de orelha foi realizada de acordo com Hecker e Schimdt (1974). A espessura da orelha foi medida próximo ao centro do círculo coletado logo após a retirada do tecido, com auxílio de um paquímetro digital (Stainless Hardened, Mtx), onde a espessura foi registrada em micrômetros e os dados foram expressos como a variação do edema. Além disso, foi verificado o peso das orelhas em balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil).

Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

4.9.5 Dosagem de Fibrinogênio

A dosagem de fibrinogênio foi realizado segundo Shalm; Jain e Carroll (1975), pela técnica de precipitação plasmática a 56 °C. Em síntese, uma alíquota da amostra do sangue foi centrifugada em tubo capilar e o índice de refração sérico foi medido. Outra alíquota foi aquecida a 56 °C por 5 min, centrifugado e o índice de refração também mensurado. A concentração de fibrinogênio foi calculada pela subtração dos valores obtidos antes e depois da precipitação do fibrinogênio (CARLETTO *et al.*, 2021, p. 3).

Para as análises, foi realizado a coleta de sangue via punção cardíaca e os animais foram anestesiados com isoflurano.

4.9.6 Análise Histológica

As amostras de orelhas coletadas dos camundongos foram enviadas para o Centro Técnico Histopatológico de Curitiba (CTHC) para confecção das lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina (HE) (RECIO *et al.*, 2000, p. 2512). Em seguida, as secções histológicas com o infiltrado inflamatório e a espessura da epiderme foram fotografadas em microscópio óptico Olympus AX70 (aumento de 20 e 40x) (Waltham, Massachusetts, USA), utilizando o *software* T capture versão 5.1.1 (Tucsen, Fuzhou, China).

A quantificação das células inflamatórias foi avaliada utilizando o *software* ImageJ – *cell counter* versão 1.44 (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), com a contagem de todo o campo de visualização.

4.9.7 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância aceito para os testes foi de $p < 0,05$.

Todos os testes foram realizados utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism versão 6 (São Diego, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

As nanocápsulas poliméricas contendo TAC foram obtidas com sucesso pelo método proposto, onde apresentaram um formato esférico com superfície lisa e regular e tamanho médio adequado (aproximadamente 250 nm, IPD menor que 0,3, potencial zeta superior a -30 mV e eficiência de encapsulação superior a 91%). Esses valores foram considerados excelentes diante da proposta de permeação pelas camadas da pele, além de apresentarem-se homoganeamente dispersas e estáveis (CAMARGO, 2020).

Em trabalho prévio, verificou-se pelo estudo da estabilidade físico-química realizado que o tamanho das partículas e o índice de polidispersão não se alteraram durante os 120 dias de armazenamento, assim como as características macroscópicas das suspensões (CAMARGO, 2020, p. 91-96).

No entanto, o pH e o potencial zeta obtiveram diferenças significativas com o passar do tempo. O pH modificou acima de 60 dias de armazenamento para a NC-3, a qual possui maior concentração de fármaco, e as demais alteraram com 90 dias, com exceção da NC-N que alterou o pH depois de 120 dias (CAMARGO, 2020, p. 91-96).

Esses resultados ocorreram provavelmente por conta da hidrólise do MCT que compõe o núcleo ou do tensoativo que são desprendidos da fase oleosa quando ocorre agregação do polímero. Outros fatores encontrados também incluem 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 (BALEST, 2013, p. 40; CAMARGO, 2020, p. 91-96; KÜLKAMP *et al.*, 2009, p. 2082,2083; MELO *et al.*, 2010, p. 67; ZANETTI *et al.*, 2019, p. 205).

Em relação ao potencial zeta, as amostras carregadas com TAC obtiveram resultados significativos com 120 dias, confirmando a possível hidrólise da cadeia polimérica que expôs os grupos carboxílicos na superfície acarretando no aumento do valor negativo da mesma (BALEST, 2013, p. 40; CAMARGO, 2020, p. 91-96).

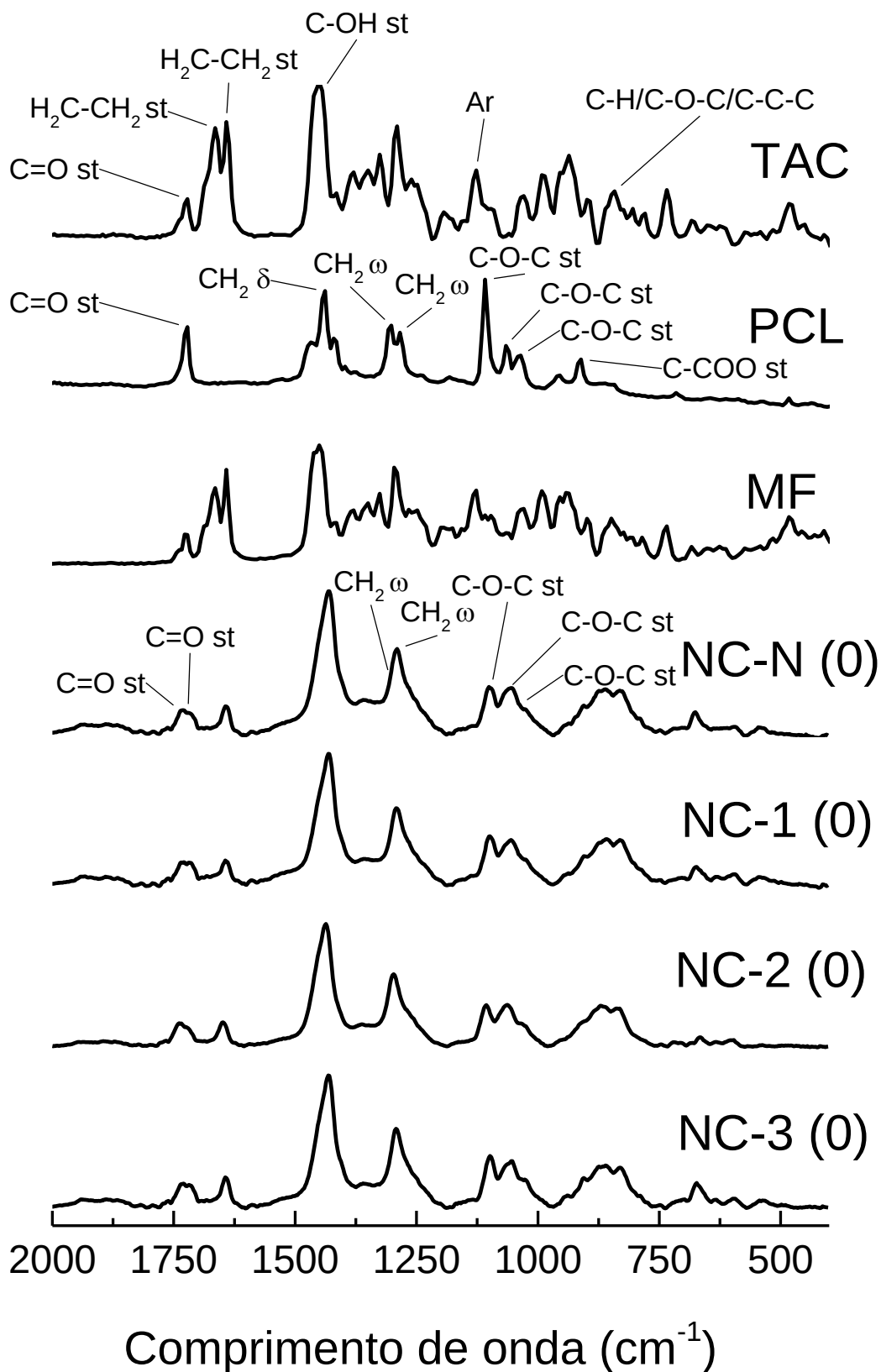
A Figura 14 mostra os espectros Raman do TAC puro, PCL puro, MF e das nanocápsulas poliméricas sem e com fármaco. O espectro do TAC apresentou as

bandas de acordo com as atribuições encontradas na literatura para vibração de estiramento C=O (1722 cm^{-1}), vibração de estiramento $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ (1665 e 1642 cm^{-1}), vibração de estiramento C—OH (1444 cm^{-1}), deformação angular no plano (1127 cm^{-1}) e deformação angular fora do plano de C—H, C—O—C e C—C—C (842 cm^{-1}) (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009, p. 269-336; ZIDAN *et al.*, 2012, p. 347).

O espectro do PCL revelou as bandas de vibração de estiramento C=O (1722 cm^{-1}), deformação angular CH_2 (1438 cm^{-1}), deformação simétrica CH_2 ($1302 - 1284\text{ cm}^{-1}$), vibração de estiramento C—O—C ($1066 - 1035\text{ cm}^{-1}$) e vibração de estiramento C—COO (911 cm^{-1}) (GUPTA *et al.*, 2012, p. 12847-12851; KISTER *et al.*, 2000, p. 927-931; KOLODZIEJ *et al.*, 2018, p. 48-50).

O espectro da MF mostrou a sobreposição dos espectros do TAC e do PCL e o das nanocápsulas de PCL tanto sem e com fármaco não demonstraram nenhuma evidência de deslocamento significativo das bandas principais quando comparadas aquelas observadas para as matérias-primas puras dos materiais. Com isso, e considerando as condições suaves utilizadas na nanoencapsulação, era esperado que nenhuma ligação covalente ocorresse entre fármaco e polímero, assim como com outros componentes da formulação quando as mesmas foram obtidas.

FIGURA 14 – Espectros Raman do TAC puro, PCL puro, mistura física (MF), controle negativo (NC-N) e nanocápsulas de PCL carregadas com TAC (NC-1, NC-2 e NC-3) imediatamente após sua preparação (tempo 0)

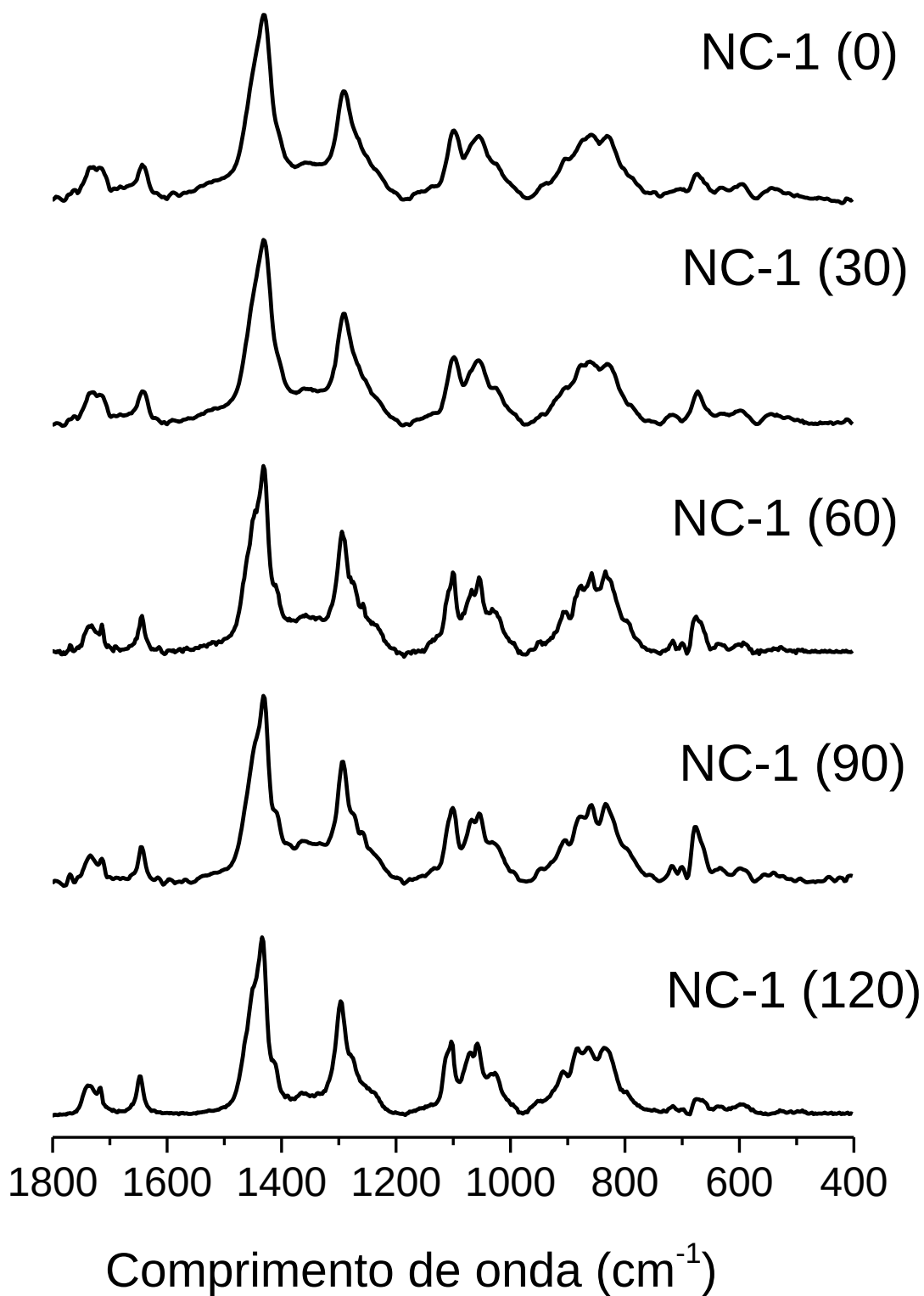


Fonte: O autor

Nota: st: vibração de estiramento / ω : vibração de deformação fora do plano / δ : vibração de deformação no plano / Ar: aromático

A espectroscopia Raman foi utilizada para investigar o efeito dos diferentes tempos de armazenamento na estabilidade das nanocápsulas poliméricas contendo TAC, conforme o representado na Figura 15. Como foi possível observar, nenhuma diferença nas atribuições da banda Raman foi detectada durante os tempos.

FIGURA 15 – Espectro Raman da amostra NC-1 em diferentes tempos de armazenamento: NC-1 (0): imediatamente após a preparação; NC-1 (30): após 30 dias; NC-1 (60): após 60 dias; NC-1 (90): após 90 dias e NC-1 (120): após 120 dias de armazenamento



Fonte: O autor

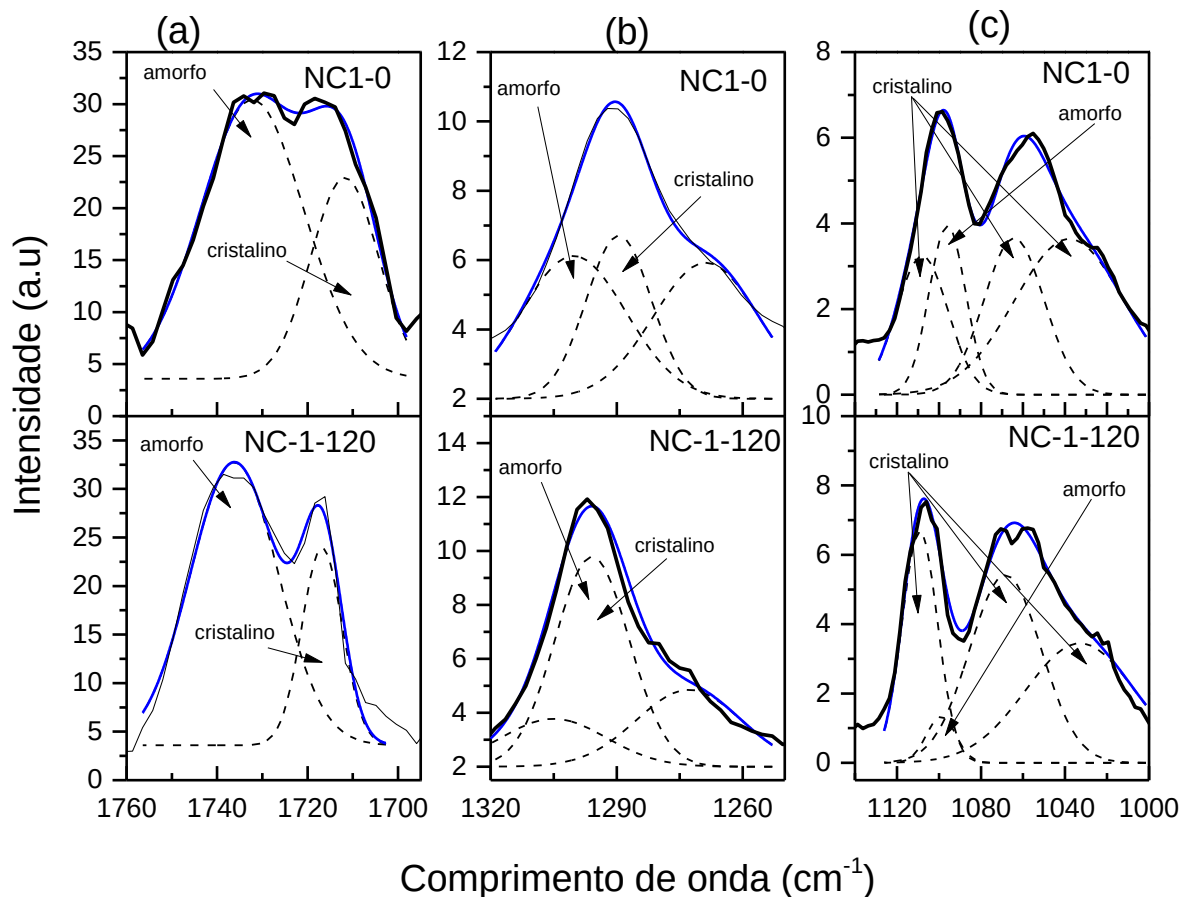
Nota: As análises dos dias 0 e 30 foram realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG e as demais no equipamento locado na Universidade Federal de Alagoas. Apesar de equipamentos diferentes, não houveram variações significativas nos espectros, obtendo resultados de resoluções distintas, mas sem alterações das bandas características dos grupos funcionais das estruturas.

