



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GEILZA CARLA DE LIMA SILVA

**MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO PENTOXIFILINA COMO AGENTE
ANTI-INFLAMATÓRIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Campina Grande

2015

GEILZA CARLA DE LIMA SILVA

**MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO PENTOXIFILINA COMO AGENTE
ANTI-INFLAMATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para
obtenção do título de Licenciada em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Karina Lidianne
Alcântara Saraiva
(CPqAM/FIOCRUZ-PE)

Coorientadora: Me. Airla Laana de
Medeiros Cavalcanti (UEPB)

Campina Grande

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S586m Silva, Geilza Carla de Lima.

Microemulsão tópica contendo pentoxifilina como agente anti-inflamatório [manuscrito] / Geilza Carla de Lima Silva. - 2015.

68 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva, Departamento de Ciências Biológicas".

"Co-Orientação: Profa. Ma. Airla Laana de Medeiros Cavalcanti, Departamento de Farmácia".

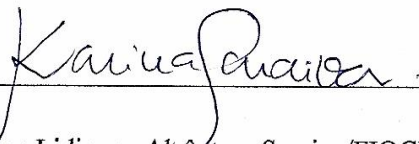
1. Microemulsão 2. Pentoxifilina 3. Inflamação cutânea 4. Fosfodiesterases. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

GEILZA CARLA DE LIMA SILVA

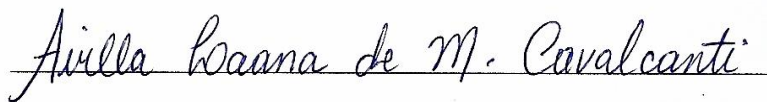
**MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO PENTOXIFILINA
COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à
exigência para obtenção do título de
Licenciada em Ciências Biológicas.



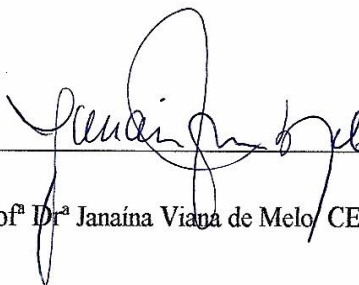
Prof^ª Dr^ª Karina Lidianne Alcântara Saraiva/FIOCRUZ-PE

Orientadora



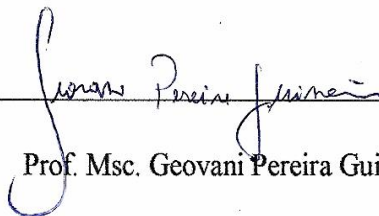
Msc. Airla Laana de Medeiros Cavalcanti/UEPB

Coorientadora



Prof^ª Dr^ª Janáina Viana de Melo/CETENE-PE

Examinador



Prof. Msc. Geovani Pereira Guimarães/UEPB

Examinador

Aos meus Pais, João e Betânia,
fonte de amor pleno e razão da minha existência
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador, pela fonte de luz plena em minha existência.

Aos meus pais João e Betânia, anjos que me guiaram e me acompanharam até aqui, exercendo com maestria seus respectivos papéis de pai e mãe, dando-me toda a força, suporte emocional e amor. Agradeço também a todos os meus familiares, em especial a minha amada avó Marcelina (*in memoriam*), fonte de luz e paz em minha vida.

À minha querida orientadora Karina Saraiva. Primeiramente, pela oportunidade e confiança no meu potencial. E posteriormente, pela brilhante orientação, amizade e fonte de inspiração, contribuindo excepcionalmente para minha formação como bióloga.

À minha querida coorientadora Airla Laana, por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, boas risadas, e acima de tudo, pela maravilhosa amizade. Sem dúvidas, você também é fonte de inspiração para mim, tanto como pessoa, quanto como profissional.

Às minhas queridas farmacêuticas Rosalina Jácome, Danielle Rocha e Giselle Lins, por toda paciência, ensinamentos e grande amizade. Agradeço a oportunidade cedida a mim de trabalharmos juntas.

À minha eterna professora de Biologia do Ensino Médio, Claudete Martins. Agradeço pelo exemplo de professora, o qual foi decisivo na escolha da minha profissão.

Às minhas companheiras de curso, que indubitavelmente, foram alicerce na minha formação. Não poderia deixar de citar o nome de cada uma, sob hipótese alguma. Agradeço a Jessica de Oliveira, Josefa Andreza, Anna Brazilina, Mayara Gomes, Andreza Dellys, Denise Queiroga, Kelly Marcelle, Monalisa Olímpio, Gabriela Soares, Sonally Cunha, Jaqueline Barbosa e Ione Costa, pelas boas risadas, companheirismo, paciência, ombro amigo nos momentos mais difíceis da minha vida e pela grande amizade que construímos, a qual levarei por toda a minha vida.

À todos os meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), pelos bons momentos de descontração, amizade e aprendizado. Em especial, Laysa, Yargo, Sonaly e Natan.

Aos meus queridos alunos do Pré-Vestibular Solidário da UFCG, pela amizade, pelo apoio e por contribuírem de forma essencial na minha formação profissional. A cada um, o meu sincero agradecimento.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e ao Biotério Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBIOTEC) da UFPB, pela disponibilidade de sua infraestrutura para a realização de alguns experimentos deste trabalho.

Aos meus professores de graduação por todo o incentivo, amizade, atenção e imensurável conhecimento construído, o qual contribuiu de maneira brilhante para minha formação acadêmica. Em especial, agradeço a Maria José, Simão Lindoso, Miguel Guedes (*in memoriam*), Adrienne Barros, Simone Lopes, Rosário Germano, Beatriz Ceballos, Carla Bicho e Cibelle Flávia.

Aos meus grandes amigos, Marcos Jr, Lucas Costa, Weiller Felipe, Kamila Cabral, Ronney de Sá e Priscilla Monteiro. Agradeço imensamente as conversas, conselhos, confiança e grande amizade.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram para realização e sucesso deste trabalho.

Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

RESUMO

A pentoxifilina (PTX) é um fármaco derivado do grupo das metilxantinas e inibidor não-seletivo de fosfodiesterases, sendo capaz de inibir a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias. Contudo, esse fármaco apresenta uma baixa biodisponibilidade quando administrado sob formas farmacêuticas orais, limitando o tratamento cutâneo. Além disso, a absorção cutânea é possivelmente limitada pela principal barreira da pele, o estrato córneo, que dificulta o fornecimento de quantidades necessárias deste fármaco para as camadas mais profundas deste órgão. Nesse contexto, as microemulsões (MEs) apresentam-se como nanocarreadores promissores para entrega do referido fármaco, permitindo possivelmente uma maior permeação cutânea, e conseqüentemente, promovendo uma maior biodisponibilidade. Este trabalho formulou, caracterizou e avaliou a atividade biológica da PTX incorporada a um sistema microemulsionado para aplicação tópica. Os componentes utilizados na formulação foram selecionados considerando as propriedades da pele e tipo estrutural de ME desejado. Obteve-se um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) utilizando água deionizada, Tween 80[®] e Brij 52[®] como mistura de tensoativos e os triglicérides do ácido cáprico e caprílico (TACC) como fase oleosa. A partir do DFPT foi selecionado um ponto de possível formação de ME do tipo A/O e a PTX foi incorporada a 1%. As MEs foram avaliadas quanto aos parâmetros físico-químicos de pH, condutividade e índice de refração, revelando-se adequado para a via tópica e sugerindo um sistema A/O. Os ensaios biológicos realizados através da indução do edema de pata por carragenina constataram a potencialização da ação do fármaco quando incorporado em MEs, dados estes em concordância com as análises histológicas. Nesta perspectiva, este sistema nanotecnológico pode propiciar uma nova estratégia para o tratamento de afecções dermatológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Microemulsão. Pentoxifilina. Inflamação Cutânea. Fosfodiesterases.

ABSTRACT

Pentoxiphylline (PTX) is a drug derived from the group of methylxanthines and it is a non-selective inhibitor of phosphodiesterases, being able to inhibit the production of some pro-inflammatory cytokines. However, this drug has a low bioavailability when administered by oral pharmaceutical forms, thus limiting the cutaneous treatment. Moreover, the cutaneous absorption is possibly limited by the primary skin barrier, the stratum corneum, which hinders the provision of required quantities of this drug into the deeper layers of this organ. In this context, microemulsions (MEs) present as promising nanocarriers for delivery of the related drug, possibly allowing a greater cutaneous permeation, and therefore promoting a higher bioavailability. This work formulated, characterized and evaluated the biological activity of PTX incorporated into a microemulsion system for topical application. The components used in the formulation were selected based on the properties of the skin and the desired structural type of ME. A pseudoternary phase diagram (DFPT) was obtained using deionized water, Tween 80 and Brij 52 as a mixture of surfactant and triglycerides of caprylic and capric acid (TACC) as the oil phase. From the DFPT was selected a point of possible formation of W/O microemulsion and PTX was incorporated at 1%. The MEs were evaluated for physicochemical parameters of pH, conductivity and refractive index, revealing suitable for topical use and suggesting a W/O system. The biological assays obtained by carrageenan-induced paw edema showed the empowerment of drug action when incorporated into MEs. These data are in accordance with the histological analyzes. In this perspective, this nanotechnological system can provide a new strategy for the treatment of dermatological diseases.

