

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIEDEMATOGÊNICA E IMUNOSSUPRESSORA DE  
TACROLIMUS ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO COM DIFERENTES  
PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE**

**ROSSANA BARCELLOS FRIEDRICH**

**Porto Alegre, 2013.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIEDEMATOGÊNICA E IMUNOSSUPRESSORA DE  
TACROLIMUS ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO COM DIFERENTES  
PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE**

Tese apresentada por **Rossana Barcellos  
Friedrich** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Adriana Raffin Pohlmann

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2013.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13.06.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Christianne Salbego  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre José Macedo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Barcellos Friedrich, Rossana  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIEDEMATOGÊNICA E  
IMUNOSSUPRESSORA DE TACROLIMUS ENCAPSULADO EM  
NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO COM DIFERENTES  
PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE / Rossana Barcellos  
Friedrich. -- 2013.  
188 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.  
Coorientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2013.

1. Tacrolimus. 2. Nanocápsulas de núcleo lipídico.  
3. Avaliação farmacodinâmica. I. Raffin Pohlmann,  
Adriana, orient. II. Carlos Ruver Beck, Ruy,  
coorient. III. Título.

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira CRB10/480

***Aos meus pais, Sandra e Mauro, pelos ensinamentos, amor e apoio incondicional.***

***Aos meus irmãos, Gustavo e Luciana, pela amizade e incentivo constante.***



## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra Adriana R. Pohlmann pela oportunidade concedida, orientação e confiança. Sobretudo, aos ensinamentos transmitidos e ao exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ruy C. R. Beck, pela coorientação, estímulo, disponibilidade e exemplo de profissional demonstrado no decorrer destes anos de trabalho.

À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres pelo apoio, confiança e colaborações científicas.

À Profa. Dra. Sandra H. Farsk, da USP, e às suas alunas Carine e Ana Lúcia pela receptividade e importantes colaborações científicas.

Ao Programa e ao corpo docente de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela realização deste trabalho e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas e amigos do laboratório K204 e 405 pelos bons momentos de convivência e troca de experiências: Tainá, Fernanda, Catiúscia, Eduardo, Luana, Cristina, Stela, Tathiana, Tatiele, Noé, Márcia, Karine, Manoel, Lucas, Frantiescoli, Ana Carolina, Ana Luiza, Renata, Karina, Denise, Kelly B., Cássia, Diego, Dileusa, Júlia, Tiago, Cláudia, Paula, Aline e Gabriele.

Em especial, à Márcia Fontana e ao Manoel Ortiz pela amizade e auxílios sempre prestados.

Ao amigo Francisco Noé Fonseca pela prestatividade, valiosas contribuições e momentos de discussão científica.

À Karine Coradini pela amizade, apoio, cumplicidade e importantes contribuições.

Ao amigo, colega e namorado Frantiescoli Dimer pelo companheirismo, paciência, carinho e seu inestimável auxílio.

Aos meus pais, Sandra e Mauro, pelos ensinamentos, apoio e formação que me propiciaram.

Aos meus irmãos, Gustavo e Luciana, pelo carinho, amizade e incentivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, PRONEM/FAPERGS-CNPq, PRONEX/FAPERGS-CNPq, INCT\_if CNPq, Rede Nanobiotec CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.



## APRESENTAÇÃO

A presente tese encontra-se estruturada na forma de capítulos, visando uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos, dividindo-se, então, da seguinte forma:

- Introdução geral;
- Objetivos, geral e específicos;
- Revisão de Literatura;
- Capítulo 1: Avaliação do efeito da nanoencapsulação do tacrolimus em modelo de artrite reumatóide induzida por adjuvante completo de Freund;
- Capítulo 2: Avaliação da atividade imunossupressora de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus após administração oral e intraperitoneal em camundongos;
- Capítulo 3: Avaliação da atividade imunossupressora do tacrolimus presente em nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimentos aniônico e catiônico após administração oral em camundongos;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	21
OBJETIVOS .....	27
1 OBJETIVO GERAL .....	29
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
REVISÃO DE LITERATURA .....	31
1 TACROLIMUS .....	33
2 NANOTECNOLOGIA .....	36
2.1 Nanopartículas poliméricas .....	37
2.2 Polissorbato 80 como material de revestimento de nanopartículas poliméricas .....	40
2.3 Aplicações da quitosana como material de revestimento ou formação de nanopartículas .....	43
2.4 Administração intraperitoneal de nanopartículas .....	46
2.5 Administração oral de nanopartículas .....	47
CAPÍTULO 1 : Avaliação do efeito da nanoencapsulação do tacrolimus em modelo de artrite reumatóide induzida por adjuvante completo de Freund.....	55
CAPÍTULO 2 : Nanoencapsulação de tacrolimus em nanocápsulas de núcleo lipídico mostrou atividade imunossupressora similar após administração oral e intraperitoneal.....	79
CAPÍTULO 3 : Avaliação da atividade imunossupressora do tacrolimus presente em nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimentos aniônico e catiônico após administração oral em camundongos.....	117
DISCUSSÃO GERAL .....	147
CONCLUSÕES .....	161
REFERÊNCIAS .....	165
ANEXO.....	183
BIOGRAFIA.....	185



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do tacrolimus.....	34
Figura 2 - Método de precipitação de polímero pré-formado empregado na preparação de nanopartículas poliméricas.....	39
Figura 3 - Desenho representativo da organização supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico.....	40
Figura 4 - Estrutura química do polissorbato 80.....	41
Figura 5 - Estrutura química da quitosana.....	43
Figura 1.1 - Análises de difratometria de laser de B-LNC <sup>3,7</sup> (linha verde) e TAC-LNC <sup>3,7</sup> (linha vermelha).....	70
Figura 1.2 - Gráfico de concentração vs. tamanho de partículas obtido por NTA (a), gráfico em 3D, tamanho vs. intensidade vs. concentração (b) e fotograma de vídeo (c) para TAC-LNC <sup>3,7</sup> .....	72
Figura 1.3 - Fotomicrografias de TAC-LNC <sup>3,7</sup> em diferentes magnitudes, 150.000 x; barra = 200 nm (a) e 500.000 x; barra = 50 nm (b).....	73
Figura 1.4 - Imagens representativas dos perfis de $\Delta$ BS para B-LNC <sup>3,7</sup> (a) e TAC-LNC <sup>3,7</sup> (b).....	73
Figura 1.5 - Perfis de liberação de TAC-EtOH (quadrado) e TAC-LNC <sup>3,7</sup> (losango) usando o método de membranas de diálise.....	74
Figura 1.6 - Efeito da nanoencapsulação do TAC sobre o edema induzido pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos.....	75
Figura 1.7 - Concentrações séricas de creatinina (mg/dL) e glicose (mg/mL) encontradas para animais que não receberam CFA nem qualquer tipo de tratamento (grupo Naive) e para os animais que receberam CFA tratados com as formulações controle (Salina, Veículo e B-LNC <sup>3,7</sup> ) e formulações contendo tacrolimus (TAC-solução e TAC-LNC <sup>3,7</sup> ).....	78
Figure 2.1 - Laser diffraction analysis of the TAC-LNC based on the volume of particles (n = 3).....	98
Figure 2.2 - TAC-LNC 2D and 3D distributions: cumulative counts vs. particle size (a), cumulative counts vs. relative intensity vs. particle size (b).....	100
Figure 2.3 - TEM photomicrographs of TAC-LNC sample (bar = 200 nm) (a) and (bar = 50 nm) (b).....	100

Figure 2.4 - In vitro release profiles of tacrolimus from the dialysis of TAC-LNC (triangle) and TAC-EtOH (square) (n = 3).....	103
Figure 2.5 - Percent peripheral lymphocyte count (mean $\pm$ SEM) by i.p. (a) and oral (b) routes at time 0, 5 and 10 days.....	105
Figure 2.6 - Body weights of mice (mean $\pm$ SEM) during i.p. (a) and oral (b) treatments at time 0, 5 and 10 days.....	109
Figura 3.1 - Perfil de distribuição granulométrica das formulações antes (a) e após adição de diferentes volumes de solução de quitosana (b e c).....	132
Figura 3.2 - Perfis de distribuição de tamanho obtidos por PCS considerando o cálculo percentual por intensidade, volume e número de TAC-LNC <sup>-</sup> (a, b e c) e TAC-LNC <sup>+</sup> (d, e e f).....	133
Figura 3.3 - Comportamento newtoniano apresentado pelas suspensões TAC-LNC <sup>+</sup> (quadrado) e TAC-LNC <sup>-</sup> (losango).....	135
Figura 3.4 - Perfil de Delta Backscattering ( $\Delta B$ ) de TAC-LNC <sup>-</sup> (a) e TAC-LNC <sup>+</sup> (b) durante análise de 60 minutos com varreduras a cada 5 minutos.....	125
Figura 3.5 - Gráficos representativos da intensidade versus tamanho de partícula (a e c) e concentração versus tamanho de partícula (b e d) obtidos a partir da análise por NTA para formulações TAC-LNC <sup>-</sup> (a e b) e TAC-LNC <sup>+</sup> (c e d).....	135
Figura 3.6 - Fotomicrografias de TAC-LNC <sup>-</sup> (a e b) e TAC-LNC <sup>+</sup> (c e d) em diferentes magnitudes, 150.000 x; barra = 200 nm (a e c) e 500.000 x; barra = 50 nm (b e d).....	137
Figura 3.7 - Perfis de liberação de TAC-D, TAC-D-Q, TAC-LNC <sup>-</sup> e TAC-LNC <sup>+</sup> em pH 7,0 (a) e pH 4,0 (b).....	140
Figura 3.8 - Número percentual de linfócitos (média $\pm$ EPM) após administração oral nos tempos 0, 5 e 10 dias das formulações.....	142
Figura 3.9 - Acompanhamento do peso corporal dos animais antes de qualquer tratamento (tempo 0) e após 5 e 10 dias de administração das formulações.....	143
Figura 3.10 - Parâmetros bioquímicos obtidos após os 10 dias de tratamento.....	147
Figura 6 - Perfis de liberação de TAC-LNC <sup>3,7</sup> (losango) e TAC-LNC (triângulo) pelo método de membrana de diálise.....	154
Figura 7 - Modelos de distribuição do fármaco sugeridos para TAC-LNC <sup>3,7</sup> (cap. 1) e TAC-LNC (cap. 2).....	155

Figura 8 - Resultados do número percentual de linfócitos (média  $\pm$  EPM) obtidos para TAC-LNC (cap. 2) e TAC-LNC<sup>+</sup> (cap. 3) na concentração de 6,0 mg/kg/dia após administração oral em camundongos.....161





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos que abordam sistemas de liberação para TAC.....	53
Tabela 1.1 - Distribuição granulométrica, diâmetros geométrico $[Dv_{(4,3)}]$ e mediano $[Dn_{(0,5)}]$ determinados difratometria de laser.....	71
Tabela 1.2 - Tamanho médio de partícula (z-average) e PDI determinados por PCS, potencial zeta por mobilidade eletroforética, teor e EE do fármaco por CL e pH por potenciometria.....	71
Table 2.1 - Design of experimental groups of the animal model.....	96
Table 2.2 - Laser diffraction analysis, particle diameters and specific surface area..	98
Table 2.3 - Average particle size and polydispersity index (PDI) determined by photon correlation spectroscopy (PCS), zeta potential by electrophoretic mobility, drug content and encapsulation efficiency by HPLC and pH by potentiometry.....	99
Table 2.4 - Serum levels of biomarkers (mean $\pm$ SEM) in CF1 mice after 10 days of administration of the formulations by oral or i.p. routes.....	110
Tabela 3.1 - Estudo de pré-formulação: concentração/volume de solução quitosana utilizadas para o revestimento das LNC-L-P80.....	124
Tabela 3.2 Distribuição granulométrica, diâmetros geométrico $[Dv_{(4,3)}]$ e mediano $[Dn_{(0,5)}]$ obtidos por difratometria de laser.....	133
Tabela 3.3 - Caracterização físico-química (média $\pm$ DP) das nanocápsulas de núcleo lipídico sem revestimento (B-LNC <sup>-</sup> e TAC-LNC <sup>-</sup> ) e com revestimento catiônico (LNC <sup>+</sup> e TAC-LNC <sup>+</sup> ).....	134
Tabela 3.4 - Dados de diâmetro, polidispersão e número de partículas/mL obtidos a partir de análises de NTA das formulações não revestidas (B-LNC <sup>-</sup> e TAC-LNC <sup>-</sup> ) e revestidas com quitosana (B-LNC <sup>+</sup> e TAC-LNC <sup>+</sup> ) (n = 3).....	137
Tabela 3.5 - Valores de $K$ , $r$ , MSC e $t_{1/2}$ obtidos após modelagem monoexponencial de todas as formulações; valores de $J$ calculados de acordo com a 1ª lei de Fick e valores de $n$ , $r$ e MSC obtidos após aplicação do modelo Korsmeyer-Peppas somente para as LNC.....	141



## RESUMO

Este trabalho centrou-se no desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus com revestimentos não iônico de polissorbato 80, aniônico de lecitina e catiônico de quitosana para posterior avaliação *in vivo* das atividades antiedematogênica e imunossupressora das formulações. As suspensões foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado utilizando a poli( $\epsilon$ -caprolactona) como polímero biodegradável. Para obtenção das nanocápsulas de núcleo lipídico de superfície catiônica, a lecitina foi adicionada à fase orgânica das suspensões e o revestimento procedeu-se por meio da incubação das partículas em solução aquosa de quitosana. De forma geral, todas as formulações apresentaram distribuição monomodal de partículas apenas na faixa nanométrica e baixa polidispersão. Os valores de potencial zeta obtidos para as formulações não iônicas e aniônicas foram negativos, enquanto que para as formulações catiônicas foram positivos. O teor de fármaco foi próximo ao teórico (0,6 ou 0,8 mg/mL) com alta eficiência de encapsulação (> 99%) e os estudos de liberação *in vitro* mostraram perfis de liberação sustentada do tacrolimus com mecanismo de transporte anômalo para todas as formulações. Além disso, as suspensões apresentaram estabilidade física adequada por meio de análises de retroespalhamento de luz e partículas de formato esferoide por microscopia eletrônica de transmissão. No modelo de artrite reumatóide induzida por adjuvante completo de Freund, o tacrolimus encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80 mostrou atividade antiedematogênica superior ao fármaco em solução na dose de 2,0 mg/kg/dia, após administração intraperitoneal das formulações em ratos Wistar. Para avaliar o potencial de nanocápsulas de núcleo lipídico em aumentar a eficácia imunossupressora do tacrolimus pela via oral, realizou-se um estudo com camundongos CF1, o qual foi conduzido em duas etapas. Primeiramente, buscando avaliar o efeito da nanoencapsulação independente da barreira gastrointestinal, o fármaco em solução ou nanoencapsulado foi administrado pela via intraperitoneal nas doses de 4,0 e 6,0 mg/kg/dia, durante 10 dias. Nos tempos 0, 5 e 10 dias, amostras de sangue foram coletadas para posterior contagem do número percentual de linfócitos. Os resultados mostraram que o tacrolimus nanoencapsulado provocou maior redução linfocitária na dose de 4,0 mg/kg/dia em relação ao fármaco livre, enquanto que na dose de 6,0

mg/kg/dia, o efeito farmacodinâmico foi similar para o tacrolimus em solução ou nanoencapsulado. Continuando o estudo, as formulações foram administradas nas doses de 6,0 e 10,0 mg/kg/dia pela via oral e os resultados mostraram que o fármaco em solução na dose de 6,0 mg/kg/dia não apresentou efeito sobre o número percentual de linfócitos durante todo o experimento, enquanto que na dose de 10,0 mg/kg/dia, o efeito da solução foi observado somente no último dia de tratamento. Quando o fármaco foi nanoencapsulado, a redução linfocitária foi significativa nas duas doses testadas (6,0 e 10,0 mg/kg/dia), a qual se iniciou no quinto dia e manteve-se até o final do experimento. Em uma análise comparativa, somente dos grupos tratados com as formulações na mesma dose (6,0 mg/Kg/dia), pelas diferentes vias de administração, observou-se que os animais tratados com o fármaco livre apresentaram diferença na redução linfocitária entre as vias oral e intraperitoneal, enquanto que os animais tratados com as nanocápsulas núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80 apresentaram equivalência farmacodinâmica entre as vias de administração avaliadas. Nesse mesmo estudo, constatou-se que as nanocápsulas na dose de 6,0 mg/kg/dia evitaram o aumento das concentrações séricas de glicose após administração oral das formulações. Prosseguindo com o mesmo modelo animal e buscando estudar a influência do tipo de revestimento das partículas (não iônico e catiônico) após administração oral do tacrolimus, foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com lecitina e polissorbato 80 revestidas ou não com quitosana. As formulações foram administradas na dose de 6,0 mg/kg/dia e os resultados mostraram maior redução do número percentual de linfócitos para os animais tratados com a formulação de superfície catiônica, a qual provocou efeito imunossupressor já no quinto dia de tratamento enquanto que a formulação aniônica mostrou efeito somente no décimo dia. Os animais tratados com a dispersão do fármaco que continha quitosana não apresentaram redução do número de linfócitos durante o experimento. Além disso, a formulação catiônica foi a única capaz de evitar alterações nas concentrações séricas de glicose, creatinina e fosfatase alcalina dos animais. O conjunto destes estudos demonstra que as nanocápsulas de núcleo lipídico apresentam-se como uma estratégia tecnológica promissora, visando o aumento da eficácia farmacológica e redução de efeitos adversos do tacrolimus.

