



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FARMÁCIA**

BRUNA GUIMARÃES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SISTEMA
MICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA**

**CAMPINA GRANDE
2024**

BRUNA GUIMARÃES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SISTEMA
MICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno
Coorientadora: Dra. Airla Laana de Medeiros Cavalcanti

**CAMPINA GRANDE
2024**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S725a Sousa, Bruna Guimarães de.
Avaliação de toxicidade *in vitro* e *in vivo* de sistema microemulsionado contendo pentoxifilina [manuscrito] / Bruna Guimarães de Sousa. - 2024.
53 f. : il.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. Bolivar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia - CCBS".

"Coorientação: Prof. Dra. Airla Laana de Medeiros Cavalcanti, Farmácia".

1. Citotoxicidade. 2. Metilxantinas. 3. Microemulsão. 4. Toxicidade dérmica. 5. Farmacodinâmica. I. Título

21. ed. CDD 615.7

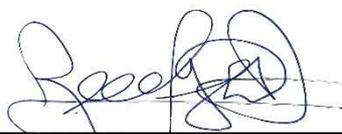
BRUNA GUIMARÃES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SISTEMA
MICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 19/11/2024.

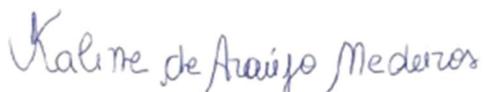
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Alisson Macário de Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba



Me. Kaline de Araújo Medeiros
Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por me sustentar e estar ao meu lado em todos os momentos, me dando força e direcionamento para seguir o caminho certo. Sua presença foi essencial para minha jornada acadêmica e pessoal. A fé que move montanhas me trouxe até aqui.

Agradeço aos meus pais, **Joelma Guimarães e Clemente Filho**, por não terem medido esforços para me apoiarem. Gratidão a todo investimento financeiro, por todas as preocupações, pelos princípios que me deram, por todos os conselhos e por todo apoio emocional sempre que precisei.

Minha gratidão se estende à minha **família**, especialmente aos meus irmãos, que sempre me apoiaram, me elogiaram e trouxeram leveza com suas brincadeiras. Ao meu sobrinho, cujos abraços e carinho tantas vezes aliviaram minhas angústias, e também aos meus tios, primos, avós e a todos que torceram por mim e me ajudaram de alguma forma.

Agradeço à **Marcelinho**, que nunca me deixou desanimar, que me deu força e me ajudou em tudo o que poderia. Pela parceria, companheirismo e por ter sido o meu escape nos dias mais difíceis. Tem sido incrível compartilhar a vida com você.

Aos meus amigos, sou imensamente grata. Aos companheiros de jornada universitária, **Luma e Daniel**, que dividiram o peso do processo comigo, verdadeiros amigos que posso chamar de irmãos. E aos amigos de longa data, que mesmo à distância, sempre me apoiaram e vibraram com minhas conquistas.

Agradeço à minha equipe de pesquisa, **Bianca, Jordannia e Maria Júlia**, pelo apoio constante, dedicação e por estarem comigo em cada passo. Devo muito do meu sucesso a vocês.

À **Universidade Estadual da Paraíba**, que me proporcionou a estrutura para me tornar uma profissional dedicada e apaixonada pela Farmácia, e aos professores, que, com cada ensinamento, experiência compartilhada e conselho, tornaram esta uma das melhores etapas da minha vida acadêmica.

Agradeço ao **Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos** (LDCPF), ao professor **Bolívar Damasceno** e, especialmente, a **Airlla Laana**, por me acolherem, orientarem e proporcionarem oportunidades de crescimento, mostrando como eu poderia evoluir e me tornar um estudante e futura profissional de excelência.

Agradeço também ao Laboratório de **Oncofarmacologia do IPeFarM**, coordenado pela Profa. Marianna Vieira Sobral que, em conjunto com o seu aluno Paulo Bruno Araújo Loureiro, me proporcionou a estrutura e apoio para realização dos experimentos de citotoxicidade. Ainda, agradeço ao **Prof. Alisson Macário de Oliveira** pelo auxílio nas análises histológicas realizadas, bem como o **Biotério Professor Eduardo Barbosa Beserra**, na pessoa de seus funcionários, que permitiram a realização do ensaio *in vivo*.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha caminhada acadêmica, minha eterna gratidão.

RESUMO

A pentoxifilina (PTX) é um derivado sintético das metilxantinas, atua como inibidor da enzima fosfodiesterase (PDE) e exibe propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias que auxiliam no tratamento de diversas doenças dermatológicas. A incorporação da PTX em microemulsões (ME) é uma alternativa promissora para o tratamento tópico dessas afecções, uma vez que exibiu propriedade anti-inflamatória e perfil controlado de liberação *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi investigar a toxicidade da ME-PTX através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* incluíram ensaios de citotoxicidade, avaliada pelo teste de MTT em células L929 (fibroblastos murinos) e HaCat (queratinócitos humanos), além da análise do potencial hemolítico das amostras. A avaliação da toxicidade dérmica aguda *in vivo* seguiu as diretrizes da OECD nº 402. Nas células L929, tanto a ME-PTX quanto a ME-branca (ME-B, sem fármaco) reduziram significativamente a viabilidade celular na concentração de 1000 µg/mL, resultando em uma viabilidade de 10±4% e 6±0,1%, respectivamente. Em concentrações menores (0,1;1;10;100 µg/mL), as formulações não promoveram citotoxicidade. Em HaCat, ME-PTX e ME-B reduziram a viabilidade celular nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, para 79±2,9% e 79±0,9% em 100 µg/mL, e para 49±4,28% e 51±5% em 1000 µg/mL, respectivamente. A PTX isolada não demonstrou citotoxicidade significativa em nenhuma linhagem ou concentração testada, indicando que a redução de viabilidade celular associada à ME-PTX se deve à composição da formulação e não ao fármaco. As taxas de hemólise apresentadas pela ME-B e ME-PTX indicaram hemocompatibilidade das formulações na maioria das concentrações testadas. No ensaio de toxicidade dérmica aguda *in vivo*, os animais tratados com ME-PTX não apresentaram sinais evidentes de toxicidade ou morte, classificando-a como de baixa toxicidade e pertencente à categoria GHS 5/ inclassificável. Entretanto, a ME-B induziu irritação cutânea entre o 2º e 11º dia de experimento. Apesar disso, não foi visto anormalidade nas análises histopatológicas dos órgãos. Portanto, a incorporação de PTX em uma microemulsão revelou-se uma alternativa segura para o desenvolvimento de novos estudos voltados ao tratamento de afecções dermatológicas.

Palavras- chave: citotoxicidade; metilxantinas; microemulsão; toxicidade dérmica; farmacodinâmica.

ABSTRACT

Pentoxifylline (PTX) is a synthetic derivative of methylxanthines, acting as an inhibitor of the phosphodiesterase (PDE) enzyme. It exhibits immunomodulatory and anti-inflammatory properties, aiding in the treatment of various dermatological conditions. The incorporation of PTX into microemulsions (ME) is a promising alternative for the topical treatment of these conditions, as it has demonstrated anti-inflammatory properties and a controlled release profile *in vitro*. The aim of this study was to investigate the toxicity profile of ME-PTX through *in vitro* and *in vivo* assays. *In vitro* studies included cytotoxicity assays, assessed by the MTT test on L929 cells (murine fibroblasts) and HaCat cells (human keratinocytes), as well as analysis of the hemolytic potential of the samples. The evaluation of acute dermal toxicity *in vivo* followed the OECD No. 402 guidelines. In L929 cells, both ME-PTX and ME-white (ME-B, without the drug) significantly reduced cell viability at a concentration of 1000 µg/mL, resulting in viabilities of 10±4% and 6±0.1%, respectively. At lower concentrations (0.1;1;10;100 µg/mL), the formulations did not induce cytotoxicity. In HaCat cells, ME-PTX and ME-B reduced cell viability at concentrations of 100 and 1000 µg/mL to 79±2.9% and 79±0.9% at 100 µg/mL, and to 49±4.28% and 51±5% at 1000 µg/mL, respectively. PTX alone did not show significant cytotoxicity in any tested cell line or concentration, indicating that the reduction in cell viability associated with ME-PTX is due to the formulation composition rather than the drug itself. The hemolysis rates exhibited by ME-B and ME-PTX indicated hemocompatibility of the formulations at most tested concentrations. In the *in vivo* acute dermal toxicity assay, animals treated with ME-PTX showed no obvious signs of toxicity or death, classifying it as low toxicity and belonging to GHS category 5 / unclassified. However, ME-B induced skin irritation between the 2nd and 11th day of the experiment. Despite this, no abnormalities were observed in the histopathological analysis of the organs. Therefore, the incorporation of PTX into a microemulsion proved to be a safe alternative for the development of further studies aimed at treating dermatological conditions.

Keywords: cytotoxicity; methylxanthines; microemulsion; dermal toxicity; pharmacodynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Percentual de viabilidade celular na linhagem L929 após o tratamento com ME-PTX, ME-B e PTX, por 24h, através do ensaio de MTT..... 29
- Figura 2-** Percentual de viabilidade celular na linhagem HaCaT após o tratamento com ME-PTX, ME-B e PTX, por 24h, através do ensaio do MTT..... 30
- Figura 3-** Percentual de hemólise induzida por ME-B e ME-PTX em diversas concentrações..... 31
- Figura 4-** Registro do 4º dia após aplicação tópica de dose única da ME-B e ME-PTX..... 34
- Figura 5-** Fotomicrografias dos órgãos dos animais do grupo controle, ME-B e ME-PTX..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Percentual de viabilidade celular em HaCaT e L929 após o tratamento com ME-PTX, ME-B e PTX durante 24 horas utilizando o ensaio do MTT.....	28
Tabela 2-	Percentual hemolítico das formulações de ME-PTX e ME-B.	31
Tabela 3-	Efeitos da administração tópica de dose única de ME-B e ME-PTX em ratos.....	32
Tabela 4-	Índice de irritação primária conforme parâmetros de Draize.....	35
Tabela 5-	Índice de órgãos dos animais tratados com a ME-PTX e ME-B comparados ao grupo controle.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise variância
A/O	Água em óleo
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAP	Doença arterial periférica
DL₅₀	Dose letal de 50%
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EPM	Erro padrão da média
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
GSH	Sistema de classificação globalmente harmonizado para substâncias e misturas químicas
HaCaT	Queratinócitos humanos
IGS	Padronização Genética Internacional
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
L929	Fibroblastos murinos
LDCPF	Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos
ME	Microemulsão