KEYWORDS: Microemulsion. Pentoxifylline. Cutaneous Inflammation. Phosphodiesterases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da estrutura da pele.	21
Figura 2 - Ativação da via NFkB através do TNF- α	23
Figura 3 - Estrutura química da pentoxifilina (PTX).	27
Figura 4 - Organização estrutural das fosfodiesterases.	27
Figura 5 - Produção dos monofosfatos cíclicos e ação das fosfodiesterases sobre os mesmos.	28
Figura 6 - Estrutura química da pentoxifilina e seus principais metabólitos.	31
Figura 7 - Diagrama de Fases Pseudoternário	33
Figura 8 - Estrutura das MEs.	34
Figura 9 - Diagrama de Fases Pseudoternário obtido.....	43
Figura 10 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após uma hora de indução do edema de pata pela carragenina.	46
Figura 11 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após duas horas de indução do edema de pata pela carragenina.	48
Figura 12 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após três horas de indução do edema de pata pela carragenina.	49
Figura 13 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após quatro horas de indução do edema de pata pela carragenina.	51
Figura 14 - Microscopia óptica da região edematosa da pata dos animais experimentais sob aumento na objetiva de 10x.	53
Figura 15 - Microscopia óptica da região edematosa da pata dos animais experimentais sob aumento na objetiva de 40x.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual (m/m) da formulação selecionada.....	44
Tabela 2 - Caracterização físico-química das formulações obtidas.	44
Tabela 3 - Percentual de inibição do edema na pata dos grupos experimentais.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
CARD10	Família com Domínio de Recrutamento de Caspase-10
CD	Célula Dendrítica
DA	Dermatite Atópica
DFPT	Diagrama de Fases Pseudoternario
EC	Estrato Córneo
FMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Guanosina Trifosfato
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IFN- γ	Interféron gama
IP	Proteína Induzida por Interféron-gama
I κ B	Inibidor κ B
IKK	Cinase I κ B
IL	Interleucina
IR	Índice de Refração
kDa	KiloDalton
LC	Células de Langerhans
LFA	Antígeno associado à Função Linfocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos 1
ME	Microemulsão
MEC	Matriz Extracelular
MPP	Metaloproteinase de Matriz
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa-B
nm	Nanômetro
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína Cinase dependente de AMPc
PKG	Proteína Cinase dependente de GMPc
PTX	Pentoxifilina
TACC	Triglicérides do Ácido Cáprico e Caprílico
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR1	Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1. Inflamação Cutânea.....	20
3.2. Pentoxifilina (PTX)	26
3.3. Microemulsão (ME).....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Seleção dos Componentes da Formulação.....	36
4.2 Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT).....	36
4.3 Seleção da formulação e Incorporação da Pentoxifilina	36
4.4 Caracterização Físico-Química	37
4.4.1 pH.....	37
4.4.2 Condutividade Elétrica	37
4.4.3 Índice de Refração	37
4.5 Atividade anti-inflamatória de ME-PTX utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina	38
4.5.1 Animais	38
4.5.2 Indução do edema de pata por carragenina.....	38
4.5.3 Tratamentos	38
4.5.4 Cálculo da Dose	39
4.5.6 Análise Histológica.....	40
4.5.7 Análise Estatística do Estudo <i>in vivo</i>	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Seleção dos Componentes.....	41
5.2. Diagrama de Fases Pseudoternário.....	42
5.3. Seleção da Formulação	43
5.4. Caracterização Físico-Química	44
5.5. Atividade Anti-inflamatória da PTX	46
5.5.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina	46

5.5.2. Análise Histológica.....	53
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB	69

1. INTRODUÇÃO

A inflamação cutânea é uma das consequências associadas às inúmeras patologias que envolvem a pele, tendo em vista que esse órgão forma uma barreira físico-química entre o meio ambiente e o organismo e, portanto, está suscetível a estímulos nocivos. Sendo assim, o processo inflamatório atua de modo a proteger os organismos contra invasores patogênicos e traumas físicos, evitando danos teciduais mais prejudiciais. Na maioria dos casos, a inflamação cutânea representa um processo benéfico e de proteção após a lesão ou infecção. Entretanto, quando a pele é submetida a respostas inflamatórias excessivas, poderá resultar em inflamação crônica e autoimunidade (WAGENER et al., 2013; ALESSANDRI et al., 2013).

O processo inflamatório caracteriza-se por ser iniciado por uma cascata molecular de eventos, sendo estes controlados especificamente por mediadores químicos endógenos. Essas substâncias químicas específicas, produzidas através da ativação de células especializadas do sistema imune, são responsáveis pelas principais consequências da inflamação, tais como a vasodilatação, aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos, recrutamento de leucócitos e eliminação de patógenos ou estímulos lesivos. Como consequência, estas alterações produzem os sinais clínicos clássicos da inflamação como dor, calor, eritema, edema e perda funcional. Cabe ressaltar ainda que a força e a duração da resposta inflamatória dependem de estímulo e do contexto imunológico do indivíduo (PAWELEC et al., 2013).

Uma das moléculas-chaves no processo inflamatório são as fosfodiesterases (PDEs), enzimas que degradam monofosfatos cíclicos (AMPc e GMPc), sendo estes segundos mensageiros imprescindíveis, tendo em vista que são integrantes das vias de transdução de sinais celulares, influenciando em processos fisiológicos essenciais para as células. Um desses processos fisiológicos é a inflamação, onde os monofosfatos cíclicos atuam inibindo a produção de citocinas importantes para o processo inflamatório. Sendo assim, caso essas moléculas sejam degradadas por fosfodiesterases, ocorrerá o aumento nos níveis de substâncias pró-inflamatórias [citocinas] e, conseqüentemente, uma resposta inflamatória exacerbada. Como as fosfodiesterases são responsáveis por regular a resposta inflamatória em muitas células do sistema imunológico, tais como monócitos, linfócitos, mastócitos e neutrófilos, modular a atividade dessas enzimas seria uma estratégia farmacêutica para tentar evitar a amplificação do processo inflamatório (MEHATS, et al., 2002; PIETROWSKA-BOREK; NUC, 2013; UNDERWOOD et al., 2014).

A pentoxifilina (PTX) é um fármaco derivado do grupo das metilxantinas e inibidor de fosfodiesterases, sendo capaz de inibir as citocinas pró-inflamatórias, principalmente, do TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa). O TNF- α amplia a expressão de outras citocinas (como a IL-6, por exemplo), aumentando o processo inflamatório. A PTX, originalmente, era usada como um fármaco hemorreológico. No entanto, ao ser constatado o seu potencial antiinflamatório, passou a ser também clinicamente utilizada para tratar um amplo espectro de patologias inflamatórias, incluindo hepatite, esteatose hepática, doença renal e artrite reumatóide. Como efeitos anti-inflamatórios, a PTX atua no alívio de dor inflamatória experimental, na prevenção da migração de neutrófilos e na redução do estresse oxidativo (SUNIL et al., 2014; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2013; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

Desse modo, a PTX pode ser uma alternativa farmacológica para o tratamento de patologias inflamatórias cutâneas. No entanto, quando a PTX encontra-se inserida em formas farmacêuticas convencionais, como no caso dos comprimidos, esta sofre uma grande degradação durante o metabolismo de primeira passagem, resultando em uma pequena quantidade de metabólitos ativos, caracterizando a baixa biodisponibilidade desse fármaco (em torno de 20-30%), o que, de certa forma, limita o tratamento de afecções dermatológicas. Nesse contexto, a aplicação tópica seria um método atraente de entrega de agentes terapêuticos para o tratamento de distúrbios da pele devido à grande área de superfície disponível e fácil acessibilidade, degradação enzimática relativamente baixa e a redução do risco de efeitos secundários sistêmicos. No entanto, a permeação transdérmica da PTX, possivelmente limitada pela principal barreira hidrofóbica da pele, o estrato córneo (EC), dificulta o fornecimento de quantidades necessárias deste fármaco para as camadas mais profundas deste órgão, já que o fármaco possui propriedades predominantemente hidrofílicas (GROEN et al., 2014; NOTMAN; ANWAR, 2013; DESAI et al., 2013; BOLZINGER et al., 2012).