No entanto, como já mencionado, é conhecido que o PCL é um polímero semicristalino contendo regiões cristalinas e amorfas e sua estabilidade depende da reorganização, da recristalização e do recozimento, que são processos de relaxamento de um cristal que não está em equilíbrio. Em geral, a degradação prossegue mais rápido em regiões amorfas, o que resulta em um aumento do grau de cristalinidade durante o armazenamento (ESPINOZA *et al.*, 2019, p. 5; KOLODZIEJ *et al.*, 2018, p. 44-45; LACOUILONCHE *et al.*, 1999, p. 987). Nesse sentido, uma análise mais aprofundada do grau de cristalinidade foi realizada para as nanocápsulas de PCL carregadas ou não com TAC em função dos tempos testados.

As bandas relacionadas com a cristalinidade do PCL apareceram em 1711 cm^{-1} (estiramento C=O); em 1284 cm^{-1} (deformação simétrica CH_2); em 1108 cm^{-1} (estiramento C—O—C) e 1065 cm^{-1} (estiramento C—O—C). Os domínios amorfos do PCL foram atribuídos em 1733 cm^{-1} (estiramento C=O) e em 1097 cm^{-1} (estiramento C—O—C) e foram detectados como alargamento de banda que caracteriza a cristalinidade do material. As bandas em 1440 cm^{-1} (deformação angular CH_2) e em 913 cm^{-1} (estiramento C—COO) também foram associados com o domínio cristalino. A banda em 1304 cm^{-1} foi acoplada com a banda em 1284 cm^{-1} como um resultado da vibração de deformação simétrica CH_2 ($x\text{CH}_2$) e essas atribuições estavam relacionadas a ambas as fases do polímero, a região amorfa e cristalina, respectivamente (KOLODZIEJ *et al.*, 2018, p. 48-50; LACOUILONCHE, 1999, p. 987-990).

Como há alargamento dessas bandas, que caracterizam o processo de cristalização, um ajuste gaussiano foi realizado a fim de obter o grau de cristalinidade para cada amostra (NC-N, NC-1, NC-2 e NC-3) e para os tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 120 dias) conforme relatado na literatura (KISTER *et al.*, 2000, p. 927-931; KOLODZIEJ *et al.*, 2018, p. 48-50). Os três intervalos avaliados foram: 1760 – 1690 cm^{-1} , 1320 – 1250 cm^{-1} e 1140 – 1000 cm^{-1} . A Figura 16 resume o ajuste gaussiano de cada faixa espectral para a amostra NC-1 no dia 0 e após 120 dias de armazenamento.

FIGURA 16 – Ajuste gaussiano para as faixas espectrais: (a) 1760-1690 cm^{-1} que incluiu 2 bandas em 1734 e 1711 cm^{-1} ; (b) 1320 – 1250 cm^{-1} que era composto por 3 bandas centrado em 1305, 1292 e 1270 cm^{-1} ; (c) 1140 – 1000 cm^{-1} que apresentou 4 bandas centradas em 1108, 1096, 1066 e 1038 cm^{-1} para amostra NC-1 no dia 0 e após 120 dias de armazenamento.



Fonte: O autor

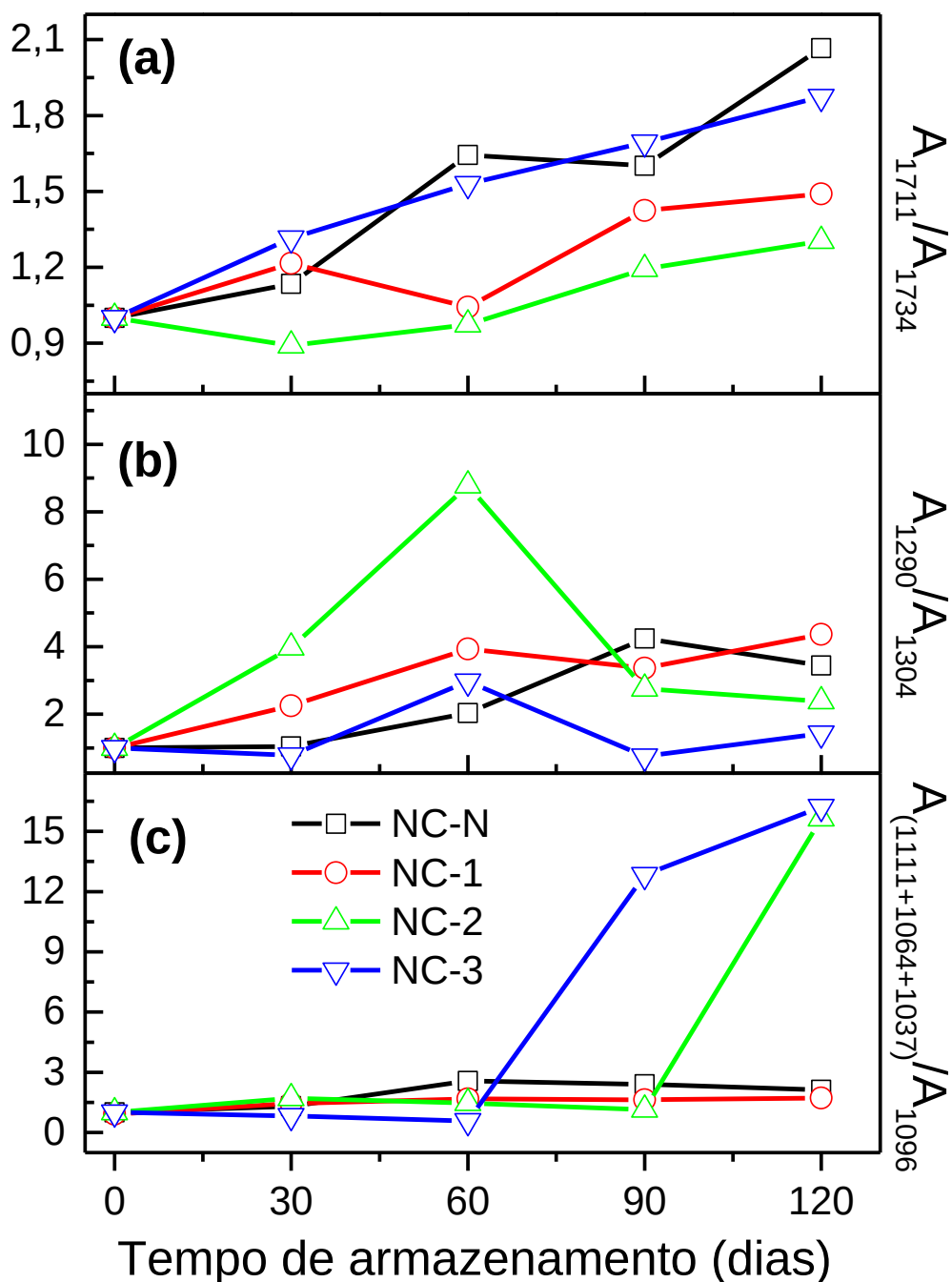
Nota: A linha azul representa o melhor ajuste gaussiano realizado com $R^2 > 0,99$.

De acordo com a Figura 16 (a), as bandas centradas em 1734 e 1711 cm^{-1} foram relacionados com as vibrações de estiramento $\text{C}=\text{O}$ dos domínios amorfos e cristalinos, respectivamente. Em relação a Figura 16 (b), a banda atribuída em 1304 cm^{-1} foi acoplada com a banda em 1284 cm^{-1} e essas duas bandas estavam relacionadas com a vibração de deformação simétrica de CH_2 e eram devidas as regiões amorfas e cristalinas, respectivamente. Em Figura 16 (c) as bandas centradas em 1037, 1064 e 1111 cm^{-1} foram relacionadas a região cristalina do PCL, enquanto a banda em 1096 cm^{-1} foi atribuída a região amorfa deste poliéster. Portanto, para determinar o grau de cristalinidade dessas faixas espectrais, foi realizada a análise das razões das áreas A_{1711}/A_{1734} , A_{1290}/A_{1304} e $A_{(1111+1064+1037)}/A_{1096}$.

O comportamento dessas razões foi apresentado na Figura 17. O grau de cristalinidade obtido para a razão A_{1711}/A_{1734} mostrou um aumento notável sobre o

tempo de armazenamento – Figura 17 (a). Na Figura 17 (b), foi demonstrado o grau de cristalinidade para a razão A_{1290}/A_{1304} , onde as amostras NC-N e NC-1 revelaram aumento da cristalinidade ao longo do tempo de armazenamento, enquanto que as amostras NC-2 e NC-3 tiveram um comportamento anômalo quando comparadas com as outras e pode-se atribuir esse resultado à natureza da banda Raman em 1304 cm^{-1} , pois deve-se levar em consideração que esta atribuição é típica do MCT e a hipótese de que esse óleo provavelmente foi liberado das nanocápsulas de PCL carregadas com TAC ao longo do tempo.

FIGURA 17 – (a) Razão de área gaussiana de regiões do PCL cristalinos/amorfos de vibração de estiramento C=O (A_{1711}/A_{1734}). (b) Razão de área gaussiana de regiões do PCL cristalinos/amorfos de deformação simétrica CH_2 (A_{1290}/A_{1304}). (c) Razão de área gaussiana de regiões do PCL cristalinos/amorfos de vibração de estiramento C—OC— [$A_{(1111+1064+1037)}/A_{1096}$]



Fonte: O autor

Nota: Todas as áreas foram normalizadas pelo dia 0, partindo, portanto, do mesmo ponto.

O grau de cristalinidade na razão $A_{(1111+1064+1037)}/A_{1096}$ (Figura 17 (c)) apresentou valores quase constantes até 60 dias de armazenamento e então, um aumento repentino foi registrado para NC-3 e NC-2 após 60 e 90 dias,

respectivamente. Esses dados foram consistentes com três hipóteses que foram propostas para as mudanças de pH observados anteriormente (CAMARGO, 2020, p. 91-96), como o ácido carboxílico livre obtidos a partir da degradação do Tween® 80, PCL e MCT.

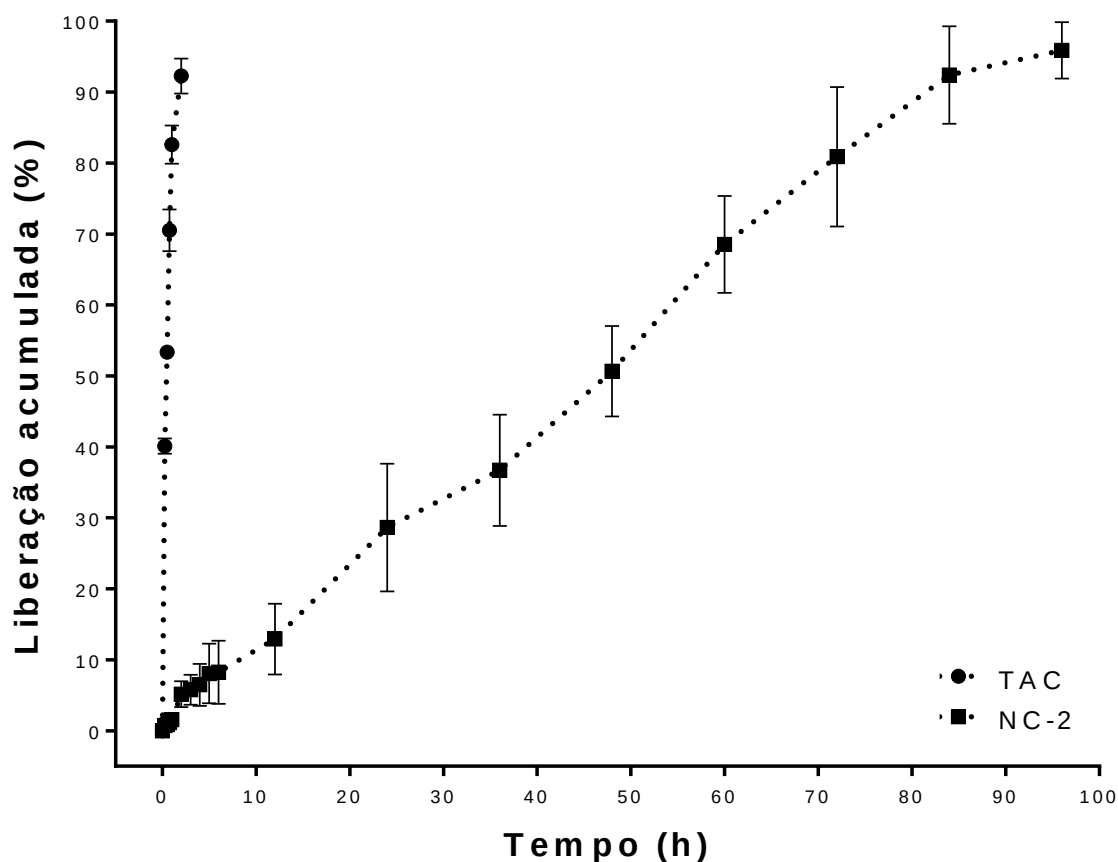
De acordo com a literatura, esses grupos químicos podem intensificar a hidrólise do poliéster por mecanismo ácido e essa reação pode ocorrer principalmente em domínios amorfos, devido a essas regiões terem um arranjo aleatório e assistemático (LACOUILONCHE, 1999, p. 987-988). Com isso, um aumento proporcional dos domínios cristalinos foi alcançado conforme observado para NC-2 e NC-3.

A partir desses resultados e os encontrados previamente foi possível concluir que essas formulações possuem uma estabilidade adequada dentro de 60 dias de preparação e podem ser adequadamente utilizadas para doenças de pele durante este intervalo de tempo.

5.2 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TACROLIMUS

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado com o TAC livre solubilizado em propilenoglicol e a formulação NC-2, escolhida para realização dos testes *in vitro* e *in vivo* pela ótima eficiência de encapsulação (superior a 99%) e a concentração de fármaco semelhante a usualmente utilizada em sua forma convencional (1 mg/mL). Os valores obtidos para cada intervalo de coleta foram corrigidos considerando as alíquotas retiradas e a Figura 18 mostra os perfis de liberação.

FIGURA 18 – Perfil de liberação *in vitro* para o TAC livre e nanocápsulas poliméricas contendo TAC (NC-2)



Fonte: O autor

O TAC apresentou perfil de liberação rápida no meio utilizado, chegando a 80% do fármaco liberado em 60 min de experimento. Em relação a NC-2, foi possível observar uma liberação controlada do fármaco com 80% de liberação após 72 horas (4.320 min).

O teste de liberação é amplamente utilizado para investigar a liberação de fármacos de uma forma farmacêutica no intuito de alterar a farmacocinética do mesmo e, eventualmente, melhorar seu efeito farmacológico. Estudos de liberação de drogas são essenciais para conhecer o comportamento de diferentes formas farmacêuticas. Eles são amplamente utilizados para o desenvolvimento e otimização de todos os tipos de sistemas de liberação sustentada, retardada ou controlada. Este experimento é essencial para nanossistemas que utilizam polímeros ou lipídios para transportar ativos para os locais desejados (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 12; SINGHVI; SINGH, 2011, p. 1).

5.2.1 Avaliação dos Perfis de Liberação

Além do ensaio de liberação do fármaco, foi possível conhecer a cinética de liberação por meio dos modelos matemáticos. Esses modelos são baseados em fenômenos como a dissolução, a difusão, o inchaço, a erosão, a precipitação e/ou a degradação. A cinética de liberação do fármaco é acionada por mecanismos que dependem da composição da matriz, da geometria, do método de preparação e do meio de dissolução utilizado para a liberação do fármaco (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 12).