ME-B	Microemulsão branca
ME-PTX	Microemulsão incorporada com Pentoxifilina
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio
O/A	Óleo em água
OECD	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDE	Fosfodiesterase
PTX	Pentoxifilina
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TACC	Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico
TNF-a	Fator de necrose tumoral - alfa
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1	Afecções dermatológicas.....	16
3.2	Administração de fármacos por via tópica.....	16
3.3	Pentoxifilina (PTX)	17
3.4	Microemulsão.....	18
3.5	Avaliação de toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	19
3.5.1	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	19
3.5.2	<i>Ensaio de hemólise in vitro</i>	20
3.5.3	<i>Ensaio de toxicidade dérmica aguda</i>	20
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	Local de Pesquisa.....	22
4.2	Obtenção da microemulsão contendo pentoxifilina (ME-PTX)	22
4.3	Citotoxicidade.....	23
4.3.1	<i>Linhagens celulares e cultivo in vitro</i>	23
4.3.2	<i>Avaliação da atividade citotóxica in vitro</i>	23
4.4	Ensaio de hemólise.....	24
4.5	Protocolo experimental <i>in vivo</i>	24
4.5.1	<i>Animais</i>	25
4.5.2	<i>Avaliação da toxicidade dérmica aguda</i>	25
4.5.3	<i>Análise histopatológica</i>	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Citotoxicidade.....	28
5.2	Ensaio de hemólise.....	30
5.3	Avaliação da toxicidade dérmica aguda.....	32
5.5	Análise histopatológica.....	36
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	43

REFERÊNCIAS	44
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	53

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2024). Dessa maneira, obtém um papel crucial para manutenção e proteção do indivíduo (Nguyen; Soulika, 2019). É a pele que faz a principal função de barreira entre organismos exógenos e endógenos, auxiliando na integridade dos tecidos (Martins; Reis, 2011). Essa função está direcionada ao extrato córneo, onde a formação da barreira física é mediada principalmente por corneócitos em conjunto com outros componentes. Logo, o comprometimento dos elementos da barreira pode contribuir para a uma proteção inadequada, auxiliando no aparecimento de condições inflamatórias na pele e conseqüentemente a presença de possíveis distúrbios nessa região (Nguyen; Soulika, 2019) que podem evoluir para quadros agravados, ocasionando um problema recorrente na população, as dermatopatias.

As doenças de pele são um problema em comum e estão presentes em todas o território mundial, afetando entre 30% e 70% dos indivíduos (Hay *et al.*, 2014). No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), as doenças de pele estão entre os três maiores motivos de busca por atendimento em saúde (SBD, 2006). Ainda, estudo aponta que entre mil pessoas com idade variada de 18 a 59 anos, 86% têm problemas de pele (Revista da Farmácia, 2022). Esses dados revelam que as dermatopatias apresentam-se como um significativo problema mundial que afeta a qualidade de vida das pessoas, principalmente aquelas que a possuem de forma crônica (SBD *et al.*, 2018).

Logo, faz-se necessária a busca por novos princípios ativos e sistemas de liberação de fármacos que minimizem os danos causados pelas doenças dermatológicas e que superem os problemas das formulações convencionais, como a baixa biodisponibilidade e o aumento das reações adversas (Henrique; Falcare; Lopes, 2006; Silva, 2010). Afinal, o impacto das condições inflamatórias cutâneas no bem-estar do paciente é significativo, o que torna crucial a busca por soluções terapêuticas eficazes.

Nesse contexto, a Pentoxifilina (PTX) é um anti-inflamatório que participa na inibição de enzimas como a fosfodiesterase (principalmente na isoforma PDE4) e citocinas que desempenham um papel importante em muitas doenças inflamatórias da pele. Inicialmente, sua utilização foi direcionada à claudicação intermitente, que é um sintoma comum de doença arterial periférica (DAP), contudo, tem demonstrado

respostas satisfatórias com seu uso *off-label* direcionado para doenças dermatológicas (Balazic *et al.*, 2023; Hassan, *et al.*, 2014).

Dessa maneira, a via de administração tópica é uma via promissora para incorporação e liberação da PTX, considerada minimamente invasiva e levando a uma maior adesão do paciente, além de permitir uma liberação controlada e anulação do efeito de primeira passagem (Cui *et al.*; 2021).

O uso da PTX de forma tópica requer a sua incorporação em formulações que concedam uma maior estabilidade, eficácia terapêutica, aumento de biodisponibilidade no tecido e uma administração de forma facilitada. Dessa maneira, a PTX incorporada a sistemas coloidais, como as microemulsões (ME), podem adquirir essas propriedades desejadas (Üstündag *et al.*, 2020; Shukla *et al.*; 2018). As microemulsões são formadas por uma fase aquosa, uma fase oleosa e uma fase de tensoativos (um ou uma mistura deles), o que conferem a característica de serem compatíveis tanto com fármacos hidrofílicos, como hidrofóbicos. Além disso, elas são termodinamicamente estáveis, isotrópicas, opticamente transparentes, e com gotículas na escala nanométrica, o que facilita a sua permeação na pele, tornando potencialmente atrativas para incorporação de fármacos (Paliwal *et al.*, 2019).

Cavalcanti *et al.* (2016) incorporaram a PTX em uma microemulsão e os resultados de sua caracterização mostraram que a ME-PTX é um agente promissor, e em seu estudo *in vivo* foi possível observar a sua atividade anti-inflamatória, tornando-se potencialmente eficaz para tratar diversas afecções dermatológicas.

Contudo, apesar de inicialmente se mostrar promissor, a incorporação de substâncias em novos sistemas requer um aprofundamento em seus estudos acerca do potencial tóxico e possível ação prejudicial ao organismo humano. Portanto, o presente trabalho se propõe a investigar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* da ME-PTX, de maneira a comprovar e garantir a segurança à essa nova alternativa para o uso da PTX.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade da ME-PTX através de ensaios *in vitro* e *in vivo* visando sua utilização em afecções dermatológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a citotoxicidade *in vitro* da ME-PTX em fibroblastos murinos e queratinócitos humanos;
- Examinar o perfil de hemocompatibilidade *in vitro* da ME-PTX através de ensaio de hemólise;
- Verificar a toxicidade dérmica aguda *in vivo* da ME-PTX em ratos Wistar.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Afecções dermatológicas

A pele é a maior barreira de proteção do organismo humano. Esta função a expõe a inúmeras agressões físicas, químicas e biológicas que contribuem para o aparecimento de diversas afecções dermatológicas. Entretanto, as causas podem variar de acordo com seu agente, de origem exógena ou endógena, à sua exposição prolongada e o próprio sistema imunológico do indivíduo (Martins; Reis, 2011).

Vale ressaltar que, as doenças que acometem a pele, podem estar restritas a ela ou, por vezes, a pele expressa sinais e sintomas como a primeira manifestação ou manifestação tardia de doenças sistêmicas demandando diferentes tipos de tratamentos, de acordo com a sua procedência (Brasil, 2002).

As dermatoses dividem-se principalmente em: eczematosas, de anexos cutâneos, infecciosas, escamosas e devido à exposição solar crônica (Wangenheim *et al.*, 2019). Seus tratamentos convencionais variam de orais a tópicos, que muitas vezes não exercem, de maneira satisfatória, o efeito esperado. Assim, faz-se necessário a inovação e busca por novos métodos de liberação, para que com os benefícios da aplicação tópica, se tornem promissores para a melhora dos quadros dérmicos.

3.2 Administração de fármacos por via tópica

A administração de medicamentos através da pele tem se tornado uma alternativa cada dia mais comum. A utilização dessa via visa a neutralização de problemas de biodisponibilidade, em comparação à administração oral de uma substância, que seria parcialmente metabolizada antes de chegar à corrente sanguínea, em um processo natural ocorrido na metabolização hepática. (Lucinda; Evangelista, 2015). Além disso, formulações tópicas também podem adquirir ação local, sendo bastante utilizadas para doenças dermatológicas, já que maximizam a concentração do fármaco e minimizam reações em outros sítios de ação.

Contudo, o transporte de fármacos através da pele pode sofrer a interferência de diversos fatores, como a estrutura da pele, o seu tipo de molécula, grau de

hidratação, concentração de lipídeos e suas propriedades físico-químicas (Silva *et al.*, 2010; Wokovich *et al.*, 2006).

Desse modo, é desejável uma formulação que aumente a permeação do fármaco através da pele, melhorando sua eficácia terapêutica, proporcionando uma melhor adesão e a diminuição de efeitos adversos, levando uma melhor qualidade de vida ao paciente (Shukla *et al.*, 2018). Logo, é necessário a otimização de um princípio ativo que, em conjunto com a formulação, seja compatível com a melhora do quadro das dermatopatias nos indivíduos. Assim, é nesse contexto que a PTX se enquadra, caracterizando-se como um anti-inflamatório que abrange vários usos além do que foi inicialmente proposto e abrigando várias características pertinentes para sua incorporação.

3.3 Pentoxifilina (PTX)

A PTX é um anti-inflamatório e vasodilatador com origem sintética da metilxantina (Hassan *et al.*, 2014) que atua como um inibidor da enzima fosfodiesterase (PDE) (Essayan, 2001). Essa enzima está diretamente relacionada com a diminuição da inflamação por consequência do aumento de AMPc intracelular, causando alterações na permeabilidade da membrana, provocando abertura dos canais de cálcio e a despolarização celular, ocasionando assim, a ativação de diversos processos metabólicos, como a coagulação sanguínea, manutenção das membranas celulares, entre outros (Pimentel, 2003; Hassan *et al.*, 2014; Ward, 1987).

Além disso, a PTX participa também da inibição de várias citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e as Interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), que desempenham um papel em muitas doenças inflamatórias da pele (Balazic *et al.*, 2023). Inicialmente, sua aplicação foi indicada pela United States Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de claudicação intermitente, devido a doença arterial oclusiva crônica das extremidades, pela sua capacidade de aumentar os níveis de glóbulos vermelhos, os quais ocasionam a deformidade celular e conseqüentemente a diminuição da viscosidade do sangue (Hassan *et al.*, 2014; Ward, 1987). Contudo, diversos estudos também mostraram alternativas *off-label* para o uso da PTX, diante as suas propriedades que auxiliam na melhora do quadro

inflamatório, auxiliando no tratamento de diversas doenças de pele (Hassan *et al.*, 2014).

Entretanto, a administração da PTX é normalmente feita por via oral ou intravenosa. No entanto, seu uso de forma oral gera limitações em sua resposta farmacológica, pois ao ser utilizado dessa forma, sua molécula passará pelo efeito hepático de primeira passagem, ocasionando a diminuição de sua eficácia e a necessidade de mais doses para manter a ação farmacológica (Balazic *et al.*, 2023; Hosny; Ali, 2012) e conseqüentemente a diminuição da adesão do paciente ao tratamento, bem como reações adversas por uso exacerbado.

É nesse contexto que, estudos como o de Balazic *et al* (2023), Cavalcanti *et al.* (2016), Hassan *et al.* (2014), entre outros, demonstram a eficácia e a utilização da PTX em aplicações dermatológicas, bem como a sua incorporação em sistemas coloidais, como as ME, corroborando com a ideia de um tratamento ainda mais promissor do que os já existentes e mostrando uma nova perspectiva para a área da dermatologia.