**Palavras-chave:** tacrolimus, nanocápsulas de núcleo lipídico, revestimento, avaliação farmacodinâmica.

## ABSTRACT

This work was based on the development of tacrolimus-loaded lipid-core nanocapsules employing the nonionic polysorbate 80, anionic lecithin and cationic chitosan coatings aiming the *in vivo* evaluation of antiedematogenic and immunosuppressive activities. The suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer using the poly( $\epsilon$ -caprolactone) as biodegradable polymer. In order to obtain the lipid-core nanocapsules with cationic surface, lecithin was added to the organic phase of the suspensions and the coating proceeded through the incubation of the particles in aqueous solutions of chitosan. In general, all formulations showed unimodal size distributions only at nanoscale and low polydispersity. The zeta potential values obtained for the nonionic and anionic formulations were negative whereas for the cationic formulations were positive. The drug contents were close to the theoretical values (0.6 or 0.8 mg mL<sup>-1</sup>) with high encapsulation efficiency (> 99%). The colloidal suspensions presented appropriate physical stability by light backscattered analysis and spheroid shaped particles by transmission electron microscopy. Moreover, drug release studies using the dialysis bag method showed sustained release profiles of tacrolimus with anomalous transport mechanism for all formulations. In the Freund's complete adjuvant-induced arthritis model, the tacrolimus-loaded lipid-core nanocapsules coated with polysorbate 80 showed higher antiedematogenic activity compared to the drug in solution after intraperitoneal administration of 2.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> in Wistar rats. Proceeding the work, a study using CF1 mice was conducted to evaluate the potential of lipid-core nanocapsules in increasing the immunosuppressive efficacy of tacrolimus. The first evaluation was carried out to determine the influence of encapsulation of tacrolimus on the pharmacodynamic effect of the drug, independently of the oral absorption barrier. In this case, the tacrolimus-loaded lipid-core nanocapsules were compared to the drug in solution after intraperitoneal administration at 4.0 and 6.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>. Blood samples were collected at times 0, 5 and 10 days for subsequent determination of lymphocytes count percent. The results showed that drug nanoencapsulation caused greater reduction lymphocyte count (%) at the dose of 4.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> compared to tacrolimus free, whereas at the dose of 6.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, the pharmacodynamic effect was similar for drug encapsulated or nonencapsulated. Continuing the study, the formulations were

administered by oral route at 6.0 and 10.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>. The results showed that the treatment with free drug at 6.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> led to no significant difference in lymphocytes percent during the whole experiment while the treatment with drug in solution at 10.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> caused exclusively a significant decrease after 10 days. On the other hand, after 5 days of treatment with tacrolimus-loaded lipid-core nanocapsules at both doses of 6.0 and 10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> had caused significant decreases in lymphocyte count (%); and the pharmacodynamic effect continued until the end of the experiment. In a comparative analysis only those groups treated with the formulations at the same dose (6.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), the animals treated with the tacrolimus solution showed different percent reduction in lymphocyte between oral and intraperitoneal routes whereas the animals treated with the lipid core nanocapsules coated with polysorbate 80 showed equivalent pharmacodynamic effect among the administration routes evaluated. The influence of particle coatings (cationic and nonionic) after oral administration of tacrolimus was also investigated using the same animal model. For this, lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin uncoated (anionic) or coated with chitosan were developed. The formulations were administered at the dose of 6.0 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and the results showed higher reduction in lymphocytes count percent for the formulation of cationic surface, which caused immunosuppressive effect on the fifth day while uncoated formulation showed the immunosuppressive effect only on the tenth day. The animals treated with the drug dispersion containing chitosan showed no reduction in lymphocytes count (%) during the experiment. Moreover, the formulation of lipid-core nanocapsules with cationic surface was the unique able to prevent alterations in serum levels of glucose, creatinine and alkaline phosphatase. This set of studies showed that the lipid-core nanocapsules are a promising technology strategy aiming at increasing of the pharmacological efficacy and reduction of adverse effects of tacrolimus.

**Keywords:** tacrolimus, lipid-core nanocapsules, coating, pharmacodynamic evaluation.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---





O tacrolimus (TAC) é um macrolídeo imunossupressor muito utilizado por via oral e intravenosa na terapia do transplante de órgãos (TAYLOR et al., 2005) e em preparação tópica para o tratamento de desordens cutâneas de natureza autoimune, como dermatite atópica (NAKAGAWA, 2006) e vitiligo (XU et al., 2009). Além disso, alguns estudos clínicos têm demonstrado eficácia e segurança da utilização do tacrolimus para o tratamento de doenças inflamatórias do cólon (BENSON et al., 2008) e da artrite reumatoide (KAWAI et al., 2006; DUTTA; AHMAD, 2011). Entretanto, após administração oral, o fármaco apresenta biodisponibilidade baixa e altamente variável devido ao seu intenso metabolismo pré-sistêmico via citocromo P450 3A, baixa solubilidade aquosa e ao efluxo mediado pela glicoproteína-P (P-gp). Vários efeitos adversos estão relacionados à utilização deste fármaco, especialmente disfunção renal, distúrbios neurológicos e efeitos diabetogênicos (GARCIA et al., 2004; AKIMOTO et al., 2008). Além disso, vale destacar o risco de anafilaxia após administração intravenosa devido à presença do óleo de rícino hidrogenado na formulação comercial (TATETSU et al., 2003). Desta forma, a grande variabilidade inter e intraindividual na biodisponibilidade e no perfil farmacocinético, juntamente com alta incidência de efeitos adversos tornam necessário o constante monitoramento farmacocinético e farmacodinâmico do tacrolimus, como forma de garantir o efeito imunossupressor e prevenir os efeitos tóxicos (GARCIA et al., 2004; BARRACLOUGH et al., 2010).

Formulações de base nanotecnológica como suspensões de nanocápsulas, de nanoesferas ou nanoemulsões, dentre outros sistemas nanoestruturados, têm despertado grande interesse como potenciais produtos na terapêutica atual (DU TOIT et al., 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010). Estas formulações são definidas como sistemas carreadores de fármacos que apresentam perfil granulométrico homogêneo, monomodal e inferior a 1  $\mu\text{m}$  (SCHAFFAZICK et al., 2003). Em relação aos sistemas convencionais, vários estudos têm demonstrado as potencialidades dos sistemas nanoparticulados em aumentar a biodisponibilidade, a eficácia terapêutica e reduzir efeitos adversos de fármacos (ITALIA et al., 2009), além de proporcionarem um aumento da capacidade de fármacos em atravessar barreiras biológicas (FROZZA et al., 2010). Aliado a estes fatos, esses sistemas possibilitam maior proteção do trato gastrointestinal frente à ação tóxica de alguns fármacos, como anti-inflamatórios não esteroides (BECK et al., 2006), assim como aumentam a

estabilidade de fármacos frente à degradação do meio gastrointestinal (ENSIGN et al., 2012) e a fatores extrínsecos, como a luz (FONTANA et al., 2009).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs um modelo supramolecular para um novo tipo de nanocápsulas poliméricas, denominadas de nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais são formadas por um núcleo lipídico contendo monoestearato de sorbitano disperso em óleo de triglicerídeos de cadeia média, circundado por uma parede polimérica de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) revestida com polissorbato 80 (JAGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011). Estes sistemas nanotecnológicos já têm demonstrado propriedades interessantes em relação ao aumento da eficácia farmacológica em modelos de inflamação aguda e crônica (BERNARDI et al., 2009) e de gliomas (ZANOTTO-FILHO et al., 2013), favorecendo a biodistribuição de compostos para o cérebro (FROZZA et al., 2010).

A utilização de polímeros naturais tem ganhado importância no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Dentre estes polímeros, destaca-se a quitosana pela sua alta biocompatibilidade, baixa toxicidade e às suas excelentes propriedades bioadesivas. Vários estudos relatam a utilização da quitosana como material de preparação e revestimento catiônico de lipossomas (TAKEUCHI *et al.*, 2005), nanoesferas (BRAVO-OSUNA et al., 2007; MAKHLOF et al., 2011) e nanocápsulas (CALVO et al., 1997b; BENDER et al., 2012) visando como destaque, o aumento da absorção oral de macromoléculas através da rota paracelular de absorção por abertura das *tight junctions* (YEH et al., 2011).

Considerando as potencialidades dos sistemas nanoparticulados em aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos (FROZZA et al., 2010; WANG et al., 2011b; ENSIGN et al., 2012), as propriedades de promoção de absorção da quitosana (NAGPAL et al., 2010) e o problemas relacionados à terapêutica do tacrolimus (TAYLOR et al., 2005), o presente trabalho de tese apresenta como hipótese o aumento da atividade anti-edematogênica e imunossupressora *in vivo* do tacrolimus quando encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico. Para validarmos nossa hipótese serão realizados estudos de: 1) Avaliação da atividade anti-edematogênica do tacrolimus encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimento não iônico em modelo de artrite reumatoide 2) Avaliação da atividade imunossupressora do tacrolimus encapsulado em

nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimento não iônico após administração por diferentes vias e doses do fármaco em camundongos 3) encapsulação do fármaco em nanocápsulas de núcleo lipídico com revestimentos aniônico de lecitina e catiônico de quitosana e avaliação da influência do tipo de revestimento sobre atividade imunossupressora após a administração oral em camundongos. Em paralelo, em todos os estudos será realizado o monitoramento de parâmetros bioquímicos para investigar possíveis alterações decorrentes das condições experimentais e doses de tacrolimus utilizadas.



**OBJETIVOS**

---



## 1 Objetivo geral

Avaliar as atividades farmacodinâmicas como antiedematogênico e imunossupressor do tacrolimus encapsulado em suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico empregando diferentes doses e rotas de administração (oral e intraperitoneal), assim como a influência do tipo de revestimento das partículas (não-iônico, aniônico e catiônico).

## 2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antiedematogênica do tacrolimus encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimento não iônico após administração intraperitoneal em ratos, usando modelo de artrite reumatoide induzida por adjuvante completo de Freund;
- Estudar o efeito da nanoencapsulação do tacrolimus sobre a resposta imunossupressora, parâmetros bioquímicos e o ganho de peso, após administração oral e intraperitoneal em camundongos de diferentes doses de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimento não iônico, estabelecendo um estudo comparativo entre as rotas de administração;
- Encapsular o tacrolimus em nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com lecitina e polissorbato 80 revestidas ou não com quitosana para avaliar a influência do revestimento das partículas sobre a atividade imunossupressora, parâmetros bioquímicos e o ganho de peso após administração oral das formulações em camundongos.





**REVISÃO DE LITERATURA**

---



## 1 Tacrolimus

O tacrolimus (TAC), também conhecido por FK506, código do laboratório Fujisawa Pharmaceutical Co. Osaka, Japan, foi descoberto em 1984 a partir de uma cultura de *Streptomyces tsukubaensis* (KINO et al., 1987; TAYLOR et al., 2005). Este composto foi liberado pelo Food and Drugs Administration (FDA) em 1994 para o uso em transplante hepático e em 1997 para uso em transplante renal (BARRACLOUGH et al., 2010).

Trata-se de um fármaco amplamente utilizado por via oral e intravenosa para evitar e tratar a rejeição após transplante de órgãos sólidos tais como fígado (ZAHIR et al., 2004), rim (VELICKOVIC-RADOVANOVIC et al., 2010), coração (KOBASHIGAWA, 2011), intestino delgado (ZEEVI et al., 2005) e pâncreas (OLIVEIRA et al., 2007). Também é utilizado em preparação tópica no tratamento da dermatite atópica (NAKAGAWA, 2006) e vitiligo (XU et al., 2009). Além disso, alguns estudos clínicos têm demonstrado a eficácia e a segurança da utilização do TAC para o tratamento de doenças inflamatórias do cólon (BENSON et al., 2008) e da artrite reumatoide (KAWAI et al., 2006; AKIMOTO et al., 2008).

Este fármaco é uma molécula neutra constituída por uma lactona macrolídea com um alfa, beta-dicetoamido hemiacetal incorporada a um anel de 23 estruturas como mostra a Figura 1 (KINO et al., 1987; WALLEMACQ; REDING, 1993). Sua fórmula molecular é  $C_{44}H_{69}NO_{12}H_2O$ , com peso atômico de 822,05. Apresenta-se como um pó branco praticamente insolúvel em água (1-2 µg/mL) e hexano e solúvel em metanol, etanol, acetonitrila, acetona e clorofórmio (WALLEMACQ; REDING, 1993; PARK et al., 2009). No Brasil é comercializado pela Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, na forma de cápsulas de 0,5, 1 mg e 5 mg, e na forma de injetáveis, contendo 5 mg/mL, com o nome comercial de Prograf® e Prograf® XL (cápsulas de ação prolongada). Também é comercializado na forma de pomada nas concentrações de 0,03 ou 0,1% de fármaco pela Roche com nome comercial de Protopic®. Além dos produtos de referência, encontra-se no Brasil o produto similar Lifaltacrolimus produzido pelo Laboratório Industrial Farmacêutico Alagoas S.A. – LIFAL disponível na forma de cápsulas de gelatina dura nas concentrações de 1 e 5 mg de fármaco.

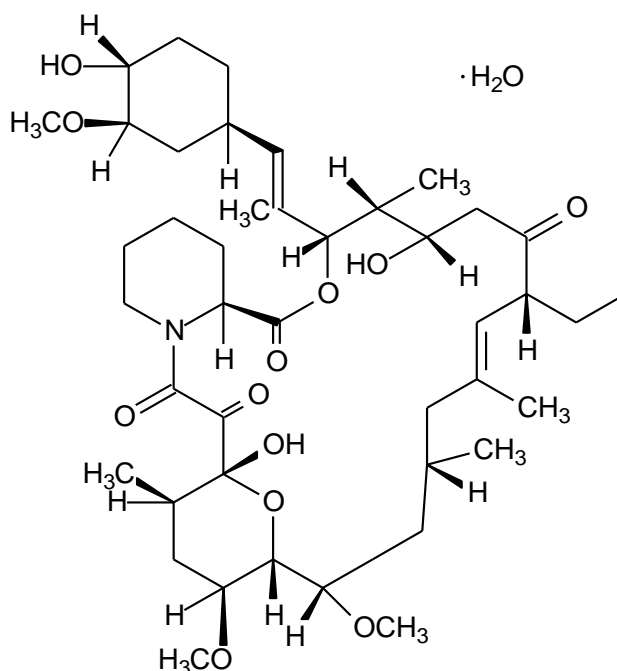


Figura 1 - Estrutura química do tacrolimus.

A farmacocinética do tacrolimus é bastante complexa. Após administração oral, o fármaco apresenta absorção incompleta e altamente variável determinando uma biodisponibilidade que varia entre 4% e 89%, sendo em média de 20% a 25% (WALLEMACQ; REDING, 1993; GARCIA et al., 2004). Este fármaco sofre intenso metabolismo pré-sistêmico via citocromo P450 3A nos enterócitos, além disso, é substrato da bomba de efluxo glicoproteína-P (P-gp), o que contribui para a sua biodisponibilidade errática (TAMURA et al., 2002). P-gp é uma proteína transmembrana pertencente à superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) envolvidos na proteção contra agentes xenobióticos tóxicos sendo responsável pelo insucesso no tratamento de vários fármacos substratos como paclitaxel, ciclosporina e tacrolimus (MARCHETTI et al., 2007). Esta proteína transportadora encontra-se superexpressa em células neoplásicas e também é encontrada em tecidos normais como intestino, fígado, rim, cérebro e na superfície de linfócitos (PARASRAMPURIA et al., 2001; MARCHETTI et al., 2007). A absorção do tacrolimus não é influenciada pela bile, representando uma vantagem particular desse fármaco no transplante hepático. Sua concentração máxima é alcançada em 30 a 60 minutos, com alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (> 99%), principalmente à albumina e à alfa-1-glicoproteína ácida (UNDRE, 2003).

Posteriormente, o fármaco sofre metabolização hepática, resultando em mais de 15 metabólitos. A meia-vida de eliminação média é de dez horas, sendo a sua depuração maior em crianças e reduzida na presença de severa disfunção hepática. Após o metabolismo hepático, 95% do fármaco são eliminados na bile e menos de 5% são excretados na urina como tacrolimus não metabolizado (GARCIA et al., 2004).

Este fármaco, assim como a ciclosporina A, pertence à classe de imunossupressores denominada inibidores da calcineurina e exerce atividade imunossupressora principalmente pela inibição da ativação e proliferação de linfócitos T (TAYLOR et al., 2005). O mecanismo de ação do TAC envolve primeiramente a ligação do fármaco a uma imunofilina intracelular denominada FKBP-12 (FK506 Binding Protein). A seguir forma-se um imunocomplexo contendo o tacrolimus, FKBP-12, cálcio, calmodulina e calcineurina que age inibindo a atividade da enzima fosfatase-calcineurina. Foi demonstrado que este efeito previne a desfosforilação e translocação do fator nuclear das células T ativadas (NF-AT), um componente nuclear previsto para iniciar a transcrição do gene e formação de diversas citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Além disso, o tacrolimus suprime a imunidade humoral pela inibição de células B secundária ao bloqueio da produção de IL-2 (GUMMERT et al., 1999; XIE, 2010).