Além disso, também dependem dos principais fatores que afetam a liberação, como o diâmetro médio da partícula, o estado físico, a concentração do fármaco dentro das partículas, as propriedades viscoelásticas do sistema polimérico, e as propriedades de dissolução-difusão do fármaco encapsulado. Sobre a liberação pelo polímero, existem dois mecanismos principais de liberação: a difusão do fármaco através da matriz polimérica e a erosão do polímero (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 13).

Com isso, vários modelos cinéticos têm sido usados para ajustar os dados de liberação *in vitro* com base nos resultados experimentais encontrados. Esses resultados podem ser ajustados a modelos como a ordem zero, a primeira ordem, o Higuchi, o Hixson-Crowell, o Korsmeyer-Peppas e outros (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 14; SINGHVI; SINGH, 2011, p. 4-7).

De acordo com os modelos cinéticos aplicados aos perfis de liberação (Tabela 2), foi possível encontrar que a NC-2 apresentou uma liberação de ordem zero (R^2 ajustado = 0,9947). O modelo de ordem zero refere-se ao processo de liberação constante do fármaco por um sistema de liberação independente da concentração do fármaco. Este modelo é ideal para uma forma farmacêutica de liberação controlada com flutuações nos níveis de ativos nos tecidos ou na circulação (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 15; SINGHVI; SINGH, 2011, p. 5). As formas farmacêuticas que apresentam esse comportamento liberam a mesma quantidade de ativo por unidade de tempo e são uma das melhores abordagens para formular medicamentos de liberação prolongada (da COSTA, 2002, p. 143).

TABELA 2 – Dados ajustados para o perfil de liberação *in vitro* das nanocápsulas poliméricas contendo TAC (NC-2)

Modelo	Equação	Equação linear	R ² ajustado
Ordem zero	$Q = Q_0 + K_0 t$	$y = 1,0506x + 1,511$	0,9947
Primeira ordem	$dC/dT = -Kt$	$y = -0,0122x + 2,0517$	0,9143
Higuchi	$Q = KH t^{1/2}$	$y = 0,0945x + 1,2057$	0,9532
Korsmeyer–Peppas	$Mt/M^\infty = Kt^n$	$y = 0,8816x + 0,2487$	0,9846
Hixson–Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_1^{1/3} = KHC t$	$y = -0,0294x + 4,7112$	0,9675

Fonte: O autor

Notas: Ordem zero: Q é a quantidade de fármaco liberado ou dissolvido, Q_0 é a quantidade inicial de fármaco em solução (geralmente é zero), t é o tempo, K_0 é a constante de liberação de ordem zero; Primeira ordem: dC é a derivada da concentração, dT é a derivada do tempo, K é a constante da velocidade de primeira ordem expresso em unidade de tempo⁻¹; Higuchi: KH é a constante de dissolução de Higuchi; Kors-Peppas: Mt/M^∞ é a fração do fármaco liberado pelo tempo t , K é a taxa constante (tendo unidades de t^n) incorporando características estruturais e geométricas do sistema de liberação. n é o expoente indicativo do mecanismo de liberação do fármaco através do polímero; Hixson-Crowell: Qt denota o peso restante de sólido em tempo t , Q_0 é o peso inicial do sólido no momento $t = 0$, e KHC representa a taxa de dissolução constante.

A biodegradabilidade de polímeros é um atributo explorado na modulação da liberação de fármacos, sendo desejável que o biomaterial desapareça assim que realizar sua função no organismo. Esses produtos de degradação formados são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou excretados na urina (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010, p. 53).

Devido à presença dos grupos ésteres em sua estrutura química, o PCL é suscetível a hidrólise. Portanto, o polímero pode sofrer hidrólise química ou enzimática, e o mecanismo de degradação do polímero altera indiretamente essa liberação. Em formulações de PCL, a clivagem não enzimática começa na região amorfa, que é auto-catalisada pelos grupos carbonilas da extremidade da cadeia polimérica fragmentada (DASH; KONKIMALLA, 2012, p. 19; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010, p. 55).

A permeabilidade à água na formulação é o passo limitante para esta fragmentação, produzindo, assim, fragmentos menores, dependendo do peso molecular do PCL. Este processo de perda de massa é geralmente acompanhado por erosão superficial causado por sulcos e rachaduras na superfície (DASH; KONKIMALLA, 2012, p. 19). Assim, foi possível supor que alterações hidrolíticas na superfície das nanocápsulas de PCL podem ter influenciado no processo de liberação do fármaco no meio de dissolução.

A fim de elucidar o mecanismo de liberação do TAC pelas nanocápsulas de PCL, o modelo de Korsmeyer-Peppas pode ser utilizado, sendo indicado quando o

mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando mais de um tipo de mecanismo pode estar envolvido. Nesta fórmula, o valor de n relata o tipo do fenômeno físico associado a liberação (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 16; SINGHVI; SINGH, 2011, p. 7; DA COSTA, 2012, p. 146).

Resumidamente, nos sistemas de liberação com geometria esférica, um valor de n menor que 0,45 indica que a liberação é controlada por difusão (difusão Fickiana); um valor de n acima de 0,89 representa que a liberação do fármaco pelo polímero ocorre por erosão (transporte caso II ou mecanismo de transporte não Fickiano); e um valor de n entre 0,45 e 0,89 caracteriza o transporte anômalo com características de ambos os mecanismos (da COSTA, 2012, p. 146; LENZI *et al.*, 2016, p. 2; PAARAKH *et al.*, 2018, p. 16; SINGHVI; SINGH, 2011, p. 7).

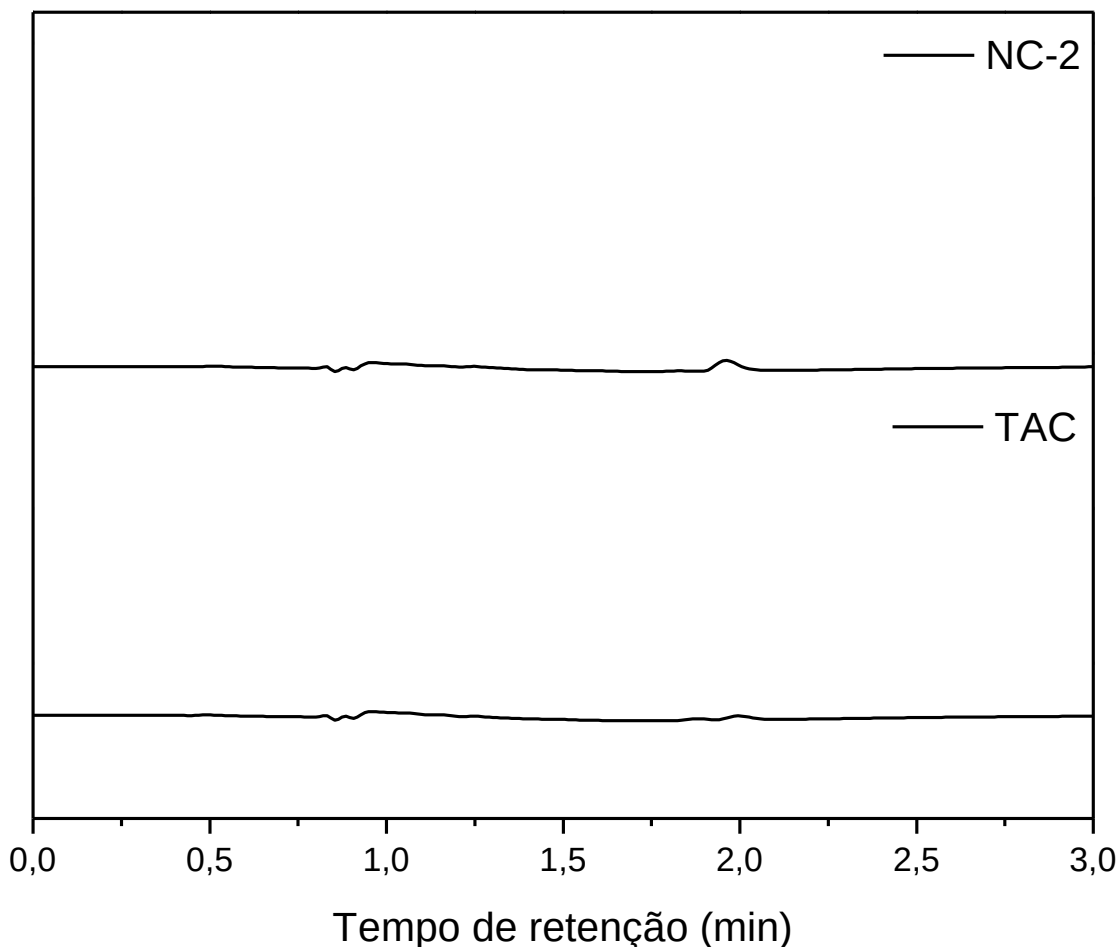
Levando tudo isso em consideração, a formulação NC-2 apresentou um valor de n de 0,8816 pelo Korsmeyer-Peppas, indicando que o mecanismo físico de liberação do fármaco pelas nanocápsulas de PCL contendo TAC ocorreu pelo transporte anômalo, no qual o fármaco foi liberado tanto por difusão Fickiana quanto por relaxamento/erosão do poliéster (PAARAKH *et al.*, 2018, p. 13).

5.3 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO *IN VITRO* POR DIFUSÃO EM CÉLULA ESTÁTICA DE FRANZ

Como já mencionado, a utilização da Strat-M® serve ao propósito de ser uma membrana econômica para testar e otimizar formulações farmacêuticas com boa reprodutibilidade e sem precisar utilizar material biológico, além de ser usada para triagem de formulações durante as fases iniciais de desenvolvimento de produtos de higiene pessoal, ativos cosméticos, formulações de proteção da pele contra agressão química, entre outros (HAQ *et al.*, 2018a, p. 433).

A Figura 19 demonstra os cromatogramas obtidos após 72 h de experimento para o TAC solubilizado em propilenoglicol e na concentração em 1 mg/mL e para a formulação NC-2.

FIGURA 19 – Cromatogramas obtidos após 72 h de realização da permeação cutânea *in vitro* utilizando a membrana sintética Strat-M® para o TAC e NC-2



Fonte: O autor

Foi possível observar que não houve sinal algum do fármaco durante o tempo da corrida cromatográfica programada e validada previamente (CAMARGO *et al.*, 2021) e em nenhum dos tempos de coletas realizados. A ausência de sinal deve-se ao motivo de não ocorrer absorção do fármaco ou das nanocápsulas poliméricas durante o experimento, indicando que ambos se encontraram retidos da membrana Strat-M®, estando de acordo com o encontrado na literatura para aplicação tópica (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2; MACHADO *et al.*, 2017, p. 746).

O fato de não ocorrer a permeação é um importante indicativo de que o ativo deve ter permanecido na região cutânea e não realizou uma entrega transdérmica (GARCIA *et al.*, 2018, p. 2). Com as nanocápsulas permanecendo nessa região, o contato entre o sistema e as células envolvidas na inflamação das doenças autoimunes cutâneas por um tempo maior e mais prolongado, favorece a ação do fármaco e deve garantir o efeito imunossupressor do TAC, assim como, a redução

dos efeitos adversos, como a irritação da pele causada pelo fármaco livre (DHEER *et al.*, 2018, p. 223).

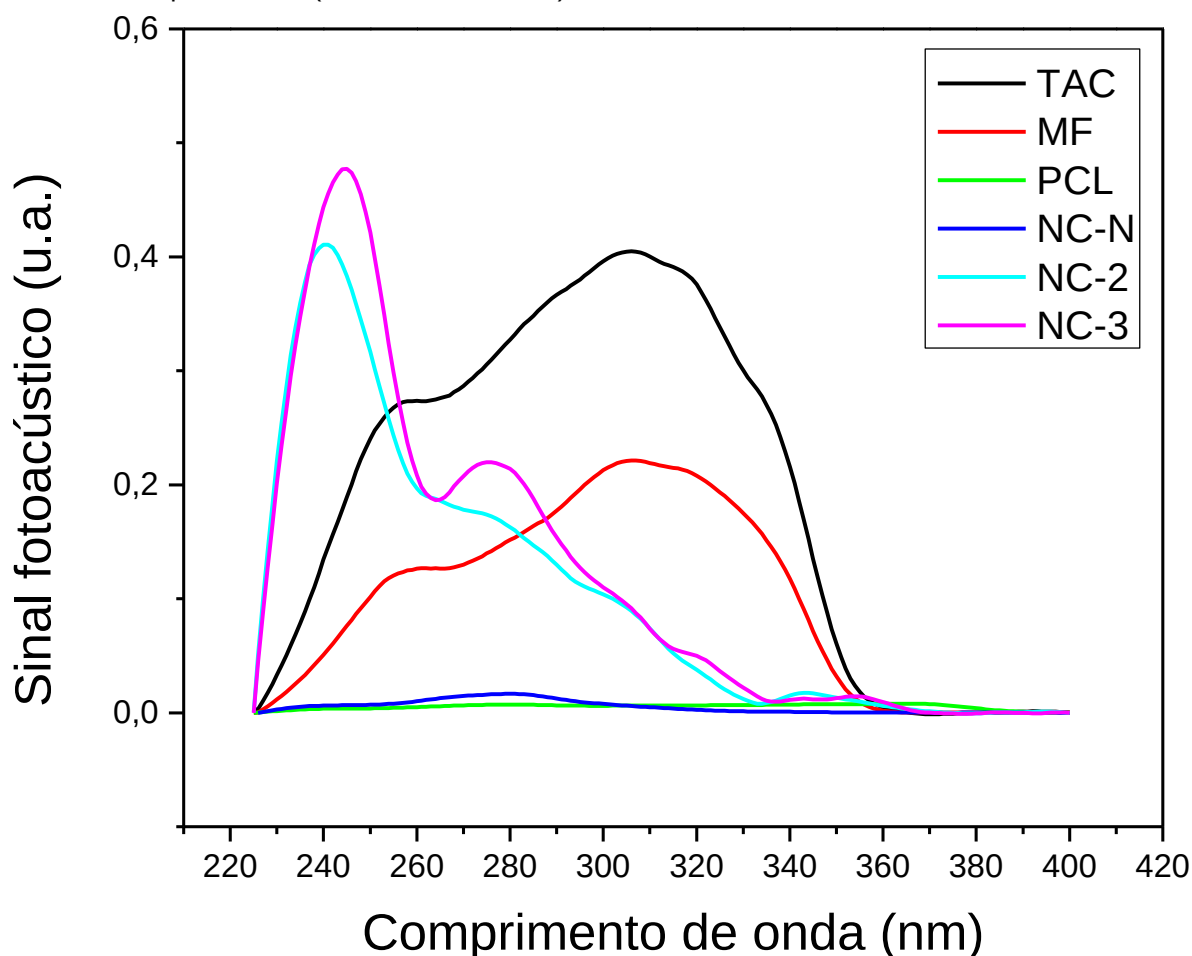
Infelizmente somente por essa técnica não foi possível verificar em qual camada da membrana se encontra o TAC livre e as nanocápsulas. Para concluir se o sistema de liberação desenvolvido melhorou ou não a permeação do fármaco, já que o mesmo, devido ao seu peso molecular (822 Da) dificulta a permeação mais profunda pela pele (YU *et al.*, 2018, p. 130) experimentos utilizando a PAS como ferramenta auxiliar foram realizados para resolver esse impasse.

5.4 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO *IN VITRO* POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

A PAS tem se mostrado uma técnica valiosa para avaliar a penetração de substâncias através da pele tanto *in vitro* como *in vivo* e seu uso foi expandido para fins de aplicações terapêuticas. Portanto, considerando a importância da investigação da distribuição e dos processos de interação quando as substâncias são aplicadas na pele, utilizou-se dessa técnica para concluir os estudos de permeação *in vitro* iniciados com as células estáticas de difusão de Franz (SEHN *et al.*, 2003, p. 758).

Para determinar a permeação do TAC pela membrana Strat-M®, os espectros de absorção do TAC e das formulações (NC-N, NC-2 e NC-3) foram primeiramente obtidos. A Figura 20 representa os espectros do fármaco, MF e das nanocápsulas e estes espectros foram normalizados somente pelo espectro do carvão.

FIGURA 20 – Espectro de absorção óptica do TAC, PCL, mistura física (MF) e das nanocápsulas poliméricas (NC-N, NC-2 e NC-3)



Fonte: O autor

Foi possível observar que o espectro do TAC é bem semelhante ao da MF e conforme resultados obtidos em trabalhos anteriores (MACENHAN, 2018, p. 85; NADAL *et al.*, 2019, p. 13), a intensidade do PCL é bem mais baixa e, portanto, não foi considerada para o trabalho, assim como para a amostra NC-N.