3.4 Microemulsão

As ME são sistemas coloidais termodinamicamente estáveis, isotrópicos, opticamente transparentes e de fácil preparo. São compostas por uma fase oleosa, uma fase aquosa e um tensoativo (ou a mistura de mais de um deles) e se apresentam, portanto, na forma de óleo em água (O/A), bifásicas ou água em óleo (A/O), sendo capazes de incorporar tanto fármacos hidrofílicos, como lipofílicos. Além disso, apresentam gotículas entre 10nm e 100nm (Paliwal, 2019; Ustundag, 2020). O tamanho de suas gotículas em escala nanométrica melhora a permeação de vários fármacos, facilitando a entrada pelo estrato córneo do que quando comparada a outras formulações tópicas convencionais, como emulsões e géis, pois apresentam uma taxa de absorção mais rápida (Paliwal, 2019; McCuistion *et al.*, 2014).

Desse modo, as ME se mostram sistemas promissores para incorporação de fármacos, uma vez que as propriedades e componentes dessa formulação facilitam a permeação da molécula ativa, minimizam efeitos adversos provenientes de altas doses e promovem inúmeros benefícios quando comparado a formulações tradicionais, tornando-se favorável para o avanço de estudos e novas pesquisas,

especialmente quanto ao seu grau de toxicidade, para que seja por fim, considerada uma alternativa segura e eficaz.

3.5 Avaliação de toxicidade *in vivo* e *in vitro*

A realização de estudos não-clínicos é essencial para a caracterização de novos compostos ou materiais que possam interagir com sistemas biológicos humanos. Esses estudos fornecem uma base importante para entender como substâncias químicas podem impactar na saúde do indivíduo. Além disso, os estudos toxicológicos antecipam os riscos que a substância em questão pode causar, o que pode impactar diretamente na busca por alternativas para minimização destes problemas (Dorato; Buckley, 2006; Organização Mundial da Saúde, 2008).

Nesse contexto, a realização de testes *in vitro* auxiliam na visualização e análise de possíveis resultados em bancada, benéficos ou não. Estes preconizam os *testes in vivo*, que são importantes testes realizados em animais a fim de visualizar o comportamento da substância testada perante a um modelo animal, com características semelhantes a humanos (Knop; Maria, 2016). Nesse contexto, a realização desses testes para o estudo do potencial tóxico de uma formulação é imprescindível para a análise e validação da segurança perante ao seu uso, apontando os seus riscos e mostrando ao pesquisador a necessidade da busca pela minimização destes problemas.

3.5.1 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade baseia-se na redução do Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT), corante amarelo solúvel em água, em cristais de formazan, que se apresentam como cristais insolúveis de cor azul-púrpura. Essa redução se dá pela clivagem do anel de tetrazólio realizada por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. A solubilização dos cristais permite sua quantificação por espectrofotometria, sendo a intensidade da cor gerada diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Kumar *et al.*, 2018), ou seja, quanto maior a presença dos cristais de formazan, maior a viabilidade celular e

consequentemente sua atividade metabólica, estando também relacionadas às concentrações testadas. Além da avaliação de citotoxicidade, outro aspecto crucial para compreender a segurança de um composto é seu potencial hemolítico, que reflete seu impacto direto sobre as células sanguíneas

3.5.2 Ensaio de hemólise *in vitro*

O ensaio de hemocompatibilidade *in vitro* caracteriza-se como um teste para avaliar a formulação quanto ao seu potencial hemolítico, ou seja, analisar a sua possível capacidade de ruptura das hemácias presentes no sangue humano (Lippi, 2015). A hemólise pode liberar hemoglobina, o que é indicativo de danos às células sanguíneas (ASTM F 756-00, 2013). Esse teste é necessário para que possíveis interações entre o material testado e o material biológico sejam previamente visualizadas, avaliando os seus riscos.

Um dos primeiros passos nesses estudos envolve a avaliação de possíveis danos à membrana dos eritrócitos (glóbulos vermelhos), verificando se o composto em teste promove a ruptura dessa estrutura celular e a consequente liberação do conteúdo interno. Esse tipo de avaliação é conduzido pelo ensaio de hemólise, amplamente utilizado devido à sua simplicidade, baixo custo e facilidade de execução. No caso de uma substância promover a hemólise, a hemoglobina, junto com outros componentes intracelulares, é liberada no sobrenadante, indicando danos às células (Sæbø *et al.*, 2023).

Assim, o ensaio de hemólise desempenha um papel fundamental em várias áreas de pesquisa e desenvolvimento, sendo empregado em diagnósticos médicos, no desenvolvimento e avaliação de fármacos, no aperfeiçoamento de tecnologias de saúde e em pesquisas amplas na ciência, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento e da segurança em produtos biológicos e farmacológicos (Sæbø *et al.*, 2023; Campen, 2022). Ainda, esses dados geram robustez para o prosseguimento de estudos *in vivo*, que por meio dos testes em animais, reafirmam as respostas visualizadas nos estudos *in vitro*, contribuindo para uma perspectiva completa do estudo.

3.5.3 Ensaio de toxicidade dérmica aguda

Testes *in vivo* em modelos animais é um importante estudo pré-clínico realizado para o desenvolvimento tecnológicos de novos fármacos, obtendo o papel principal de apontar a confiabilidade do produto, bem como a presença ou não de possíveis reações (Andersen *et al.*, s.d.). Dessa maneira, o ensaio toxicológico em animais tem como objetivo avaliar a segurança através da caracterização dos efeitos tóxicos nos órgãos-alvo, da relação dose-resposta e, quando adequado, da reversibilidade de determinado efeito (Lavandeira, 2014).

Desse modo, o teste de toxicidade dérmica aguda baseia-se na exposição única de um animal à uma substância para uso tópico por um período de 24 horas seguida da sua remoção (OECD, 2017). Segundo Klaassen (2019), a resposta da exposição aguda a agentes pode ser de forma imediata ou retardada, podendo ou não ser semelhantes aos efeitos tóxicos da exposição crônica. Contudo, a realização do teste de exposição aguda torna-se necessária para classificar as substâncias de acordo com normas de segurança globais, como a classificação no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), que visam garantir a segurança dos indivíduos e estabelecer o potencial risco dos produtos testados (Wallau, 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

Os protocolos experimentais de preparação da formulação e ensaio de hemocompatibilidade foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) coordenado pelo Prof. Bolívar Ponciano. O ensaio de citotoxicidade por sua vez, foi realizado no Laboratório de Oncofarmacologia do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e coordenado pela Profa. Marianna Vieira. Além disso, o ensaio de toxicidade *in vivo* foi realizado Biotério Professor Eduardo Barbosa Beserra da UEPB e, por fim, o estudo histopatológico foi realizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.2 Obtenção da microemulsão contendo pentoxifilina (ME-PTX)

O desenvolvimento do diagrama de fases pseudoternário, bem como a obtenção da ME-PTX foram previamente descritos no trabalho de Cavalcanti *et al.* (2016). De maneira sucinta, os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TACC) foram utilizados como fase oleosa, o Tween[®] 80 e o Brij[®]52 foram usados como tensoativos e a água como fase aquosa. Os diagramas de fases pseudoternários foram construídos variando as proporções de tensoativos e fase oleosa, seguidos de titulação com fase aquosa, homogeneização ultrassônica e repouso. Após equilíbrio, as misturas foram analisadas visualmente e classificadas de acordo com o sistema obtido.

A ME obtida caracterizou-se por ser uma microemulsão do tipo A/O, com composição percentual de 5% de fase aquosa, 51% de fase oleosa e 44% da mistura de tensoativos na proporção de 9:1 (Tween[®] 80 e o Brij[®]52, respectivamente). Como a PTX possui características hidrofílicas, foi dissolvida na fase aquosa antes da adição dos outros componentes e sua concentração final foi de 1% (p/p). A ME-PTX foi preparada através da técnica de emulsificação por ultrassom, por meio de 3 ciclos de

homogeneização ultrassônica por 1,5 minuto, seguido da remoção de bolhas de ar em banho de ultrassom por 1 minuto.

4.3 Citotoxicidade

4.3.1 Linhagens celulares e cultivo *in vitro*

As linhagens celulares utilizadas no teste de citotoxicidade foram L929 (fibroblastos murino) e HaCat (queratinócitos sadios humanos imortalizados). As linhagens celulares foram provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Nutricell[®], Brasil), respectivamente, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO[®], Grand Island, NY, EUA) e 1% de solução de antibiótico (contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) (Sigma-Aldrich[®]). As células foram cultivadas em estufa (CytoGROW GLP Panasonic[®]) a 37 °C, em uma atmosfera com 5% de CO₂.

4.3.2 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada por meio do ensaio de redução do Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT). Esse método permite quantificar a viabilidade e a proliferação celular. Para tanto, 100 µL de células foram semeadas, em placas de 96 poços, a uma concentração de 3 x 10⁵ células/mL. Após 24 horas, as amostras de ME-PTX, ME-branca (ME-B, sem fármaco) e PTX foram diluídas em meio de cultura em diferentes concentrações (0,1, 1, 10, 100 ou 1000 µg/mL). As células foram tratadas e incubadas por 24 horas em uma estufa com 5% de CO₂ a 37 °C.

Após o período de incubação, 110 µL do sobrenadante foi removido, e 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionada. As placas foram incubadas por 4 horas, e então 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan durante a noite. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro (leitor de microplacas

BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados até dois experimentos independentes, cada um em quadruplicata. Os dados estão expressos como média \pm EPM. A análise dos dados foi feita utilizando análise de variância (ANOVA) One-way, seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.4 Ensaio de Hemólise

Para avaliação do potencial hemolítico da ME-PTX e da ME-B, uma coleta de amostra de sangue O+ de um doador humano saudável foi realizada utilizando tubos contendo ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 10% (p/v) na proporção de 1mg/mL de sangue. Após a coleta, as amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C, para a obtenção de um precipitado de hemácias. O plasma e a camada de leucócitos foram removidos e o pellet de hemácias obtidos foi lavado três vezes com solução de NaCl a 0,9%. As hemácias purificadas foram ressuspensas em salina gelada e diluídas para uma suspensão a 10% de sua concentração inicial.

Em seguida, a ME-PTX, ME-B e a PTX foram diluídas em solução salina para atingir concentrações de 10, 25, 100, 200, 400 e 800 μ L/mL.). Essas concentrações, bem como a metodologia seguida, foram definidas com base no trabalho de Gharbavi *et al.* (2019) e Rhyaf *et al.* (2023) com modificações.