Vários efeitos adversos estão associados com a utilização do tacrolimus, especialmente disfunção renal, distúrbios neurológicos, hiperglicemia, susceptibilidade aumentada a infecções, sintomas gastrintestinais como vômito, diarreia e dor abdominal (TAYLOR et al., 2005; AKIMOTO et al., 2008). Além disso, podemos destacar o risco de reações anafiláticas após administração intravenosa devido à presença do óleo de rícino hidrogenado na formulação comercial (TATETSU et al., 2003). Desta forma, a alta incidência de efeitos adversos juntamente com a grande variabilidade inter e intraindividual na biodisponibilidade e no perfil farmacocinético, tornam necessário o monitoramento terapêutico das concentrações sanguíneas do fármaco como forma de garantir o efeito imunossupressor e minimizar os efeitos tóxicos (OELLERICH et al., 1998; KAPTURCZAK et al., 2004). Na rotina laboratorial, a monitoração é realizada por

*Kits* comerciais contendo anticorpos monoclonais incluindo *enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA – PRO-Trac™ II FK 506 (Diasorin Inc., Stillwater, USA) e ensaio imunoenzimático de micropartículas - MEIA (IMx), sendo este mais vantajoso em termos de custo e rapidez (GARCIA et al., 2004).

Em virtude dos problemas relacionados à terapia com tacrolimus, a literatura reporta estratégias de modificação das suas propriedades biofarmacêuticas que visam o aumento da eficácia farmacológica e redução dos efeitos adversos do fármaco. Dentre estas estratégias, destaca-se o desenvolvimento de microemulsões (BORHADE et al., 2008), pró-fármaco (YURA et al., 1999), dispersões sólidas (YAMASHITA et al., 2003; PARK et al., 2009), microesferas pH-sensível (LAMPRECHT et al., 2004), lipossomas (MOFFATT et al., 1998; ERDOGAN et al., 2002; ALI et al., 2010), complexação com ciclodextrinas (ARIMOA et al., 2001) e nanopartículas poliméricas (LAMPRECHT et al., 2005a; MEISSNER et al., 2006; NASSAR et al., 2008; NASSAR et al., 2009). Esses últimos sistemas, propósito de estudo neste trabalho, terão uma abordagem mais aprofundada no decorrer desta revisão.

## **2 Nanotecnologia**

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que tem emergido rapidamente com potencial aplicação em diversos setores, como física, engenharia, tecnologia de informação, biologia e medicina. O termo nanobiotecnologia refere-se à interface entre a nanotecnologia e a biotecnologia tendo por objetivo o desenvolvimento, o processamento e a fabricação de novos materiais e produtos baseados na crescente capacidade da tecnologia moderna em manipular átomos e moléculas, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico (MARCATO; DURAN, 2008; FAROKHZAD; LANGER, 2009). De acordo com as recomendações do *Official Journal of the European Union* o termo nanomaterial significa todo material de origem natural, acidental ou manufaturada que contém partículas no estado singular, agregado e/ou aglomerado onde, para 50% ou mais das partículas em sua distribuição granulométrica por número, possui ao menos uma dimensão externa com tamanho entre 1 e 100 nm (EUROPEAN, 2011).

Historicamente, a concepção do uso de nanocarreadores começou no início do século 20, quando Paul Ehrlich propôs o modelo conhecido como “bala mágica”, em que o fármaco seria ligado ao transportador e direcionado ao alvo específico, exercendo sua atividade farmacológica (WITKOP, 1999). Anos depois, em meados da década de 70, foram desenvolvidos os primeiros sistemas coloidais denominados de lipossomas, prosseguindo com o advento dos dendrímeros, das nanopartículas e nanocápsulas poliméricas convencionais. No final dos anos 80, surgiram as nanopartículas magnéticas e finalmente, na década de 90 outros sistemas derivados dos anteriores, foram desenvolvidos. Estes sistemas são mais sofisticados que os convencionais, como o caso das nanopartículas furtivas com revestimento de polietilenoglicol (PEG), que permitem maior tempo de circulação sanguínea, além daquelas funcionalizadas com anticorpos capazes de proporcionar maior vetorização sítio-específica (COUVREUR et al., 2002; MARCATO; DURAN, 2008; SHI et al., 2010).

Com o reconhecimento da importância desta área, estima-se que o mercado mundial de aplicações da nanoescala no âmbito médico e farmacêutico cresça em torno de 70 a 160 bilhões de dólares em 2015 (SHI et al., 2010). Utilizando a nanotecnologia é possível: 1) aumentar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos adversos de fármacos; 2) melhorar a liberação e a absorção de fármacos pouco hidrossolúveis; 3) modificar o perfil de biodistribuição tissular; 4) possibilitar a co-liberação de dois ou mais ativos terapêuticos visando uma terapia combinada; 5) promover a permeação e penetração de fármacos através das barreiras endoteliais e epiteliais; 6) aumentar a sensibilidade das técnicas de diagnóstico *in vitro* para detecção de vírus, bactérias e células tumorais; 7) permitir maior precisão e rapidez na detecção de doenças (ex. câncer) com o uso de técnicas menos invasivas de rastreamento por imagem *in vivo*; 8) capacitar a mimetização de tecidos celulares e o desenvolvimento de implantes utilizando materiais biocompatíveis com propriedades mecânicas otimizadas para uso na área médica e odontológica (FERRARI, 2005; FAROKHZAD; LANGER, 2009; SHI et al., 2010).

## **2.1 Nanopartículas poliméricas**

As nanopartículas poliméricas têm recebido grande atenção como potenciais sistemas de liberação controlada de fármacos, principalmente aquelas obtidas a

partir de polímeros biodegradáveis. Em geral, estes sistemas apresentam diâmetro entre 100 e 500 nm e constituem uma ferramenta útil para mascarar propriedades físico-químicas intrínsecas de fármacos ou ativos, melhorando sua interação e transporte através de membranas biológicas, como a pele (GUTERRES et al., 2007), a mucosa gastrointestinal (ENSIGN et al., 2012) e a barreira hematoencefálica (KREUTER, 2013).

A utilização de polímeros biodegradáveis na preparação de nanopartículas tem ganhado destaque nos últimos anos, pois possibilita a degradação *in vivo* do polímero em fragmentos não tóxicos que podem ser excretados pelo organismo (KALLINTERI et al., 2005). Dentre estes polímeros, destaca-se a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) devido às suas propriedades mecânicas associados à inocuidade do polímero e de seu produto de degradação, o ácido hidroxicapróico. A PCL é um polímero semicristalino que apresenta degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos. Além disso, poliésteres como a PCL apresentam propriedades bioadesivas, característica bastante importante, pois a bioadesividade confere um acréscimo na deposição das partículas nas regiões do trato gastrointestinal, aumentando assim, a absorção sistêmica de fármacos (SINHA et al., 2004).

Nanopartículas poliméricas podem ser obtidas por diversos métodos que são classificados em duas categorias principais, levando-se em consideração se a formação das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) ou se estas são formadas diretamente, utilizando-se uma macromolécula natural ou polímero sintético (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; MORA-HUERTAS et al., 2010). A técnica da nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 2), a qual foi utilizada neste trabalho, consiste no emprego de um solvente miscível com a água, onde o polímero, a substância ativa e um estabilizador (tensoativo de baixo equilíbrio hidrófilo-lipófilo - EHL) são dissolvidos e posteriormente injetados a uma fase aquosa contendo um estabilizador hidrofílico (tensoativo de alto EHL) (FESSI et al., 1989; JAGER et al., 2009). As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente que é posteriormente eliminado da suspensão por evaporação sob pressão reduzida. A presença do óleo na fase orgânica durante o processo de obtenção dos sistemas



leva a formação de nanocápsulas que são estruturas vesiculares, enquanto sua ausência origina a formação de nanoesferas, que são sistemas matriciais (SCHAFFAZICK et al., 2003; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

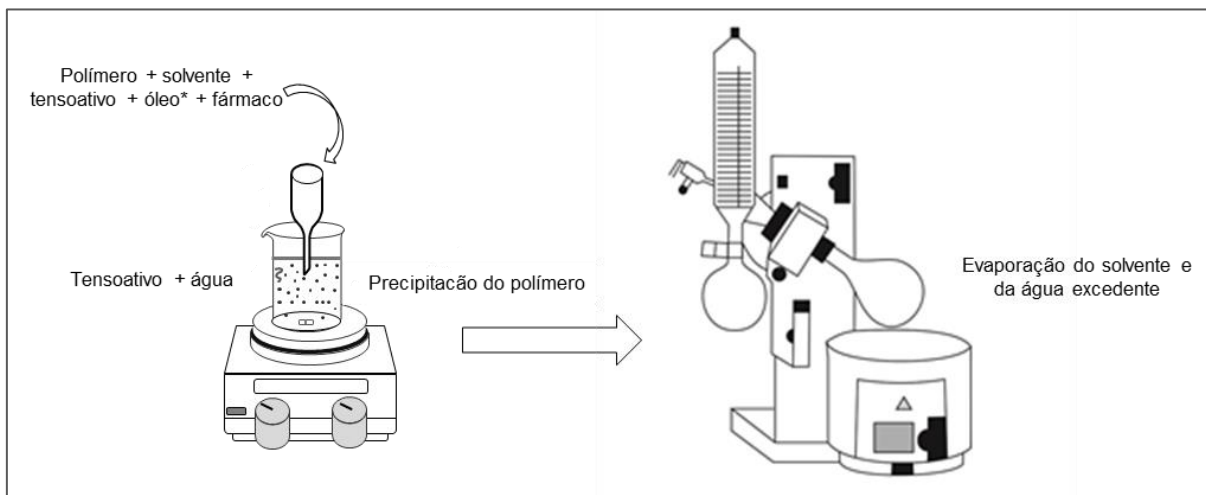


Figura 2 - Método de precipitação de polímero pré-formado empregado na preparação de nanopartículas poliméricas. \*componente empregado apenas na preparação de nanocápsulas.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs um modelo supramolecular para um novo tipo de nanocápsulas, denominadas de nanocápsulas de núcleo lipídico (Figura 3). Esses sistemas diferem das nanocápsulas convencionais, pois são formadas por um núcleo oleoso constituído de uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos de cadeia média circundado por uma parede polimérica de PCL revestida com polissorbato 80 (VENTURINI et al., 2011; JORNADA et al., 2012). A composição do núcleo oleoso e da parede polimérica das nanocápsulas de núcleo lipídico proporciona uma maior rigidez das partículas quando comparado às nanocápsulas poliméricas convencionais. A elasticidade das vesículas pode ser modulada pelo uso de monoestearato de sorbitano disperso no óleo que compõe o núcleo oleoso da vesícula. Isto demonstra que os carreadores desenvolvidos são estruturas versáteis, uma vez que suas propriedades mecânicas podem ser ajustadas (FIEL et al., 2011).

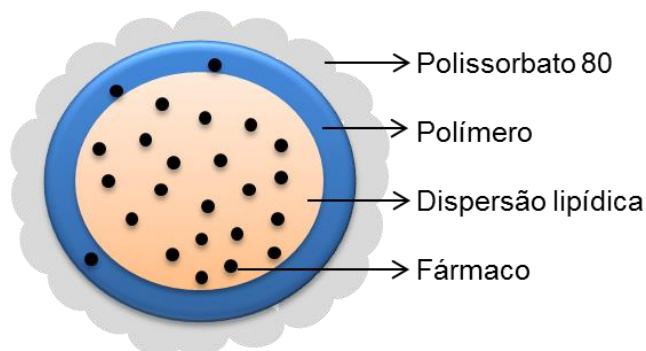


Figura 3 - Desenho representativo da organização supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico.

As nanocápsulas de núcleo lipídico já demonstraram suas potencialidades em aumentar a fotoestabilidade (FONTANA et al., 2009) e a biodisponibilidade (FROZZA et al., 2010) de fármacos, como também segurança *in vivo* em experimentos de toxicidade aguda e subcrônica (BULCÃO et al., 2012). Além disso, estudos mostraram que esses sistemas podem diminuir a agressão gastrointestinal de anti-inflamatórios não-esteróides (diclofenaco e indometacina) e aumentar a eficácia farmacológica de fármacos e compostos naturais em modelos biológicos de glioma e inflamação (BERNARDI et al., 2009; ZANOTTO-FILHO et al., 2013).

## 2.2 Polissorbato 80 como material de revestimento de nanopartículas poliméricas

O tamanho e as características de superfície são os principais fatores que determinam a cinética de depuração e biodistribuição de partículas coloidais. De um modo geral, nanopartículas poliméricas, assim como demais sistemas carreadores coloidais (lipossomas e microemulsões), sofrem rápida remoção da circulação sanguínea por células do sistema reticuloendotelial (SRE). Conseqüentemente, após administração intravenosa, grande parte da dose é distribuída para o fígado (60 - 90%), baço (2 - 20%), pulmões (cerca de 5%) e medula óssea (< 1%), os quais representam os principais órgãos que compõem o SRE (KREUTER, 1993; STORM et al., 1995).

A captação de nanopartículas pelo SRE, executada em grande parte pelos macrófagos, é principalmente governada pela interação entre as partículas coloidais e componentes do sangue e esta interação, por sua vez, pode ser modulada de

acordo com as propriedades de superfície dos coloides. A utilização de tensoativos (polissorbatos e poloxamers) ou polímeros hidrofílicos (polietilenoglicol e quitosana) no revestimento de nanopartículas são formas bastante empregadas para modificação de superfície dos sistemas. Acredita-se que a mudança na biodistribuição decorrente do revestimento possa ser em função da alteração da carga de superfície das partículas, modificação na interação hidrofóbica com as proteínas do plasma ou ainda, por impedimento estérico que evita a opsonização das nanopartículas (TRÖSTER et al., 1990). Dentre os tensoativos utilizados, destaca-se o polissorbato 80, tensoativo hidrofílico de caráter não-iônico (Figura 4).

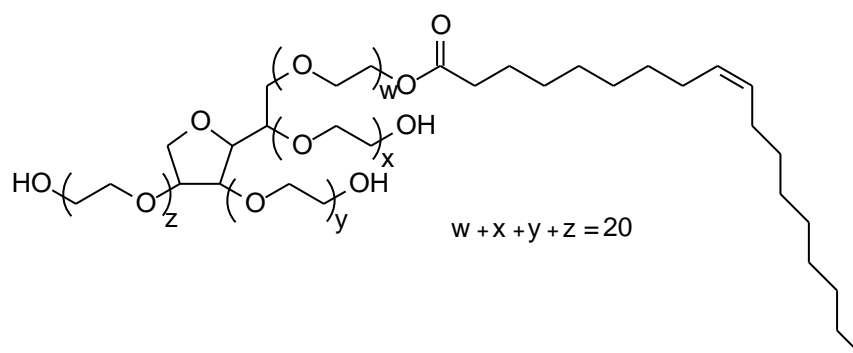


Figura 4 - Estrutura química do polissorbato 80.

A literatura reporta o revestimento de nanopartículas poliméricas com polissorbato 80 visando principalmente a vetorização cerebral. Um dos mecanismos sugeridos para explicar essa vetorização seria a adsorção de certas proteínas plasmáticas, como a apolipoproteína E na superfície de nanopartículas. Assim, as nanopartículas com apolipoproteína E adsorvida seriam reconhecidas como lipoproteínas de baixa densidade, sendo transportadas pelas células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) por endocitose mediada por receptor. As células endoteliais da BHE teriam um papel fundamental na vetorização cerebral por meio da adesão das nanopartículas com posterior endocitose, transcitose, modulação das *tight junctions* e modulação da atividade da glicoproteína-P (KREUTER, 2001; FROZZA et al., 2010).

Em relação às nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais são revestidas com polissorbato 80, Frozza e colaboradores (2010) avaliaram a biodistribuição do *trans*-resveratrol nanoencapsulado ou na forma livre após administração oral e i.p. em ratos. Simultaneamente, foram conduzidos estudos de avaliação da toxicidade

gastrointestinal das formulações. Os resultados demonstraram que a nanoencapsulação possibilitou que maiores concentrações de *trans*-resveratrol chegassem ao fígado, rim e cérebro independente da via de administração. Os autores sugeriram que o revestimento das partículas com polissorbato 80 diminuiu a captação das nanopartículas pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando o seu tempo de circulação. No trato gastrointestinal as nanocápsulas de núcleo lipídico provavelmente seriam capturadas pelas Placas de Peyer migrando diretamente para a circulação linfática, minimizando assim, a metabolização do *trans*-resveratrol nos enterócitos. Além disso, as nanocápsulas de núcleo lipídico propiciaram menores índices lesionais no trato gastrointestinal quando comparado ao polifenol na forma livre. (FROZZA et al., 2010).

A influência do revestimento de nanopartículas poliméricas sobre a absorção de nanopartículas no trato gastrointestinal e a biodistribuição em diversos órgãos também foi avaliada por Araujo e colaboradores (1999). A superfície de nanopartículas de polimetilmetacrilato marcadas com carbono 14 foi alterada com revestimento hidrofílico de polissorbato 80 ou poloxamina 908. Além disso, a influência de um veículo hidrofóbico (óleo de amendoim), com e sem adição de promotor da absorção (ácido oleico), foi avaliada. Os resultados demonstraram que a adição de polissorbato 80 nas formulações aumentou a absorção no trato gastrointestinal das nanopartículas de forma significativa, enquanto que a presença de veículo hidrofóbico não alterou este parâmetro em relação à solução salina. Os autores consideraram o fato de que partículas com superfície hidrofílica promoverem maior absorção intestinal comparado às partículas suspensas em veículo hidrofóbico algo surpreendente e sugeriram que este resultado é decorrente de interações específicas dos tensoativos com as células do epitélio intestinal (ARAUJO et al., 1999). Entretanto, é conhecido que o polissorbato 80 provoca inibição da glicoproteína-P, aumentando o tempo de residência entre os substratos desta bomba de efluxo com os enterócitos promovendo a absorção de fármacos (MARCHETTI et al., 2007).