Em relação às nanocápsulas foi possível identificar um aumento na intensidade da banda em 244 nm e um ombro em 277 nm, sendo que este fica mais intenso conforme aumenta a concentração do fármaco. Também foi observado o aparecimento de uma ligeira banda em 350 nm. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para o TAC livre (AMARDEEP; BANDE; AGARWAL, 2012, p. 319; BÖER; MARQUES; CARDOSO, 2008, p. 139; PATEL *et al.*, 2021, p. 240; YANG *et al.*, 2022, p. 2).

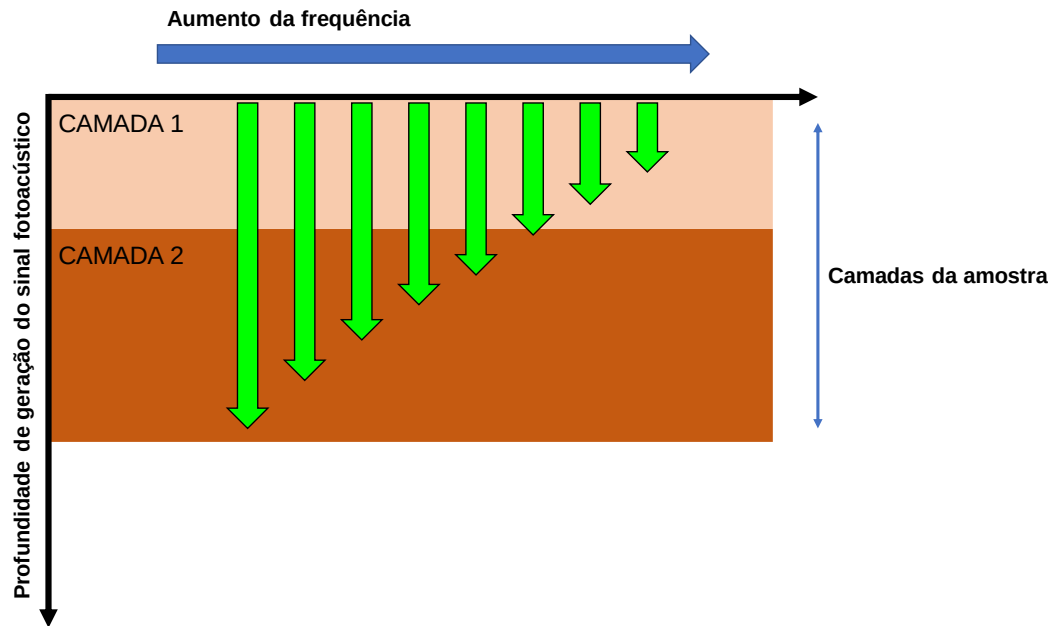
Essa diferença entre os espectros do TAC e das nanocápsulas pode ser justificado pelo fato de que como a NC-N possui um sinal muito baixo de absorção

óptica, considera-se que a formulação sem TAC possui uma baixa condução térmica e consequentemente, quando incidimos uma radiação no material, a mesma é transmitida para o interior das nanocápsulas e absorvida pelo fármaco gerando calor e, com isso, produzindo o sinal fotoacústico. Este efeito já foi observado em trabalhos anteriores com nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso (FERRARI *et al.*, 2019, p. 10).

Segundo Macenhan (2018, p. 81); Nadal *et al.* (2019, p. 17); Haq *et al.* (2018b, p. 61) e como já mencionado, as membranas sintéticas Strat-M® são compostas de duas camadas de poli(étersulfona) com uma superfície muito compacta, equivalente ao estrato córneo, que fornece resistência a permeação de certos fármacos. Abaixo dessas camadas existe uma terceira camada de poliolefina de 100 μm a qual possui poros maiores e, portanto, maior permeabilidade. Essas camadas poliméricas criam uma estrutura porosa que é impregnada com uma mistura de lipídios sintéticos que fornecem um gradiente de tamanho de poros e difusividade.

Macenhan (2018, p. 82) e Nadal *et al.* (2019, p. 9-10), realizaram a caracterização da Strat-M® e para obter o perfil de profundidade através da membrana determinaram o comprimento de difusão (μ), o qual mensura a espessura da parcela de amostra que mais contribui para a geração do sinal fotoacústico. Além disso, verificaram que as frequências de modulação 5, 23, 51 e 203 Hz eram equivalentes as profundidades da membrana em 210, 100, 67 e 34 μm , respectivamente e isso deve-se ao fato de que a frequência é inversamente proporcional a profundidade, como representado na Figura 21.

FIGURA 21 – Esquema representativo da relação entre a frequência utilizada x penetração da amostra

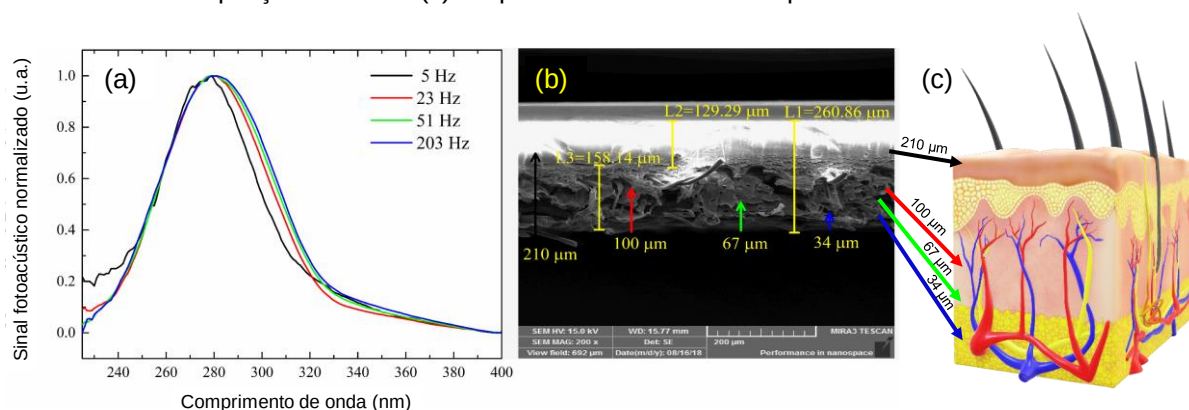


Fonte: O autor

Ao analisarem a membrana pelo lado interno, os resultados proporcionaram uma intensificação da equivalência entre as camadas da Strat-M® com a pele humana. A região equivalente ao estrato córneo tem uma penetração de 210 μm de profundidade, enquanto que a região equivalente a derme tem uma profundidade de penetração de 100 μm (NADAL *et al.*, 2019, p. 17).

Os espectros obtidos por PAS para a membrana Strat-M® em 5, 23, 51 e 203 Hz estão apresentados na Figura 22 (a), enquanto que a Figura 22 (b) demonstra a fotomicrografia da membrana realizada por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG) e a Figura 22 (c) representa um esquema tridimensional da pele humana com o intuito de melhorar o entendimento das profundidades.

FIGURA 22 – (a) Espectro PAS para a membrana Strat-M®. (b) Fotomicrografia da membrana com ampliação de 200x. (c) Esquema tridimensional da pele humana



Fonte: Adaptado de NADAL, J. M. *et al.* Adapalene-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles: Physicochemical characterization and in vitro penetration by photoacoustic spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1-20, 2019.

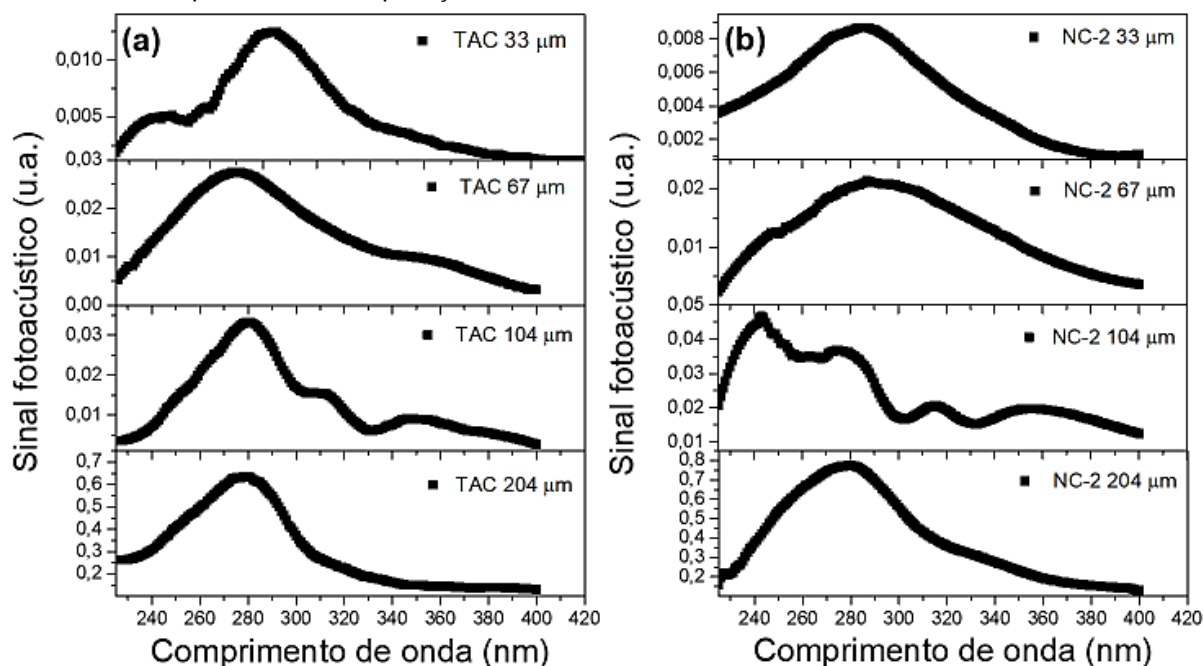
Nota: As setas ilustram o comprimento de difusão térmica (μ_{membrana}) obtido para as frequências de 5, 23, 51 e 203 Hz e a correlação com as camadas da pele – as cores são as mesmas do respectivo espectro (a)

Com esses resultados, Macenhan (2018, p. 82) e Nadal *et al.* (2019, p. 11-12), concluíram a existência de um *red shift* entre 278 e aproximadamente 300 nm (Figura 22 (a)), que representa a passagem da camada poli(étersulfona) para a camada de poliolefina. Os autores associaram essa banda principalmente em função das interações intracadeias poliméricas, além das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos elétrons nos orbitais π dos anéis aromáticos.

Nadal *et al.* (2019, p. 12), também observaram que a mudança de 300 para 350 nm significa que as cadeias poliméricas se tornam menos emaranhadas e, portanto, para uma frequência de modulação de 5 Hz (210 μm), o sinal fotoacústico gerado era da camada poli(étersulfona).

A Figura 23 mostra os espectros em função da profundidade para as amostras TAC (a) e NC-2 (b) após 15 min de aplicação nas membranas. Efetuou-se a medida na parte interna da Strat-M® e, com isso, observou-se o sinal do fármaco puro em 104 μm (ombros em aproximadamente 310 e 350 nm) e em 33 μm (ombro em aproximadamente 240 nm), indicando que após 15 min o TAC livre percorreu praticamente toda a extensão da membrana. Em relação a amostra NC-2 verificou-se sinal da formulação apenas na profundidade de 104 μm (sinais em 240, 279, 316 e ~350 nm).

FIGURA 23 – Espectros fotoacústicos em função da profundidade das amostras TAC (a) e NC-2 (b) após 15 min de aplicação na membrana

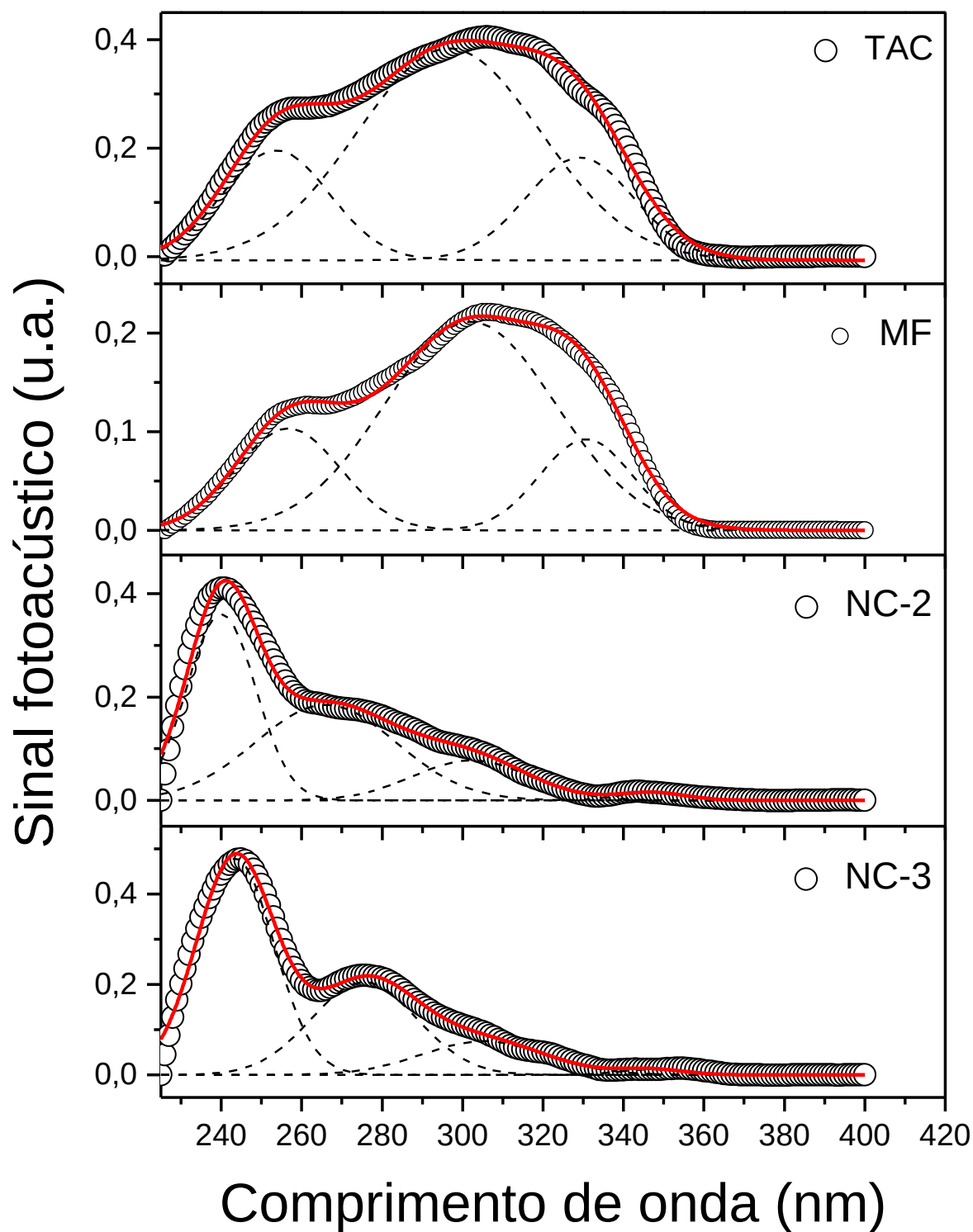


Fonte: O autor

Mesmo observando estas diferenças não se deve esquecer da contribuição da membrana no sinal fotoacústico. Neste caso, o primeiro passo foi aplicar o mesmo método matemático utilizado em estudos anteriores. Este método consistiu em efetuar as deconvoluções gaussianas nos espectros das amostras apresentadas na Figura 20, com exceção das amostras PCL e NC-N devido à baixa intensidade das bandas.

A Figura 24 apresenta essas deconvoluções, onde foi possível verificar para o TAC três gaussianas centradas em 253, 296 e 329 nm, sendo o mesmo encontrado para a amostra MF. Com relação as nanocápsulas (NC-2 e NC-3) observamos quatro gaussianas centradas em 243, 275, 305 e 347 nm.