Assim, 2mL da suspensão de eritrócitos foi incubado com 2mL das respectivas ME e da PTX por 4 horas a 37°C, em banho-maria. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi removido (Rhyaf, 2023). A hemoglobina presente no sobrenadante foi avaliada através de espectrofotometria, utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Uma solução de Turk a 1% e solução salina 0,9% foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2018). A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de potencial hemolítico calculado de acordo com a Equação 1 (Sæbø *et al.*, 2023):

$$\text{Potencial hemolítico (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra testada} - \text{Absorbância do controle negativo}}{\text{Absorbância do controle positivo} - \text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

(1)

4.5 Protocolo experimental *in vivo*

4.5.1 Animais

Todos os animais foram provenientes do Biotério Professor Eduardo Barbosa Beserra. Foram selecionados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) IGS (do inglês, International Genetic Standardization), adultos jovens contendo de 9 à 10 semanas com a pele intacta e sendo fêmeas nulíparas e não grávidas. Esses animais foram alojados em caixas de polipropileno e submetidos à dieta balanceada à base de ração padronizada tipo pellets (Quimtia[®] irradiada com raios gama, Colombo, PR, Brasil) e acesso à água *ad libitum*. Além disso, os animais foram mantidos em salas com ventilação e temperatura (22 ± 2 °C) controladas e submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 horas. A escolha da idade, maturidade sexual, sexo, e outras características dos animais foi baseada nas recomendações da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e na curva de desenvolvimento ponderal do Laboratório Charles River e do Biotério da UEPB.

Os protocolos experimentais tiveram início apenas após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPB e seguiram rigorosamente todas as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob aprovação CEUA de número 050/2024 (Anexo 1).

4.5.2 Avaliação da toxicidade dérmica aguda

A toxicidade aguda seguiu o “Guideline for testing of chemicals” nº 402 fornecido pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para o procedimento do método de dose fixa com algumas modificações (OECD, 2017).

Antes do início dos procedimentos, os animais (fêmeas) foram aclimatados por pelo menos cinco dias, divididos randomicamente em grupos (n=3) e adequadamente identificados. No dia anterior ao experimento, pelo menos 10% da região dorsal dos animais foram depiladas (linha mediana cervical) de maneira que não causasse nenhum dano à pele. Os anestésicos cetamina (75 mg/Kg) e xilazina

(5mg/Kg) foram utilizados para auxiliar no manejo dos animais e minimizar o estresse. Alguns parâmetros foram levados em consideração para decidir a área depilada, como: o peso dos animais, as dimensões da cobertura com os tratamentos e as doses dos anestésicos. Além disso, todos os animais foram pesados antes do início dos tratamentos e, semanalmente, também houve o monitoramento do consumo alimentar e do peso até a conclusão dos devidos experimentos.

Para os estudos de toxicidade dérmica aguda, as formulações tópicas ME-B e ME-PTX foram aplicadas em doses únicas, com período de exposição de 24 horas, seguido de monitorização dos animais por 14 dias consecutivos. Dada a falta de dados relacionados à toxicidade dérmica das ME-PTX, os animais foram submetidos a um estudo para determinação de alcance, onde a dose inicial de teste foi de 200 mg/kg de peso corporal, seguindo as recomendações da OECD. O tratamento dos animais com a próxima dose foi aprazada até que a sobrevivência dos animais previamente tratados fosse confirmada. O estudo principal foi realizado após a finalização do estudo para determinação de alcance, utilizando a dose de 2000mg/kg.

As formulações foram aplicadas de maneira uniforme sobre a área exposta da pele dorsal e permaneceram em contato com a pele, através do auxílio de uma gaze porosa, durante todo o período de exposição. O local da aplicação foi coberto de maneira adequada de forma que reteve as formulações tópicas em estudo, e os animais foram separados em caixas individuais a fim de evitar a ingestão oral das formulações por outros animais que também estivessem alocados na mesma caixa.

A mortalidade e os sinais de toxicidade geral foram cuidadosamente avaliados nos intervalos de 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 minutos e diariamente, uma vez ao dia, durante estes 14 dias. Os parâmetros observados incluíram, além da mortalidade, a avaliação do aspecto da pele e pelos, olhos, membranas mucosas, salivação, presença de tremores, convulsões, hiperatividade, irritabilidade, agressividade, entre outros (Almeida *et al.*, 1999; OECD 402). Ao final do período de exposição (24 horas), os resíduos das formulações foram removidos utilizando solução salina. Os animais foram realocados ao alojamento coletivo nas caixas.

A partir do período de 24 horas após aplicação das ME, os animais foram avaliados conforme os Critérios de Draize (1944) a fim de indicar o índice primário de irritação. A obtenção desse resultado consiste na análise dos animais no período de 24, 48 e 72 horas após o contato tópico das formulações para caracterizar, conforme

a pontuação indicada por Draize, a presença de edema e eritema. A pontuação consiste em uma escala de 0-4, onde o 0 representa a ausência do parâmetro e 4 representa a severidade. Dada a pontuação, foi realizada a média das pontuações do grupo de animais. Essa média foi avaliada como: Média \leq 2 – levemente irritantes; média de 2 a 5 – moderadamente irritantes; média \geq 6 – severamente irritantes (Draize, 1959).

Após o décimo quarto dia, os animais sobreviventes foram eutanasiados, através de overdose de anestésicos (cetamina – 300 mg/Kg e xilazina – 30 mg/Kg) e as mortes foram confirmadas após a verificação dos sinais vitais. Todos os animais testados tiveram seus órgãos (fígado, baço, rins e pele) pesados após a total remoção do tecido adiposo e conjuntivo para o cálculo do índice relativo dos órgãos. Para o cálculo do índice dos órgãos foi utilizada a equação 2 (Rolim et al; 2017):

$$\text{Índice relativo dos órgãos} = \frac{\text{peso do órgão (mg)}}{\text{peso do animal (g)}} \quad (2)$$

Os órgãos dos animais também foram avaliados conforme análise macroscópica, comparando-os com o grupo controle. Os resultados obtidos de toxicidade e mortalidade foram utilizados para definir a classificação da substância de acordo com o GSH (Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures). A mortalidade também foi utilizada para estimar a DL₅₀, dose única derivada estatisticamente capaz de provocar a morte de 50% dos animais experimentais

4.5.3 Análise histopatológica

Os principais órgãos, incluindo a pele, o fígado, baço e rim, foram preservados em formalina tamponada neutra a 10% para análise subsequente. Após a fixação, as amostras de tecido foram processadas em blocos de parafina. Esses blocos de parafina foram então seccionados (5 μ m) e montados em lâminas de vidro e visualizadas em microscópio Motic BA200 acoplado a uma câmera digital. Exames microscópicos foram realizados em todas as seções de tecido após coloração com hematoxilina e eosina.

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade de ME-PTX, ME-B e PTX foi avaliada nas linhagens HaCaT e L929 nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL. Os resultados são expressos na tabela 1 e nas figuras 1 e 2 que mostram a porcentagem de viabilidade celular após 24 horas de tratamento.

Tabela 1 - Percentual de viabilidade celular em HaCaT e L929 após o tratamento com ME-PTX, ME-B e PTX por 24 horas, utilizando o ensaio do MTT.

Amostras	Concentração (µg/mL)	Viabilidade celular (%)	
		HaCaT	L929
ME-PTX	0,1	104±3,9	104±9,6
	1	97±3,9	86±0,3
	10	94±3,2	85±8,8
	100	79±2,9	86±7,9
	1000	49±2,8	10±4
ME-B	0,1	96±5,3	110±9
	1	95±3,2	90±3,4
	10	101±4,7	86±2,7
	100	79±0,9	86±3,5
	1000	51±5	6±0,1
PTX	0,1	96±5,6	108±11
	1	92±4,4	101±5,1
	10	94±4,7	97±8
	100	100±4,4	90±7,9
	1000	98±3,2	87±4

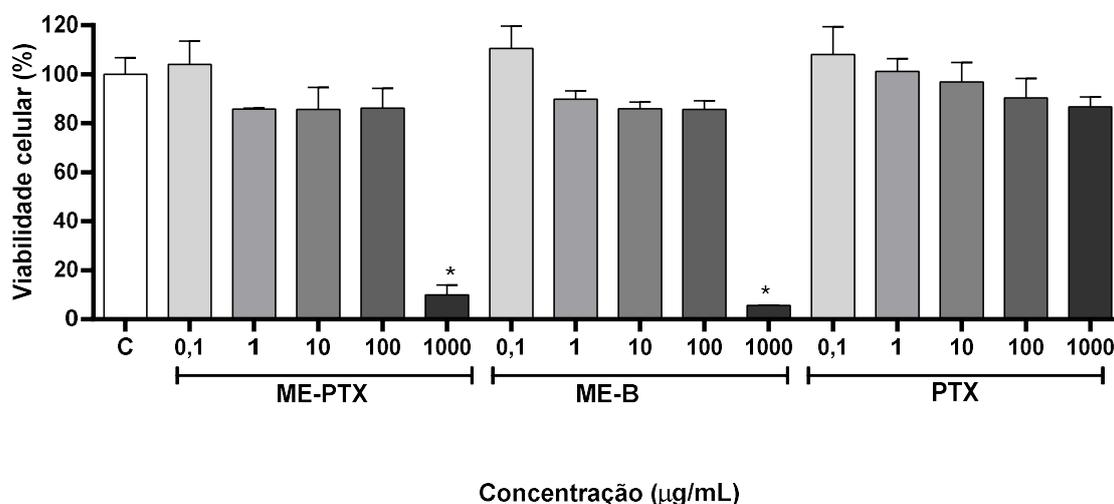
Os dados foram obtidos através de até dois experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados como a média ± EPM. ME-PTX: Microemulsão com Pentoxifilina; ME-B: Microemulsão branca (sem fármaco); PTX: Pentoxifilina.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Através da análise da tabela 1 e figura 1, podemos observar que na linhagem celular L929, tanto o tratamento com ME-PTX quanto com a ME-B demonstraram efeitos citotóxicos estatisticamente significativos nas concentrações mais altas de

ambas as amostras, em relação ao grupo controle. Na concentração de 1000 µg/mL, a ME-PTX resultou em uma viabilidade celular de $10 \pm 4\%$, já a ME-B ocasionou uma viabilidade ainda menor, de $6 \pm 0,1\%$. Nas demais concentrações (0,1;1;10;100 µg/mL), as formulações não induziram citotoxicidade.

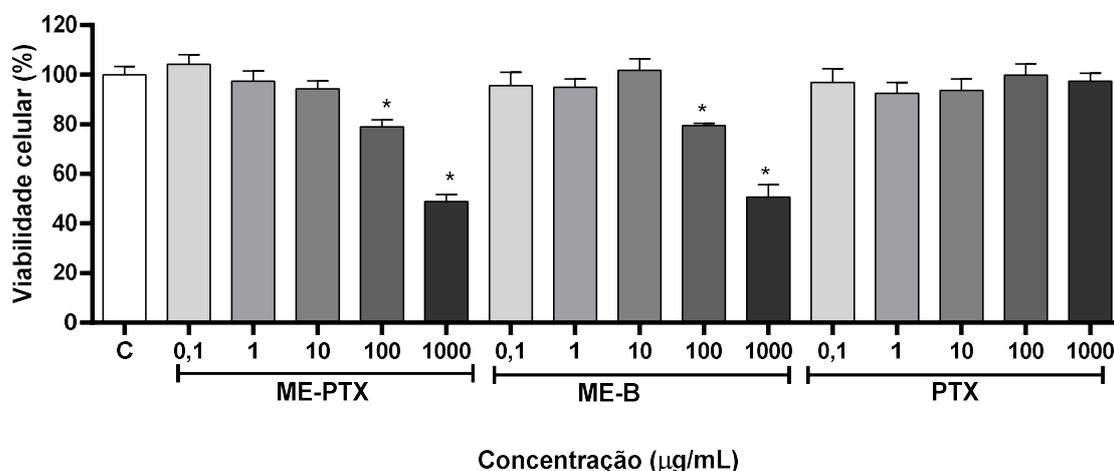
Figura 1 - Percentual de viabilidade celular na linhagem L929 após o tratamento com ME-PTX, ME-B e PTX, por 24h, através do ensaio de MTT.