O polissorbato 80 confere uma maior estabilidade coloidal devido ao impedimento estérico que proporciona, prevenindo assim, a adsorção de vários componentes do sangue (células e opsoninas) à superfície das partículas (STORM et al., 1995). Dessa forma, é possível afirmar que o revestimento de nanopartículas

poliméricas com polissorbato 80 é uma ferramenta interessante quando se busca um aumento no tempo de circulação e menor captação das nanopartículas pelo SRE.

### 2.3 Aplicações da quitosana como material de revestimento ou formação de nanopartículas

Assim como o polissorbato 80 abordado anteriormente, o uso da quitosana (Figura 5) para modificação de superfície de nanopartículas vem ganhando destaque nos últimos anos, a qual é utilizada tanto como material de revestimento catiônico de lipossomas (TAKEUCHI et al., 2005), nanoesferas (BRAVO-OSUNA et al., 2007; MAKHLOF et al., 2011) e nanocápsulas (CALVO et al., 1997b; DE CAMPOS et al., 2003) como agente formador de partículas, os quitossomas (JANES et al., 2001).

A quitosana é um polímero biodegradável poliacatiônico obtido da desacetilação da quitina, presente principalmente na carapaça de crustáceos marinhos (RAVI KUMAR, 2000). Devido à sua alta biocompatibilidade, baixa toxicidade e às suas excelentes propriedades bioadesivas, é crescente o interesse da utilização de sistemas nanocarreadores baseados em quitosana em aplicações para *drug delivery*. Esses sistemas visam principalmente o aumento da absorção oral de macromoléculas como proteínas e agentes relacionados à terapia gênica e de vacinação, os quais não podem difundir através das bicamadas lipídicas das membranas celulares por apresentarem alto peso molecular e hidrofiliidade, limitando-se à rota paracelular de absorção (PONCHEL; IRACHE, 1998; NAGPAL et al., 2010).

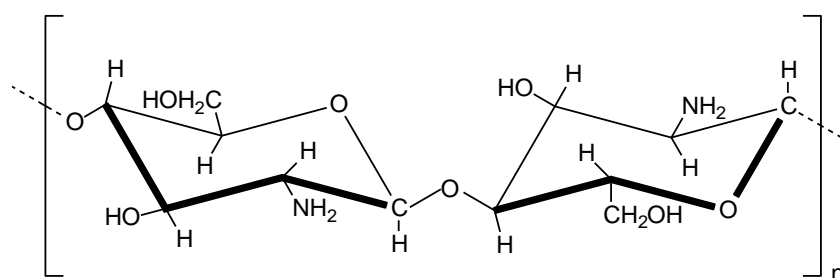


Figura 5 - Estrutura química da quitosana.

Este copolímero é originário de ligações monossacarídeas lineares  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) e compostas por unidade de 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucano unidos alternadamente por ligações glicosídicas de composição variável em função do grau médio de

acetilação, que representa a fração de unidades de 2-acetomido-2-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e é um dos principais parâmetros para a sua caracterização. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito marcante na sua solubilidade. Em pH ácido, este polímero comporta-se como um polieletrólito catiônico. É insolúvel em água, porém, torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácido clorídrico diluído (SANTOS et al., 2003).

No âmbito molecular, a quitosana apresenta influência sobre a integridade das *tight junctions* em modelo de células Caco-2. Mudanças nas medidas de resistência elétrica transepitelial e nos padrões de coloração na monocamada de células Caco-2, além de análises de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que a quitosana pode reversivelmente e transitoriamente abrir as *tight junctions* entre as células, aumentando a permeabilidade celular. A análise de genes presentes nas *tight junctions* utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, ensaios de imunofluorescência e *Western Blot* mostraram que a quitosana provoca uma redistribuição reversível do gene claudin-4 da membrana para o citoplasma celular, que posteriormente é degradado nos lisossomas, enfraquecendo as *tight junctions* (YEH et al., 2011).

Em recente estudo, Makhlof e colaboradores (2011) prepararam nanopartículas de quitosana por meio de interações iônicas do polímero pH-sensível hidroxipropilmetilcelulose ftalato (HPMCF) ou o poliânion tripolifosfato (TPP) e avaliaram *in vitro* quanto a capacidade das formulações protegerem a insulina contra a degradação da pepsina gástrica. O comportamento mucoadesivo e de penetração intestinal das nanopartículas foram estudados após administração oral em ratos por análise quantitativa por fluorescência e microscopia confocal usando nanopartículas marcadas com fluoresceína-5-isotiocianato. Os resultados demonstraram estabilidade superior das nanopartículas de quitosana preparadas com HPMCF frente ao meio ácido e um aumento de 2 a 4 vezes na capacidade mucoadesiva e de penetração quando comparado às partículas preparadas com TPP. Após administração oral das formulações em ratos, as nanopartículas obtidas a partir de quitosana e HPMCF aumentaram o efeito hipoglicêmico cerca de 10 e 3 vezes quando comparado à insulina em solução ou associada a nanopartículas de quitosana com TPP, respectivamente. A partir dos resultados obtidos, foi

demonstrado que os sistemas nanoparticulados contendo quitosana combinado aos benefícios de uma formulação pH-sensível proporcionaram uma melhora na estabilidade, além do aumento da atividade biológica da insulina, podendo estender-se a outros peptídeos (MAKHLOF et al., 2011).

Para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados revestidos com quitosana, parâmetros do processo de revestimento e a composição dos sistemas merecem atenção, pois influenciam na carga de superfície, diâmetro e estabilidade das partículas. A verificação de alterações na superfície de partículas revestidas com quitosana pode ser realizada por estimativas do potencial de superfície, densidade de grupos funcionais e/ou aumento da hidrofília de superfície. Um dos métodos utilizados para medir estas alterações é a determinação do potencial zeta de nanopartículas em suspensão aquosa. Um elevado valor de potencial zeta em módulo é importante para a estabilidade físico-química das suspensões coloidais uma vez que forças repulsivas tendem a evitar agregação de nanopartículas adjacentes (CALVO et al., 1997a; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2007).

González-rodríguez e colaboradores (2007) aplicaram um desenho experimental estatístico ( $2^{5-1}$ ) para estudar as variáveis que influenciavam no revestimento de lipossomas de lidocaína com quitosana. Os fatores analisados foram concentração de quitosana na solução de revestimento, velocidade de gotejamento desta solução na dispersão coloidal de lipossomas, velocidade de agitação, tempo decorrido desde a preparação dos lipossomas até o revestimento e a quantidade de fármaco associada aos lipossomas. As variáveis de resposta selecionadas foram a eficiência de encapsulação (EE, %), a eficiência de revestimento (ER, %) e o potencial zeta. Os resultados obtidos apontaram que a quantidade de lidocaína foi o fator predominante que aumentou EE (%) e a ER (%) foi afetada principalmente pela concentração da solução de quitosana e velocidade de agitação, embora todas as interações entre os principais fatores tiveram significância estatística (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2007).

Calvo e colaboradores (1997) prepararam nanocápsulas de PCL pela técnica de deposição interfacial, nas quais a quitosana foi incorporada às formulações para fornecer caráter catiônico às partículas, objetivando facilitar a interação destas com a superfície ocular. Para a preparação das nanocápsulas revestidas, a quitosana, foi

adicionada na fase aquosa durante o processo de obtenção das nanocápsulas. A análise do tamanho de partículas demonstrou que o revestimento influenciou no diâmetro e potencial zeta das partículas, variando entre  $238 \pm 6$  nm e  $-39,9 \pm 0,3$  mV para nanocápsulas não revestidas e  $384 \pm 60$  nm e  $37,1 \pm 1,8$  mV para nanocápsulas revestidas com quitosana (CALVO et al., 1997a).

Recentemente nosso grupo de pesquisa avaliou o revestimento catiônico de nanocápsulas poliméricas em formulações de filtros solares. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial da PCL, as quais foram revestidas utilizando uma solução de quitosana e, posteriormente incorporadas em hidrogéis de hidroxietilcelulose. A caracterização por espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética mostrou que a nanocápsulas revestidas apresentaram diâmetro médio de  $202 \pm 7$  nm e potencial zeta positivo de  $+ 21 \pm 1$  mV (SIQUEIRA et al., 2011).

## **2.4 Administração intraperitoneal de nanopartículas**

A via intraperitoneal é pouco utilizada em humanos, sendo recomendada para administração de antibióticos em casos de peritonite (ação local) e de insulina (ação sistêmica). Também pode ser utilizada em pacientes com insuficiência renal que necessitam de diálise (DE VIN et al., 2009) e para o tratamento de carcinomatose peritoneal (GOULD et al., 2012; DE SMET et al., 2013). Entretanto, a administração intraperitoneal é muito utilizada na experimentação animal para avaliação de formulações de ação local e também para predizer a ação sistêmica de fármacos, devido à sua alta vascularização e à facilidade do procedimento comparado a outros métodos parenterais, principalmente quando se necessita de uma frequência alta de administrações.

A literatura reporta diversos estudos envolvendo animais que utilizam a administração intraperitoneal de sistemas nanocarreadores de fármacos. Em geral, os perfis farmacocinéticos de fármacos provenientes da administração intravenosa e intraperitoneal de nanopartículas são bastante semelhantes. Outra interessante abordagem é que as propriedades de superfície de nanopartículas podem influenciar na disponibilidade sistêmica de fármacos a partir da cavidade peritoneal (REDDY; MURTHY, 2004). Partículas de superfície aniônica tendem a ser depuradas mais



rapidamente do peritônio para a corrente sanguínea em relação à partículas de superfície hidrofílica e partículas catiônicas. Isso porque partículas aniônicas, que possuem potencial zeta altamente negativo, são rapidamente capturadas pelos macrófagos locais e levadas à circulação sistêmica. Chegando na corrente sanguínea, as partículas aniônicas sofrem maior opsonização acumulando-se em maior quantidade em órgãos do sistema reticuloendotelial (baço, fígado e pulmão) (REDDY; MURTHY, 2004; DE SMET et al., 2013).

Recentemente, Bulcão e colaboradores (2012) avaliaram a toxicidade aguda e subcrônica das nanocápsulas de núcleo lipídico após administração intraperitoneal em ratos. Os tratamentos não causaram mortalidade, nem alterações permanentes no peso dos animais durante os experimentos. Além disso, não foram observadas alterações em parâmetros hepáticos e renais. Reação granulomatosa do tipo corpo estranho foi observada no fígado e baço de animais que receberam as maiores doses da formulação. No estudo agudo, a maior dose administrada foi equivalente a dez vezes o volume de nanocápsulas de núcleo lipídico utilizado em estudos anteriores para fins terapêuticos (FROZZA et al., 2010). Os resultados deste estudo indicam que as nanocápsulas de núcleo lipídico são sistemas de liberação seguros visando a administração sistêmica de fármacos (BULCÃO et al., 2012).

## **2.5 Administração oral de nanopartículas**

A via oral é conhecidamente a mais utilizada para administração de fármacos por mostrar-se como a mais segura, conveniente e econômica. Entretanto apresenta desvantagens relacionadas à absorção variável e baixa biodisponibilidade de muitos fármacos. Estas características devem-se principalmente ao metabolismo de primeira passagem, à inativação no trato gastrointestinal e interações com alimentos que inúmeros fármacos sofrem após serem administrados por via oral, determinando assim, efeito farmacodinâmico reduzido quando comparado às vias parenterais de administração, tais como intravenosa e intraperitoneal (PONCHEL & IRACHE, 1998).

A disponibilidade sistêmica de um fármaco administrado por via oral depende fundamentalmente da sua capacidade de absorção/permeação através do epitélio intestinal. Esta barreira é composta por uma monocamada celular constituída principalmente pelos enterócitos, representando cerca de 90% do epitélio, sendo

também formada por células caliciformes, placas de Peyer, células de Paneth, linfócitos e células endócrinas secretoras de hormônios. As células epiteliais se ligam nas superfícies apicais por junções paracelulares, as *tight junctions*, e estão cobertas por uma camada de muco. Quando sistemas nanoparticulados são administrados na forma de suspensão ocorre rápida difusão da formulação ao longo do trato gastrointestinal e adesão à mucosa de superfície. Os fármacos presentes em sistemas nanoestruturados podem ultrapassar a barreira intestinal via transporte transcelular, o que inclui a difusão passiva, o transporte ativo ou facilitado, a endocitose e a transcitose, ou por transporte paracelular através das *tight junctions* (PONCHEL; IRACHE, 1998; GRAMA et al., 2011; O'NEILL et al., 2011).

O transporte transcelular de nanopartículas é realizado pelo processo de transcitose, o qual as partículas são primeiramente internalizadas pela membrana plasmática das células apicais (endocitose) seguido do transporte através da célula, sendo finalmente liberadas pela membrana basolateral. O processo de endocitose pode ser dividido em endocitose mediada por receptor (EMR) e endocitose adsortiva (JUNG et al., 2000; GRAMA et al., 2011). O processo de EMR requer a ligação de moléculas específicas nos receptores das membranas apicais para inicialização do processo de endocitose. Por outro lado, o processo de endocitose adsortiva não requer nenhuma interação ligante-receptor específico na superfície celular e pode ser inicializado por meio de adsorção física de carreadores nanoparticulados à superfície celular por forças eletrostáticas (ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals). Considerando que o processo de endocitose adsortiva não envolve a presença de ligantes específicos, a absorção depende em grande parte do tamanho de partícula e das propriedades de superfície do material. Ambos os processos de endocitose são saturáveis e dependentes de energia. A captação de nanopartículas pela via transcelular ocorre por meio de dois tipos de células intestinais, os enterócitos e as células M das placas de Peyer (JOSÉ ALONSO, 2004). Os enterócitos estão em grande número no epitélio intestinal enquanto que as células M, localizadas primariamente nas Placas de Peyer, representam aproximadamente apenas 1% de toda a superfície intestinal (JUNG et al., 2000; GRAMA et al., 2011; O'NEILL et al., 2011).

Os enterócitos possuem membrana apical relativamente espessa com alto teor proteico (glicocálice) e menor fluidez em relação às demais células intestinais, o

que pode limitar o acesso de partículas ao epitélio subjacente. Além disso, estas células são caracterizadas por um elevado número de microvilosidades, que possuem em torno de 1 mm de comprimento e 50 nm de largura. Consequentemente, visto que o processo de endocitose ocorre principalmente na base das microvilosidades, propõe-se que partículas maiores que 50 nm sofram o processo de endocitose de forma não eficiente (GRAMA et al., 2011; O'NEILL et al., 2011).

As placas de Peyer são nódulos linfáticos localizados primariamente no íleo e constituem um ramo aferente do tecido linfóide associado ao intestino que reconhece antígenos por um mecanismo especializado de amostragem das células M contidas no epitélio. Uma mescla de linfócitos, macrófagos e células dendríticas é encontrada no topo do folículo voltada para lúmen intestinal. As células M das placas de Peyer não contêm lisossomas, apresentando elevado nível de endocitose de uma ampla variedade de materiais como peptídeos, proteínas, micro e nanopartículas do lúmen intestinal até os folículos, de onde migram para a circulação via nódulos mesentéricos e ductos linfáticos torácicos. O transporte de nanopartículas via tecido linfóide adjacente apresenta a vantagem de evitar o metabolismo hepático de primeira passagem (PONCHEL; IRACHE, 1998; JUNG et al., 2000; GRAMA et al., 2011; O'NEILL et al., 2011).

A via paracelular para translocação de nanopartículas é limitada devido à pequena área dos espaços intercelulares que corresponde menos que 1% da área total da superfície da mucosa intestinal e a capacidade de estanqueamento das junções paracelulares que possuem estreito diâmetro de poros em torno de 0,5-3 nm. No entanto, o transporte paracelular de fármacos pode ser aprimorado com a utilização de polímeros como a quitosana e os poliacrilatos. Estes polímeros têm sido utilizados para facilitar o transporte paracelular por meio de interações eletrostáticas entre o polímero e a membrana celular (quitosana) ou pela redução extracelular da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (poliacrilatos), resultando na abertura das *tight junctions* (PONCHEL; IRACHE, 1998; NAGPAL et al., 2010).

#### 4 Sistemas de liberação de tacrolimus

Com o intuito de aumentar a solubilidade do tacrolimus, Park e colaboradores (2009) prepararam dispersões sólidas do fármaco com diferentes proporções de água, lauril sulfato de sódio, ácido cítrico e carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) usando a técnica de secagem por aspersão. As propriedades físico-químicas das dispersões sólidas foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial e difração de raios x. Além disso, a solubilidade e dissolução das formulações foram avaliadas comparando-se com o fármaco em pó. Os autores demonstraram que a dispersão preparada na razão tacrolimus/CMC-Na/lauril sulfato de sódio/ácido cítrico de 3/24/3/0,2 promoveu um significativo aumento da solubilidade e dissolução do fármaco comparado à sua forma de pó. Além disso, os resultados de microscopia eletrônica sugeriram que o polímero hidrofílico e o tensoativo estariam associados à superfície do fármaco e por análises de DSC e difratometria constatou-se que não houve modificação da cristalinidade do fármaco quando em dispersão sólida. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que as formulações preparadas podem ser potenciais candidatas a sistemas de liberação do TAC promovendo o aumento da solubilidade, sem conversão cristalina do fármaco (PARK et al., 2009).