FIGURA 24 – Espectro fotoacústico para o TAC, MF e as formulações de nanocápsulas (NC-2 e NC-3) com as deconvoluções gaussianas

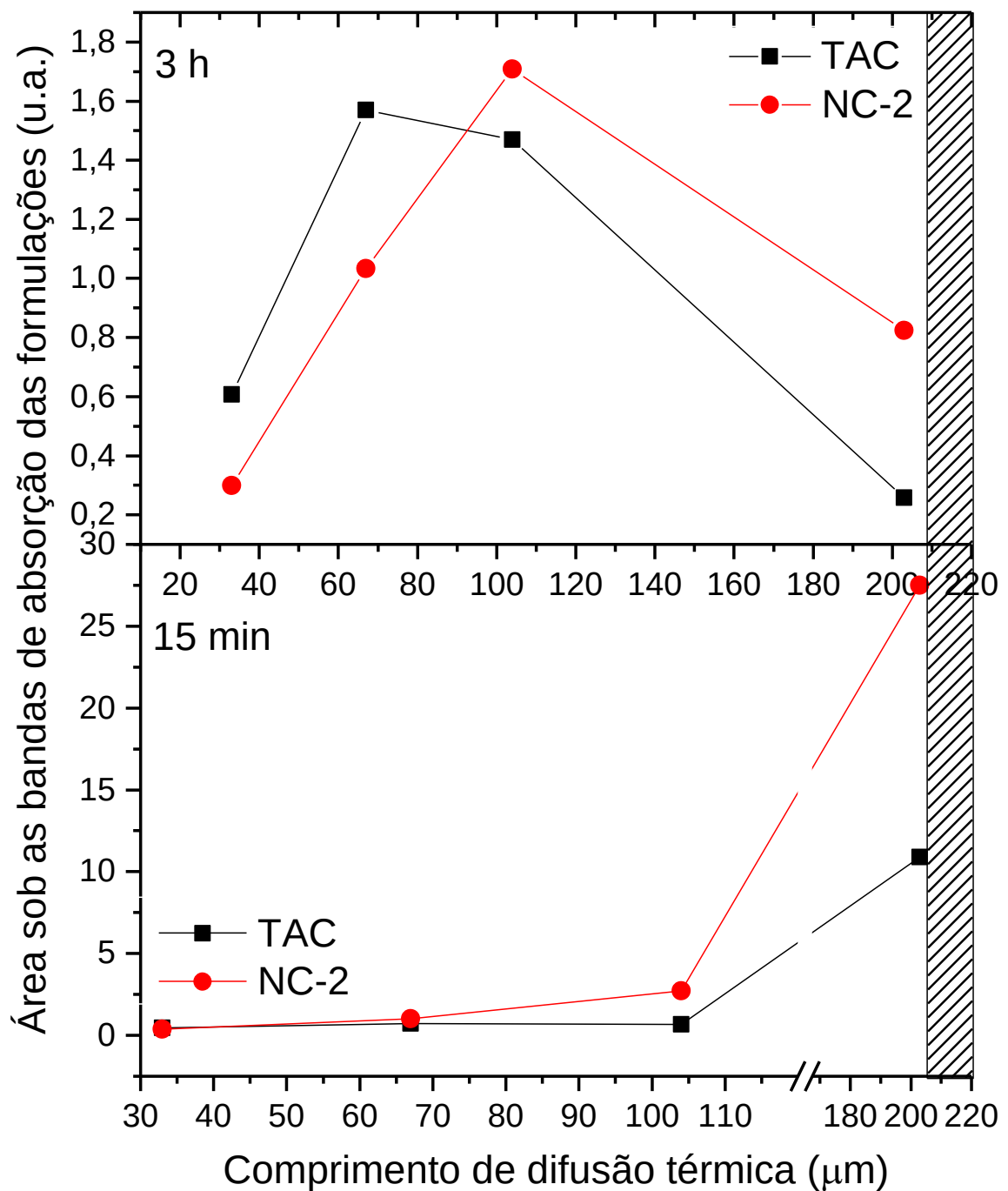


Fonte: O autor

Por conta de possuir gaussianas correspondentes às contribuições da membrana e das formulações centradas nas mesmas posições (~280 nm e 300 nm – Figura 22 (a)), não foi possível utilizar o mesmo critério de ajuste dos estudos

anteriores. Neste caso, fez-se necessário subtrair a contribuição da membrana para cada frequência (profundidade) e então integrar a área do espectro resultante. Matematicamente o resultado é o mesmo e foi apresentado na Figura 25.

FIGURA 25 – Evolução da permeação de TAC e da formulação NC-2 na membrana em função do comprimento de difusão térmica após 15 min e 3 h de aplicação



Fonte: O autor

A partir disso, foi possível notar que em 15 min após a aplicação das amostras uma grande concentração de NC-2 e uma concentração menor de TAC encontraram-

se retidos na região mais superficial da membrana, equivalente ao estrato córneo na pele humana (204 μm). Enquanto que depois de 3 h uma maior quantidade da NC-2 encontrou-se disponível na região equivalente a derme humana (104 μm) e o TAC livre foi capaz de permear a membrana até as camadas mais profundas (33 μm).

A escolha desta amostra NC-2, como já mencionado, se deve ao fato de que essa formulação possui uma ótima eficiência de encapsulação (superior a 99%) e a concentração de fármaco semelhante a usualmente utilizada em sua forma convencional (0,1%).

Lapteva *et al.* (2014, p. 2995-2996), realizaram um estudo para verificar a biodistribuição na pele humana de TAC encapsulado em micelas poliméricas e na sua pomada convencional e observaram que as micelas também ficaram mais retidas nas camadas mais superficiais da pele, enquanto que o TAC livre atingia todas as camadas, incluindo as mais profundas. Os autores concluíram que a formulação contendo o fármaco encapsulado entregou o TAC mais rapidamente e em quantidades significativamente maiores do que a pomada convencional.

Ainda, os autores verificaram que as micelas poliméricas entregaram muito mais fármaco no estrato córneo e na epiderme viável, aumentando a deposição de TAC em até 4 vezes quando comparado ao fármaco livre. Esse resultado em pacientes com psoríase foi considerado como excelente, pois na psoríase o estrato córneo encontra-se espessado e a epiderme inflamada, além de ocorrer a migração de linfócitos T para essa região, o que não acontece em uma pele saudável, pois essas células encontram-se somente na derme (LAPTEVA *et al.*, 2014, p. 2998).

Uma das desvantagens da forma convencional do TAC para pacientes com doenças autoimunes cutâneas foi atribuída a incapacidade da formulação em entregar o TAC através do estrato córneo espessado, além de que a pior entrega também deve-se aos excipientes da formulação, dado que a forma tópica possui excipientes altamente lipofílicos, diferentes tipos de parafina, carbonato de propileno e cera de abelha que reduz a atividade termodinâmica do fármaco e, como consequência, a partição do TAC da formulação para a pele (LAPTEVA *et al.*, 2014, p. 2997-2998).

Pan *et al.* (2016, p. 4044), desenvolveram nanopartículas combinadas com nicotinamida para melhorar a entrega percutânea de TAC e analisaram a permeação *in vitro* utilizando a pele abdominal de ratos. Os autores verificaram que a aplicação de nanopartículas tende a alcançar uma maior retenção do fármaco na pele, além de

prolongar o tempo de residência, o direcionamento para as camadas mais superiores e melhorar as propriedades físico-químicas indesejáveis do TAC.

Yu *et al.* (2018, p. 136), avaliaram a permeação cutânea *in vitro* também utilizando a pele abdominal de ratos para nanopartículas de quitosana carregando TAC combinadas com nicotinamida e os autores também perceberam um aumento da retenção das nanopartículas nas camadas mais superiores da pele, principalmente uma maior retenção na região do estrato córneo, enquanto que o TAC proveniente da pomada comercial teve uma menor permeação cutânea. Os autores definiram esses resultados do TAC livre como consequência das características farmacotécnicas da forma farmacêutica, já que as nanopartículas tendem a melhorar a solubilidade do TAC e, com isso, aumentar o gradiente de concentração e a partição pele/veículo.

Fereig *et al.* (2021, p. 8-9), encapsularam o TAC em nanopartículas de quitosana com o intuito de aumentar a deposição cutânea em casos de psoríase. Para a análise utilizaram a pele do dorso de ratos e verificaram que as nanopartículas tiveram menor permeação que a pomada comercial de TAC depois de 24 horas, porém as nanopartículas apresentaram um maior depósito (75%) na pele quando comparado a pomada (34%), incluindo maior depósito no estrato córneo. Os autores concluíram que a melhora da retenção nas camadas superiores em peles com lesões psoriáticas, principalmente estrato córneo e epiderme, acabava sendo muito mais benéfico e, além disso, as nanopartículas de quitosana diminuíram a absorção sistêmica do fármaco e fortaleceram a terapia tópica.

Com isso, foi possível concluir que as nanocápsulas de PCL contendo TAC na concentração de 1 mg/mL (NC-2) forneceram um sistema adequado para o tratamento tópico, pois o processo de encapsulação reduziu a permeação cutânea do TAC por todas as camadas, melhorando a biodistribuição e acumulando a maior concentração das nanocápsulas no estrato córneo, na epiderme viável e na região dérmica, que são as camadas da pele onde encontra-se o infiltrado inflamatório em doenças autoimunes cutâneas (LAPTEVA *et al.*, 2014, p. 2998).

Além disso, prevê-se que quando aplicado na pele doente, esse sistema de liberação estaria disponibilizando o TAC em uma liberação controlada para agir diretamente nos linfócitos T e induzir o seu efeito imunossupressor com um menor efeito adverso (LAPTEVA *et al.*, 2014, p. 2998).

Por fim, vale ressaltar que nenhum trabalho foi encontrado na literatura que envolvesse o desenvolvimento de nanocápsulas de PCL contendo TAC para o estudo

da avaliação da permeação cutânea *in vitro* em membranas sintéticas Strat-M® e nem utilizando da espectroscopia fotoacústica como ferramenta de análise, sendo esse, portanto, um trabalho de caráter inédito.

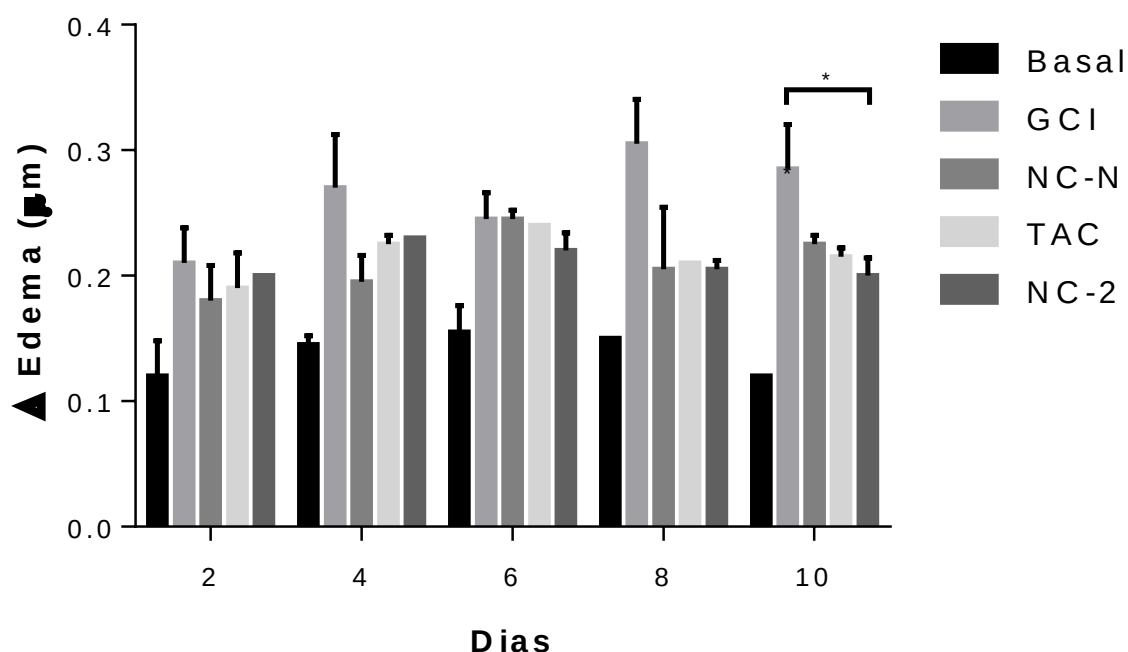
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

5.5.1 Análise do Edema e Peso das Orelhas

A análise do edema e do peso das orelhas são índices importantes para avaliar a severidade da inflamação causada pela aplicação do TPA. A partir disso, dois camundongos BALB/c de cada grupo foram eutanasiados, a cada dia, intercalado com o tratamento, para avaliar as mudanças da espessura e do peso da orelha direita de cada camundongo (SHI *et al.*, 2017, p. 449).

A Figura 26 demonstra os resultados da espessura das orelhas dos camundongos, nos diferentes grupos e nos diferentes tempos de tratamento. Foi possível observar o aumento da espessura nas orelhas de todos os grupos que receberam o tratamento com o agente flogístico, TPA (2,5 µg/orelha), quando comparado ao grupo basal, sem tratamento. A injeção subcutânea de TAC e da formulação de nanocápsulas poliméricas contendo TAC não suprimiram o inchaço da orelha quando comparado ao grupo controle inflamatório (GCI), com exceção de uma leve supressão significativa no décimo dia para o grupo NC-2.

FIGURA 26 – Efeito do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na redução do edema das orelhas de camundongos machos Balb/c induzidos por TPA

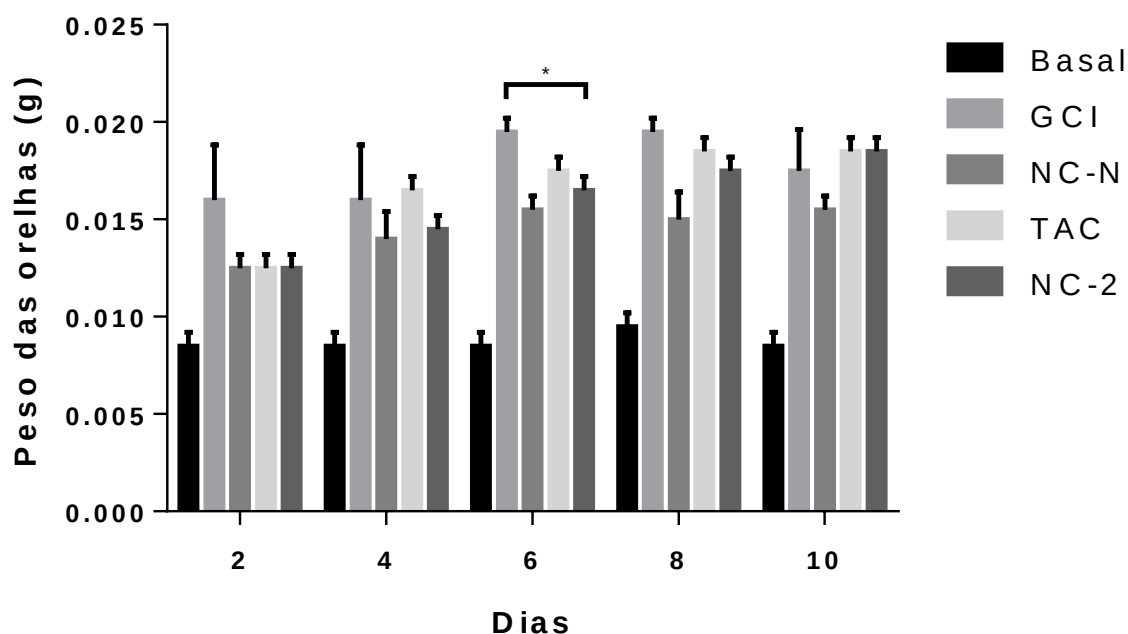


Fonte: O autor

Notas: Análise estatística realizada em cada grupo nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de tratamento. Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, com significância de $*p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle inflamatório (GCI)

Em relação a análise do peso das orelhas (Figura 27) foi possível observar que também não houve diferença significativa neste quesito, apesar da diferença entre os grupos GCI e NC-2 no sexto dia, indicando que nem o fármaco livre e nem a formulação NC-2 foram capazes de reduzir o peso das amostras.

FIGURA 27 – Efeito do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na redução do peso das orelhas de camundongos machos Balb/c induzidos por TPA



Fonte: O autor

Notas: Análise estatística realizada em cada grupo nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de tratamento. Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, com significância de $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle inflamatório (GCI)

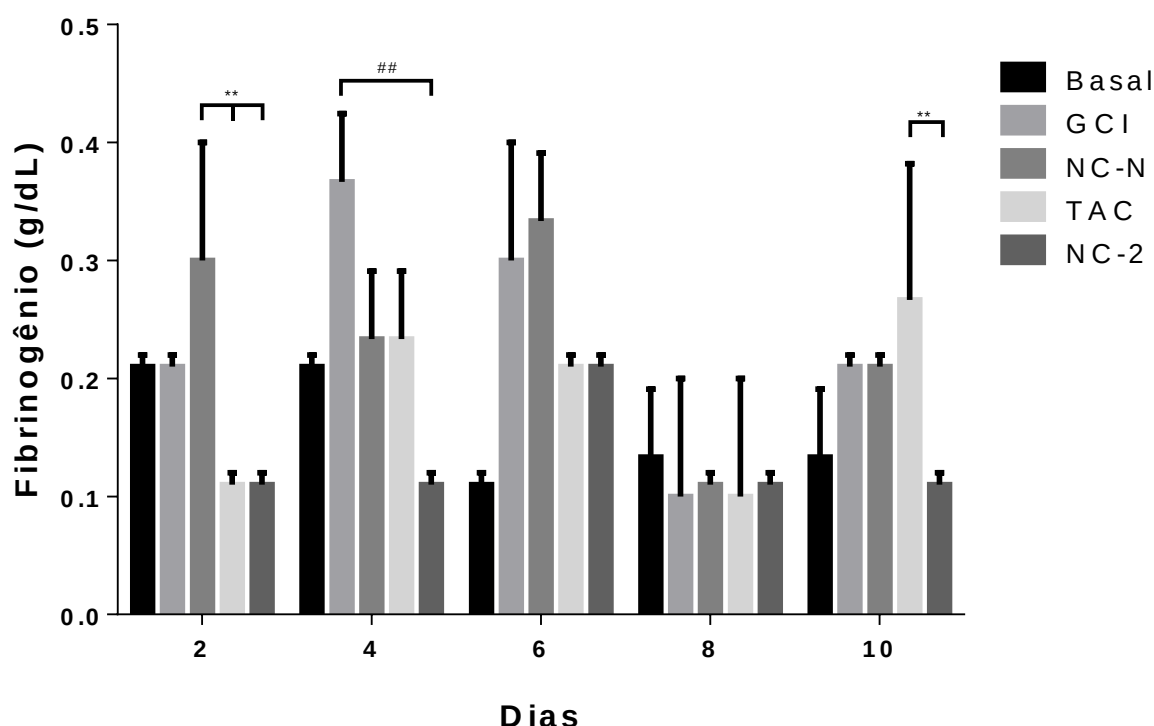
Com isso, foi possível concluir que a administração da formulação NC-2 nos camundongos com inflamação nas orelhas induzida pelo TPA não causou melhora a longo prazo no edema das orelhas, porém o mesmo é visualizado nos grupos que receberam o TAC livre.