Os dados foram obtidos através de até dois experimentos independentes realizados em quadruplicata e são apresentados como percentual de viabilidade celular \pm EPM, sendo comparados por Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,0001$, comparado ao grupo controle. ME-PTX: Microemulsão com Pentoxifilina; ME-B: Microemulsão branca (sem fármaco); PTX: Pentoxifilina.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Em células HaCat, a partir da concentração de 100 µg/mL, já é possível observar reduções estatisticamente significativas na viabilidade celular, porém de forma menos pronunciada em relação a linhagem L929 (Figura 2). Na concentração de 100 µg/mL, as células tratadas com ME-PTX e ME-B apresentaram viabilidades reduzidas para $79 \pm 2,9\%$ e $79 \pm 0,9\%$, respectivamente. Para a concentração mais alta de 1000 µg/mL, a viabilidade celular caiu para $49 \pm 4,28\%$ e $51 \pm 5\%$ com os tratamentos de ME-PTX e ME-B, respectivamente.

Figura 2 - Percentual de viabilidade celular na linhagem HaCaT após o tratamento com ME-PTX, ME-B e PTX, por 24h, através do ensaio do MTT.



Os dados foram obtidos através de até dois experimentos independentes realizados em quadruplicata e são apresentados como percentual de viabilidade celular \pm EPM, sendo comparados por Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle. ME-PTX: Microemulsão com Pentoxifilina; ME-B: Microemulsão branca (sem fármaco); PTX: Pentoxifilina.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Por outro lado, a PTX isolada não demonstrou citotoxicidade significativa em nenhuma linhagem ou concentração testada, mantendo a viabilidade celular sempre acima dos 83%. Esse resultado indica que o fármaco isolado não apresenta efeito citotóxico relevante e que a redução de viabilidade celular associada à ME-PTX está relacionada à composição da formulação e não ao fármaco.

5.2 Ensaio de hemólise

O teste de hemólise foi utilizado para determinar a compatibilidade das amostras ME-PTX e ME-B com o sangue humano. De acordo com a ASTM F756-13 (2013) a razão de hemólise é definida da seguinte maneira: <2%: não hemolítico, 2-5%: levemente hemolítico e >5%: material hemolítico.

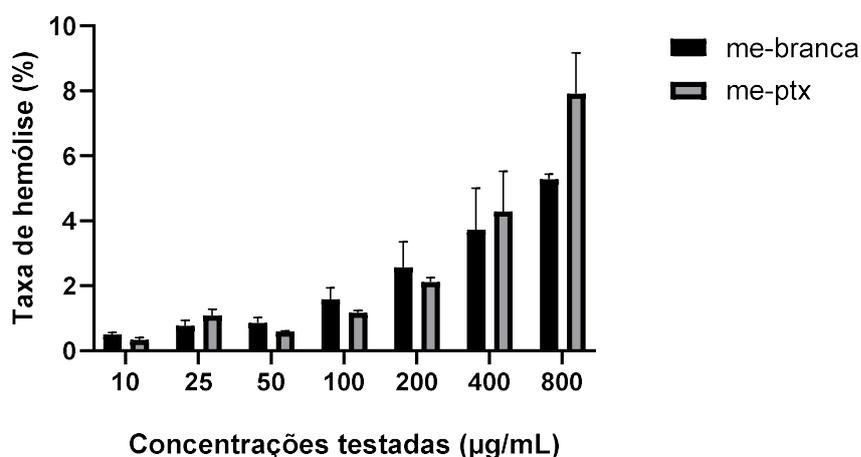
As taxas de hemólise das amostras podem ser verificadas na Tabela 2, bem como na Figura 3.

Tabela 2 - Percentual hemolítico das formulações de ME-PTX e ME-B.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Percentual de Hemólise (%)
ME-PTX	10	0,33 \pm 0,07
	25	1,08 \pm 0,21
	50	0,59 \pm 0,02
	100	1,17 \pm 0,06
	200	2,11 \pm 0,14
	400	4,27 \pm 1,24
	800	7,91 \pm 1,26
ME-B	10	0,50 \pm 0,07
	25	0,76 \pm 0,18
	50	0,86 \pm 0,16
	100	1,58 \pm 0,36
	200	2,56 \pm 0,79
	400	3,72 \pm 1,28
	800	5,27 \pm 0,16

Os dados foram obtidos em triplicata, apresentados como percentual de hemólise \pm EPM, sendo comparados por Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle. ME-PTX: Microemulsão com Pentoxifilina; ME-B: Microemulsão sem fármaco.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 3 – Percentual de hemólise induzida por ME-B e ME-PTX em diferentes concentrações.

Porcentagem de hemólise induzida por ME-PTX e ME-B em várias concentração a 37°C. O teste foi realizado em triplicata e os dados foram representados como média \pm desvio padrão (n=3). Diferenças estatisticamente significativas indicadas como * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A partir da análise dos dados, podemos observar que as amostras testadas apresentaram percentual de hemólise gradativo, proporcional às concentrações testadas. Os resultados sugerem que a ME-PTX e ME-B nas concentrações de 10, 25, 50 e 100µg/mL não se apresentaram como hemolíticas, obtendo uma taxa abaixo de 2%. Ademais, as concentrações de 200 e 400µg/mL de ambas permaneceram na faixa de percentual que as classifica como levemente hemolíticas. Contudo, na concentração de 800µg/mL, ambas as formulações se apresentaram como hemolíticas, possuindo uma taxa de hemólise superior a 5%. Quando comparadas entre si, ME-PTX e ME-B, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das concentrações testadas.

5.3 Avaliação da toxicidade dérmica aguda

O estudo de toxicidade dérmica aguda foi iniciado com um teste de determinação de faixa (*Range-Finding Study*), uma vez que não havia informações prévias suficientes sobre a toxicidade da ME-PTX. Neste teste, foi utilizada uma dose inicial de 200 mg/kg, seguindo o fluxograma estipulado nas diretrizes. Nenhum dos animais expostos a aplicação de ME-PTX nas doses de 200, 1000 e 2000 mg/kg desenvolveram sinais de toxicidade significativos ou evoluíram para morte. Dessa forma, a dose de 2000 mg/kg foi considerada a de escolha para o teste principal.

O estudo principal consistiu na exposição aguda dos animais à dose de 2000mg/kg tanto da ME-PTX, bem como da ME-B, seguido de um período de avaliação de 14 dias consecutivos. Os efeitos da aplicação das formulações podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeitos da administração tópica de dose única de ME-B e ME-PTX em ratos.

(continua)

Grupo		M/T	Efeitos comportamentais					
			60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	360 min
ME- B (2000 mg-kg)	Animal 1	0/3	Nenhum efeito foi observado					

(continuação)

Grupo		M/T	Efeitos comportamentais					
			60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	360 min
	Animal 2		Quadro de irritabilidade	Nenhum efeito foi observado				
	Animal 3		Quadro de irritabilidade			Nenhum efeito foi observado		
ME-PTX (2000 mg-kg)	Animal 1	0/3	Quadro de hiperatividade	Nenhum efeito foi observado				
	Animal 2		Nenhum efeito foi observado					
	Animal 3		Nenhum efeito foi observado					
Controle	Animal 1	-	Nenhum efeito foi observado					
	Animal 2		Nenhum efeito foi observado					
	Animal 3		Nenhum efeito foi observado					

M/T: Número de animais mortos/número de animais tratados; ME-PTX: Microemulsão com Pentoxifilina; ME-B: Microemulsão sem fármaco.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

De acordo com a tabela podemos observar que nos animais do grupo controle, não foram observados sinais de toxicidade associados a alterações no sistema nervoso central (SNC) ou sistema nervoso autônomo (SNA), nem houve registros de morte, tanto nas primeiras horas de observação quanto nos 14 dias seguintes. Já em relação aos animais expostos tanto a ME-PTX quanto a ME-B, foi observado que nos primeiros 60 minutos ocorreram algumas alterações consideradas inespecíficas, com a presença de efeitos característicos de ação excitatória (hiperatividade e

irritabilidade), quando comparado ao grupo controle. Entretanto, esses sinais foram completamente revertidos já na avaliação de 90 minutos, não apresentando nenhum outro efeito adicional ao longo do tempo de avaliação.

Ademais, os animais também foram avaliados de acordo com a escala numérica de Draize (1944). Assim, os animais foram avaliados por um período de 24, 48 e 72 horas após a exposição e foi possível constatar que nenhum dos animais apresentou um quadro de edema.

No entanto, dois animais, um do grupo ME-PTX e um do grupo ME-B, desenvolveram uma reação irritativa com presença de eritema e descamação após 48 horas de exposição à respectiva formulação (Figura 4). Contudo, quando caracterizados de acordo com o Índice de irritação primária (determinado pela combinação e média das pontuações), as formulações foram consideradas como levemente irritantes (Draize, 1959) (Tabela 4). O animal que recebeu ME-PTX teve reversão do quadro após o quarto dia, enquanto o animal exposto à ME-B apresentou reversão apenas no nono dia após o surgimento da reação. Vale salientar que a reação ocasionada pelo tratamento com ME-PTX foi visualmente menor e de resolução mais rápida em relação a obtida nos animais tratados com ME-B, sugerindo que a incorporação de PTX no sistema auxiliou na prevenção ou reduziu o desenvolvimento de um processo irritativo maior.

Figura 4 – Registro do 4º dia após aplicação tópica de dose única de ME-B e ME-PTX.



(a) ME-B; (b) ME-B.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 4 - Índice de irritação primária conforme parâmetros de Draize.