Em relação à associação de TAC em ciclodextrinas podemos destacar o estudo realizado por Arimoa e colaboradores (2001). Resumidamente, neste trabalho os autores avaliaram o efeito das ciclodextrinas sobre a solubilidade e velocidade de dissolução do fármaco. Ainda, realizaram estudos absorção oral das formulações em ratos. Os resultados foram comparados aos obtidos com o produto comercial na forma de cápsulas. Neste estudo, foram utilizadas ciclodextrinas naturais e derivados hidrofílicos de  $\beta$ -ciclodextrinas. Análises espectroscópicas, estudos de dissolução e solubilidade mostraram a formação de complexos do tacrolimus com as ciclodextrinas e aumento da solubilidade do fármaco. Os estudos *in vivo* evidenciaram um aumento da absorção oral e menor variabilidade na absorção do fármaco quando associado à  $\beta$ -ciclodextrinas (ARIMOA et al., 2001).

Com o objetivo de melhorar o perfil de dissolução e aumentar a atividade imunossupressora do tacrolimus, Borhade e colaboradores (2008) desenvolveram um sistema auto-microemulsionável de liberação para o fármaco (SMEDDS)

construindo um diagrama de fases para determinar a solubilidade do tacrolimus em diferentes óleos, tensoativos e tampões. O sistema de liberação desenvolvido apresentou tamanho médio de glóbulos menor que 25 nm. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a formulação desenvolvida apresentou um perfil de dissolução superior e um aumento da atividade imunossupressora do fármaco, após a administração oral em camundongos, quando comparado à forma comercial de cápsulas (BORHADE et al., 2008).

Ali e colaboradores (2010) desenvolveram sistemas de liberação para TAC a partir de lipídios naturais denominados nanossomas. Esses sistemas diferem dos lipossomas convencionais por não utilizarem solventes tóxicos em nenhuma etapa de preparação. Os autores caracterizaram a estrutura morfológica das formulações por microscopia eletrônica de criofractura onde se observou população homogênea de partículas menores que 100 nm. Além disso, foram conduzidos estudos de toxicidade em roedores e estudos de segurança, tolerabilidade e farmacocinética em humanos, comparando-se com a formulação comercial de uso intravenoso que contém óleo de rícino hidrogenado, substância conhecidamente tóxica, em sua composição. Os resultados mostraram que as formulações administradas durante 14 dias nas doses de 5 e 10 mg/kg em ratos e camundongos, respectivamente, não resultaram em mortalidade dos animais. Os estudos em humanos demonstraram segurança e perfil farmacocinético dos nanossomas semelhante à formulação comercial. Estes resultados sugerem que o produto desenvolvido, sem álcool e óleo de rícino hidrogenado, pode representar uma alternativa de tratamento para pacientes transplantados (ALI et al., 2010).

Na literatura podemos encontrar a utilização do TAC associado à nanopartículas poliméricas para o tratamento de doenças inflamatórias do cólon. Lamprecht e colaboradores em 2005 testaram a eficácia terapêutica de formulações de nanopartículas de PLGA contendo TAC em dois modelos de indução de colite em ratos após administração oral e retal das mesmas. A fim de elucidar o mecanismo de ação deste novo sistema de liberação, estudos *ex vivo* de penetração das partículas e do fármaco no tecido do cólon inflamado foram realizados. Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, Meissner e colaboradores (2006) utilizaram, além do PLGA, o polímero sensível ao pH Eudragit P-4135F para preparação das nanopartículas contendo TAC e testaram a eficácia dos sistemas em modelo de

colite induzida em camundongos, avaliando também a nefrotoxicidade das formulações. Em ambos os trabalhos, os autores concluíram que os sistemas nanoestruturados apresentaram potencial para aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos causados pelo tacrolimus (LAMPRECHT et al., 2005a; MEISSNER et al., 2006).

Nassar e colaboradores (2008) utilizaram o TAC, como fármaco modelo, associado à nanocápsulas poliméricas duplamente revestidas, com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos substratos da bomba de efluxo glicoproteína-P e do citocromo P450 3A, sem modular a atividade fisiológica desses sistemas de metabolização. Primeiramente as nanocápsulas foram preparadas com diferentes razões de polimetacrilatos, seguido da microencapsulação com hidroxipropiletilcelulose pela técnica de secagem por aspersão. Estudos *in vitro* demonstraram que a formulação desenvolvida melhorou a permeação do tacrolimus através das células Caco-2. Os mesmos autores em 2009 comprovaram os resultados anteriores com experimentos *in vivo*, onde foi demonstrado um aumento da biodisponibilidade oral do fármaco após sua administração em roedores e suínos (NASSAR et al., 2008; NASSAR et al., 2009).

As principais considerações referentes às estratégias mencionadas anteriormente, juntamente com outros trabalhos envolvendo de sistemas de liberação para TAC, constam na Tabela 1 em ordem cronológica decrescente.

Tabela 1 - Trabalhos que abordam sistemas de liberação para TAC.

Sistemas	Considerações principais	Referência
Nanopartículas de albumina contendo o complexo TAC/ciclodextrina	Estudos de liberação <i>in vitro</i> e avaliação farmacocinética indicaram que os sistemas desenvolvidos possibilitaram uma liberação mais sustentada e estável do fármaco.	(GAO et al., 2012)
Dispersão sólida	Dispersões sólidas contendo TAC obtidas a partir de Eudragit E modificado (polímero dissolvido em 10% de HCL e seco por spray-drying) apresentaram solubilidade aproximadamente 15 vezes maior em relação às dispersões obtidas com HPMC. Além disso, impediram a reprecipitação do TAC por 24 h.	(YOSHIDA et al., 2012)
Micelas	Micelas contendo TAC preparadas a partir de tribloco de PCL-PEG-PCL demonstraram boa estabilidade e liberação mais lenta do fármaco em relação a sua forma livre. Além disso, estudos de toxicidade e testes hemolíticos mostraram baixa toxicidade e segurança desses sistemas para administração intravenosa.	(WANG et al., 2011a)
Carreadores lipídicos nanoestruturados	Géis obtidos a partir de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo TAC mostraram melhor perfil de liberação <i>in vitro</i> , maior permeação cutânea e aumento da biodisponibilidade <i>in vivo</i> em comparação a formulação tópica comercial.	POPLE; SINGH (2011)
Micelas	Micelas preparadas com uma mistura de tacrolimus e rifampicina aumentaram a sobrevida de camundongos após transplante da pele de cauda.	(DANE et al., 2011)
Carreadores lipídicos nanoestruturados	Estudos <i>in vitro</i> em células de Franz revelaram que os sistemas nanoparticulados proporcionaram um aumento de 1,64 vezes na penetração do TAC quando em relação à formulação comercial	(SO HEE NAM, 2011)
Lipossomas não convencionais	Nanossomas contendo TAC obtidos a partir de lipídeos naturais demonstraram segurança e perfil farmacocinético semelhante ao produto comercial após estudos em humanos	(ALI et al., 2010)
Nanoesferas	Nanopartículas de TAC preparadas a partir de PLGA e PLGA com superfície modificada com PEG apresentaram maior eficiência de liberação nos nódulos linfáticos mesentéricos em relação ao produto comercial após administração intravenosa em ratos	(SHIN et al., 2010)
Nanocápsulas duplamente revestidas	Microencapsulação com HPMC a partir de nanocápsulas contendo tacrolimus aumentaram a biodisponibilidade oral do fármaco cerca de 4,9 e 2,45 vezes em relação ao produto comercial após administração oral em ratos e porcos, respectivamente	(NASSAR et al., 2009)
SMEDDS	Desenvolveram sistemas de liberação auto-microemulsionáveis contendo TAC que apresentaram diâmetro de glóbulo inferior a 25 nm com perfil de dissolução e atividade imunossupressora superior a formulação comercial Pangra <sup>®</sup> cápsulas.	(BORHADE et al., 2008)
Nanocápsulas duplamente revestidas	Micropartículas obtidas a partir de nanocápsulas de polimetacrilatos contendo TAC promoveram maior absorção em monocamada de células Caco-2 em relação ao fármaco em solução sem alterar as propriedades fisiológicas da bomba de efluxo glicoproteína-P	(NASSAR et al., 2008)
Agregados nanoestruturados	Agregados nanoestruturados contendo TAC obtidos pelo processo de <i>ultra-rapid freezing</i> utilizando lactose como adjuvante mostraram propriedades adequadas para uso via nebulização com performances similares <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	(SINSWAT et al., 2008)
Lipossomas	Formulação para veiculação pulmonar obtida a partir de lipossomas de TAC secos por <i>spray-drying</i> mostrou liberação <i>in vitro</i> prolongada por mais de 18 h, seguindo o modelo de Higuchi's e alto tempo de residência do fármaco nos pulmões após administração intratraqueal em ratos.	(CHOUGULE et al., 2007)

Nanoesferas	Nanopartículas de PLGA ou de Eudragit P-4135F contendo TAC demonstraram potencial de reduzir efeitos nefrotóxicos em modelo animal de colite em camundongos	(MEISSNER et al., 2006)
Nanoesferas	Nanopartículas aumentaram a eficácia terapêutica pelo do aumento da seletividade local de fármaco em modelo experimental de colite em ratos	(LAMPRECHT et al., 2005a)
Nanoesferas	Microesferas pH-sensíveis obtidas a partir de nanopartículas de TAC apresentaram liberação seletiva no cólon e superior atividade terapêutica em modelo animal de colite em relação ao fármaco livre ou associado à nanopartículas	(LAMPRECHT et al., 2005b)
Lipossomas	O tratamento tópico com loção contendo lipossomas de TAC possibilitou aumento da sobrevida de camundongos submetidos a transplante de pele e redução significativa do edema e da espessura da orelha em modelo de hipersensibilidade induzido por ovoalbumina quando comparado a administração sistêmica do fármaco livre	(ERDOGAN et al., 2002)
Lipossomas	Lipossomas administrados por via oral proporcionaram maior da biodisponibilidade do TAC em camundongos, diminuição da rejeição do enxerto após transplante de pele e aumento da sobrevida de ratos submetidos a transplante de coração.	(MCALISTER et al., 1999)
Lipossomas	O tratamento i.p. com lipossomas de TAC associado ou não a anticorpos monoclonais promoveram aumento da sobrevida de roedores após transplante cardíaco em doses menores de TAC quando comparado ao fármaco livre	(MOFFATT et al., 1998)



O conteúdo presente nos capítulos 1, 2 e 3 refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foram excluídos nesta versão. Entretanto, nesta versão parcial, na página posterior ao título de cada capítulo, foram inseridas as principais considerações dos conteúdos retirados. No total, foram excluídos os conteúdos presentes em 83 páginas da versão total desta tese.

**CAPÍTULO 1** : Avaliação do efeito da nanoencapsulação do tacrolimus em modelo de artrite reumatóide induzida por adjuvante completo de Freund

---



## Principais considerações do capítulo 1

O objetivo desse capítulo foi desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus para investigar se a nanoencapsulação poderia aumentar a eficácia farmacológica do fármaco em relação a sua forma livre em modelo animal de artrite reumatoide induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). As formulações foram obtidas nas concentrações de 0,8 mg/mL apresentando perfis de distribuição granulométrica, descritos por volume e número, apenas na faixa nanométrica. O estudo de liberação *in vitro* mostrou que o fármaco nanoencapsulado apresentou um perfil de liberação mais sustentado em relação a sua forma livre, com mecanismo anômalo de transporte. A avaliação das propriedades antiartríticas do tacrolimus livre (TAC-solução) ou nanoencapsulado (TAC-LNC<sup>3,7</sup>) foi realizada por meio do monitoramento do edema da pata utilizando um pletismômetro. Ambas as formulações TAC-solução e TAC-LNC<sup>3,7</sup> foram capazes de inibir a progressão do edema quando comparadas com seus respectivos grupos controles: veículo e nanocápsulas brancas (B-LNC<sup>3,7</sup>). Entretanto, os animais tratados com TAC-LNC<sup>3,7</sup> apresentaram inibição percentual do edema significativamente mais acentuada em relação ao grupo tratado com TAC-solução. Além disso, em relação às concentrações séricas de glicose, observou-se um aumento significativo somente para o grupo de animais tratados com TAC-solução, o qual foi estatisticamente diferente de todos os demais grupos. A hiperglicemia está bastante associada com a administração de tacrolimus, sugerindo, desse modo, que a nanoencapsulação do fármaco evitou a ocorrência desse efeito adverso. Considerando o exposto, nossos resultados indicam que a encapsulação do tacrolimus à nanocápsulas de núcleo lipídico constitui uma potencial estratégia para o tratamento da artrite reumatóide.

















































**CAPÍTULO 2** : Nanoencapsulação de tacrolimus em nanocápsulas de núcleo lipídico mostrou atividade imunossupressora similar após administração oral e intraperitoneal

---



## Principais considerações do capítulo 2

Tacrolimus é amplamente utilizado para tratar e prevenir a rejeição após transplante de órgãos. Entretanto, vários estudos reportam que o fármaco apresenta variável e pobre biodisponibilidade após administração oral, além de provocar efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, hiperglicemia, nefro- e neurotoxicidade. O objetivo deste capítulo foi desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus para avaliar se o “efeito nano” possibilitaria equivalência farmacodinâmica entre as vias intraperitoneal (i.p.) e oral de administração. As formulações desenvolvidas neste capítulo possuem fração volumétrica (massa de constituintes/mL) em torno de 7,4 %, o que corresponde ao dobro da fração volumétrica das formulações obtidas no capítulo anterior. O efeito farmacodinâmico foi avaliado em camundongos por meio da contagem percentual de linfócitos no sangue total, antes (tempo 0) e nos tempos 5 e 10 dias após a administração das formulações em diferentes doses: 4 mg/kg/dia (i.p.), 6 mg/kg/dia (oral e i.p.) e 10 mg/kg/dia (oral). Em paralelo, parâmetros bioquímicos e acompanhamento do peso dos animais foram monitorados para investigar potenciais alterações nas doses experimentais utilizadas. As formulações apresentaram diâmetro em torno de 210 nm com distribuição monomodal das partículas e 99,5% de eficiência de encapsulação. O estudo de liberação *in vitro* mostrou perfil de liberação sustentado do fármaco a partir de TAC-LNC, com mecanismo anômolo de transporte (n=0,8). TAC-LNC demonstrou maior atividade imunossupressora em relação ao fármaco na forma livre, após administração i.p e oral. Na dose de 6 mg/kg/dia, o fármaco nanoencapsulado mostrou efeito imunossupressor equivalente para ambas vias utilizadas. Após administração oral, a nanoencapsulação possibilitou uma redução de pelo menos 40% da dose do fármaco. Além disso, TAC-LNC preveniu a ocorrência de hiperglicemia. Considerando o exposto, as nanocápsulas de núcleo lipídico são potenciais sistemas de liberação para tacrolimus visando aumentar a eficácia farmacológica do fármaco pela via oral.















































































**CAPÍTULO 3** : Avaliação da atividade imunossupressora do tacrolimus presente em nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimentos aniônico e catiônico após administração oral em camundongos

---





### Principais considerações do capítulo 3

O objetivo deste capítulo foi desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com lecitina e polissorbato 80 revestidas ou não com quitosana para avaliar a influência do revestimento das partículas (aniônico e catiônico) sobre a atividade farmacodinâmica do tacrolimus após administração oral das formulações em camundongos. Além disso, alguns parâmetros bioquímicos e o peso dos animais foram monitorados a fim de investigar possíveis alterações decorrentes dos tratamentos utilizados. O efeito farmacodinâmico foi avaliado em camundongos por meio da contagem percentual de linfócitos no sangue total, antes (tempo 0) e nos tempos 5 e 10 dias após a administração oral das formulações na dose de 6 mg/kg/dia. As formulações aniônicas (TAC-LNC<sup>-</sup>) apresentaram potencial zeta negativo, em torno de -15 mV, enquanto que as formulações catiônicas (TAC-LNC<sup>+</sup>) apresentaram valores positivos de potencial zeta, próximo a +17 mV. Os estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos em dois meios com diferentes pHs (4,0 e 7,0) e mostraram que, em ambos os meios testados, as formulações TAC-LNC<sup>-</sup> e TAC-LNC<sup>+</sup> apresentaram perfis de liberação similares entre si e mais sustentados em relação aos perfis do fármaco livre. Os resultados referentes aos estudos *in vivo* mostraram maior redução do número percentual de linfócitos para os animais tratados com a formulação de superfície catiônica, a qual provocou efeito imunossupressor já no quinto dia de tratamento enquanto que a formulação aniônica mostrou efeito somente no décimo dia. Os animais tratados com uma dispersão do fármaco contendo quitosana não apresentaram redução do número de linfócitos durante o experimento. Além disso, a formulação TAC-LNC<sup>+</sup> foi a única capaz de evitar alterações nas concentrações séricas de glicose, creatinina e fosfatase alcalina dos animais. Considerando o exposto, as nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana representam uma interessante estratégia visando o aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos do tacrolimus após sua administração oral.





























































**DISCUSSÃO GERAL**

---



O aumento da eficácia terapêutica e redução de efeitos adversos de fármacos podem ser alcançados por meio da modificação e síntese de novas entidades químicas ou com a utilização de estratégias que modifiquem suas propriedades biofarmacêuticas. Os processos de descoberta e desenvolvimento de novos protótipos tendem a ser complexos. Desse modo, a incorporação de fármacos a sistemas nanocarreadores tem sido uma estratégia bastante estudada atualmente, fazendo desta linha de pesquisa uma área promissora e de destaque no setor farmacêutico (COUVREUR et al., 2002; MARCATO; DURAN, 2008).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos de atual interesse em nanomateriais, dentre os quais se destacam as nanocápsulas de núcleo lipídico. Estes sistemas já têm demonstrado suas potencialidades terapêuticas por meio da encapsulação de fármacos anti-inflamatórios não esteroides e compostos naturais (GUTERRES et al., 2001; BERNARDI et al., 2009; ZANOTTO-FILHO et al., 2013), além de demonstrarem segurança em estudos de toxicidade aguda e sub-crônica em ratos (BULCÃO et al., 2012).