Nesse contexto, como estratégia para sanar os problemas supracitados da PTX, viabilizando sua atividade anti-inflamatória cutânea efetiva, as microemulsões (MEs) apresentam-se como nanocarreadores promissores para veiculação do referido fármaco e devido aos seus componentes químicos estruturais, esse sistema nanocarreador interage com o EC da pele, desestruturando os seus lipídeos constituintes, permitindo possivelmente uma maior permeação do fármaco carregado. Além disso, esse sistema nanoestruturado, pelo fato de provavelmente aumentar a permeabilidade do fármaco na pele, pode ampliar por consequência a sua biodisponibilidade (ZHAO, 2014; PROW et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2004; CADDEO et al., 2013).

Desse modo, o presente estudo torna-se promissor, apoiando a hipótese de que a PTX, se carregada em um sistema microemulsionado, provavelmente minimizará os efeitos do processo inflamatório de modo mais efetivo. O sucesso desta metodologia será de grande interesse para as indústrias farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Formular um sistema microemulsionado para veiculação da PTX para uso tópico como anti-inflamatório.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Selecionar os componentes adequados para compor o sistema microemulsionado;
- ❖ Desenvolver um diagrama de fases pseudoternário para obtenção de um sistema microemulsionado do tipo água/óleo (A/O);
- ❖ Selecionar o ponto de ME para incorporar a PTX;
- ❖ Caracterizar as microemulsões quanto aos aspectos físico-químicos (Condutividade, pH e Índice de refração);
- ❖ Testar as formulações desenvolvidas em um sistema biológico através do modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- ❖ Realizar a análise histológica da região edematosa.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Inflamação Cutânea

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo aproximadamente a 16% do peso total do mesmo, e serve de barreira física na interface entre o corpo e o meio, atuando principalmente como um meio de retenção de água e contra a penetração de agentes externos, tendo em vista que abriga uma microbiota complexa em sua superfície que pode ser composta por bactérias, vírus, fungos e/ou microartrópodes. Em contrapartida, a pele proporciona muitos nichos em que grandes populações de micróbios são submetidos a pressões ambientais variáveis, incluindo a umidade, temperatura, pH, e a composição de peptídeos antimicrobianos e lipídeos que dificultam o crescimento exacerbado destes organismos (WICKETT; VISSCHER, 2006; BOLZINGER et al., 2012; SCHOMMER; GALLO, 2013; PLASENCIA et al., 2007).

A pele apresenta uma estrutura bastante complexa, sendo dividida em três camadas histológicas bem diferenciadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A epiderme é um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com espessura variável dependendo da região corporal, onde o principal tipo celular são os queratinócitos, responsáveis pela síntese de queratina, uma proteína fibrosa que auxilia na arquitetura da pele, e citocinas em resposta à lesões. Os melanócitos compõem 5-10% da população de células desta camada e são responsáveis pela produção de melanina, pigmento que dá cor ao referido órgão e respectivos anexos (GODIN; TOUITOU, 2007; SMEDEN et al., 2014).

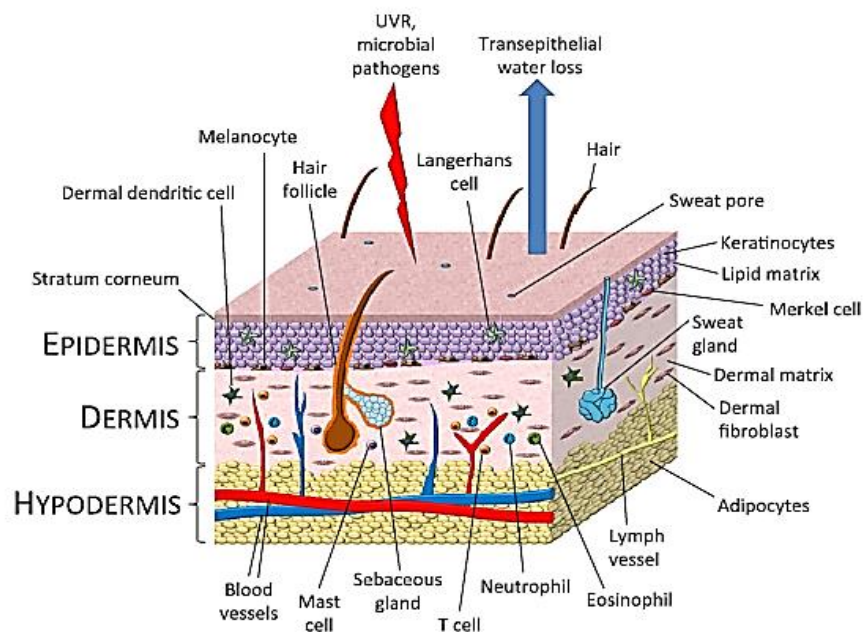
A epiderme pode ser ainda subdividida em quatro camadas, sendo elas: o **estrato basal**, composto por células prismáticas ou cuboides que repousam sob a membrana basal. É uma camada rica em células-tronco (*Stem cells*) epidérmicas e apresenta, conseqüentemente, uma alta taxa mitótica. A camada subsequente é o **estrato espinhoso** formado por células cuboides ou achatadas com curtas expansões citoplasmáticas que contêm feixes de filamentos de queratina – os desmossomos. Nesta camada, podem-se identificar as células de Langerhans, que atuam na captura e processamento de antígenos e sua posterior apresentação a linfócitos T, adquirindo assim uma grande importância no desenvolvimento de reações imunitárias cutâneas. Em imediato, encontra-se o **estrato granuloso**, onde os queratinócitos existentes contêm grânulos intracelulares de querato-hialina, sendo esta expelida para formar uma barreira impermeabilizante, conferindo coesão intercelular. Por fim, ocorre a **camada córnea** (ou EC), sendo esta a mais externa da epiderme. É composta por células mortas,

achatadas e anucleadas, ricas em queratina em embebidas numa matriz lipídica (LAI-CHEONG; McGRATH, 2013; MENON et al., 2012).

A derme é o tecido conjuntivo delimitado externamente por sua junção com a epiderme e internamente pela gordura subcutânea. Apresenta uma espessura variável, sendo resistente e conferindo proteção ao corpo contra lesões mecânicas. Sendo um tecido conjuntivo, apresenta grande quantidade matriz extracelular (MEC) composta por fibras (colágenas, elásticas e reticulares), substância amorfa (macromoléculas de proteoglicanos) e células, sendo as principais os fibroblastos e células do sistema imune, tais como macrófagos, mastócitos, plasmócitos, dentre outros (VENUS et al., 2011).

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo que une a derme aos órgãos subjacentes. Além disso, apresenta uma camada de tecido adiposo constituído por adipócitos, que são simplesmente depósitos de triglicerídeos. Assim, as gotículas de gorduras armazenadas intracelularmente são hidrolisadas quando necessário, atuando como reserva energética e isolante térmico (SOULA et al., 2015).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte: KENDALL; NICOLAOU, 2013

A pele é um importante componente do sistema imune, tendo como principal mecanismo de defesa o desencadeamento da inflamação, uma resposta natural do organismo contra uma infecção ou lesão, com o objetivo de destruir os agentes agressores (ABBAS et

al., 2011). Este processo participa de mecanismos fisiológicos que medeiam a cicatrização da pele e reparo de lesões, embora seja uma característica central em um número de dermatoses e no desenvolvimento do câncer. Um equilíbrio delicado entre os sinais pró e anti-inflamatórios é crítico na manutenção das funções fisiológicas da pele. Para desencadear uma resposta inflamatória, a pele conta com células especializadas, incluindo queratinócitos epidérmicos, os melanócitos, e as células de Langerhans, bem como os fibroblastos dérmicos, mastócitos e leucócitos de infiltração. Além disso, faz uso de substâncias que atuam nas funções celulares e atração dessas células, as citocinas e quimiocinas (NICOLAOU, 2013; YOSHIKAWA et al., 2008).