Grupo	Eritema	Edema
ME-B	2,00± 2,00	0,0±0,0
ME-PTX	1,33±1,53	0,0±0,0

Resultados obtidos a partir da média das pontuações registradas (n=3) ± Desvio padrão. ME-B: Microemulsão sem fármaco; ME-PTX: Microemulsão contendo pentoxifilina.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Ao longo dos dias subsequentes, todos os animais mantiveram-se saudáveis e sem sinais significativos de toxicidade como incapacidade de acesso à comida e água, perda excessiva de peso, convulsões, tremores, automutilações, mudança na pelagem, em mucosas, respiração, alteração comportamental ou morte. Todos os grupos mostraram aumento de peso e os resultados foram expressos como média do grupo ± desvio padrão. Os animais do grupo controle e os grupos tratados com a ME-B e ME-PTX obtiveram um ganho de 15,22±6,85, 20,09±8,31 e 16,51±3,71, respectivamente. Além disso, os animais exibiram um comportamento característico da espécie. Portanto, os dados indicam que a aplicação tópica aguda de ME-PTX ocasionou apenas irritação na pele, sem impactar os parâmetros fisiológicos sistêmicos.

As avaliações macroscópicas realizadas nos órgãos dos animais tratados revelaram que não houve alterações significativas em termos de aparência, cor ou consistência em nenhum dos grupos experimentais em relação ao controle. Também não houve alterações estatisticamente significativas com relação ao tamanho dos órgãos, confirmado por meio do cálculo do índice de órgãos (Tabela 5). Além disso, com base na análise da letalidade foi possível qualificar a ME-PTX na categoria 5/Inclassificável da classificação do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GSH) da diretriz da OECD.

Tabela 5 – Índice de órgãos dos animais tratados com a ME-PTX e ME-B comparados ao grupo controle

Grupos	Fígado (mg/g)	Rins (mg/g)	Baço (mg/g)
Controle	53,76±1,8	9,80±0,2	2,43±0,1
ME-BRANCA	52,32±6,3	10,22±0,6	2,60±0,3
ME-PTX	55,23±2,6	10,43±0,4	2,70±0,2

Os dados representam a média \pm o erro padrão da média (n=3/grupo). Diferença estatisticamente significativa indicada como *p < 0,05. ME-PTX: Microemulsão com Pentoxifilina; ME-B: Microemulsão sem fármaco.

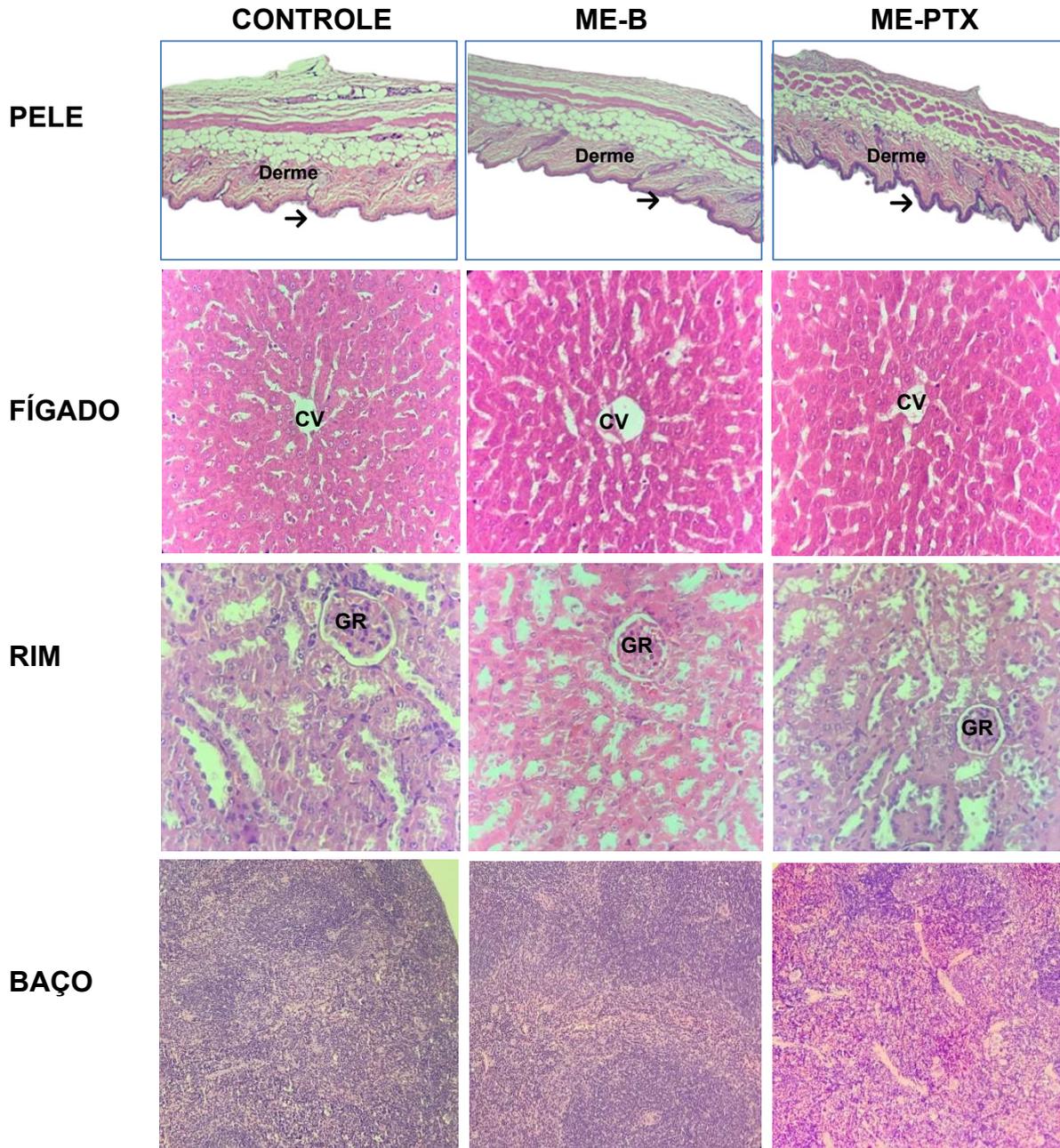
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Portanto, esses dados sugerem que o tratamento com ME-PTX na dose de 2000 mg/Kg não desenvolve potenciais riscos toxicológicos sistêmicos, no entanto a alta dose promove quadro de irritação dérmica reversível.

5.5 Análise histopatológica

Após análise das amostras, o exame histopatológico revelou que os animais dos grupos controle e ME-B apresentaram arquitetura de pele normal, espessura média da epiderme queratinizada bem formada e estrutura dérmica normal. O tratamento com ME-PTX, revelou arquitetura normal da pele, espessura aumentada de queratina bem formada na epiderme (setas pretas), estrutura normal da derme. Na avaliação histopatológica dos órgãos, os fígados dos animais nos grupos Controle, ME-B e ME-PTX exibiram uma rede vascular composta de veias centrolobulares de calibres variados sem congestão e parênquima bem desenvolvido e hepatócitos sem alterações. Os rins apresentaram cápsula externa fibrosa e regiões medulares e corticais bem delimitadas. Os glomérulos eram bem desenvolvidos, com uma cápsula de Bowman e espaço capsular bem definidos. O baço tinha uma arquitetura normal, e uma cápsula composta de tecido conjuntivo denso não modelado e as polpas branca vermelha estavam inalteradas sem sinais de hiperestimulação.

Figura 5 – Fotomicrografias dos órgãos dos animais do grupo controle, ME-B e ME-PTX.



Avaliação histopatológica dos órgãos dos animais que obtiveram contato com as formulações testadas. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina, ampliação x400. Setas pretas: epiderme; Derme: derme; CV: veia centrolobular; GR: glomérulos renais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

6 DISCUSSÃO

Em seu estudo, Cavalcanti *et al.* (2016) demonstraram que a incorporação da PTX em uma ME poderia representar uma associação bastante vantajosa para o tratamento de doenças de pele. O sistema desenvolvido mostrou-se estável e exibiu características físico-químicas adequadas para uma formulação de uso tópico. Além disso, os testes *in vivo* indicaram atividade anti-inflamatória significativa, reforçando o potencial terapêutico da ME-PTX.

Entretanto, este estudo não possui ainda uma avaliação dos aspectos de segurança, como os ensaios de toxicidade, que são fundamentais para a viabilidade do uso clínico dessa formulação. Com base nessa lacuna, o presente trabalho complementa esse estudo, realizando a avaliação da capacidade toxicológica da ME-PTX, tendo em vista que para a implementação de um novo medicamento no mercado, é necessário a comprovação da sua segurança.

No estudo citotóxico com a linhagem HaCat, os dados indicaram uma diminuição da viabilidade celular nas maiores concentrações de ME-PTX e ME-B testadas (100 e 1000 µg/mL), enquanto para as células L929, a viabilidade celular foi reduzida apenas na concentração de 1000 µg/mL. Diante desses resultados, uma vez que apenas as microemulsões apresentaram citotoxicidade e a PTX não promoveu o aumento da morte celular, podemos sugerir que as reduções na viabilidade celular apresentadas pelas formulações ocorreram devido a composição das ME, em que os tensoativos podem adquirir um maior potencial tóxico a depender da sua concentração.

O efeito tóxico dos tensoativos está ligado à sua estrutura anfifílica e à sua atividade de superfície. As partes hidrofílicas e lipofílicas dos tensoativos interagem, respectivamente, com os grupos de cabeça polar e as caudas lipofílicas da bicamada lipídica, resultando na ruptura da membrana plasmática (Partearroyo *et al.*, 1990; Effendy; Maybach, 1995).

A toxicidade dos tensoativos não iônicos foi também relatada como inversamente proporcional ao comprimento da cadeia hidrofílica e proporcional ao tamanho da parte lipofílica (Ernst; Arditti, 1980). Cadeias hidrofílicas longas poderiam evitar a desestabilização da membrana celular por meio de repulsão estérica, restringindo a penetração do tensoativo na bicamada lipídica e, assim, manter a

integridade celular. Em contrapartida, a parte hidrofóbica teria o efeito contrário, favorecendo a ruptura da membrana (Maupas *et al.*, 2011).

Os tensoativos utilizados na ME-PTX e ME-B foram o Tween 80[®] e o Brij 52[®], que possuem cadeias hidrofílicas PEGiladas curtas, com aproximadamente 20 e 10 unidades, respectivamente (Maupas *et al.*, 2011). Adicionalmente, a parte hidrofóbica do Tween 80[®] é mais longa que a do Brij 52[®]. Portanto, em concentrações mais elevadas (1000 µg/mL), a toxicidade das formulações pode ser atribuída as cadeias hidrofóbicas do Tween 80[®], tendo em vista que ele é o tensoativo prevalente da formulação, além da menor repulsão elétrica das cadeias hidrofílicas de ambos os tensoativos. Contudo, a utilização desses tensoativos na ME-PTX não inviabiliza o seu uso, pois em baixas concentrações, a formulação pode ser considerada segura para uso.

A hemocompatibilidade das formulações ME-PTX e ME-B foi verificada através do estudo de hemólise. Esse teste revela a toxicidade da amostra sobre as hemácias e indica se seu uso é favorável para uma administração intravenosa ou aplicação em contato com o sangue. A porcentagem de hemólise indicada para que uma amostra seja considerada hemocompatível é de no máximo 5% (Anastácio *et al.*, 2014; Sahiner *et al.*, 2023).