Diversas características tornam o tacrolimus um fármaco bastante propício à sua incorporação em nanocápsulas de núcleo lipídico. Podemos destacar o alto custo da matéria-prima, a gravidade, a cronicidade e o impacto sócio-econômico das doenças e condições fisiológicas a que se destina tratar, como é o caso da artrite reumatoide, terapia de prevenção da rejeição de órgãos transplantados, doença de Crohn e vitiligo. Agregado a estes aspectos, tem-se a baixa solubilidade aquosa do fármaco, a biodisponibilidade variável e incompleta após administração oral, a alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas e os efeitos adversos relacionados, tais como: distúrbios diabetogênicos, renais e neurológicos (GARCIA et al., 2004; KAPTURCZAK et al., 2004).

Diante destes aspectos, este trabalho foi realizado no sentido de desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus com o objetivo de aumentar a atividade anti-inflamatória e imunossupressora *in vivo* após administração intraperitoneal e oral das formulações, lançando-se mão de diferentes estratégias: incorporação do TAC em nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com

polissorbato 80 (capítulos 1 e 2) e, posteriormente, em nanocápsulas de núcleo lipídico com revestimentos aniônico e catiônico (capítulo 3).

No capítulo 1, o tacrolimus foi encapsulado à nanocápsulas de núcleo lipídico objetivando aumentar a eficácia terapêutica do fármaco no tratamento da artrite reumatoide. As formulações foram preparadas com o polímero biodegradável poli( $\epsilon$ -caprolatona) e submetidas a uma ampla caracterização físico-química por meio de análises de difratometria de laser, espectroscopia de correlação de fótons, rastreamento de partículas, espalhamento múltiplo de luz, microscopia eletrônica de transmissão, além de estudos de liberação *in vitro*. Os sistemas apresentaram distribuição monomodal de partículas apenas na faixa nanométrica, adequada estabilidade física e perfil de liberação sustentada do fármaco. As características nanotecnológicas obtidas juntamente com as propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade do polímero utilizado encorajaram a realização do posterior estudo biológico.

O experimento *in vivo* realizado neste capítulo foi a avaliação das propriedades antiartríticas do tacrolimus nanoencapsulado ou na forma livre em modelo de artrite reumatoide induzida por CFA. Foram utilizados ratos Wistar, os quais receberam uma injeção intradérmica do adjuvante na pata direita e após 14 dias da indução da artrite procedeu-se o tratamento dos animais com as formulações equivalentes a 2,0 mg/kg/dia do tacrolimus. Essa dose foi selecionada após um estudo piloto, no qual também foi testada a dose de 1,0 mg/Kg/dia, sendo esta pouco efetiva após avaliação visual e com pletismômetro. Este equipamento foi utilizado durante o período de tratamento como forma de avaliar a eficácia das formulações, sendo amplamente empregado para este tipo de estudo, pois monitora o edema por meio do deslocamento do volume de uma solução aquosa apropriada.

Até o momento não há trabalhos na literatura que avaliem os efeitos do tacrolimus associado à nanopartículas em modelo animal de artrite reumatoide, embora a eficácia terapêutica desse fármaco já tenha sido descrita e estudada para essa doença (AKIMOTO et al., 2008). Nossos resultados mostraram que a nanoencapsulação do tacrolimus foi capaz de melhorar a resposta antiedematogênica em relação ao fármaco livre, onde a redução do edema passou de 38% para 59% após a nanoencapsulação do fármaco. Estes resultados podem



ser decorrentes de uma combinação de fatores: maior acúmulo das LNC no tecido inflamado, além da menor opsonização e ligação às proteínas plasmáticas (STORM et al., 1995; BERNARDI et al., 2009). Além disso, a nanoencapsulação do fármaco evitou o aumento das concentrações séricas de glicose, o qual foi observado para o fármaco não encapsulado.

A literatura relata que o fato do endotélio apresentar-se fenestrado e mais permeável em regiões inflamadas e tumorais possibilita o acúmulo de nanopartículas nesses sítios. Isto porque em tecidos saudáveis, as células endoteliais estão bem próximas umas das outras permitindo apenas que pequenas moléculas possam atravessar os espaços entre elas, passando do sangue para os tecidos adjacentes. Dessa forma, quando o fármaco está na forma livre, este consegue atravessar o endotélio em quase todas as regiões do corpo, chegando tanto nas regiões-alvo quanto em outras regiões não relacionadas à doença. Diferente de quando o fármaco está encapsulado em nanopartículas de 50 a 500 nm (em média), as quais não são capazes de atravessar a parede de vasos de regiões saudáveis do organismo onde o espaço entre as células é de apenas 15 a 30 nm (ULBRICH; LAMPRECHT, 2010).

A probabilidade de que o maior efeito farmacológico do fármaco nanoencapsulado seja em decorrência da redução da opsonização e/ou ligação às proteínas plasmáticas, deve-se ao revestimento das LNCs com polissorbato 80. Este tensoativo hidrofílico de caráter não iônico confere estabilização estérea às nanopartículas, o que contribui para uma menor adsorção e captura pelos componentes sanguíneos aumentando o tempo de circulação do fármaco (STORM et al., 1995). Vale ressaltar ainda que o tacrolimus possui alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (> 99%), porém o efeito farmacológico é devido apenas a sua fração não ligada (UNDRE, 2003) Desse modo, uma liberação sustentada do fármaco na circulação, como pode prever o estudo de liberação *in vitro*, impediria a sua rápida ligação às proteínas plasmáticas, contribuindo para um maior efeito imunossupressor e anti-inflamatório.

O capítulo 2 abordou o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus e avaliação do efeito da nanoencapsulação do fármaco sobre a resposta imunossupressora *in vivo*. As formulações do capítulo 2 diferem das

formulações do capítulo 1 quanto à fração volumétrica. Para a preparação das TAC-LNC (cap. 2) os componentes das fases orgânica e aquosa, exceto o fármaco, foram utilizados em quantidades duas vezes maior em relação à TAC-LNC<sup>3,7</sup> (cap. 1), porém mantendo sempre a mesma proporção. Nossa hipótese era que essa modificação ocasionasse uma liberação ainda mais sustentada do fármaco, devido à menor concentração de fármaco por partícula, onde esta passou de  $2,08 \pm 0,15 \times 10^{-15}$  (TAC-LNC) para  $1,31 \pm 0,02 \times 10^{-15}$  mmol/fármaco/partícula (TAC-LNC<sup>3,7</sup>). Esta diferença da concentração de fármaco por partícula é decorrente do diferente número de partículas presentes em cada formulação. Como mostram os resultados dos capítulos 1 e 2, ambas as formulações apresentaram características similares de tamanho por PCS, sendo  $212 \pm 11$  para TAC-LNC<sup>3,7</sup> e  $210 \pm 14$  para TAC-LNC, alta eficiência de encapsulação (> 99%) e ausência de cristais por rastreamento de partículas. A Figura 6 mostra um gráfico comparativo apenas dos perfis de liberação obtidos para TAC-LNC<sup>3,7</sup> e TAC-LNC, os quais já estão representados separadamente nos seus respectivos capítulos em comparação ao controle etanólico.

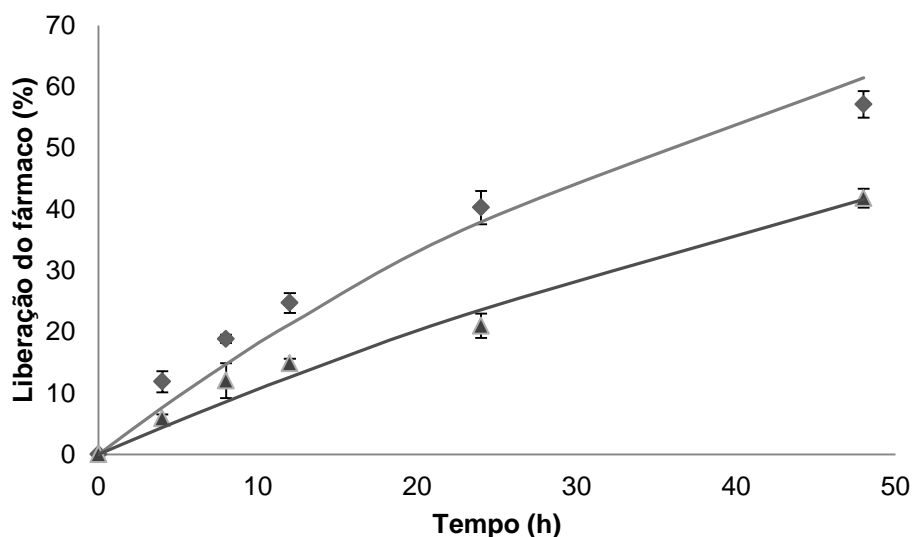


Figura 6 - Perfis de liberação de TAC-LNC<sup>3,7</sup> (losango) e TAC-LNC (triângulo) pelo método de membrana de diálise. As linhas contínuas representam os perfis ajustados de acordo com o modelo monoexponencial (n=3).

O estudo de liberação *in vitro* mostrou um perfil de liberação mais sustentado para TAC-LNC, onde o valor de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) obtido aumentou de 34h (TAC-LNC<sup>3,7</sup>, cap. 1) para 62 h (TAC-LNC, cap.2), o que confirma a nossa hipótese. Desse modo sugere-se que a liberação mais sustentada de TAC-LNC seja decorrente de um menor número de moléculas de tacrolimus no núcleo da partícula. Essas moléculas levariam maior tempo para difundirem-se do núcleo lipídico em direção ao meio aquoso, devido ao menor gradiente de concentração quando comparado às formulações do capítulo 1 (TAC-LNC<sup>3,7</sup>). A partir dessas considerações podemos sugerir dois modelos de organização do fármaco nas nanocápsulas de núcleo lipídico obtidas, conforme a Figura 7.

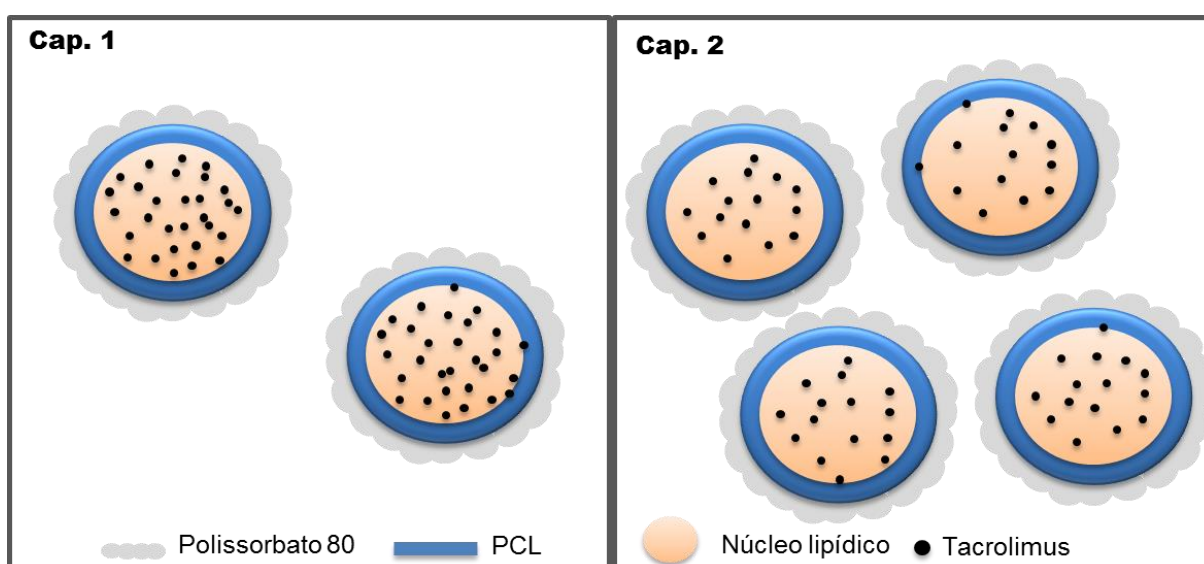


Figura 7 - Modelos de distribuição do fármaco sugeridos para TAC-LNC<sup>3,7</sup> (cap. 1) e TAC-LNC (cap. 2).

O modelo farmacodinâmico conduzido no capítulo 2 baseou-se no poder de redução do número percentual de linfócitos exercido pelo tacrolimus. Considerando que as LNCs apresentam alta estabilidade cinética como coloides sendo capazes de melhorarem as propriedades biofarmacêuticas de fármacos, nosso objetivo foi propor a encapsulação do tacrolimus em LNCs como uma estratégia de liberação oral do fármaco. O tacrolimus foi administrado em camundongos na forma livre, denominada de “TAC-solution” no capítulo 2 ou na forma nanoencapsulada (TAC-LNC). Após tempos pré-estabelecidos (0, 5 e 10 dias) procedeu-se a coleta do sangue por “tail snip” e posterior contagem do número percentual dos linfócitos. Em paralelo alguns parâmetros bioquímicos e o peso dos animais foram monitorados para investigar possíveis alterações nas doses experimentais utilizadas.

Continuando neste capítulo, primeiramente avaliamos a influência da encapsulação do fármaco no modelo experimental independente da barreira de absorção oral. Para isto, o efeito farmacodinâmico do fármaco nanoencapsulado e na sua forma livre foi comparado após administração i.p em camundongos nas doses de 4,0 e 6,0 mg/kg/dia. O animais tratados com o fármaco não encapsulado na maior dose (6,0 mg/kg/dia) ou na forma nanoencapsulada nas duas doses testadas (4,0 e 6,0 mg/kg/dia) apresentaram decréscimo do número percentual de linfócitos após cinco dias de tratamento que permaneceu reduzido até o décimo dia ( $p > 0,05$ ). Enquanto que, os animais tratados com o fármaco livre na menor dose (4,0 mg/kg/dia) só apresentaram decréscimo no número de linfócitos (%) no décimo dia. Isso mostra que na dose de 4,0 mg/kg/dia o efeito farmacodinâmico do fármaco é significativamente maior quando está nanoencapsulado. Estes resultados demonstraram que a nanoencapsulação aumentou a eficácia farmacológica do tacrolimus, no mínimo em 30%, desde que o efeito imunossupressor de TAC-LNC na dose de 4,0 mg/kg/dia foi equivalente ao efeito de “TAC-solution” na dose de 6,0 mg/kg/dia. Considerando que a glicoproteína-P (P-gp) é expressa na superfície dos linfócitos (PARASRAMPURIA et al., 2001), o maior efeito imunossupressor de TAC-LNC em relação ao fármaco livre na mesma dose (4,0 mg/kg/dia) pode ser atribuído ao não reconhecimento do fármaco pela P-gp na membrana celular dos linfócitos, o qual ficaria “escondido” no interior das nanocápsulas de núcleo lipídico. Apesar de que o próprio polissorbato 80, tensoativo que reveste as LNCs, é capaz de inibir a glicoproteína-P. Entretanto, “TAC-solution” também foi preparada com polissorbato 80 na mesma concentração de TAC-LNC. Desse modo, estes resultados sugerem que a simples adição de polissorbato 80 pode não estar associada à inibição da glicoproteína-P. O maior efeito farmacodinâmico de TAC-LNC estaria relacionado à forma de organização do polissorbato 80 e às propriedades físico-químicas dos sistemas desenvolvidos.

Além disso, o revestimento hidrofílico de nanopartículas com polissorbato 80 é uma estratégia capaz de diminuir a interação de sistemas coloidais com componentes sanguíneos (proteínas plasmáticas e opsoninas) aumentando o tempo de circulação na corrente sanguínea. Troster e colaboradores (1990) relataram que nanopartículas de polimetil[ $^{14}\text{C}$ ]metacrilato revestidas com polissorbato 80 foram encontradas em concentrações significativamente maiores no sangue e no baço que

as mesmas partículas não revestidas após administração intravenosa em ratos. Estes resultados são interessantes devido ao baço ser o maior órgão controlador do sistema imune (TRÖSTER et al., 1990). Esta combinação de fatores (não reconhecimento pela glicoproteína-P e modificação na biodistribuição) pode ser a principal responsável pelo maior efeito farmacodinâmico do fármaco encapsulado a LNCs em relação ao mesmo na forma livre, porém maiores investigações são necessárias para confirmação. É importante ressaltar que nossas formulações possuem a vantagem de não conter o óleo de rícino hidrogenado, tensoativo responsável por reações alérgicas após administração intravenosa da formulação comercial (TATETSU et al., 2003).

Prosseguindo nosso estudo, a formulação TAC-LNC foi comparada à “TAC-solution” após administração oral em camundongos nas doses de 6,0 e 10,0 mg/kg/dia. Para nossa surpresa, “TAC-solution” na dose de 6,0 mg/kg/dia não apresentou efeito sobre o percentual de linfócitos durante os dez dias de experimento, enquanto que a mesma na dose de 10,0 mg/kg/dia apresentou decréscimo linfocitário (%) significativo apenas no décimo dia. Por outro lado, os grupos que receberam TAC-LNC, em ambas as doses, apresentaram redução significativa no número percentual de linfócitos após 05 dias de tratamento, o qual permaneceu até décimo dia. Os resultados mostraram que o efeito imunossupressor de TAC-LNC na menor dose (6,0 mg/kg/dia) foi equivalente a “TAC-solution” na maior dose (10,0 mg/kg/dia), indicando que a nanoencapsulação permitiu uma redução de pelo menos 40% da dose.