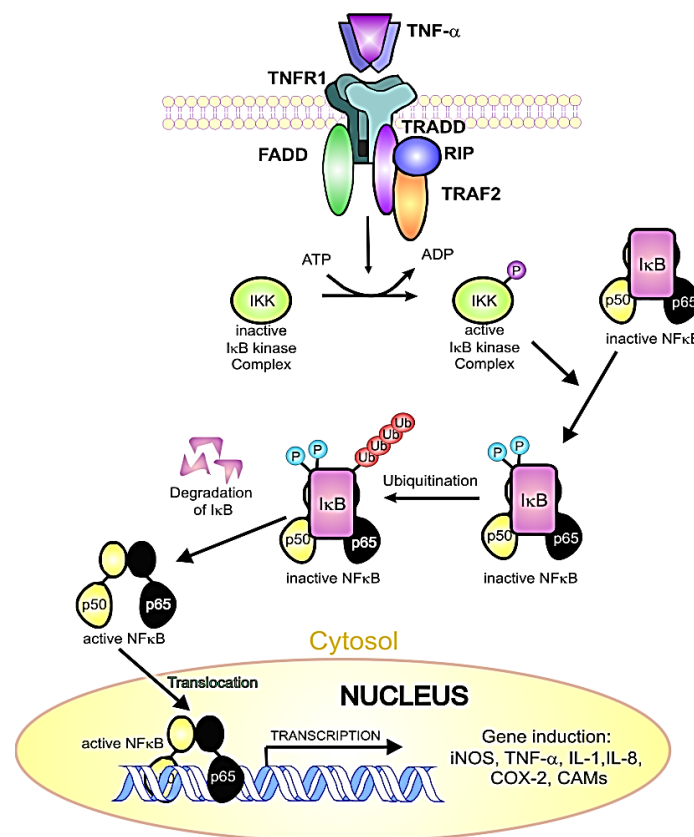
As citocinas são mediadores que atuam na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes, incluindo a iniciação ou influência de numerosos processos biológicos como a inflamação, sepse e cicatrização de feridas. As quimiocinas são citocinas que representam um grande grupo de pequenas proteínas quimiotáticas (com tamanho de 8-11 kDa) e orientam o movimento de leucócitos para locais de inflamação (LEE; HWANG, 2012). Para isso, os leucócitos ativam seus receptores de quimiocinas da superfície celular, que pertencem geralmente à família de receptores acoplados a proteína G. A ação em concentrações mínimas, rápida estimulação e curta duração de atividade, caracteriza a regulação autócrina/parácrina desses peptídeos (GRELLNER et al., 2000). Elas são produzidas por uma variedade de tipos celulares como macrófagos, trombócitos e queratinócitos, e essa produção pode depender de fatores externos. Por exemplo, o pH ácido da pele influencia a atividade de proteases (tais como as calicreínas 5 e 7) envolvidas na ativação de citocinas (WITTMANN et al., 2014; PRIMO et al., 2012).

Quando ocorre alguma injúria à pele, tais como trauma físico, irradiação ultravioleta ou produtos bacterianos, estas células secretam citocinas que permitem-lhes regular o seu próprio comportamento e recrutar células inflamatórias. As citocinas secretadas pelos queratinócitos, em resposta à lesão, são consideradas como os principais mediadores da resposta inflamatória cutânea. Dentre os fatores liberados por estas células em resposta a vários estímulos, incluem TNF- α , IL-1 α , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TGF- α , TGF- β , IFN- γ e MCP-1, entre outros (KIM et al., 2013; RICH; KUPPER, 2001).

A produção local de citocinas por queratinócitos tem múltiplas consequências locais e sistêmicas, tais como migração de células inflamatórias, a ativação de resposta imunológica, alterações nos processos de proliferação e diferenciação de queratinócitos e de fibroblastos e ação autócrina para os queratinócitos. Dois fatores autócrinos proeminentes para queratinócitos, TNF- α e IL-1 α , são denominados citocinas primárias porque ativam a via do

NFκB (Fator de transcrição nuclear kappa-B) (Figura 2), estimulando transcrição de um número de outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e outros efetores de muitos tipos celulares. O TNF-α secretado por queratinócitos, por exemplo, estimula o acúmulo de células inflamatórias através da indução da expressão de moléculas de adesão, tais como o ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular 1), sobre células endoteliais vizinhas. Além disso, o TNF-α pode induzir a produção de citocinas secundárias resultando na expansão das reações imunitárias/ inflamatórias (KADOSHIMA-YAMAOKA et al., 2009).

Figura 2 - Ativação da via NFκB através do TNF-α.



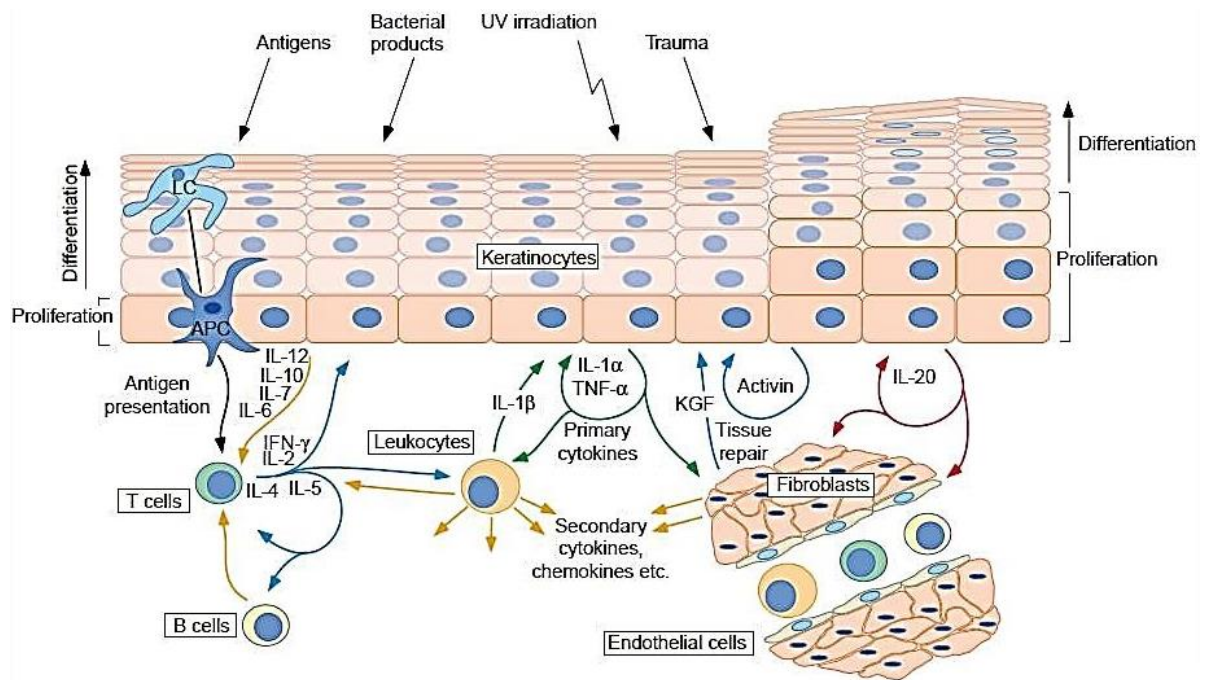
Fonte: INGARAMO, et al., 2013.

Nota: O TNF-α estimula a célula através de sua ligação com um receptor específico (TNFR1), o que acarreta a fosforilação do complexo IKβ cinase (IKK). Esse complexo quando ativado, por sua ação cinase, fosforila o inibidor κB (IκB) que está ligado ao NFκB, inativando-o. Com a referida fosforilação, o IκB desprende-se do NFκB, seguindo a via de ubiquitinação para posterior proteólise. Já o NFκB, é ativado e direcionado ao núcleo celular, para atuar como fator de transcrição de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias.

As citocinas liberadas pelos queratinócitos também ativam as células dendríticas (CDs), sendo estas um grupo heterogêneo de células apresentadoras de antígenos e ativadores

de células T, que são importantes tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Estas estão presentes na derme e na epiderme, sendo denominadas de células de Langerhans (LC), neste último caso (Figura 3) (HALPERN, 2012). As CDs são grandes produtoras de IL-20, *iNOS* (Óxido Nítrico Sintase Induzida), bem como de IL-23 e TNF- α , que por sua vez, atuam estimulando a produção de queratinócitos, promovendo a vasodilatação, proliferação de linfócitos Th27 e produção de IL-8, IP-10 e IL-1, respectivamente. Ao ativar os linfócitos T, estes migram para a pele através da ligação entre as moléculas de adesão expressas na sua membrana plasmática (CLA e LFA-1) e as moléculas de adesão presentes na membrana da célula endotelial cutânea ativada (E-selectina e ICAM-1) (SANCHEZ, 2010). Na derme, os linfócitos T se encontram e interagem com as CDs e macrófagos, formando novas interações imunológicas, levando a produção de várias citocinas, e consequentemente amplificando o processo inflamatório (GRAGNANI et al., 2014).

Figura 3 - Sinalização celular e molecular da pele em resposta a danos físicos, químicos ou biológicos.



Fonte: RICH; KUPPER, 2001.

Muitas patologias dermatológicas são caracterizadas pela presença do processo inflamatório cutâneo. Dentre elas, destacam-se a psoríase, a dermatite atópica e a furunculose recorrente. A psoríase é uma condição inflamatória crônica da pele, caracterizada por um aumento na proliferação e diferenciação de queratinócitos. Isso gera aspectos clínicos como

lesões avermelhadas na pele, cobertas com uma camada branco-prateada e descamativa, pequenas manchas vermelhas, pele seca com facilidade para sangramentos e alergias, bem como queimaduras e irritações na pele (PINHEIRO et al., 2014).