5.5.2 Dosagem de Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática com grande variedade de atividades no sistema de hemostasia. Essa proteína é um produto de três genes FGA, FGB e FGG e é sintetizado principalmente por hepatócitos, embora a síntese extra-hepática de fibrinogênio seja observada no pulmão, rim e outros tecidos. O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda por conta de sua concentração plasmática aumentar rapidamente na presença de processos inflamatórios. Em concentrações adequadas, esta proteína suporta a inflamação controlada, permitindo até a síntese de outras proteínas, como o colágeno na derme. A síntese hepática de fibrinogênio pode aumentar em 20 vezes a partir dos níveis basais em condições de estresse severo (CARLETTO *et al.*, 2021, p. 4; ROSHAL, 2013, p. 793).

A Figura 28 representa a quantificação do fibrinogênio entre os grupos e durante os 10 dias de tratamento. Foi possível notar que a formulação NC-2 manteve valores baixos de fibrinogênio em todos os intervalos de tempo testado e forneceu um valor de fibrinogênio estatisticamente menor que do TAC puro no décimo dia. Nesse sentido, as nanocápsulas carregadas com TAC demonstraram melhor controle do fibrinogênio do que os demais grupos de tratamento.

FIGURA 28 – Efeito do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na variação do fibrinogênio sérico na inflamação em camundongos machos Balb/c induzidos por TPA



Fonte: O autor

Notas: Análise estatística realizada em cada grupo nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de tratamento. Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, com significância de **/##p < 0,01, quando comparado com o grupo controle inflamatório (GCI) ou entre o fármaco, NC-N e NC-2

A inflamação aguda é conhecida por deslocar o equilíbrio homeostático em direção a um estado pró-trombótico e antifibrinolítico em que há aumento na circulação desses mediadores. A potência do fibrinogênio como mediador inflamatório está ligado a uma capacidade de influenciar múltiplos aspectos leucocitários por meio de mecanismos diretos e indiretos. O fibrinogênio pode facilitar a transmigração de leucócitos para fora da vasculatura e induz funções efetoras dessas células, servindo como uma pista local, especialmente definida dentro do tecido danificado (LUYENDYK; SCHOENECKER; FLICK, 2019, p. 512,513).

No caso de neutrófilos, o fibrinogênio desempenha essa função por meio da modulação da geração de segundos mensageiros, produção de espécies reativas de oxigênio e adesão celular sob condições inflamatórias. Esses achados claramente demonstram que a interação leucócito-fibrinogênio pode alterar a função leucocitária e, portanto, levar a mudanças na migração celular para o tecido afetado (ALMEIDA *et al.*, 2015, p. 98).

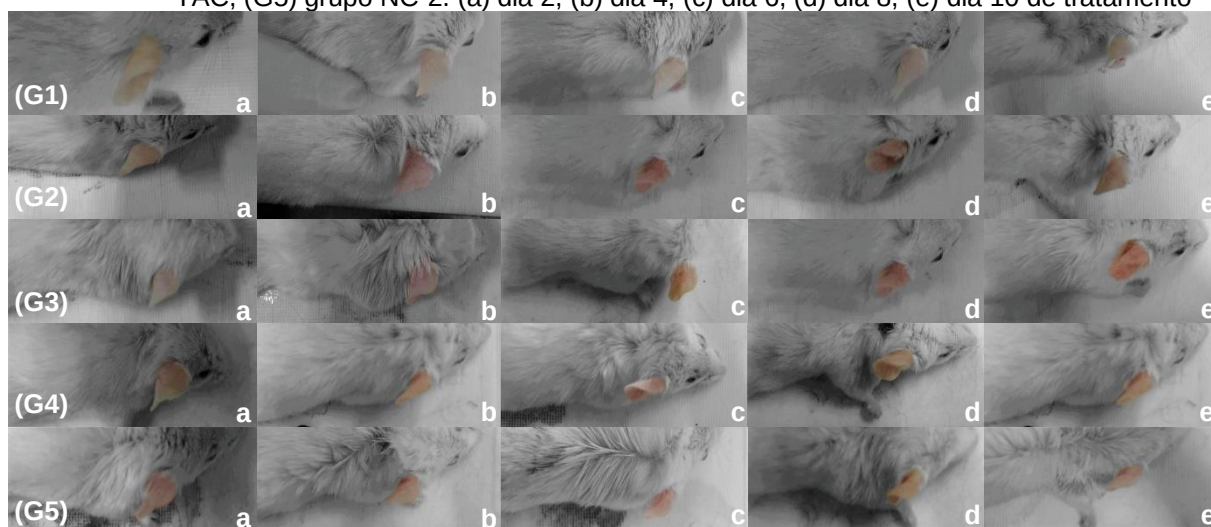
Assim, a complexidade do fibrinogênio como mediador inflamatório é ditado pela localização específica ou das interações no microambiente e o envolvimento de parceiros de ligação específicos ficando claro que a redução do fibrinogênio circulante demonstra uma redução e controle da inflamação e, conseqüentemente, do dano no tecido (LUYENDYK; SCHOENECKER; FLICK, 2019, p. 513). Com isso, foi possível concluir que as formulações de nanocápsulas poliméricas contendo TAC tiveram um melhor resultado no controle do aumento de fibrinogênio quando comparadas aos demais grupos de tratamento.

5.5.3 Efeito das Nanocápsulas Poliméricas Contendo TAC nas Análises Histopatológicas e Acúmulo de Células Inflamatórias no Modelo de Indução da Inflamação por TPA

A aplicação repetida de TPA nas orelhas dos camundongos provocam uma dermatite alérgica, resultando na infiltração de células inflamatórias como linfócitos, eosinófilos e mastócitos (SHI *et al*, 2017, p. 451). A Figura 29 demonstra a diferença subjetiva macroscópica das orelhas dos camundongos durante os diferentes dias de tratamento e dos diferentes grupos.

Foi possível notar uma diferença entre a orelha normal (grupo Basal) e a orelha inflamada (grupo GCI e NC-N) e uma diferença intermediária entre os demais grupos tratados (grupos TAC e NC-2), indicando que macroscopicamente foi possível observar uma alteração pelo tratamento com a aplicação subcutânea das formulações.

FIGURA 29 – Efeito macroscópico do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na inflamação das orelhas dos camundongos machos Balb/c ao longo dos dias. (G1) grupo basal, (G2) grupo controle inflamatório, (G3), grupo NC-N, (G4), grupo TAC, (G5) grupo NC-2. (a) dia 2, (b) dia 4, (c) dia 6, (d) dia 8, (e) dia 10 de tratamento

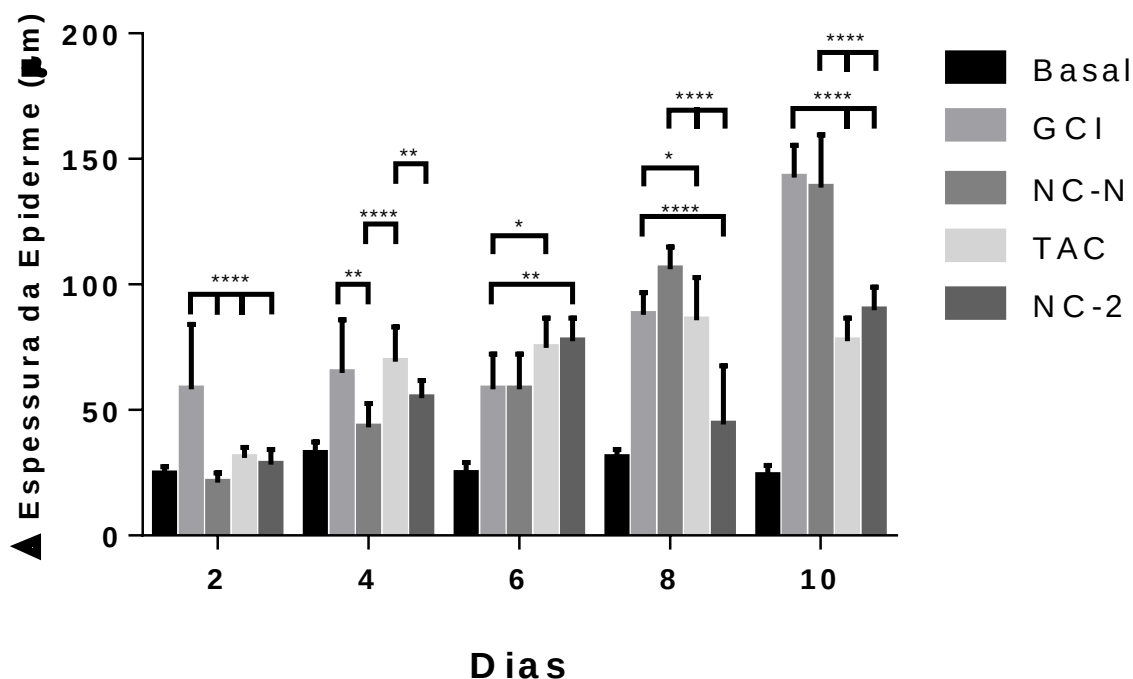


Fonte: O autor

A fim de investigar se o TAC e a formulação NC-2 influenciaram na infiltração de células inflamatórias na pele após a aplicação de TPA, secções de tecido foram coradas com HE para revelar as células e as camadas das orelhas. A Figura 30 indica a variação da espessura da epiderme nos diferentes grupos e tempos de tratamento.

Foi possível verificar que o TAC e a NC-2 apresentaram alterações estatisticamente menores na espessura da epiderme do que o grupo controle inflamatório nos dias 2, 8 e 10 de tratamento, mesmo com a agressão química do TPA. O grupo NC-2 teve uma redução significativa na espessura da epiderme do que o TAC nos dias 4 e 8, sugerindo uma melhor modulação inflamatória da formulação das nanocápsulas do que do fármaco puro. A formulação NC-N também proporcionou uma redução significativa na espessura da epiderme quando comparado ao grupo GCI nos dias 2 e 4.

FIGURA 30 – Efeito do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na variação da espessura da epiderme das orelhas de camundongos machos Balb/c induzidos por TPA



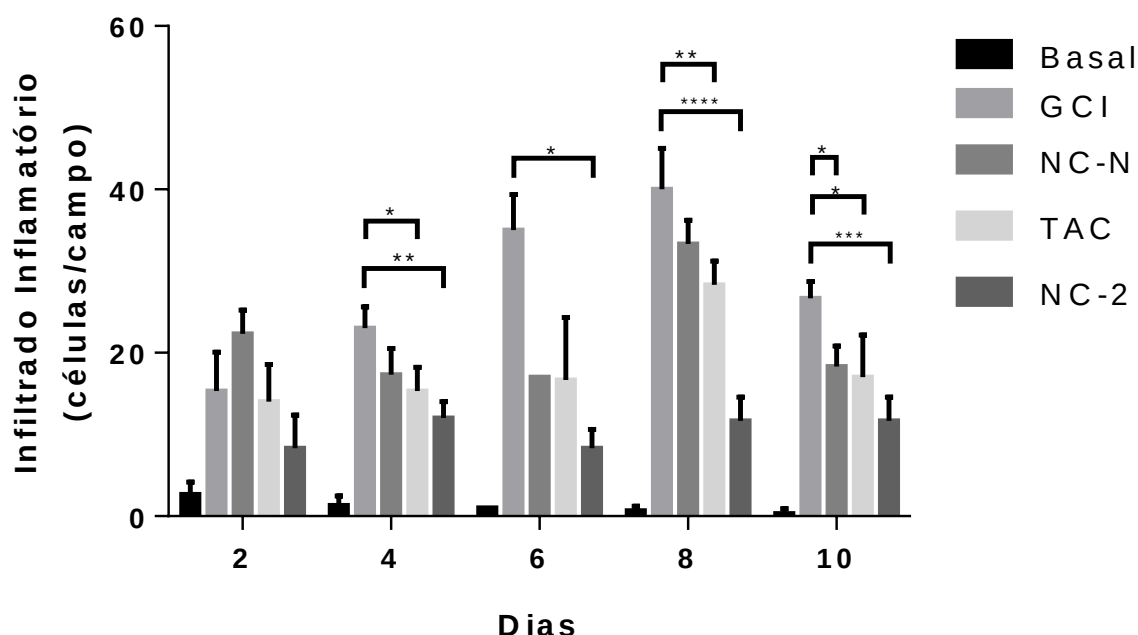
Fonte: O autor

Notas: Análise estatística realizada em cada grupo nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de tratamento. Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$, quando comparado com o grupo controle inflamatório (GCI)

Em relação ao infiltrado inflamatório (Figura 31) foi possível constatar a migração de células inflamatórias para a região dérmica da orelha nos grupos que receberam TPA indicativo da indução da dermatite. O TAC e a NC-2 suprimiram significativamente a infiltração celular nos dias 4, 8 e 10 de tratamento quando comparado com o GCI. A NC-2 também revelou uma redução significativa estatística na inflamação do que o GCI no dia 6.

Portanto, a NC-2 teve um desempenho relativamente melhor do que o fármaco livre, fornecendo um efeito anti-inflamatório possivelmente devido à liberação controlada do fármaco.

FIGURA 31 – Efeito do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na infiltração celular das orelhas de camundongos machos Balb/c induzidos por TPA



Fonte: O autor

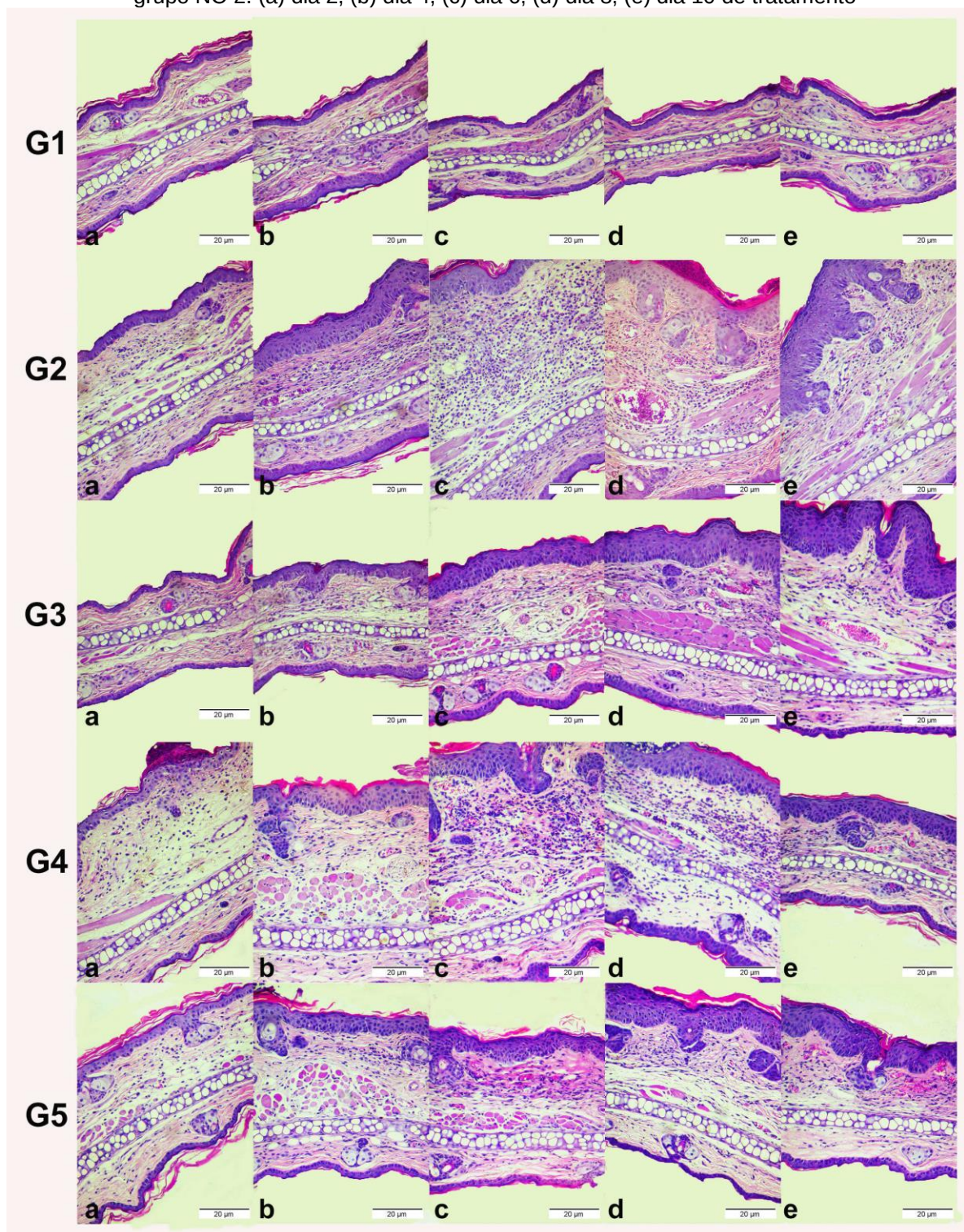
Notas: Análise estatística realizada em cada grupo nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de tratamento. Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, quando comparado com o grupo controle inflamatório (GCI)

A Figura 32 demonstra as secções histológicas das orelhas dos camundongos Balb/c machos dos diferentes grupos experimentais nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de tratamento. Esses resultados são consistentes com a análise estatística da variação da espessura da epiderme e do infiltrado inflamatório. O grupo basal não apresentou edema de orelha, enquanto o GCI revelou uma inflamação intensa e uma resposta hiperproliferativa ao TPA compatível com a AD.