Em uma análise comparativa, considerando somente os grupos tratados com formulações na dose de 6,0 mg/kg/dia pelas diferentes vias de administração observou-se que os grupos tratados com tacrolimus livre apresentaram diferença na redução linfocitária (tempos 5 e 10) entre as vias oral e i.p. ( $p \leq 0,05$ ) enquanto que os animais tratados com as suspensões de nanocápsulas apresentaram perfis de decréscimo linfocitário semelhantes entre as duas vias de administração testadas, sem diferença estatística entre todos os tempos analisados. A semelhança do efeito farmacodinâmico oral e sistêmico das TAC-LNC indica um aumento da biodisponibilidade oral do fármaco quando encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico.

A literatura reporta que quando nanopartículas são administradas oralmente na forma de suspensão ocorre rápida difusão pelo trato gastrointestinal e adesão na superfície da mucosa. A absorção pode ocorrer majoritariamente via células-M das placas de Peyer, onde as partículas migrariam diretamente para os ductos linfáticos, diminuindo o metabolismo de primeira passagem do fármaco. Dessa forma, após administração oral, os sistemas nanoparticulados podem propiciar proteção ao metabolismo do citocromo P450A e “escape” do fármaco ao efluxo da P-gp, a qual está presente na membrana celular da mucosa gastrointestinal. A possibilidade de substituição da administração do fármaco de uma via parenteral por uma via enteral, representadas neste modelo animal pelas rotas i.p e oral, respectivamente, torna as nanocápsulas de núcleo lipídico sistemas promissores visando o aumento da eficácia farmacológica com redução da dose do tacrolimus, considerando a biodisponibilidade errática e os efeitos adversos do fármaco. Além disso, a via oral é forma mais prática e segura para administração de medicamentos (AULTON, 2005; LAMPRECHT et al., 2005; NASSAR et al., 2008).

Em relação ao peso corpóreo dos animais foi observado que os grupos tratados com as formulações contendo tacrolimus nanoencapsulado ou livre não apresentaram alterações significativas nesse parâmetro após a administração oral ou i.p.. Diferentemente dos grupos que receberam as formulações controle, os quais mostraram ganho de peso significativo em relação ao tempo zero pelas duas vias de administração. Isto mostra que esse efeito adverso, decorrente provavelmente da diarreia observada em animais que receberam formulações com tacrolimus, deva-se somente ao fármaco e não ao fato de estar livre ou nanoencapsulado. A respeito dos parâmetros bioquímicos observou-se aumento significativo das concentrações séricas de glicose para os animais tratados com “TAC-solution” (6,0 e 10,0 mg/kg/dia) após administração oral. Este aumento já poderia ser esperado, visto que a hiperglicemia é comumente relatada na terapia com tacrolimus. Entretanto, a nanoencapsulação possibilitou um descréscimo desse efeito adverso já que somente os animais tratados com TAC-LNC na maior dose (10,0 mg/kg/dia) apresentaram aumento significativo nas concentrações de glicose em relação ao controle (água).

Com o intuito de avaliar a influência das propriedades de superfície de nanocápsulas de núcleo lipídico sobre a eficácia farmacodinâmica após administração oral do tacrolimus, o capítulo 3 abordou o desenvolvimento e avaliação da atividade imunossupressora de nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimentos aniônico e catiônico em camundongos. Adicionalmente, parâmetros bioquímicos e o peso dos animais foram monitorados para detecção de possíveis alterações decorrente das formulações nas condições experimentais utilizadas. Na obtenção dessas formulações, foi adicionada a lecitina de soja na fase orgânica dos sistemas, pois as cargas aniônicas desse tensoativo facilitam a posterior interação iônica com os grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana. As formulações aniônicas (B-LNC<sup>-</sup> e TAC-LNC<sup>-</sup>) foram diluídas com água com mesmo volume de solução de quitosana das formulações catiônicas (B-LNC<sup>+</sup> e TAC-LNC<sup>+</sup>). Os resultados demonstraram a possibilidade do revestimento catiônico das suspensões, as quais apresentaram potencial zeta positivo mantendo o diâmetro das partículas na faixa nanométrica e com baixa polidispersão.

Enquanto nos capítulos 1 e 2, os perfis de liberação das nanocápsulas foram comparados aos perfis de difusão do fármaco a partir de soluções etanólicas, no capítulo 3, foram comparados os perfis de liberação entre nanocápsulas e formulações do fármaco não encapsulado (TAC-D e TAC-D-Q) que foram administradas nos animais. Devido à baixa solubilidade aquosa do tacrolimus, utilizou-se DMSO e polissorbato 80 para preparação do fármaco livre. A formulação do fármaco livre, anteriormente denominada de TAC-solução e “TAC-solution” nos capítulos 1 e 2, passou a denominar-se de TAC-D ou TAC-D-Q (com adição de quitosana) no capítulo 3. Isso porque, pelos experimentos de liberação, vimos que o fluxo do tacrolimus a partir das soluções etanólicas foi aproximadamente 3,3 vezes maior que o fluxo das “soluções” administradas nos animais. Dessa forma, as formulações do fármaco livre não se tratam de soluções e sim de dispersões.

O experimentos de liberação conduzidos no capítulo 3 mostraram que a presença de quitosana e os diferentes pHs dos meios de liberação (pH 7,0 e pH 4,0) não influenciaram nos perfis de liberação das dispersões e formulações nanoencapsuladas do tacrolimus. O mecanismo de transporte do fármaco a partir das nanocápsulas também não foi alterado, permanecendo anômolo nas diferentes

condições testadas. Considerando a baixa solubilidade aquosa e a alta eficiência de encapsulação do fármaco atribui-se que o tacrolimus está majoritariamente concentrado no núcleo lipídico das formulações. Essa atribuição está de acordo com o algoritmo proposto pelo nosso grupo de pesquisa, o qual prevê modelos de distribuição de moléculas nas LNCs a partir do seu  $\text{Log } D$ . O valor de  $\text{Log } D$  para o tacrolimus é alto ( $\text{Log } D = 3,96$ ), sendo assim, considerada grande a sua afinidade pelo núcleo (OLIVEIRA et al., 2013). Dessa forma, os resultados indicam que a etapa limitante da liberação do fármaco a partir de TAC-LNC<sup>-</sup> e TAC-LNC<sup>+</sup> é a sua difusão pelo núcleo lipídico e passagem através da parede polimérica de PCL. Assim, a difusão do fármaco pelos demais compartimentos externos à PCL (polissorbato 80, lecitina e quitosana) não influenciariam nos parâmetros de liberação do tacrolimus.

A avaliação farmacodinâmica realizada após administração oral das formulações mostrou que os animais tratados com o fármaco livre (TAC-D e TAC-D-Q) não mostraram efeito imunossupressor significativo durante todo o período do experimento. Os animais tratados com TAC-LNC<sup>+</sup> mostraram diminuição significativa no percentual de linfócitos verificada já após cinco dias de tratamento que continuou até o décimo dia ( $p > 0,05$ ). Para os animais tratados com TAC-LNC<sup>-</sup>, o decréscimo linfocitário (%) foi observado somente no décimo dia, mostrando que revestimento catiônico favoreceu a um maior efeito neste parâmetro avaliado quando comparado a formulação não revestida. Desse modo, os resultados indicam que somente a presença da quitosana na solução não foi suficiente para maior redução linfocitária. Além disso, TAC-LNC<sup>+</sup> não mostrou aumento das concentrações séricas de glicose, creatinina e fosfatase alcalina como apresentaram os animais tratados com TAC-LNC<sup>-</sup> e TAC-D-Q.

Ao analisarmos os resultados obtidos para as diferentes nanocápsulas de núcleo lipídico avaliadas nos capítulos 2 e 3, verificamos que os animais tratados com TAC-LNC na dose de 6,0 mg/kg/dia (capítulo 2) apresentaram redução do número de linfócitos iniciada no quinto dia, assim como os animais tratados com TAC-LNC<sup>+</sup> obtidas no capítulo 3. As duas formulações foram capazes de aumentar o efeito imunossupressor após administração oral em relação às outras formulações avaliadas na dose de 6,0 mg/kg/dia como mostra a Figura 8. Além disso, ambas



TAC-LNC e TAC-LNC<sup>+</sup> na mesma dose não provocaram alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados e mostraram comportamento semelhante quanto ao ganho de peso. Os animais tratados com TAC-LNC não apresentaram alteração no peso durante o experimento e os animais que receberam TAC-LNC<sup>+</sup> ganharam peso no décimo dia em relação ao tempo zero. Desse modo, dentre TAC-LNC e TAC-LNC<sup>+</sup> não podemos eleger até o momento, uma formulação mais promissora em termos biológicos, sendo as duas merecedoras de maiores investigações.

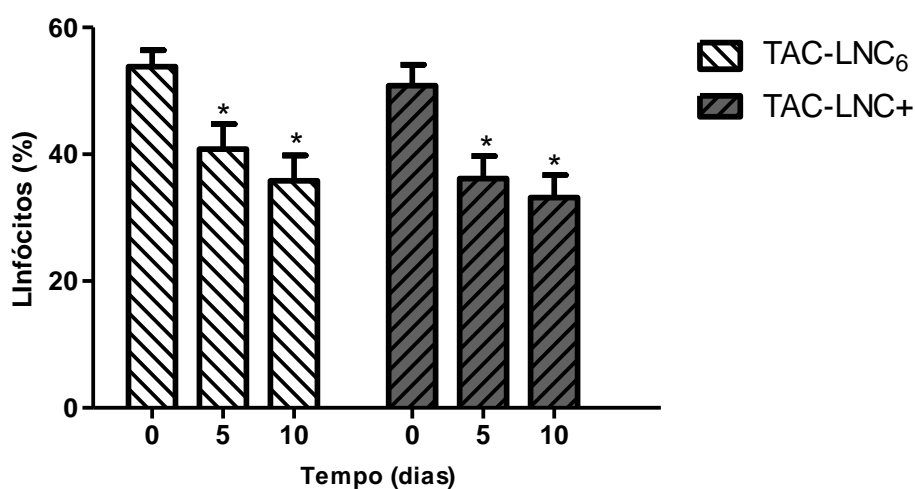


Figura 8 - Resultados do número percentual de linfócitos (média  $\pm$  EPM) obtidos para TAC-LNC (capítulo 2) e TAC-LNC<sup>+</sup> (capítulo 3) na concentração de 6,0 mg/kg/dia após administração oral em camundongos. \*Diferença significativa em relação ao tempo zero. ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

O sucesso no desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes proporções de constituintes e revestimentos de partícula, aliado ao melhor desempenho biológico dos sistemas obtidos em relação ao fármaco livre demonstraram que a nanotecnologia pode funcionar como uma importante ferramenta tecnológica visando o aumento da eficácia farmacológica e redução de efeitos adversos do tacrolimus.



**CONCLUSÕES**

---



- O presente trabalho mostrou a possibilidade de obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus com diferentes propriedades de superfície, as quais apresentaram perfis de liberação sustentado do fármaco e adequadas características nanotecnológicas;
- O tacrolimus nanoencapsulado apresentou efeito antiedematogênico significativamente maior em relação ao fármaco livre após administração intraperitoneal das formulações. Além disso, as nanocápsulas de núcleo lipídico evitaram o aumento das concentrações séricas de glicose decorrente da utilização do fármaco;
- As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus apresentaram eficácia imunossupressora superior em relação ao fármaco livre após administração intraperitoneal e oral das formulações em camundongos, possibilitando a redução da dose do fármaco. Além disso, após administração oral, a nanoencapsulação do tacrolimus também evitou a hiperglicemia neste modelo;
- A formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus possibilitou equivalência farmacodinâmica entre as vias oral e intraperitoneal, representando uma estratégia promissora visando driblar os problemas associados à administração oral do tacrolimus;
- As nanocápsulas de núcleo lipídico com revestimento catiônico de quitosana mostraram maior atividade imunossupressora em relação ao fármaco livre e quando comparadas às nanocápsulas de núcleo lipídico de revestimento aniônico após administração oral em camundongos. Além disso, as nanocápsulas catiônicas evitaram o aumento das concentrações séricas de glicose, creatinina e fosfatase alcalina.



## REFERÊNCIAS

---





AGARWAL, S. K. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. **Journal of managed care pharmacy**, v. 17, n. 9 Suppl B, p. S14-18, 2011.

AKIMOTO, K.; KUSUNOKI, Y.; NISHIO, S.; TAKAGI, K.; KAWAI, S. Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 27, n. 11, p. 1393-1397, 2008.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005.

ALI, S. M.; AHMAD, A.; SHEIKH, S.; AHMAD, M. U.; RANE, R. C.; KALE, P.; PAITHANKAR, M.; SAPTARISHI, D.; SEHGAL, A.; MAHESHWARI, K.; AHMAD, I. Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil free nanosomal formulation of immunosuppressant Tacrolimus: Pharmacokinetics, safety, and tolerability in rodents and humans. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 325-330, 2010.

ALMOALLIM, H.; KAMIL, A. Rheumatoid arthritis: should we shift the focus from "Treat to Target" to "Treat to Work?". **Clinical Rheumatology**, v. 32, n. 3, p. 285-287, 2013.

ARAÚJO, J.; NIKOLIC, S.; EGEA, M. A.; SOUTO, E. B.; GARCIA, M. L. Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery to the posterior segment of the eye. **Colloids Surf., B**, v. 88, n. 1, p. 150-157, 2011.

ARAUJO, L.; SHEPPARD, M.; LÖBENBERG, R.; KREUTER, J. Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, n. 2, p. 209-224, 1999.

ARIMOA, H.; YUNOMAE, K.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 2, p. 547-555, 2001.

BARRACLOUGH, K. A.; STAATZ, C. E.; ISBEL, N. M.; MCTAGGART, S. J. Review: Pharmacodynamic monitoring of immunosuppression in kidney transplantation. **Nephrology (Carlton)**, v. 15, n. 5, p. 522-532, 2010.

BECK, R. C. R.; HAAS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A. R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, p. 990-996, 2006.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions** v. 1, n. 4, p. 377-385, 2001.

BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOME, L. M.; ABDALLA, D. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly(varepsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1-2, p. 271-279, 2012.

BENSON, A.; BARRETT, T.; SPARBERG, M.; BUCHMAN, A. L. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 1, p. 7-12, 2008.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A. C.; JAGER, E.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B.; CALIXTO, J. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 1104-1111, 2009.

BORHADE, V.; NAIR, H.; HEGDE, D. Design and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of tacrolimus. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 13-21, 2008.

BOWMAN, L. J.; BRENNAN, D. C. The role of tacrolimus in renal transplantation. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 4, p. 635-643, 2008.

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2233-2243, 2007.

BULCÃO, R. P.; FREITAS, F. A. D.; VENTURINI, C. G.; DALLEGRAVE, E.; DURGANTE, J.; GÖETHEL, G.; CERSKI, C. T. S.; ZIELINSKY, P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; GARCIA, S. C. Subchronic toxicity evaluation of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, p. 162- 76, 2012.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46-53, 1997a.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. A. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, n. 1, p. 41-50, 1997b.

CHOUGULE, M.; PADHI, B.; MISRA, A. Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus: preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 675-688, 2007.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

DANE, K. Y.; NEMBRINI, C.; TOMEI, A. A.; EBY, J. K.; O'NEIL, C. P.; VELLUTO, D.; SWARTZ, M. A.; INVERARDI, L.; HUBBELL, J. A. Nano-sized drug-loaded micelles deliver payload to lymph node immune cells and prolong allograft survival. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 154-160, 2011.

DE CAMPOS, A. M.; SANCHEZ, A.; GREF, R.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 73-81, 2003.

DE SMET, L.; CELEN, W.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Optimization of Drug Delivery Systems for Intraperitoneal Therapy to Extend the Residence Time of the Chemotherapeutic Agent. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 7, 2013.

DE VIN, F.; RUTHERFORD, P.; FAICT, D. Intraperitoneal administration of drugs in peritoneal dialysis patients: a review of compatibility and guidance for clinical use. **Peritoneal Dialysis International**, v. 29, n. 1, p. 5-15, 2009.

DU TOIT, L. C.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; PILLAY, S.; HARILALL, S. L. Patenting of nanopharmaceuticals in drug delivery: no small issue. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 1, n. 2, p. 131-142, 2007.

DUTTA, S.; AHMAD, Y. The efficacy and safety of tacrolimus in rheumatoid arthritis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 3, n. 6, p. 283-291, 2011.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 6, p. 557-570, 2012.

ERDOGAN, M.; WRIGHT, J. R.; MCALISTER, V. C. Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 6, p. 964-967, 2002.

EUROPEAN. **Commission Recommendation on the definition of the term "nanomaterial"**. COMMISSION, E. Official Journal of the European Union. L275 2011.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIEL, L. A.; REBELO, L. M.; DE MELO SANTIAGO, T.; ADORNE, M. D.; GUTERRES, S. S.; SOARES DE SOUSA, J.; POHLMANN, A. R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7240-7247, 2011.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-361, 2003.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 254-263, 2009.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; DA SILVA, T.; BATTASTINI, A. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 694-703, 2010.

GAFFO, A.; SAAG, K. G.; CURTIS, J. R. Treatment of rheumatoid arthritis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 24, p. 2451-2465, 2006.

GAO, S.; SUN, J.; FU, D.; ZHAO, H.; LAN, M.; GAO, F. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of tacrolimus-dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complex-loaded albumin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 410-416, 2012.