Afeta aproximadamente 2% da população mundial, tendo sua etiologia ainda pobremente compreendida, embora saiba-se que a mesma parece ter predisposição genética e ser imuno-mediada. A pele com lesões psoriáticas mostram um aumento significativo em células T ativadas, CDs e macrófagos, que produzem diferentes mediadores pró-inflamatórios. Macrófagos ativados, por exemplo, aumentam a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , que promove angiogênese (também através da via NF-kB) dirigida por neutrófilos por causa de alterações na MEC, aumento da secreção de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e proliferação de células endoteliais vasculares (KIM et al., 2011). Assim, as lesões características dessa doença mostram propriedades altamente angiogênicas, sendo estes eventos estreitamente ligados, ao nível molecular, a uma maior produção de várias citocinas e expressão dos VEGF, MMPs (Metaloproteinase de Matriz), entre outros (KUMAR et al., 2011).

Uma outra doença caracterizada por inflamação cutânea é a dermatite atópica (DA), uma doença crônica, recorrente, fortemente pruriginosa, que geralmente desenvolve-se na primeira infância e tem uma distribuição idade-dependente característica. AD é relativamente comum, afeta 10% a 20% das crianças e persiste durante a vida adulta em 1% a 3% dos casos. O prurido é característico nos portadores de AD, além de áreas de liquenificação e nódulos fibrosos, muitas vezes acompanhados por lesões agudas (LYONS et al., 2015).

Nesta patologia, ocorre a ativação do sistema imunitário, com expansão de células Th2, aumento nos níveis séricos de IgE, além de hiperplasia e apoptose de queratinócitos na fase crônica (YOKOUCHI et al., 2014). As causas da dermatite atópica ainda não são bem entendidas, embora a predisposição genética e fatores ambientais atuem de modo crítico. A inflamação da pele, neste caso, pode persistir durante várias semanas e o quadro clínico agrava-se ainda mais caso haja infecções secundárias (*Staphylococcus aureus*, por exemplo), que contribuem para a ativação da resposta imune inata via NF-kB em queratinócitos (LYONS et al., 2015; SMEDEN et al., 2014).

Como moléculas ativadoras desta via, pode-se citar a proteína CARD10 (Família com Domínio de Recrutamento de Caspase-10), que contém o domínio de recrutamento da caspase 10. Essa proteína é ativada através de um receptor acoplado à proteína G e medeia a degradação do I κ B, e assim, ativa NF κ B (REBANE et al., 2014). A fase crônica da inflamação da pele em AD é afetada também pela IL-22, produzida principalmente por

células Th22, e pelo IFN- γ produzido por células do tipo Th1. O IFN- γ é o principal fator responsável pela apoptose dos queratinócitos, o que intensifica a inflamação através da regulação positiva de numerosos genes pró-inflamatórios da pele. No que se refere às quimiocinas, ocorrem algumas induzidas por IFN- γ em queratinócitos, a CCL5, CCL8, CCL11, CCL17, CCL22, CCL26, CCL27 e CX3CL1, que atraem células T, macrófagos e eosinófilos (GASPAR et al., 2013).

Cabe destacar ainda a furunculose recorrente, um tipo de foliculite profunda gerada por uma infecção estafilocócica da unidade pilo-sebácea, que desencadeia uma reação inflamatória, formando uma coleção purulenta e necrose central. Os furúnculos começam como nódulos firmes, avermelhados e dolorosos e posteriormente tornam-se flutuantes e se rompem eliminando tecido necrótico. A duração e curso de furunculose são variáveis, tendo em vista que alguns doentes podem apresentar apenas um episódio, enquanto que outros desenvolvem recorrências por meses ou mesmo anos (TIVERS et al, 2008).

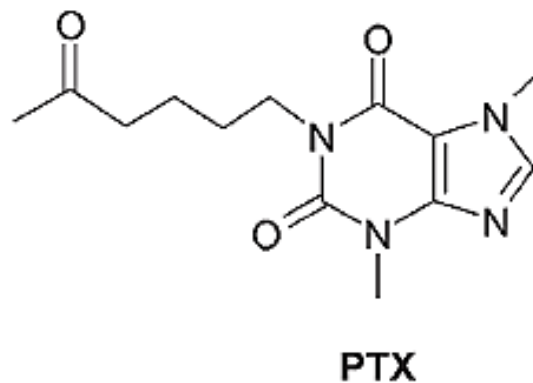
Atanaskova e Tomecki (2010) demonstraram o aumento dos níveis de expressão de IL-2 e de mRNA de IFN- γ em comparação com lesões de outras foliculites em tecidos controles. A expressão destas citocinas no tecido doente indica a presença de células T ativadas e sugere que essa patologia é associada com a inflamação mediada por estas células. No entanto, respostas imunitárias humorais a bactéria causadora podem ser responsáveis por dirigir a resposta de células T em tecidos afetados, não sendo isso atributo apenas das citocinas em questão.

Desse modo, faz-se necessário modular os eventos que ocorrem durante o processo inflamatório para minimizar os possíveis danos ao organismo acometido pelas patologias que desencadeiam a inflamação. Diante disso, as vias de transdução de sinais inflamatórias são alvos de fármacos que atuam através de mecanismos de ação variados, propiciando um efeito terapêutico eficiente. Nesse contexto, destaca-se a PTX como uma alternativa farmacológica para o tratamento de patologias inflamatórias cutâneas.

3.2. Pentoxifilina (PTX)

A pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil) purina-2,6-diona) é um derivado do grupo das metilxantinas, com fórmula e peso molecular de $C_{13}H_{18}N_4O_3$ e 278.30702 g/mol, respectivamente (Figura 4). As xantinas (teobromina, cafeína, teofilina) são alcalóides obtidos de diferentes classes de vegetais, amplamente distribuídos.

Figura 3 - Estrutura química da pentoxifilina (PTX).



Fonte: FANTIN et al., 2006

A PTX caracteriza-se por ser um inibidor não-seletivo de fosfodiesterases (PDEs). As PDEs são uma classe de enzimas-chave dentro da cascata de transdução de sinal intracelular, inclusive no processo inflamatório, que seguem a ativação de vários tipos de receptores ligados a membranas. PDEs degradam AMPc ou GMPc por meio de hidrólise de ligações fosfodiéster. As isoformas das PDEs compartilham uma organização estrutural comum (Figura 5), com um domínio catalítico conservado (cerca de 250-300 aminoácidos) na porção C-terminal, seguido de uma curta cauda C-terminal hidrófila e precedida por uma região reguladora do terminal N. Esses domínios catalíticos contêm sequências específicas que determinam as diferenças nas afinidades de substrato, propriedades catalíticas, e sensibilidade para efeitos e inibidores específicos. A concentração intracelular dos monofosfatos cíclicos é dependente da taxa de síntese através da ativação das enzimas adenilato e guanilato ciclase e também da sua degradação através da PDE. A inibição de PDEs foi considerada como uma nova estratégia terapêutica para restaurar os níveis de nucleotídeos cíclicos (SHARMA et al., 2013).

Figura 4 - Organização estrutural das fosfodiesterases.



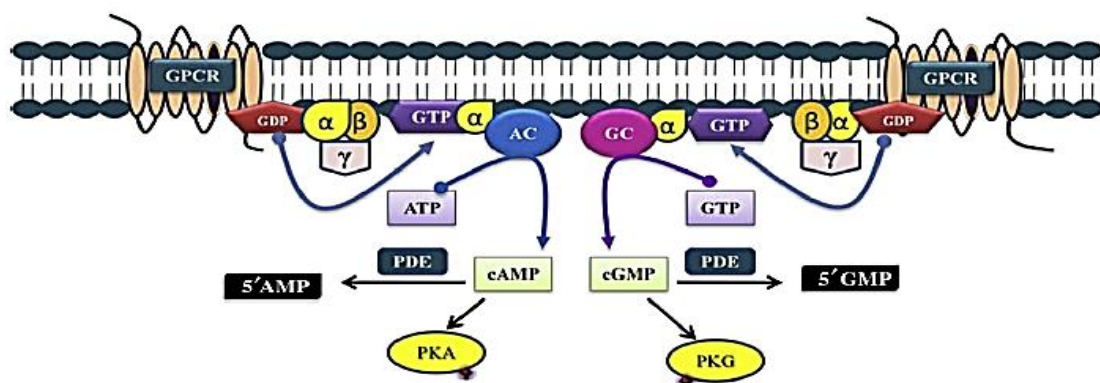
Fonte: SHARMA et al., 2013 (adaptado).

Os monofosfatos cíclicos são segundos mensageiros, ou seja, importantes moléculas sinalizadoras, que vem sendo estudadas ao longo das últimas décadas e são integrantes essenciais para a transdução de sinais em ambos os organismos eucarióticos e procarióticos (PIETROWSKA-BOREK; NUC, 2013; UNDERWOOD et al., 2014). A produção dessas moléculas está associada à atividade enzimática de ciclases, como a guanilato ciclase e adenilato ciclase que, quando ativadas, convertem trifosfatos de guanosina e adenosina em estrutura cíclica com apenas um grupo fosfato, GMPc e AMPc, respectivamente.