A formulação NC-2 proporcionou um melhor controle da vasodilatação, da infiltração dos leucócitos polimorfonucleares no tecido da epiderme e da formação de edema do que os grupos NC-N e TAC. O grupo TAC reduziu as características histológicas inflamatórias no segundo e no décimo dia de tratamento.

Portanto, os resultados histopatológicos suportam a ideia de que a formulação NC-2 levou ao efeito *in vivo* do TAC com uma maior supressão da ativação de células T e uma redução do infiltrado inflamatório. As nanocápsulas de PCL carregadas com TAC também podem ser uma alternativa viável ao medicamento, reduzindo os efeitos adversos do TAC e melhorando a adesão dos pacientes ao tratamento (SHI *et al.*, 2017, p. 452).

FIGURA 32 – Efeito do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo ou não TAC (NC-N e NC-2) na infiltração celular das orelhas de camundongos machos Balb/c induzidos por TPA. (G1) grupo basal, (G2) grupo controle inflamatório, (G3), grupo NC-N, (G4), grupo TAC, (G5) grupo NC-2. (a) dia 2, (b) dia 4, (c) dia 6, (d) dia 8, (e) dia 10 de tratamento



Fonte: O autor

Notas: As imagens são representativas dos cortes transversais das orelhas dos camundongos coradas com HE (ampliação: 200x; escala: 20 μm)

O agente irritante TPA é um potente agente inflamatório e causador de tumor que acarreta em inflamação e uma hiperproliferação celular intensa (células T, neutrófilos e células dendríticas), eritema e alteração epidérmica, como acantose (BOSCARDIN, 2012, p. 95; GABRIEL *et al.*, 2016, p. 22). A aplicação tópica repetida de TPA induz a uma dermatite na orelha dos camundongos BALB/c, acarretando em uma resposta imune dos linfócitos T e a uma forte reação alérgica retardada que afeta na espessura da orelha dos mesmos (LI *et al.*, 2012, p. 54).

Segundo Boscardin (2012, p. 95), a resposta inflamatória cutânea causada por esse agente ocorre por vasodilatação e desenvolvimento do eritema, seguido por um aumento na espessura da orelha devido ao extravasamento de células, que alcança o pico máximo na sexta hora. Além disso, entre a quarta e sexta hora, a aderência de leucócitos polimorfonucleares à parede do vaso e a degranulação de mastócitos são observados, ocorrendo a infiltração máxima de leucócitos no tecido 24h após aplicação.

Os resultados demonstrados pelo grupo controle inflamatório (GCI) representam as características típicas de uma dermatite, como o inchaço significativo da orelha e o acúmulo de células inflamatórias (LI *et al.*, 2012, p. 54). No modelo induzido por TPA utilizado, a pele encontra-se espessada devido à hipertrofia e hiperqueratose de células epidérmicas e o aumento da concentração de células inflamatórias (YU *et al.*, 2018, p. 139). Isso indica que a reação alérgica causada por TPA é um modelo útil para avaliar os efeitos farmacológicos do TAC e das nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco. A dose escolhida para a atividade anti-inflamatória *in vivo* estava de acordo com as formas farmacêuticas tópicas convencionais a 0,1% (LI *et al.*, 2012, p. 54; SHI *et al.*, 2017, p. 451; YU *et al.*, 2018, p. 139).

Estudos indicam dois possíveis mecanismos que podem estar por trás da DA que é inibida pelas nanocápsulas de PCL contendo TAC. A primeira foi associada ao fenótipo de células T tipo 2 (Th2) e, a segunda, ao acúmulo de grande quantidade de eosinófilos, mastócitos e células dendríticas, que foram observadas na epiderme e na derme de pacientes com doenças autoimunes cutâneas (LI *et al.*, 2012, p. 54).

Kandikattu e Mishra (2018, p. 9), como já mencionado, relataram que o TAC, além para suprimir a ativação de células Th1/Th2, também suprime a degranulação de mastócitos, reduz a liberação do neurotransmissor sensorial primário, causa a dessensibilização do receptor TRPV-1, limita a produção de IL-31 e IL-33, diminui a

expressão de mRNA do receptor ST2, minimiza o comprometimento do equilíbrio TLR2/TLR1, limita a produção de periostina e reduz o prurido e a sensação de coçar na DA.

Outros estudos descritos na literatura desenvolveram diferentes sistemas de liberação controlada para o TAC. Em resumo, esses estudos demonstraram uma redução da inflamação na pele causado por doenças autoimunes, como DA e psoríase. Gabriel *et al.* (2016, p. 23) desenvolveram um hidrogel contendo TAC para o controle da psoríase e observou a diminuição do eritema cutâneo, da descamação e da espessura, indicando a eficácia do tratamento quando comparado a pomada convencional. Jain *et al.* (2019, p. 103) avaliaram o efeito de nanoformulações baseadas em lipídios e lipossomas contra psoríase e DA e verificaram maior perfil de eficácia e segurança. Yu *et al.* (2018, p. 140) prepararam nanopartículas de quitosana contendo TAC, que foram superiores a pomada convencional para o tratamento da DA. No entanto, nenhum deles desenvolveu e avaliou *in vitro* e *in vivo* nanocápsulas poliméricas para o controle da DA.

A liberação controlada de TAC em sistemas nanoestruturados e direcionados ao local desejado é imprescindível para atingir um melhor tratamento das doenças autoimunes cutâneas, como a dermatite, a psoríase, o vitiligo e outras, onde a barreira epidérmica e dérmica é espessada devido à hiperproliferação dos queratinócitos e à formação de uma placa, resultando em uma maior barreira à penetração do fármaco (LI *et al.*, 2012, p. 55).

Com isso, os resultados farmacológicos do presente trabalho demonstraram que o comportamento do TAC foi significativamente melhorado usando as nanocápsulas de PCL como um novo sistema de liberação controlada. Essa notável melhora no perfil farmacodinâmico foi alcançada por um novo nanocarreador que não requer nenhum aprimoramento físico, como oclusão ou ultrassom. Essa abordagem pode levar a uma maior adesão do paciente, principalmente quando for tratar regiões maiores do corpo. A combinação destes resultados *in vivo* com o ensaio de liberação evidencia a maior eficácia do sistema nanoparticulado proposto quando em comparação com o fármaco livre.

6 CONCLUSÕES

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

A estabilidade das nanocápsulas de PCL avaliadas por espectroscopia Raman forneceram informações relevantes sobre o processo de degradação dos sistemas. A espectroscopia foi a ferramenta adequada para explicar o mecanismo de degradação ocorrido principalmente em regiões amorfas resultando em uma maior cristalinidade do polímero. Essas formulações apresentaram estabilidade adequada até 60 dias após o preparo, podendo serem utilizadas adequadamente durante esse intervalo de tempo.

Os experimentos de liberação do fármaco mostraram uma liberação de 80% do TAC em 72 horas. A cinética de liberação foi melhor ajustada ao modelo da equação de ordem zero e o modelo Korsmeyer-Peppas demonstrou um mecanismo de liberação baseado em transporte anômalo.

O estudo de permeação evidenciou que tanto o fármaco livre como as nanocápsulas de PCL contendo TAC permaneceram retidas na membrana Strat-M® realizando o efeito tópico desejado e sem resultar em uma absorção sistêmica.

O ensaio de permeação pela espectroscopia fotoacústica revelou que o processo de encapsulação reduziu a permeação cutânea do TAC por todas as camadas da pele, melhorando a biodistribuição e acumulando a maior concentração das nanocápsulas no estrato córneo, na epiderme viável e na região dérmica.

A atividade anti-inflamatória *in vivo* das nanocápsulas carregadas com TAC revelou um melhor efeito da formulação quando comparado ao fármaco puro no controle do aumento do fibrinogênio e na diminuição da espessura da epiderme nas orelhas de camundongos Balb/c por impedirem substancialmente a hiperplasia das células induzida pelo TPA, além da redução do infiltrado inflamatório por evitarem a migração dessas células para o tecido. A análise histológica confirmou esses achados, apesar de não afetarem na espessura e no peso das orelhas.

Esses resultados desempenham um papel importante nas doenças autoimunes cutâneas, inibindo a ação imediata e crônica dessas doenças e as

reações alérgicas, resultando em melhores resultados clínicos e melhor adesão do paciente.

Com isso, as nanocápsulas de PCL carregadas com TAC podem ser usadas como uma nova terapia alternativa ao tratamento convencional das doenças autoimunes cutâneas com maior conforto e menos efeitos adversos ao paciente. A evidência atual sugere que esta formulação nanométrica melhora o efeito do TAC e tem benefícios adicionais sobre a pomada tradicional. Estas vantagens são as razões para o grande interesse e a aplicação aprimorada de nanocápsulas na área farmacêutica como carreador de fármacos e ativos cosméticos.

REFERÊNCIAS

- ABAMOR, E. S. *et al.* *Nigella sativa* oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. **IET Nanotechnology**, v. 12, n. 8, p. 1018-1026, 2018.
- ALMEIDA, V. V. de *et al.* Fibrinogen modulates leukocyte recruitment *in vivo* during the acute inflammatory response. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 59, n. 2, p. 97-106, 2015.
- AMARDEEP; BANDE, M. S.; AGARWAL, S. Validated spectrophotometric method for determination of tacrolimus in marketed formulation. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 317-321, 2012.
- ASTRATH, A. C. N. **Espectroscopia fotoacústica: determinação das taxas de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina**. 2011, 105 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2011.
- AusPAR. **Australian Public Assessment Report for Tacrolimus**. Órgão emissor: Australian Government – Department of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration. Disponível em: < https://www.tga.gov.au/ws-auspar-index?search_api_views_fulltext=tacrolimus&sort_by=field_date&sort_order=DESC&items_per_page=10>. Acesso em: 28 jan. 2022.
- BALCUCHO, J.; NARVÁEZ, D. M.; CASTRO-MAYORGA, J. L. Antimicrobial and Biocompatible Polycaprolactone and Copper Oxide Nanoparticle Wound Dressings against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1-21, 2020.
- 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.
- BAO, Q. *et al.* In vitro release testing method development for ophthalmic ointments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1-2, p. 145-156, 2017.
- BARONI, G. *et al.* Simvastatin-loaded nanocapsules reduce tnf- α expression in rat peritoneum after infusion of peritoneal dialysis solution. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 14, n. 7, p. 146-152, 2021.
- BÖER, T. M.; MARQUES, M. R.; CARDOSO, S. G. Determination of tacrolimus in pharmaceutical formulations by validated spectrophotometric methods. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 137-143, 2008.
- BOSCARDIN, P. M. D. **Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. 2012, 172 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BOSE, R. JC. *et al.* Biodegradable polymers for modern vaccine development. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 77, p. 12-24, 2019.

CALABRETTA, M. M. *et al.* Precision medicine, bioanalytics and nanomaterials: toward a new generation of personalized portable diagnostics. **Analyst**, v. 145, p. 2841-2853, 2020.

CAMARGO, G. dos A. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da eficiência de encapsulação de nanocápsulas poliméricas contendo tacrolimus**. 2020, 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2020.

CAMARGO, G. dos A. *et al.* Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, p. 103139, 2020.

CAMARGO, G. dos A. *et al.* Validation of Analytical Methods for Tacrolimus Determination in Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules and Identification of Drug Degradation Products. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 21, n. 12, p. 5920-5928, 2021.

CARLETTO, B. *et al.* Ursolic acid-loaded lipid-core nanocapsules reduce damage caused by estrogen deficiency in wound healing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, p. 111720, 2021.

CARR, W. W. Topical Calcineurin Inhibitors for Atopic Dermatitis: Review and Treatment Recommendations. **Pediatric Drugs**, v. 15, p. 303-310, 2013.

CÉSAR, A.; AZEVEDO, F.; MOTA, A. Gravidez, Aleitamento e Fármacos em Dermatologia: Tratamento Tópico. **Revista SPDV**, v. 75, n. 1, p. 19-26, 2017.

da COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15-33, 2012.

DENG, S. *et al.* Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 1-36, 2020.

DHEER, D. *et al.* Tacrolimus: An updated review on delivering strategies for multifarious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 217-227, 2018.

ESPINOZA, S. M. *et al.* Poly- ϵ -caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer.

International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, v. 69, n. 2, p. 85-126, 2019.

FARJADIAN, F. *et al.* Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. **Nanomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1-34, 2018.

FEREIG, S. A. *et al.* Tacrolimus-loaded chitosan nanoparticles for enhanced skin deposition and management of plaque psoriasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 268, p. 1-16, 2021.

FERRARI, P. C. *et al.* Hesperidin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Development and Physicochemical Properties Evaluation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 8, p. 1-11, 2019.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, R1-R4, 1989.

GABRIEL, D. *et al.* Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 16-24, 2016.

GANAPATHY, S. *et al.* Autoimmune Disorders–Immunopathogenesis and Potential Therapies. **Journal of Young Pharmacists**, v. 9, n. 1, p. 14-22, 2017.

GARCIA, M. T. J. *et al.* Alternative Methods to Animal Studies for the Evaluation of Topical/Transdermal Drug Delivery Systems. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1-13, 2018.

GOMES, M. L. S. *et al.* Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. **Materials Science & Engineering C**, v. 94, p. 694-702, 2019.

GUPTA, K. K. *et al.* Polycaprolactone composites with TiO₂ for potential nanobiomaterials: tunable properties using different phases. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 37, p. 12844-12853, 2012.

HAQ, A. *et al.* Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p. 432-437, 2018a.

HAQ *et al.* Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1-2, p. 58-64, 2018b.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters: the irritants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L. **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 31, p. 377-467, 1974.

HÉRNANDEZ-AGUILAR, C. *et al.* Photoacoustic Spectroscopy in the Optical Characterization of Foodstuff: A Review. **Journal of Spectroscopy**, v. 2019, p. 1-35, 2019.

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

JAIN, S. *et al.* Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid based Tacrolimus loaded nanoformulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, p. 96-104, 2019.

KANDIKATTU, H. K.; MISHRA, A. Immunomodulatory effects of tacrolimus (FK506) for the treatment of allergic diseases. **International Journal of Cell Biology and Physiology**, v. 1, n. 1-2, p. 5-13, 2018.

KANDIKATTU, H. K.; VENKATESHAIAH, S. U.; MISHRA, A. Synergy of Interleukin (IL)-5 and IL-18 in eosinophil mediated pathogenesis of allergic diseases. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 47, p. 83-98, 2019.

KAUR, A. *et al.* Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1-20, 2019.

KISTER, G. *et al.* Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of d,l-lactide-co-1-caprolactone by Raman spectroscopy. **Polymer**, v. 41, n. 3, p. 925-932, 2000.