A microemulsão de pentoxifilina (ME-PTX), quando utilizada em altas concentrações como 800 µg/mL, demonstra potencial hemolítico. Embora a pentoxifilina possua propriedades que influenciam a hemólise, a resposta hemolítica também pode variar devido a fatores individuais, incluindo predisposições genéticas e características metabólicas do paciente (Hadjesfandiari, 2021).

Essa atividade hemolítica induzida pelas formulações pode ser diretamente influenciada pela presença e quantidade de tensoativos. Esses agentes, que atuam na estabilização do sistema, possuem propriedades que, em concentrações mais elevadas, aumentam a taxa de hemólise, ou seja, promovem a ruptura das membranas das hemácias. Esse efeito ocorre porque os tensoativos interagem com a bicamada lipídica dos glóbulos vermelhos, desestabilizando-os. Assim, a elevação na quantidade de tensoativo na amostra está associada a um maior potencial hemolítico do sistema, impactando sua compatibilidade com células sanguíneas (Durgadas *et al.*, 2009). Contudo, apesar da resposta apresentada pela maior concentração, as concentrações de 10 à 400 µg/mL testadas se mostraram

hemocompatíveis, apontando a segurança da formulação para sua utilização em baixas concentrações.

O ensaio de toxicidade dérmica aguda *in vivo* se caracteriza como um teste realizado para avaliar os efeitos tóxicos de uma substância quando aplicada de maneira única sobre a pele dos animais, permitindo a identificação de vários aspectos, incluindo alterações sistêmicas, mudanças comportamentais, dano aos órgãos, além de alterações a nível local, identificando reações adversas na pele, além da classificação dentro das categorias de risco do GSH. Esse conjunto de dados é essencial para determinar se uma substância pode ser usada com segurança em contato com a pele.

Na dose experimental utilizada, a ME-PTX não induziu nenhuma morte e nem sinais sistêmicos aparentes de toxicidade. As alterações sistêmicas apresentadas na primeira hora não possuem relevância toxicológica, uma vez que não podem ser analisadas de forma isolada, necessitando da associação a outros sinais sistêmicos que poderiam exigir um monitoramento adicional do animal. Além disso, essas alterações foram completamente revertidas 90 minutos após a administração da formulação.

Entretanto, a ME-PTX induziu uma reação local na pele, revelando a necessidade do uso de doses mais baixas. Embora as ME precisem ser termodinamicamente estáveis, é essencial limitar a quantidade de tensoativos em sua formulação, tendo em vista que o risco de irritação na pele aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração de tensoativos utilizados no preparo da ME (Neubert, 2001). Portanto, conforme mencionado nos demais resultados, a irritação dérmica induzida pela ME-PTX pode estar associada às propriedades, bem como quantidade dos tensoativos presentes na formulação.

Essa sugestão pode ser corroborada pelo quadro irritativo visualmente mais exacerbado induzido pela ME-B, formulação que contém apenas as fases aquosa, oleosa e a combinação de tensoativos, demonstrando que o fármaco não tem envolvimento no processo irritativo, pelo contrário, a incorporação da PTX no sistema reduziu a reação local induzida pela ME-PTX, uma vez que a PTX possui alto potencial anti-inflamatório e imunomodulador, demonstrando um efeito inibitório na reação que foi obtida pelos tensoativos (Neuner, 1994; Hassan *et al.*, 2014; Ghate *et al.*, 2019).

Tendo em vista que a utilização de uma determinada combinação de tensoativos na formulação pode refletir em um efeito indesejado na pele de alguns indivíduos mais sensíveis, o uso de doses menores de ME-PTX promoveria uma minimização dessa reação indesejada.

Ainda que animais da ME-B e ME-PTX tenham apresentado reações dérmicas, ambas formulações foram consideradas levemente irritantes (Draize, 1959), pois, apesar de um animal de cada formulação ter apresentado reação, esse resultado não foi expresso nos demais animais do grupo, tendo em vista que cada animal possui sua individualidade, podendo ou não apresentar uma sensibilidade maior às ME. Desse modo, a irritação não é um parâmetro comum a todos.

Este estudo fornece os primeiros dados acerca do potencial toxicológico da ME-PTX, classificando-a na categoria 5/Inclassificável. Essa categorização é importante, pois indica que a formulação apresenta baixa toxicidade aguda, especialmente em doses mais baixas, reforçando a segurança do seu uso.

As avaliações histopatológicas dos órgãos substanciam a ausência de alterações no fígado, baço e rins demonstrando a ausência da toxicidade advinda das formulações testadas. Além disso, estudos como os de Satapathy *et al.* (2006), Genovés *et al.* (2014) e Alkhatib *et al.* (2023) elucidam os benefícios da PTX em doenças relacionadas a órgãos como fígado e rins, reforçando a perspectiva de benefício e segurança do uso da ME-PTX.

Em relação a análise da pele, podemos observar que, embora o grupo tratado com a ME-B tenha apresentado um quadro mais persistente de irritação, não foi evidenciada nenhuma alteração na pele coletada após os 14 dias. Esse resultado pode estar associado ao fato de que a coleta do material foi realizada apenas ao final do experimento, permitindo a reversão completa do quadro de irritação.

Já o animal tratado com a ME-PTX apresentou um processo de hiperqueratose. O aumento na camada de queratina da pele após uma irritação cutânea, devido à ativação dos queratinócitos, indica uma resposta de defesa do organismo com a finalidade de formar uma barreira protetora adicional (Shamilov *et al.*, 2021). Essa resposta pode ser temporária ou não. A ME-PTX pode ter induzido uma irritação que, embora menos intensa que a causada pela ME-B, foi suficiente para desencadear uma resposta compensatória da pele com aumento na camada de queratina. Isso indica que o efeito de irritação da ME-PTX, ainda que menor, pode ter

produzido um impacto mais duradouro na estrutura celular da pele, influenciando uma adaptação dérmica caracterizada pela hiperqueratose. A ME-B pode ter causado uma irritação mais visível, mas transitória, sem induzir a hiperqueratose.

Vale destacar que a PTX não é conhecida por estimular diretamente a produção de queratinócitos, mas, exerce efeitos anti-inflamatórios e melhora a microcirculação, assim, podendo indiretamente promover um ambiente mais saudável para o crescimento e a regeneração da pele (Redondo *et al.*, 1997; Gilhar *et al.*, 1996).

Por fim, esses dados contribuíram para o avanço da caracterização desse sistema, possibilitando uma melhor compreensão de sua segurança e ampliando o interesse para estudos experimentais subsequentes.

7 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados, permitiu-se concluir que:

- O estudo citotóxico das linhagens celulares testadas se mostrou eficaz, permitindo o conhecimento do perfil citotóxico da ME-PTX quando utilizadas em baixas e em altas concentrações.
- Os ensaios hemolíticos corroboraram com os resultados citotóxicos, mostrando que a ME-PTX em altas concentrações manifesta um certo grau de toxicidade.
- O estudo de toxicidade dérmica aguda permitiu a visualização *in vivo* dos possíveis efeitos que a ME-PTX pode acarretar. Além disso, a avaliação histopatológica dos órgãos dos animais possibilitou comprovar a ausência de alterações, evidenciando a confiabilidade no uso da ME-PTX.
- A ME-PTX é uma formulação favorável para uso tópico, entretanto, ainda há a necessidade de estudos mais avançados para conhecimento de doses concisas que garantam a segurança do indivíduo.
- Portanto, o presente estudo possibilita a abertura de novos estudos voltados a aplicação da ME-PTX para que, de fato, seja aplicado no tratamento terapêutico em quadros dermatológicos

REFERÊNCIAS

ALKHATIB, L.; DIAZ, L.A.V.; VARMA, S.; CHOWDHARY, A.; BAPAT, P.; PAN, H.; KUKREJA, G.; PALABINDELA, P.; SELVAM, S.A., KALRA, K. Lifestyle Modifications and Nutritional and Therapeutic Interventions in Delaying the Progression of Chronic Kidney Disease: A Review. **Cureus** 15(2): e34572, 2023.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72.76, 1999.

ANASTÁCIO, G. S.; SANTOS, K. O.; SUAREZ, P. A. Z.; TORRES, F. A. G.; DE MARCO, J. L.; PARACHIN, N. S. Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 505-510, 2014.

ANDERSEN, M. L.; MAZARO-COSTA, R. Idealizadoras. Dona Ciência: A importância dos animais em pesquisas no Brasil. Ilustração: MÔNICA O. Revisão: KIMI T. Revisão técnica: MÁRCIA S. G.; ANTÔNIO A. B. V. 2ª edição, s.d.

BALAZIC, E.B.S.; EDEN, A.B.S.; KONISKY, H.B.S.; KHANNA, U.M.D.; KOBETS, K.M.D. Pentoxifylline in dermatology. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 22, p. 410–417, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Dermatologia na Atenção Básica / Ministério da Saúde, **Secretaria de Políticas de Saúde**. - 1ª edição. - Brasília: Ministério da Saúde, 2002

CAMPEN, P.K.; MARIANNE, S.D.; Hemolysis Testing In Vitro: A Review of Challenges and Potential Improvements. **ASAIJ Journal** 68(1):p 3-13, 2022.

CAVALCANTI, A.L.M.C.; REIS, M.Y.F.A.; SILVA, G.C.L.; RAMALHO, I.M.M.; GUIMARÃES, G.P.; SILVA, J.A.; SARAIVA, K.L.A.; DAMASCENO, B.P.G.L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 506, p. 351–360, 2016.

CUI, M.; WIRAJA, C.; CHEW, S.W.T.; XU, C. Nanodelivery Systems for Topical Management of Skin Disorders. **Molecular Pharmaceutics**, v.18, p. 491–505, 2021.

DORATO, M.A.; BUCKLEY L.A. **Toxicology in the drug discovery and development process**. **Curr Protoc Pharmacol**. Apr;Chapter 10:3, 2006.

DRAIZE, J.H.; WOORDAD, G.; CALVERY O.H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J Pharmacol Exp Ther**. 1944; 83: 377-390

DRAIZE, J. H. "Dermal Toxicity." In: **Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs, and Cosmetics**, edited by United States Food and Drug Administration, Association of Food & Drug Officials of the United States, 1959, pp. 46-59.

DURGADAS, C.; KALADHAR, K.; DIVYA, P.; SREENIVASAN, K.; SHARMA, C. Preliminary studies on blood compatibility and Langmuir monolayer stability of gold nanoparticles stabilized through amino-PEG functionality. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 23, n. 2, 2009.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H.I. **Surfactants and experimental irritant contact dermatitis**. **Contact Dermatitis**, 33, 217-225, 1995.

ERNST, R.; ARDITTI, J. Biological effects of surfactants, IV. Effects of non-ionics and amphoteric on HeLa cells. **Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 233-242, 1980. ISSN 0300-483X.

ESSAYAN, D.M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.108, p. 671–680, 2001.