Os monofosfatos cíclicos modulam uma variedade de enzimas envolvidas em processos fisiológicos essenciais para as células, entre elas as proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) e de GMPc (PKG). O aumento na concentração do AMPc estimula a PKA, resultando na fosforilação de um número de proteínas reguladoras, incluindo a proteína CREB que pode inibir o NFκB, inibindo conseqüentemente a produção de várias citocinas, tendo em vista que o NFκB é um fator de transcrição envolvido na transcrição dessas substâncias (WEI et al., 2009). Além disso, a via de sinalização AMPc/PKA também regula o metabolismo, bem como o crescimento e divisão celular, a diferenciação celular e o funcionamento dos canais iônicos (HANSSON et al., 2000). Embora acreditasse inicialmente que as PKAs fossem o único efetor de AMPc, novos alvos de AMPc foram posteriormente descritos (BUFFONE et al., 2014).

Por sua vez, o GMPc regula processos fisiológicos fundamentais no miocárdio, como relaxamento e contração muscular, além de crescimento celular e apoptose nas demais células por meio de três grupos principais de moléculas alvo: PKGs, canais de cátions dependentes de GMPc e fosfodiesterases (PDE) (KUKREJA et al., 2012).

Figura 5 - Produção dos monofosfatos cíclicos e ação das fosfodiesterases sobre os mesmos.



Fonte: SHARMA et al., 2013 (adaptado).

Nota: Com um estímulo externo aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), ocorre a ativação da proteína G acoplada e a consequente dissociação da subunidade α da mesma. Esta subunidade modula a atividade de enzimas produtoras de monofosfatos cíclicos, ativando a adenilato ciclase e guanilato ciclase, culminando na produção de AMPc e GMPc, respectivamente. Esses monofosfatos cíclicos modulam a atividade de enzimas envolvidas em processos fisiológicos essenciais para as células (PKA e PKG), inclusive no processo inflamatório. No entanto, os monofosfatos cíclicos podem ser alvos de fosfodiesterases (PDEs), enzimas que degradam essas moléculas.

A PTX atua inibindo a ação das fosfodiesterases e isto tem uma série de consequências moleculares. Apresenta propriedades reológicas, tendo estabelecido seus efeitos hemorreológicos em células vermelhas, leucócitos e plaquetas, resultando no aumento da deformabilidade e menor viscosidade do sangue.

A PTX e seus metabólitos podem inibir a adesão de neutrófilos a células endoteliais. Entretanto, esse efeito é muito controverso, tendo em vista que em alguns experimentos foi demonstrado o contrário. Isso pode ser justificado pelo fato de que a PTX pode ter diferentes efeitos na migração, dependendo da sua concentração. Em baixas concentrações, provoca um aumento da migração aleatória, através da quimiocinética. Em concentrações mais elevadas, provoca uma inibição da quimiotaxia devido ao aumento de FMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina). Estas observações podem conciliar os resultados aparentemente contraditórios na literatura (ELFERINK et al., 1997). Além disso, o tratamento de neutrófilos com PTX, impede a degranulação da mieloperoxidase e lisozima, enzimas envolvidas na apoptose e condução do processo inflamatório e antibacteriano, respectivamente (SAMLASKA; WINFIELD, 1994).

A PTX estimula o endotélio vascular para libertar prostaciclina (PGH), que inibe a adesão e agregação das plaquetas. Magnusson et al. (2008) mostraram que tanto a pentoxifilina, quanto o M4 e a mistura racêmica do M1 inibem significativamente a agregação plaquetária *in vitro*, de um modo dependente da concentração.

Como já referido, a PTX tem uma ação anticitocinas devido a sua atividade inibitória para fosfodiesterases. Estudos demonstram que o tratamento com PTX diminuiu os níveis de TNF- α , IL-6, IL-10, INF- γ e IL-12 e outras citocinas *in vitro* (MARCINKIEWICZ et al., 2000; DEMIR et al., 2006). Além disso, Peterson et al. (2011) mostraram que a pentoxifilina inibiu a produção de IL-18, TNF- α , e produziu níveis mais baixos de IL-12 em modelo de colite. Em estudos *in vitro* com humanos, as células têm mostrado que a pentoxifilina pode inibir a apoptose em diferentes linhagens de células e diminuir a liberação de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (FERNANDES et al., 2008).

Em fibroblastos, a presença da PTX aumenta a atividade da collagenase, causando uma diminuição na quantidade de colágeno, glicosaminoglicanos, e fibronectina. Além disso, inibe seletivamente a expressão de TNF- α (mas não o interferon- γ) por células de Langerhans epidérmicas humanas *in vitro* (SAMLASKA; WINFIELD, 1994).

Em macrófagos alveolares, alguns estudos demonstraram o efeito da PTX sobre a expressão de IL-1. O fármaco não diminuiu a expressão do RNAm de IL-1a, mas houve uma redução da expressão de RNAm de IL-1b em aproximadamente 30% quando comparado com o nível observado em macrófagos expostos a LPS (MYERS et al., 2002).

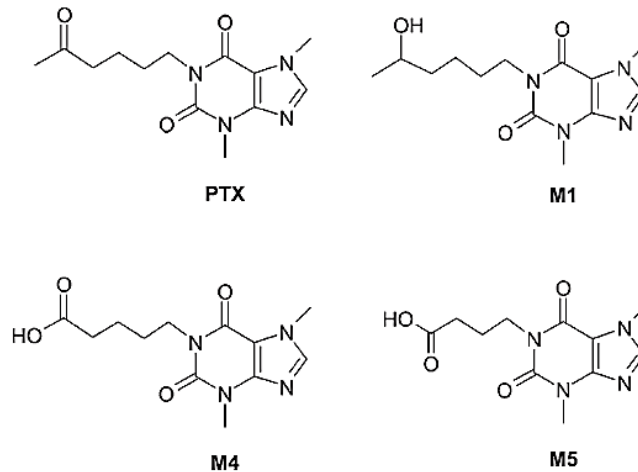
Contudo, altas doses de PTX pode ter um efeito contrário, ou seja, induzir a inflamação. Isso se deve ao fato de que há alguns mecanismos moleculares pelos quais o AMPc regula positivamente a expressão do gene *iNOS*, que atua na produção de óxido nítrico (um importante marcador inflamatório) em diferentes tipos celulares (KIM et al., 2002). Sendo assim, entender as características farmacocinéticas da PTX na via de administração utilizada é imprescindível para uma terapêutica eficaz.

O fármaco pode ser administrado através das vias oral ou intravenosa. No caso da via oral, os efeitos colaterais gastrointestinais são minimizados com a utilização de liberação controlada, através de cápsulas revestidas. A absorção intestinal é rápida, com concentrações plasmáticas máximas obtidas em 3,2 horas, não sendo extensa a reciclagem entero-hepática dos metabólitos. As preparações orais têm uma biodisponibilidade de apenas 20% a 30%, devido a uma elevada depuração de primeira passagem. Transformações metabólicas extensas são responsáveis pela biodisponibilidade baixa e variável do fármaco (SAMLASKA; WINFIELD, 1994).

A atividade metabólica gera sete metabólitos de PTX, sendo a HPTX (ou M1), 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthine, o mais ativo. Além deste, há metabólitos carboxilados, como M5 [1 (carboxipropil) -3,7-dimetilxantina] e M4 (1-(4-carboxybutyl)-3,7-dimethylxanthine) que também são metabólitos circulantes, presentes em seres humanos (Figura 6). Apesar da falta de conhecimento sobre os exatos alvos moleculares, uma utilização terapêutica de M4 e M5, em certas condições patológicas, é concebível (FANTIN et al., 2006). Em particular, o M5 mantém os efeitos moduladores da PTX na deformabilidade de eritrócitos, na agregação de plaquetas e função de neutrófilos, mas sem atividade inibidora substancial para a produção de TNF- α , como o principal metabólito ativo. Assim, merece maior avaliação pré-clínica para o seu potencial terapêutico como um agente hemorreológico e anti-inflamatório. Estudos sugerem que ambos os metabólitos carboxilados podem ser inibidores de fosfodiesterases do AMPc, porém sendo mais fracos que o fármaco original e o

M1; Outras experiências demonstraram que a PTX e M1, mas não M4 e M5, reduziram a proliferação e/ou a viabilidade celular (WINDMEIER; GRESSNER, 1997).

Figura 6 - Estrutura química da pentoxifilina e seus principais metabólitos.



Fonte: FATIN et al., 2006.