GARCIA, S. C.; LOPES, L. D. S.; SCHOTT, K. L.; BECK, S. T.; POMBLUM, V. J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 40, p. 393-401, 2004.

GONSCHIOR, A. K.; CHRISTIANS, U.; WINKLER, M.; LINCK, A.; BAUMANN, J.; SEWING, K. F. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1426-1432, 1996.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L.; BARROS, L. B.; PALMA, J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, P. L.; RABASCO, A. M. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 336-345, 2007.

GOULD, N.; SILL, M. W.; MANNEL, R. S.; THAKER, P. H.; DISILVESTRO, P.; WAGGONER, S.; YAMADA, S. D.; ARMSTRONG, D. K.; WENZEL, L.; HUANG, H.; FRACASSO, P. M.; WALKER, J. L. A phase I study with an expanded cohort to assess the feasibility of intravenous paclitaxel, intraperitoneal carboplatin and intraperitoneal paclitaxel in patients with untreated ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic Oncology**, v. 125, n. 1, p. 54-58, 2012.

GRAMA, C. N.; ANKOLA, D. D.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for peroral delivery of bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 238-245, 2011.

GUMMERT, J. F.; IKONEN, T.; MORRIS, R. E. Newer immunosuppressive drugs: a review. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 6, p. 1366-1380, 1999.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S. S.; MULLER, C. R.; MICHALOWSKI, C. B.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **Stp Pharma Sciences**, v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, 2003.

HUO, M.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; ZOU, A.; YU, D.; WU, Y.; LI, J.; LI, H. Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, n. 1-2, p. 162-173, 2010.

IDE, N.; NAGAYASU, T.; MATSUMOTO, K.; TAGAWA, T.; TANAKA, K.; TAGUCHI, T.; SUMIDA, Y.; NAKASHIMA, M. Efficacy and safety of inhaled tacrolimus in rat lung transplantation. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 133, n. 2, p. 548-553, 2007.

ISHIHARA, T.; KUBOTA, T.; CHOI, T.; HIGAKI, M. Treatment of experimental arthritis with stealth-type polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, n. 2, p. 412-417, 2009.

ITALIA, J. L.; YAHYA, M. M.; SINGH, D.; RAVI KUMAR, M. N. Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 6, p. 1324-1331, 2009.

JAGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

JANES, K. A.; FRESNEAU, M. P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M. A. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 255-267, 2001.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PETZHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, n. 24, p. 6646-6655, 2012.

JOSÉ ALONSO, M. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, n. 3, p. 168-172, 2004.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J. X.; KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 147-160, 2000.

KALLINTERI, P.; HIGGINS, S.; HUTCHEON, G. A.; ST. POURÇAIN, C. B.; GARNETT, M. C. Novel Functionalized Biodegradable Polymers for Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1885-1894, 2005.

KAPTURCZAK, M. H.; MEIER-KRIESCHE, H. U.; KAPLAN, B. Pharmacology of calcineurin antagonists. **Transplantation Proceedings**, v. 36, n. 2, p. S25-S32, 2004.

KAWAI, S.; HASHIMOTO, H.; KONDO, H.; MURAYAMA, T.; KIUCHI, T.; ABE, T. Comparison of tacrolimus and mizoribine in a randomized, double-blind controlled study in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 11, p. 2153-2161, 2006.

KINO, T.; HATANAKA, H.; HASHIMOTO, M.; NISHIYAMA, M.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1249-1255, 1987.

KOBASHIGAWA, J. A. Strategies in Immunosuppression After Heart Transplantation: Is Less Better? **Circulation: Heart Failure**, v. 4, n. 2, p. 111-113, 2011.

KREUTER, J. The influence of coatings with surfactants on the body distribution of nanoparticles after intravenous injection to rats. **Clinical Materials**, v. 13, n. 1–4, p. 131-134, 1993.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 1, p. 65-81, 2001.

KREUTER, J. Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier (BBB). **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 1, p. 49-54, 2013.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Design of pH-sensitive microspheres for the colonic delivery of the immunosuppressive drug tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 37-43, 2004.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Nanoparticles enhance therapeutic efficiency by selectively increased local drug dose in experimental colitis in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 315, n. 1, p. 196-202, 2005a.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; UBRICH, N.; TAKEUCHI, H.; MAINCENT, P.; KAWASHIMA, Y. FK506 Microparticles Mitigate Experimental Colitis with Minor Renal Calcineurin Suppression. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 2, p. 193-199, 2005b.

MAGARI, K.; NISHIGAKI, F.; SASAKAWA, T.; OGAWA, T.; MIYATA, S.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.; GOTO, T. Anti-arthritic properties of FK506 on collagen-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 52, n. 12, p. 524-529, 2003.

MAJITHIA, V.; GERACI, S. A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 11, p. 936-939, 2007.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 445-451, 2011.

MARCATO, P. D.; DURAN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal for Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216-2229, 2008.



MARCHETTI, S.; MAZZANTI, R.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). **The Oncologist**, v. 12, n. 8, p. 927-941, 2007.

MCALISTER, V. C.; KESHAVAMURTHY, M.; LEE, T. D. Oral delivery of liposomal tacrolimus: increased efficacy and reduced toxicity. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n. 1-2, p. 1110, 1999.

MEISSNER, Y.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: Particle targeting versus pH-sensitive delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, n. 1–2, p. 138-143, 2006.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRÉ, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, n. 2, p. 445-456, 1999.

MIYATA, S.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. **Inflammation Research**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2005.

MOFFATT, S. D.; MCALISTER, V.; CALNE, R. Y.; METCALFE, S. Comparative efficacy of liposomal FK506 with FK506. **Transplantation Proceedings**, v. 30, n. 8, p. 4066-4067, 1998.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113-142, 2010.

MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NAKAGAWA, H. Comparison of the efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment with topical corticosteroids in adult patients with atopic dermatitis: review of randomised, double-blind clinical studies conducted in Japan. **Clinical Drug Investigation**, v. 26, n. 5, p. 235-246, 2006.

NANIWA, T.; WATANABE, M.; BANNO, S.; MAEDA, T. Adding low dose tacrolimus in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to tumor necrosis factor inhibitor therapies. **Rheumatology International**, v. 29, n. 11, p. 1287-1291, 2009.

NASSAR, T.; ROM, A.; NYSKA, A.; BENITA, S. A Novel Nanocapsule Delivery System to Overcome Intestinal Degradation and Drug Transport Limited Absorption of P-glycoprotein Substrate Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2019-2029, 2008.

NASSAR, T.; ROM, A.; NYSKA, A.; BENITA, S. Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 1, p. 77-84, 2009.

O'NEILL, M. J.; BOURRE, L.; MELGAR, S.; O'DRISCOLL, C. M. Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: physiological barriers and preclinical models. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 5-6, p. 203-218, 2011.

OELLERICH, M.; ARMSTRONG, V. W.; SCHÜTZ, E.; SHAW, L. M. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. **Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 309-316, 1998.

OLIVEIRA, C. P.; VENTURINI, C. G.; DONIDA, B.; POLETTO, F. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141-1150, 2013.

OLIVEIRA, L. M. D.; BENDER, A. L.; TRAESEL, M. A.; KROTH, L.; HARTMANN, M. J.; GULLO NETO, S.; SAITOVITCH, D.; THIESEN, F. V. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in pancreas transplantation at São Lucas Hospital. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 339-345, 2007.

PARASRAMPURIA, D. A.; LANTZ, M. V.; BENET, L. Z. A Human Lymphocyte Based Ex Vivo Assay to Study the Effect of Drugs on P-glycoprotein (p-Gp) Function1. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 2001.

PARK, Y.-J.; RYU, D.-S.; LI, D.; QUAN, Q.; OH, D.; KIM, J.; SEO, Y.; LEE, Y.-I.; YONG, C.; WOO, J.; CHOI, H.-G. Physicochemical characterization of tacrolimus-loaded solid dispersion with sodium carboxymethyl cellulose and sodium lauryl sulfate. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 6, p. 893-898, 2009.

PONCHEL, G.; IRACHE, J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced drug delivery reviews**, v. 34, n. 2-3, p. 191-219, 1998.

POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: application to topical delivery of tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 82-94, 2011.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

REDDY, L. H.; MURTHY, R. S. Pharmacokinetics and biodistribution studies of Doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 148, n. 2, p. 161-166, 2004.

SAKUMA, S.; NISHIGAKI, F.; MAGARI, K.; OGAWA, T.; MIYATA, S.; OHKUBO, Y.; GOTO, T. FK506 is superior to methotrexate in therapeutic effects on advanced stage of rat adjuvant-induced arthritis. **Inflammation Research**, v. 50, n. 10, p. 509-514, 2001.

SANTOS, J. E. D.; SOARES, J. D. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, p. 242-249, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SHI, J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3223-3230, 2010.

SHIN, S.-B.; CHO, H.-Y.; KIM, D.-D.; CHOI, H.-G.; LEE, Y.-B. Preparation and evaluation of tacrolimus-loaded nanoparticles for lymphatic delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 2, p. 164-171, 2010.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

SINSWAT, P.; OVERHOFF, K. A.; MCCONVILLE, J. T.; JOHNSTON, K. P.; WILLIAMS, R. O. Nebulization of nanoparticulate amorphous or crystalline tacrolimus - Single-dose pharmacokinetics study in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 1057-1066, 2008.

SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 3, p. 166-174, 2011.

SO HEE NAM, X. Y. J., AND JONG-SANG PARK. Investigation of Tacrolimus Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Drug Delivery. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, p. 956-960, 2011.

STORM, G.; BELLLOT, S. O.; DAEMEN, T.; LASIC, D. D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, n. 1, p. 31-48, 1995.

TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, n. 1-2, p. 160-170, 2005.

TAMURA, S.; OHIKE, A.; IBUKI, R.; AMIDON, G. L.; YAMASHITA, S. Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: The effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 3, p. 719-729, 2002.

TATETSU, H.; ASOU, N.; NAKAMURA, M.; KOH, Y.; TAJIRI, T.; MATSUNO, F.; HORIKAWA, K.; YONEMURA, Y.; MITSUYA, H. [Allergic reaction against an emulsifier, HCO-60, contained in multamin and enocitabine]. **Rinsho Ketsueki**, v. 44, n. 7, p. 471-473, 2003.

TAYLOR, A. L.; WATSON, C. J. E.; BRADLEY, J. A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 56, n. 1, p. 23-46, 2005.

TRÖSTER, S. D.; MÜLLER, U.; KREUTER, J. Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 61, n. 1–2, p. 85-100, 1990.

ULBRICH, W.; LAMPRECHT, A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, p. S55-S66, 2010.

UNDRE, N. A. Pharmacokinetics of tacrolimus based combination therapies. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. suppl 1, p. i12-i15, 2003.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.

VELICKOVIC-RADOVANOVIC, R.; CATIC-DJORDJEVIC, A.; MILOVANOVIC, J. R.; DJORDJEVIC, V.; PAUNOVIC, G.; JANKOVIC, S. M. Population pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant patients. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, n. 6, p. 375-382, 2010.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1–3, p. 200-208, 2011.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, p. 415-422, 1999.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; JANES, K.; BEHRENS, I.; KISSEL, T.; JATO, J. L. V.; ALONSO, M. A. J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 123-131, 2004.

WALLEMACQ, P. E.; REDING, R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2219-2228, 1993.

WANG, Y.; WANG, C.; FU, S.; LIU, Q.; DOU, D.; LV, H.; FAN, M.; GUO, G.; LUO, F.; QIAN, Z. Preparation of Tacrolimus loaded micelles based on poly( $\epsilon$ -caprolactone)–poly(ethylene glycol)–poly( $\epsilon$ -caprolactone). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1–2, p. 184-189, 2011a.

WANG, Y. J.; SUN, J.; ZHANG, T. H.; LIU, H. Z.; HE, F. C.; HE, Z. G. Enhanced oral bioavailability of tacrolimus in rats by self-microemulsifying drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 10, p. 1225-1230, 2011b.

WITKOP, B. Paul Ehrlich and his Magic bullets--revisited. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 143, n. 4, p. 540-557, 1999.

XIE, H.-G. Personalized immunosuppressive therapy in pediatric heart transplantation: Progress, pitfalls and promises. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 126, n. 2, p. 146-158, 2010.

XU, A. E.; ZHANG, D. M.; WEI, X. D.; HUANG, B.; LU, L. J. Efficacy and safety of tacrolimus cream 0.1% in the treatment of vitiligo. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 86-90, 2009.

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

YEH, T.-H.; HSU, L.-W.; TSENG, M. T.; LEE, P.-L.; SONJAE, K.; HO, Y.-C.; SUNG, H.-W. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6164-6173, 2011.

YOSHIDA, T.; KURIMOTO, I.; YOSHIHARA, K.; UMEJIMA, H.; ITO, N.; WATANABE, S.; SAKO, K.; KIKUCHI, A. Aminoalkyl methacrylate copolymers for improving the solubility of tacrolimus. I: Evaluation of solid dispersion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 428, n. 1-2, p. 18-24, 2012.

YURA, H.; YOSHIMURA, N.; HAMASHIMA, T.; AKAMATSU, K.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Synthesis and pharmacokinetics of a novel macromolecular prodrug of Tacrolimus (FK506), FK506-dextran conjugate. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 1, p. 87-99, 1999.

ZAHIR, H.; MCCAUGHAN, G.; GLEESON, M.; NAND, R. A.; MCLACHLAN, A. J. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 298-309, 2004.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; DE OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; FORCELINI, C. M.; BECK, R. C. R.; MOREIRA, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 2, p. 156-167, 2013.

ZEEVI, A.; BRITZ, J. A.; BENTLEJEWSKI, C. A.; GUASPARI, D.; TONG, W.; BOND, G.; MURASE, N.; HARRIS, C.; ZAK, M.; MARTIN, D.; POST, D. R.; KOWALSKI, R. J.; ELMAGD, K. A. Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients. **Transplant Immunology**, v. 15, n. 1, p. 17-24, 2005.





## ANEXO

Artigos científicos realizados em autoria e coautoria durante o período de doutorado:

DIMER, F. A.; **FRIEDRICH, R. B.**; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POLHMANN, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. Manuscrito submetido à revista Química Nova.

**FRIEDRICH, R. B.**; DIMER, F. A.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Nanoencapsulation of tacrolimus in lipid-core nanocapsules showed similar immunosuppressive activity after oral and intraperitoneal administrations. Manuscrito submetido à revista Journal of Biomedical Nanotechnology.

DIMER, A. F.; ORTIZ, M.; PASE, S. C.; ROVERSI, K.; **FRIEDRICH R. B.**; POHLMANN A. R.; BURGER, M. E.; GUTERRES, S. S. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. Manuscrito submetido à revista Journal of Biomedical Nanotechnology.

**FRIEDRICH, R. B.**; CORADINI, K.; FONSECA, F. N.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Improvement of anti-arthritic properties of tacrolimus-loaded lipid-core nanocapsules in experimental model of chronic inflammation in rats. Manuscrito em preparação a ser submetido à revista Journal Nanoparticle Research.

**FRIEDRICH, R. B.**; FONSECA, F. N.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Immunosuppressive activity of tacrolimus-loaded lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan by oral route. Manuscrito em preparação a ser submetido à revista European Journal of Pharmaceutical Sciences.



## BIOGRAFIA

### **Graduação:**

Farmácia Industrial (2002 – 2007): Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

### **Pós-graduação:**

Nível Mestrado (2007 – 2009): Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Dissertação: Nanocápsulas contendo dexametasona: desenvolvimento, caracterização e incorporação em formas farmacêuticas sólidas.

Nível Doutorado (2009 – 2013): Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

### **Docência:**

Professora substituta (2007 – 2009): Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disciplina ministrada: Tecnologia dos Medicamentos e dos Cosméticos.

### **Lista de publicações:**

GONCALVES, A. F. G., **FRIEDRICH, R. B.**, BOLIGON, A., PIANA, M., BECK, R.C.R., ATHAYDE, M.L. Antioxidant capacity, total phenolic contents and HPLC determination of rutin in *Viola tricolor* (L) flowers. *Free Radicals and Antioxidants*, v. 2, p. 32 – 37, 2012.

**FRIEDRICH, R. B.**, BASTOS, M. O., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S. S., BECK, R. C. R. Drying Polymeric Drug-Loaded Nanocapsules: The Wet Granulation Process as a Promising Approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.10, p.616 - 621, 2010.

MARCHIORI, M. L., LUBINI, G, DALLA NORA, G., **FRIEDRICH, R. B.**, FONTANA, M. C., OURIQUE, BASTOS, M. O.; RIGO, L. A., SILVA, C. B., TEDESCO S. B., BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.36, p. 962 - 971, 2010.

**FRIEDRICH, R. B.**, BASTOS, M. O., FONTANA, M. C, OURIQUE, A. F., BECK, R. C. R. Tablets containing Drug-Loaded Polymeric Nanocapsules: An Innovative Platform. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.10, p.5885 - 5888, 2010.

**FRIEDRICH, R. B.**, RAVANELLO, A., CICHOTA, L.C., ROLIM, C.M.B., BECK, R.C.R. Validation of a simple and rapid UV spectrophotometric method for dexamethasone assay in tablets. *Química Nova*, v.32, p.1052 - 1054, 2009.

**FRIEDRICH, R. B.**, FONTANA, M.C., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BECK, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsules suspensions. *Química Nova*, v.31, p.1131 - 1136, 2008.

BASTOS, M. O., **FRIEDRICH, R. B.**, BECK, R.C.R. Effects of Filler-Binders and Lubricants on Physicochemical Properties. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.27, p.578 - 583, 2008.