GENOVÉS, P.; GARCÍA, D.; CEJALVO, D.; MARTIN, A.; ZARAGOZA, C.; TOLEDO, A.H.; PEREYRA, L.H.T.; CARSI, J.M.L. **Pentoxifylline in Liver Ischemia and Reperfusion. Journal of Investigative Surgery**, 27, 114–124, 2014.

GHARBAVI, M.; MANJILI, H. K.; AMANI, J.; SHARAFI, A.; DANAFAR, H. In vivo and in vitro biocompatibility study of novel microemulsion hybridized with bovine serum albumin as nanocarrier for drug delivery. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01858, 2019.

GHATE, V. M.; KODOTH, A. K.; SHAH, A.; VISHALAKSHI, B.; LEWIS, S. A. Colloidal nanostructured lipid carriers of pentoxifylline produced by microwave irradiation ameliorates imiquimod-induced psoriasis in mice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 389-399, 2019.

GILHAR, A.; GROSSMAN, N.; KAHANOVICZ, S.; REUVENI, H.; COHEN, S.; EITAN, A. Antiproliferative effect of pentoxifylline on psoriatic and normal epidermis. **Acta Derm Venereol** (Stockh), 76: 437-441, 1996.

HADJESFANDIARI, N.; KHORSHIDFAR, M.; DEVINE, D. V. Current understanding of the relationship between blood donor variability and blood component quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 3943, 2021.

HASSAN, I.; DORJAY, K.; ANWAR, P. Pentoxifylline and Its Applications in Dermatology. **Indian Journal of Dermatology**, v. 5, p. 510, 2014.

HAY, R. J.; JOHNS, N. E.; WILLIAMS, H. C.; BOLLIGER, I. W.; DELLAVALLE, R.P.; MARGOLIS, D. J.; MARKS, R.; NALDI, L.; WEINSTOCK, M. A.; WULF, S. K.; MICHAUD, C.; MURRAY, C. J. L.; NAGHAV, M. The Global Burden of Skin Disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. **Journal Of Investigative Dermatology**, 134(6): 1527-1534, 2014.

HENRIQUE, J.S.; FALCARE, R.S.; LOPES, P.S. Sistema de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, p. 22, 2006.

HOSNY, K.M.; ALI, S.M. Novel controlled release oxyptentifylline microspheres; Preparation, characterization and in-vivo evaluation. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 27, p. 2039-2048, 2012.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR M.O.; DOULL J.; **Principles of toxicology chapter. Casarett & doull's toxicology: the basic science of poisons**, 3rd ed., 1986.

KNOP, L. B. & MARIA, D. A. Métodos Substitutivos e a Experimentação Animal: um Enfoque Inovador. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, 4(2), 101-114, 2016.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 095505, 2018

LAVANDEIRA, Fernanda Márcia Ferreira. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2014.

LIPPI, G. Systematic Assessment of the Hemolysis Index: Pros and Cons. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 71, p. 157-170, 2015.

LUCINDA, R. M., & EVANGELISTA, R. C. SISTEMAS TRANSDÉRMICOS PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, 10(1/6), 54–57, 2015.

MAUPAS, C.; MOULARI, B.; BÉDUNEAU, A.; LAMPRECHT, A.; PELLEQUER, Y. Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 136-141, 2011.

MARTINS, L.E.A.M.; REIS, V.M.S. Imunopatologia da dermatite de contato alérgica. **An Bras Dermatol.** 2011;86(3):419-33.

MCCUISTION, L.E.; KEE, J.; HAYES, E.R. Pharmacology: A Patient-Centered Nursing Process Approach, 8^a Ed. **Chapter 1: Drug Action: Pharmaceutic, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Phases.** Elsevier Saunders, USA, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NERY, J.A., PERISSÉ, A.R., SALES, A.M., VIEIRA, L.M., SOUZA, R.V., SAMPAIO, E.P., SARNO, E.N. The use of pentoxifylline in the treatment of type 2 reactional episodes in leprosy. **Indian Journal of Leprosy**, v. 72, p. 457–467, 2000.

NEUBERT, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1-2, 2001.

NGUYEN, A.V.; SOULIKA, A.M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, 1811, 20, 2019.

OECD- **Organization for Economic Cooperation and Development.** Guideline 402: Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure. Paris: OECD; 2017.

OLIVEIRA, S. S. M.; MACHADO, L. A.; DE OLIVEIRA, W. N.; ALENCAR, É. N.; ZATTA, K. C.; DE SOUZA, L. B. F. C.; MEDEIROS, A. D. C.; CHAVES, G. M.; EGITO, E. S. T. Buccal bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) oil emulsion: A mucoadhesive system intended for treatment of oral candidiasis. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 257, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente. Programa Internacional de Segurança Química; Tradução: Janaína

Conrado Lyra da Fonseca, Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Jassyrara Conrado Lyra da Fonseca. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2008.

PALIWAL, H.; SOLANKI, R.S.; CHAUHAN, C.S.; DWIVEDI. J. Pharmaceutical considerations of Microemulsion as a Drug Delivery System. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, p. 661–665, 2019.

PARTEARROYO, M. A.; OSTOLAZA, H.; GONI, F. M.; BARBERA-GUILLEM, E. Surfactant induced cell toxicity and cell lysis: a study using B16 melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 1323-1328, 1990.

PIMENTEL, S. Canais e transportadores de cálcio. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2003.

RAWLINGS, A.V; HARDING, C.R.; Moisturization and skin barrier function. **Dermatologic Therapy**, Vol. 17, 43–48, 2004.

REDONDO P, GARCIA-FONCILLAS J, ESPAÑA A, CUEVILLAS F, QUINLANILLA E. Differential modulation of IL-8 and TNF- α expression in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. **Exp Dermatol**, 6: 186–194. Munksgaard, 1997.

REVISTA DA FARMÁCIA. Pesquisa aponta que quase 90% dos brasileiros têm problemas de pele. *Revista da Farmácia*, 2024. Disponível em: <https://revistadafarmacia.com.br/saude/pesquisa-aponta-que-quase-90-dos-brasileiros-tem-problemas-de-pele/>. Acesso em: 24 nov. 2024.

RHYAF, A.; NAJI, H.; AL-KARAGOLY, H.; ALBUKHATY, S.; SULAIMAN, G. M.; ALSHAMMARI, A. A. A.; MOHAMMED, H. A.; JABIR, M.; KHAN, R. A. In vitro and in vivo functional viability, and biocompatibility evaluation of bovine serum albumin-ingrained microemulsion: A model based on sesame oil as the payload for developing an efficient drug delivery platform. **Pharmaceuticals**, v. 16, p. 582, 2023.

ROLIM, T. L.; MEIRELES, D. R. P.; BATISTA, T. M.; DE SOUSA, T. K. G.; MANGUEIRA, V. M.; DE ABRANTES, R. A.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. C. O.; BATISTA, L. M.; DA SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. ***BMC Complementary and Alternative Medicine***, v. 17, n. 1, p. 347, 2017.

SÆBØ, I. P.; BJØRÅS, M.; FRANZYK, H.; HELGESEN, E.; BOOTH, J. A. Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 24, n. 3, p. 2914, 2023.

SAHINER, M.; YILMAZ, A. S.; AYYALA, R. S.; SAHINER, N. Biocompatible glycol chitosan microgels as effective drug carriers. ***Gels***, v. 9, p. 398, 2023.

SATAPATHY, S.K.; SAKHUJA, P.; MALHOTRA, V.; SHARMA B.C.; SARIN, S.K. Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. ***Journal of Gastroenterology and Hepatology*** 22, 634–638, 2006.

SHAMILOV, R.; ROBINSON, V.L.; ANESKIEVICH, B.J. Seeing Keratinocyte Proteins through the Looking Glass of Intrinsic Disorder. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 7912, 2021.

SHUKLA, T.; UPMANYU, N.; AGRAWAL, M.; SARAF, S.; SARAF, S.; ALEXANDER, A. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, 108, 1477–14, 2018.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. ***Rev Ciênc Farm Básica Apl.***, 31(3):125-131 ISSN 1808-4532, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD); MIOT, H. A.; PENNA, G. O.; RAMOS, A. M. C.; PENNA, M. L. F.; SCHMIDT, S. M.; LUZ, F. B.; SOUSA, M. Au. J.;

PALMA, S. L. L.; SANCHES JUNIOR, J. A. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). **An Bras Dermatol.**, 93(6): 916-28, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 81(6): 549-558; 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Cuidados com a pele e anexos do recém-nascido: da higienização e hidratação ao tratamento. Departamento Científico de Dermatologia e Departamento Científico de Neonatologia, Sociedade Brasileira de Pediatria. Rio de Janeiro, 49 f, 2024.

STM INTERNATIONAL. ASTM F756–13: Standard guide for care and use of laboratory animals in testing of medical devices. ASTM International, 2013. Disponível em: <https://www.astm.org>. Acesso em: 10 nov. 2024.

ÜSTÜNDAG, N.; ÇAĞLAR, E.S.; SIAFAKA, P.I. Novel Ocular Drug Delivery Systems: An Update on Microemulsions. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 342–354, 2020.

WALLAU, W. M.; JÚNIOR, J. A. S. O Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) – uma introdução para sua aplicação em laboratórios de ensino e pesquisa acadêmica. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 607-617, 2013.

WANGENHEIM, A.V; NUNES, D.H.; WAGNER, H.M. **Relatório Técnico do Instituto Nacional para Convergência Digital/ Departamento de Informática e Estatística**, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. -- v.9, n.7, 2019.

WARD, A.; CLISSOLD, S.P. Pentoxifylline A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic Efficacy. **Drugs** 34: 50-97, 1987.

WOKOVICH, A.M.; PRODDUTURI, S.; DOUB, W. H.; HUSSAIN, A.S.; BUHSE, L.F. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 64 (2006) 1–8.

YEWALE, C., BARADIA, D., VHORA, I., MISRA, A. Proteins: emerging carrier for delivery of cancer therapeutics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, p. 1429–1448, 2013.

ZARGARI, O. Pentoxifylline: a drug with wide spectrum applications in dermatology. **Dermatology Online Journal**, v.14, p. 2, 2008.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DÉRMICA E ESTUDO DE PERMEÇÃO CUTÂNEA *in vitro* DE SISTEMAMICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA**”, registrada com o nº 050/2024, sob a responsabilidade da técnica Airlla Laana de Medeiros Cavalcanti, que envolve o uso de *Rattus Norvegicus-Wistar*, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 05 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual da Paraíba.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	05/04/2024 a 05/04/2025	
Espécie/linhagem/raça	Rattus Norvegicus- Wistar	
Nº de animais	82 (oitenta e dois)	
	Machos	Fêmeas
	32	50
Idade/ peso	08 a 10 semanas / 200g a 300g	
Origem	Centro de Bioterismo da UEPB	

Informação ao pesquisador:

Lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-UEPB o **Relatório Final** baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do **relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, previsto para conclusão em 04/2025.**

Campina Grande, 05 de maio de 2024.

Coordenadora da CEUA/UEPB