Mais de 90% da PTX absorvida é excretada na urina na forma dos seus respectivos produtos metabólicos. Apresenta uma meia-vida de eliminação de 3,4 horas, embora alguns estudos afirmem que em voluntários saudáveis, a PTX é eliminada da circulação com uma meia-vida de eliminação de cerca de 0,9 horas depois da administração oral e cerca de 1 a 1,6 horas após a administração intravenosa (SAMLASKA; WINFIELD, 1994). Estudos realizados para analisar a degradação da PTX sob estresse oxidativo mostraram que este fármaco foi altamente susceptível a oxidação com peróxido de hidrogênio e foi degradado completamente em produtos altamente polares dentro de 19 h, a 80 °C (MONE; CHANDRASEKHAR, 2010).

A dosagem recomendada de PTX oral para adultos (comprimido com formulação de liberação controlada) é de 400 mg, três vezes ao dia com as refeições. Esta dose pode ser reduzida se ocorrer efeitos colaterais. A constante administração intravenosa de PTX em indivíduos saudáveis mostrou que o efeito adverso predominante de infusão do fármaco foi dependente da dose e caracterizou-se por náuseas e vômitos. Doses muito elevadas como 2200 mg por dia (por via intravenosa e oral em uma terapia combinada) tem sido bem tolerada em pacientes com doença vascular periférica grave (WINDMEIER; GRESSNER, 1997).

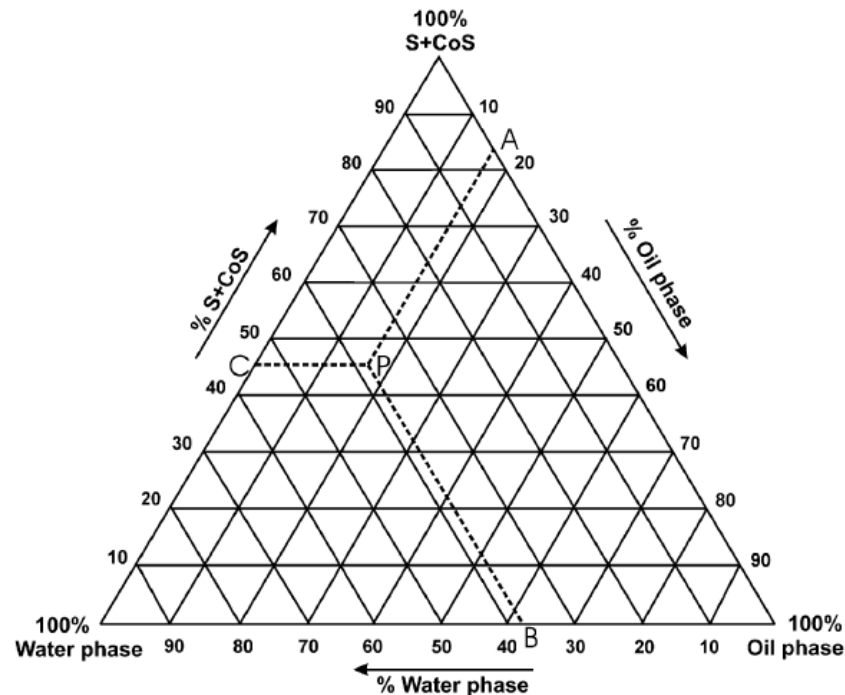
Conforme já descrito, embora a PTX tenha propriedades anti-inflamatórias consideráveis, esse fármaco é susceptível a intensa degradação metabólica, quando administrado através das formas farmacêuticas orais, gerando uma pequena quantidade de metabólitos ativos. Nesse contexto, a via de administração tópica seria uma alternativa viável, porém, a pele atua como uma barreira física, o que dificulta a difusão do fármaco pelo referido órgão. Assim, a utilização de um nanocarreador que possivelmente permita uma melhor permeação da PTX através da pele, e conseqüentemente, uma maior biodisponibilidade desse fármaco, provavelmente melhoraria o efeito terapêutico da mesma.

3.3. Microemulsão (ME)

Microemulsões (MEs) são uma mistura monofásica, transparente e termodinamicamente estável composta de óleo, água e estabilizada com tensoativo e/ou co-tensoativo (ZHAO, 2014). As MEs diferem-se das emulsões tendo em vista que apresentam uma tensão interfacial muito baixa, propiciando assim uma formação espontânea e um pequeno tamanho de gotículas, sendo, por consequência, opticamente límpidas. Em contraste, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas, com alta tensão interfacial e gotículas de tamanho até 100 vezes maiores que as das MEs, tornando-as termodinamicamente instáveis (DAMASCENO et al., 2011).

A demonstração mais comumente utilizada para representar os sistemas microemulsionados é o diagrama de fases pseudoternário (DFPT) (Figura 7). Este descreve em que condição experimental é possível obter MEs e as regiões limites de transição entre emulsões, fases separadas e os diferentes tipos estruturais das MEs, onde a fase aquosa, fase oleosa e mistura de tensoativo/co-tensoativo são representadas nos vértices de um triângulo. O DFPT é definido para cada relação tensoativo/co-tensoativo. Assim, podem-se preparar misturas dos componentes correspondentes a cada lado do triângulo e realizar a titulação com o outro componente. Os pontos da titulação referem-se às modificações verificadas no sistema, tais como, separação de fases, sistema transparente líquido, sistema transparente gel, sistema opaco, entre outros (OLIVEIRA et al., 2004).

Figura 7 - Diagrama de Fases Pseudoternário



Fonte: SCHMIDTS et al., 2009

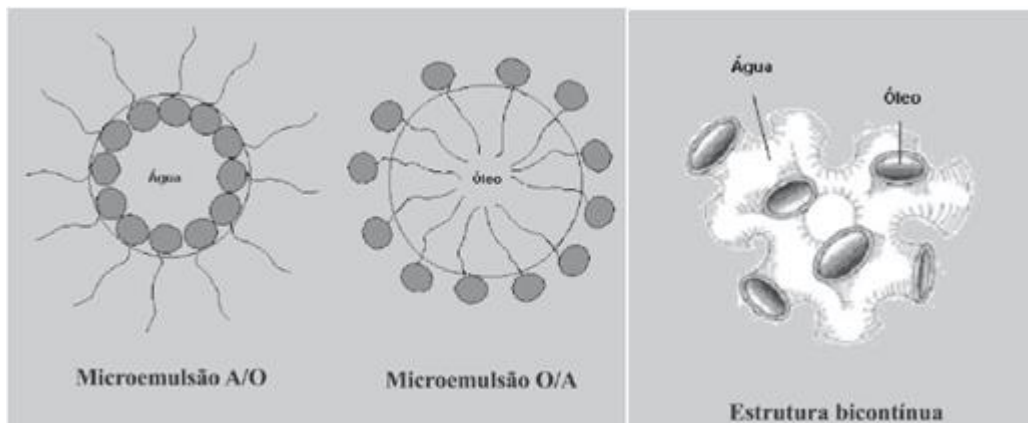
Winsor (1948) criou um sistema de classificação que define os vários equilíbrios existentes entre a microemulsão e as fases aquosa e oleosa. Foram estabelecidos quatro tipos de sistemas: 1) *Winsor I* – representado pelo equilíbrio entre a fase emulsionada com a fase oleosa em excesso, onde a emulsão posiciona-se abaixo do óleo devido a sua maior densidade. 2) *Winsor II* - Representado pelo equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso, onde a emulsão posiciona-se na porção superior a água, devido a sua menor densidade se comparada a mesma. 3) *Winsor III* – representado quando ocorrem três fases em equilíbrio, óleo, emulsão e água, onde o óleo é a fase superior, a emulsão a fase intermediária e a água, a fase inferior, sendo essa localização reflexo da densidade dos componentes em questão. 4) *Winsor IV*- representado por um sistema no qual ocorre apenas a fase de microemulsão, ou seja, um sistema visualmente monofásico (SANTOS, 2010; LI; KUNIEDA, 2003; FORMARIZ et al., 2005).

O sistema *Winsor IV* (sistema de MEs) pode apresentar-se de diferentes formas estruturais, sendo isto dependente da composição química e da quantidade dos componentes do sistema (Figura 8). As MEs podem ser do tipo água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas. Nas MEs do tipo A/O, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico. Contrariamente, nas ME do tipo O/A, o

componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico, sendo que ambas microestruturas são suscetíveis a inversão (de A/O para O/A ou vice-versa) caso ocorra variações nas condições de emulsificação. Já a estrutura bicontínua é caracterizada por seus componentes hidrofílicos e lipofílicos formarem canais adjacentes alongados, como uma rede de tubos aquosos em matriz oleosa ou rede de tubos oleosos em matriz aquosa e contendo volumes relativos aproximadamente iguais entre a fase aquosa e oleosa (FORMARIZ et al., 2005).