KOŁODZIEJ, A. *et al.* Raman microspectroscopic investigations of polymer nanocomposites: evaluation of physical and biophysical properties. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 68, n. 1-3, p. 44-52, 2018.

KÜLKAMP, I. C. *et al.* Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484-3504, 2009.

LACOUOLONCHE, F. *et al.* Stability and In Vitro Drug Release of Flurbiprofen-Loaded Poly-ε-Caprolactone Nanospheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 9, p. 983-993, 1999.

LANGUER, R.; WEISSLEDER, R. Nanotechnology. **JAMA**, v. 313, n. 2, p. 135-136, 2015. doi: 10.1001/jama.2014.16315.

LAPTEVA, M. *et al.* Polymeric Micelle Nanocarriers for the Cutaneous Delivery of Tacrolimus: A Targeted Approach for the Treatment of Psoriasis. **Molecular pharmaceutics**, v. 11, n. 9, p. 2989-3001, 2014.

LEE, D-Y. *et al.* Recent onset vitiligo treated with systemic corticosteroid and topical tacrolimus: Need for early treatment in vitiligo. **The Journal of Dermatology**, v. 37, n. 12, p. 1057-1059, 2010.

LENZI, E. K. *et al.* Diffusion Processes and Drug Release: Capsaicinoids - Loaded Poly (ϵ -caprolactone) Microparticles. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-12, 2016.

LI, G. *et al.* Tacrolimus-loaded ethosomes: Physicochemical characterization and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 49-57, 2012.

LUYENDYK, J. P.; SCHOENECKER, J. G.; FLICK, M. J. The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. **Blood**, v. 133, n. 6, p. 511-520, 2019.

MACHADO, A. C. H. R. *et al.* Skin Penetration. In: SAKAMOTO, K. *et al.* **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**, 1 ed. Elsevier, 2017, p. 741-755.

MACENHAN, W. R. **Estudo de permeação cutânea “in vitro” de micropartículas poliméricas contendo adapaleno por espectroscopia fotoacústica**. 2018, 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

MALECIC, N.; YOUNG, H. Tacrolimus for the management of psoriasis: clinical utility and place in therapy. **Psoriasis: Targets and Therapy**, v. 6, p. 153-163, 2016.

MARADUCA, M. A. *et al.* Skin - a vast organ with immunological function (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 1, p. 18-23, 2020.

MASON, A. *et al.* Topical treatments for chronic plaque psoriasis: An abridged Cochrane Systematic Review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 5, p. 799-807, 2013.

MELO, N. F. S. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli(l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.

MOREIRA, J. V.; SILVA, S. C. M.; CREMASCO, M. A. Evaluation of carbon:nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00440, 2020.

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. *et al.* Adapalene-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles: Physicochemical characterization and in vitro penetration by photoacoustic spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1-20, 2019.

NAKAHARA, T. *et al.* Mechanistic insights into topical tacrolimus for the treatment of atopic dermatitis. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, n. 3, p. 233-238, 2017.

NEUPANE, R. *et al.* Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 1-25, 2020.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1-53, 2019.

NISHIYAMA, M.; IZUMI, S.; OKUHARA, M. Discovery and Development of FK506 (Tacrolimus), A Potent Immunosuppressant of Microbial Origin. In: MERLUZZI, V. J.; ADAMS, J. **The search for anti-inflammatory drugs: case histories from concept to clinic**. 1 ed. Basileia: Birkhäuser, 1995, p. 65-104.

OHTSUKI, M.; MORIMOTO, H.; NAKAGAWA, H. Tacrolimus ointment for the treatment of adult and pediatric atopic dermatitis: Review on safety and benefits. **Journal of Dermatology**, v. 45, n. 8, p. 936-942, 2018.

PAARAKH, M. P. *et al.* Release kinetics – concepts and applications. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 8, n. 1, p. 12-20, 2018.

PAN, W. *et al.* Combination of hydrotropic nicotinamide with nanoparticles for enhancing tacrolimus percutaneous delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4037-4050, 2016.

PARK, C. *et al.* Chlorin e6-Loaded PEG-PCL Nanoemulsion for Photodynamic Therapy and In Vivo Drug Delivery. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 16, p. 1-11, 2019.

PATEL, S. *et al.* Development and Validation of UV-Visible Spectrophotometric Method for Estimation of Tacrolimus in Bulk and Pharmaceutical Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, n. 62B, p. 238-242, 2021.

PELAZ, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. **ACSNANO**, v. 11, n. 3, p. 2313-2381, 2017.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

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.

PUBCHEM. **Tacrolimus**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tacrolimus>> Acesso em: 28 jan. 2022.

RABHA, B. *et al.* Synthesis and Characterization of Diosgenin Encapsulated Poly-ε-Caprolactone-Pluronic Nanoparticles and Its Effect on Brain Cancer Cells. **Polymers**, v. 13, n. 8, p. 1-17, 2021.

RECIO, M. C. *et al.* In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509-2518, 2000.

ROCHA, J. C. B. *et al.* Ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 587, n. 1, p. 132-136, 2007.

ROSHAL, M. Thrombin Time and Fibrinogen Determination. In: SHAZ, B. H. *et al.* **Transfusion Medicine and Hemostasis**, 2 ed. Elsevier, 2013, p. 793-798.

RUDNIK, L. A. C. *et al.* Co-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1-19, 2020.

SANTO-SILVA, A. M. dos *et al.* Self-Assembled Benznidazole-Loaded Cationic Nanoparticles Containing Cholesterol/Sialic Acid: Physicochemical Properties, In Vitro Drug Release and In Vitro Anticancer Efficacy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 1-16, 2019.

SATOLLI, F.; ROVESTI, M.; FELICIANI, C. Autoimmune Skin Disorders. In: FRANÇA, K.; LOTTI, T. **Advances in Integrative Dermatology**. 1 ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd., 2019, p. 89-102.

SAVIC, V. *et al.* Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1-2, p. 491-505, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHALM O.W.; JAIN N.C.; CARROLL W.J. **Veterinary hematology**. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 807p., 1975.

SEHN, E. *et al.* Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment. **Review of Scientific Instruments**, v. 74, n. 1, p. 758-760, 2003.

SEHN, E. *et al.* Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 115-120, 2009.

SHAFIQUE, M.; LUO, X. Nanotechnology in Transportation Vehicles: An Overview of Its Applications, Environmental, Health and Safety Concerns. **Materials**, v. 12, n. 15, p. 1-32, 2019.

SHESHALA, R. *et al.* In Vitro Drug Dissolution/Permeation Testing of Nanocarriers for Skin Application: a Comprehensive Review. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 20, p. 1-28, 2019.

SHI, C. *et al.* Drug-loaded poly (d,l-lactide-co-glycolide) microspheres as treatment for allergic contact dermatitis in mice model. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 32, n. 5, p. 445-455, 2017.

SHOUGHY, S. S. Topical tacrolimus in anterior segment inflammatory disorders. **Eye and Vision**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 2017.

SHOUGHY, S. S.; ALJASSAR, F. M.; TABBARA, K. F. Aqueous penetration of topical tacrolimus. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 17, p. 100582, 2020.

SINGHVI, G.; SINGH, M. Review: in-vitro drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 2, n. 1, p. 77-84, 2011.

SIQUEIRA, D. D. *et al.* Efeito das variáveis reacionais na síntese de um polímero biodegradável funcionalizado: PCL-g-MA. **Revista Matéria**, v. 23, n. 4, p. 1-16, 2018.

SISTI, A.; SISTI, G.; ORANGES, C. M. Effectiveness and safety of topical tacrolimus monotherapy for repigmentation in vitiligo: a comprehensive literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 2, p. 187-195, 2016.

SOUTO, E. B. *et al.* Trends in Atopic Dermatitis—From Standard Pharmacotherapy to Novel Drug Delivery Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 1-17, 2019.

TRUITE, C. V. R. *et al.* Percutaneous Penetration, Melanin Activation and Toxicity Evaluation of a Phytotherapeutic Formulation for Vitiligo Therapeutic. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 6, p. 1529-1536, 2007.

VILELA, A. P. *et al.* Effect of topical application of nanoencapsulated eugenol on dental sensitivity reduction after in-office dental bleaching: a randomized, triple-blind clinical trial. **Journal of Esthetic and restorative dentistry**, v. 33, n. 4, p. 660-667, 2021.

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.

VOJVODIC, A. *et al.* Emerging drugs for the treatment of vitiligo. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 25, n. 1, p. 1-58, 2020.

WAHLICH, J. *et al.* Nanomedicines for the delivery of biologics. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 1-14, 2019.

WAN, T. *et al.* Effects of nanoparticles with hydrotropic nicotinamide on tacrolimus: permeability through psoriatic skin and antipsoriatic and antiproliferative activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1485-1497, 2017.

WOODBY, B. *et al.* Skin Health from the Inside Out. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 235-254, 2020.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

YANG, H-J. *et al.* Modification of nanoscale polymeric adsorbent for the preparative separation and purification of tacrolimus from fermentation broth of *Streptomyces tsukubaensis*. **Journal of Chromatography A**, v. 1675, p. 1-12, 2022.

YU, K. *et al.* Tacrolimus nanoparticles based on chitosan combined with nicotinamide: enhancing percutaneous delivery and treatment efficacy for atopic dermatitis and reducing dose. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 129-142, 2018.

ZANETTI, M. *et al.* Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 198–207, 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**, v. 197, p. 478-489, 2018.

ZIDAN, A. S. *et al.* Crystallinity evaluation of tacrolimus solid dispersions by chemometric analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 341-350, 2012.

APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

CAMARGO, G. dos A.; FERREIRA, L.; SCHEBELSKI, D. J.; LYRA, A. M.; BARBOZA, F. M.; CARLETTO, B.; KOGA, A. Y.; SEMIANKO, B. C.; DIAS, D. T.; LIPINSKI, L. C.; NOVATSKI, A.; RAMAN, V.; MANFRON, J.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V. Characterization and In Vitro and In Vivo Evaluation of Tacrolimus-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules for the Management of Atopic Dermatitis. *Pharmaceutics*, v.13, 2021.



pharmaceutics



Article

Characterization and In Vitro and In Vivo Evaluation of Tacrolimus-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules for the Management of Atopic Dermatitis

Guilherme dos Anjos Camargo ¹, Leandro Ferreira ¹, Diego José Schebelski ¹, Amanda Martinez Lyra ¹, Fernanda Malaquias Barboza ¹, Bruna Carletto ¹, Adriana Yuriko Koga ¹, Betina Christi Semianko ², Daniele Toniolo Dias ², Leandro Cavalcante Lipinski ³, Andressa Novatski ^{3,4}, Vijayasankar Raman ⁵, Jane Manfron ¹, Jessica Mendes Nadal ¹ and Paulo Vitor Farago ^{1,*}

CAMARGO, G. dos A.; COSTA FILHA, A. R. C. da; LYRA, A. M.; NOVATSKI, A.; NADAL, J. M.; DE LARA, L. S.; DIAS, D. T.; NASCIMENTO, E. A. do; ROCHA SILVA, U.; JACINTO, C.; FARAGO, P. V. Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v.110, p.103139 - , 2020.

Vibrational Spectroscopy 110 (2020) 103139



Contents lists available at ScienceDirect

Vibrational Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vibspec



Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy



Guilherme dos Anjos Camargo ^a, Amanda Roderjan Cray da Costa Filha ^a, Amanda Martinez Lyra ^a, Andressa Novatski ^{b,d,*}, Jessica Mendes Nadal ^a, Lucas Stori de Lara ^b, Daniele Toniolo Dias ^c, Elizangela Anazilda do Nascimento ^d, Uéslen Rocha Silva ^d, Carlos Jacinto ^d, Paulo Vitor Farago ^a

CAMARGO, G. A.; LYRA, A. M.; BARBOZA, F. M.; FIORIN, B. C.; BELTRAME, F. L.; NADAL, J. M.; NOVATSKI, A.; FARAGO, P. V. Validation of Analytical Methods for Tacrolimus Determination in Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules and Identification of Drug Degradation Products. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.21, p.5880 - 5888, 2021.



Copyright © 2021 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Article

*Journal of
Nanoscience and Nanotechnology*
Vol. 21, 1–9, 2021
www.aspbs.com/jnn

Validation of Analytical Methods for Tacrolimus Determination in Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules and Identification of Drug Degradation Products

Guilherme A. Camargo¹, Amanda M. Lyra¹, Fernanda M. Barboza¹, Barbara C. Fiorin², Flávio L. Beltrame¹, Jessica M. Nadal^{1,*}, Andressa Novatski³, and Paulo V. Farago¹

¹Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 84010-330 Ponta Grossa – PR, Brazil

²Department of Chemistry, State University of Ponta Grossa, 84010-330 Ponta Grossa – PR, Brazil

³Department of Physics, State University of Ponta Grossa, 84010-330 Ponta Grossa – PR, Brazil

MARCOVICZ, C.; **CAMARGO, G. dos A.**; SCHARR, B.; SENS, L.; LEVANDOWSKI, M. N.; ROZADA, T. de C.; CASTELLEN, P.; INABA, J.; DE OLIVEIRA, R. N.; MINÉ, J. C.; CORRÊA, S. de A. P.; ALLEGRETTI, S. M.; FIORIN, B. C. Schistosomicidal Evaluation of Synthesized Bromo and Nitro Chalcone Derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v.1258, p.132647 - , 2022.

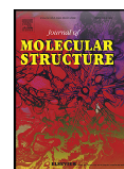
[Journal of Molecular Structure 1258 \(2022\) 132647](#)



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstr



Schistosomicidal evaluation of synthesized bromo and nitro chalcone derivatives



Camila Marcovicz^a, Guilherme dos Anjos Camargo^a, Bianca Scharr^a, Larissa Sens^a, Mariana Negrelli Levandowski^a, Thiago de Castro Rozada^a, Patrícia Castellen^a, Juliana Inaba^a, Rosimeire Nunes de Oliveira^{b,d,*}, Júlio César Miné^c, Sheila de Andrade Penteadó Corrêa^d, Silmara Marques Allegretti^d, Barbara Celânia Fiorin^{a,*}

BARONI, G.; FERRONATTO, M. F.; **CAMARGO, G. dos A.**; LYRA, A. M.; RECHE, P. M.; NADAL, J. M.; NOVATSKI, A.; LIPINSKI, L. C.; FARAGO, P. V. Simvastatin-loaded nanocapsules reduce $\text{tnf-}\alpha$ expression in the rat peritoneum after infusion of peritoneal dialysis solution. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v.14, p.146 - 152, 2021.

ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH



Vol 14, Issue 7, 2021

Online - 2455-3891
Print - 0974-2441

Research Article

SIMVASTATIN-LOADED NANOCAPSULES REDUCE TNF- α EXPRESSION IN RAT PERITONEUM AFTER INFUSION OF PERITONEAL DIALYSIS SOLUTION

GILBERTO BARONI^{1*}, MYLENA FERNANDA FERRONATTO¹, GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO², AMANDA MARTINEZ LYRA², PÉRICLES MARTIM RECHE¹, JESSICA MENDES NADAL¹, ANDRESSA NOVATSKI¹, LEANDRO CAVALCANTE LIPINSKI¹, PAULO VITOR FARAGO¹

¹Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Parana, Brazil. ²Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Parana, Brazil. Email: gbaroninefro@gmail.com

BARBOZA, F. M.; **CAMARGO, G. A.**; LYRA, A.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V. A simple and fast RP-UHPLC-PDA method for determination of isradipine from polymeric nanocapsules. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.13, p.225 - 229, 2020.

ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH



Vol 13, Issue 8, 2020

Online - 2455-3891
Print - 0974-2441

Research Article

A SIMPLE AND FAST RP-UHPLC-PDA METHOD FOR DETERMINATION OF ISRADIPINE FROM POLYMERIC NANOCAPSULES

FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA, GUILHERME DO ANJOS CAMARGO, AMANDA MARTINEZ LYRA, JESSICA MENDES NADAL, PAULO VITOR FARAGO*

Laboratory of Drug Development and Industrial Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Ponta Grossa, Parana, Brazil. Email: pvfarago@gmail.com

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/Process CEUA: 0069285

Protocolo UEPG: 19.000005443-9

Título: Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* com modelo de edema de orelha em camundongos: nanocápsulas de tacrolimus e óleo essencial de *Eucalyptus terebinthifolius*

Interessado: Prof. Paulo Vitor Farago

e-mail: pvfarago@gmail.com

Data de Entrada: 11/06/2019

Resultado: Aprovado

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCAs), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 84 camundongos (*Mus musculus*) BALB/c, de 2 a 3 meses de idade, para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 14 de setembro de 2019

Profa. Dra. Luciana da Silva Leal Karolewski
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG



Documento assinado eletronicamente por Luciana da Silva Leal Karolewski, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP, em 14/09/2019, às 19:10, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 0069285 e o código CRC E190ECB4.