Cabe ressaltar ainda que as moléculas tensoativas encontram-se organizadas de modo que suas cabeças polares estejam voltadas para o meio aquoso e suas caudas hidrofóbicas para o meio oleoso. Além disso, as propriedades químicas desses componentes influenciam diretamente na microestrutura dos sistemas microemulsionados, sendo que tensoativos mais hidrofóbicos propiciam a formação de MEs do tipo A/O e os mais hidrofílicos, MEs do tipo O/A (FANUN, 2012).

Figura 8 - Estrutura das MEs.



Fonte: FORMARIZ et al., 2005.

O desenvolvimento de novas formulações para o carreamento de fármacos, em particular as MEs, tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, devido à sua estabilidade termodinâmica, solubilidade potencialmente elevada, biocompatibilidade e alta capacidade para melhorar a biodisponibilidade de drogas (FORMARIZ et al., 2010). Estes agregados têm domínios hidrofílicos e lipofílicos distintos, permitindo a dissolução de drogas solúveis e insolúveis em água. A princípio, as MEs podem ser utilizadas para entregar drogas aos pacientes através de várias rotas, mas a aplicação tópica de MEs ganha cada vez mais interesse (GE et al., 2014).

Como um sistema de liberação dérmico promissor, as MEs podem aumentar a permeação e retenção da droga na pele. Três mecanismos principais têm sido propostos para explicar suas vantagens. Em primeiro lugar, o potencial de alta solubilidade para drogas hidro, lipo e anfífilas em sistemas de MEs. Em segundo lugar, os tensoativos das MEs que atuam como promotores de permeação podem desestabilizar a estrutura do EC e aumentar a permeação de fármaco através da pele. Em terceiro lugar, a taxa de permeação da droga em ME pode ser aumentada, uma vez que a afinidade de um fármaco para a fase interna na ME pode ser facilmente modificado para favorecer o particionamento da micela (OKUR et al., 2011; BUTANI et al., 2014).

Sendo assim, as MEs são bastante interessantes para o âmbito farmacêutico, inclusive para a utilização tópica, já que possivelmente melhora ação de fármacos convencionais, que apresentam limitações nas suas propriedades farmacocinéticas, biológicas, dentre outras, como a PTX.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Componentes da Formulação

Para selecionar os componentes a serem utilizados na constituição das formulações, utilizou-se a revisão da literatura para escolher componentes que fossem largamente adotados na área farmacêutica e cosmética, apresentando características tais como não-irritação, difícil oxidação e utilização em sistemas tópicos.

4.2 Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT)

O preparo e o aperfeiçoamento das formulações foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Com o propósito de conseguir as proporções ideais dos componentes que constituiriam a área correspondente a sistemas transparentes e/ou translúcidos, os DFPTs foram obtidos por meio do método de titulação da fase aquosa à temperatura ambiente (25 °C), com imediata averiguação visual do resultado da mistura dos componentes (CHEN et al, 2004). Quatro DFPT foram construídos mediante a preparação de misturas iniciais de tensoativos nas proporções 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. A fase oleosa foi acrescentada a essa mistura nas proporções que variaram de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, respectivamente. A fase aquosa foi titulada por meio de uma pipeta automática em cada uma das proporções obtidas entre óleo e tensoativos. Posteriormente a cada titulação, a homogeneização foi realizada em um desruptor de células ultrassônico (Unique, Brasil) por 1,5 minutos na potência de 250 Watts, seguido de retirada de possíveis bolhas em banho de ultrassom (Unique, Brasil) por 1 minuto e um período de repouso de 2 minutos antes da observação final do seu respectivo aspecto.

Após o período de equilíbrio, todas as alterações no aspecto visual das misturas foram analisadas contra um fundo escuro e classificadas em: sistema transparente (ST), sistema semissólido opaco (SSSO), sistema semissólido leitoso (SSSL), sistema líquido opaco (SLO), sistema líquido leitoso (SLL) e separação de fases (SF). Os resultados obtidos foram plotados em um triângulo equilátero com o auxílio do *software* Origin Pro[®] 8.0, no qual cada ponto da superfície corresponde à proporção definida dos componentes da mistura.

4.3 Seleção da formulação e Incorporação da Pentoxifilina

Com a construção do DFPT, analisaram-se as regiões correspondentes a formação dos sistemas transparentes e, posteriormente, selecionaram-se as proporções dos componentes que iriam compor o sistema carreador, acarretando na escolha da formulação a ser testada. Esta foi preparada através de 3 ciclos de homogeneização ultrassônica por 1,5 minuto, com imediata retirada de excesso de possíveis bolhas de ar em banho de ultrassom por 1 minuto.

O fármaco PTX, por possuir características predominantemente hidrofílicas, foi dissolvido na fase aquosa antes da adição dos outros componentes e sua concentração final em cada formulação foi de 1% (m/m). Todas as formulações foram preparadas 48 horas antes da realização dos testes de caracterização físico-química para que permitisse a sua estabilização termodinâmica em temperatura ambiente (SILVA et al., 2010).

4.4 Caracterização Físico-Química

4.4.1 pH

O pH da formulação escolhida foi determinado através de um pHmetro digital (Tecnozon, Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. As medidas foram realizadas em triplicata, imergindo o eletrodo diretamente em diluições aquosas na proporção de 1:10.

4.4.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica das formulações foi medida utilizando o condutivímetro digital (Tecnozon, Brasil), previamente calibrado com solução padrão $146,9 \mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura de 25 °C e as medidas foram feitas submergindo a célula de platina do condutivímetro diretamente na amostra. Os resultados foram expressos como a média e o desvio padrão em triplicata.

4.4.3 Índice de Refração

O índice de refração (IR) foi determinado utilizando-se Refratômetro de Abbé, Carl Zeiss-Jena (Biobrix, Brasil), aferido com água destilada (índice de refração 1,3325) à

temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. O experimento foi realizado em triplicata. A refringência de cada amostra foi medida conforme a escala interna do equipamento.

4.5 Atividade anti-inflamatória de ME-PTX utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina

4.5.1 Animais

Utilizaram-se ratos Wistar (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) machos, com idade entre 3 e 5 meses, pesando entre 200-250 g, sendo estes fornecidos pelo Biotério Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBIOTEC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus* de João Pessoa. Os animais foram mantidos a temperatura de 22 ± 3 °C, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração Purina® tipo *pellets* e com livre acesso à água. O referido estudo foi realizado mediante aprovação prévia, por escrito, da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB (Anexo A).

4.5.2 Indução do edema de pata por carragenina

O teste de edema de pata, além de ser um modelo de fácil manipulação, também é efetivo para testar substâncias com potencial anti-inflamatório. Os animais a serem submetidos ao teste foram mantidos em jejum, embora com livre acesso à água, por um período de 24 horas e posteriormente receberam uma injeção subplantar de 100 µL de uma suspensão de carragenina a 1% (p/v) (WINTER, 1962). O volume (mL) atingido pela pata foi medido por meio de um hidropletismômetro imediatamente antes da injeção subplantar e em 1, 2, 3 e 4 horas após este procedimento.

4.5.3 Tratamentos

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n= 7), onde receberam os seguintes tratamentos: solução de PTX na concentração de 36 mg.kg^{-1} , solução de PTX na concentração de 72 mg.kg^{-1} , PTX incorporada na ME na concentração de 36 mg.kg^{-1} , PTX incorporada na ME na concentração de 72 mg.kg^{-1} , ME sem fármaco incorporado e o último grupo não recebeu tratamento (controle negativo). Todos os grupos foram tratados 30 minutos

antes da administração da suspensão de carragenina, exceto o grupo que recebeu apenas a injeção do agente inflamatório. Os grupos relativos ao referido fármaco foram tratados via intraperitoneal com solução de PTX (ABDEL-SALAM et al., 2003) e os grupos tratados com a ME branca e a ME-PTX receberam seus respectivos tratamentos por via tópica.

O resultado foi dado como aumento do volume (mL) em função do tempo (t), sendo o volume calculado como a variação do volume da pata no tempo t quando comparado ao valor obtido antes da injeção do agente inflamatório (SADEGHI et al., 2011). Além disso, o percentual de inibição do edema (OLAJIDE et al., 1999) induzido pela carragenina foi calculado em cada hora do ensaio utilizando a Equação 1:

$$\text{Percentual de inibição(\%)} = \frac{(C_t - C_o)_{\text{controle}} - (C_t - C_o)_{\text{tratado}}}{(C_t - C_o)_{\text{controle}}} \quad (1)$$

Sendo C_t , o volume da pata em x horas após a injeção de carragenina e C_o , o volume da pata antes da injeção de carragenina.

4.5.4 Cálculo da Dose

A dose a ser administrada nos ratos por via tópica foi calculada baseada no peso corporal dos animais em concordância com a razão da área de superfície corporal. A partir disto, para um rato de 200 g esta razão corresponde a 5, e, para um homem de 70 Kg, corresponde a 56 (GHOSH, 2005). Para converter a dose oral para uma dose tópica/transdérmica em um rato, a dose humana foi utilizada. A dose oral de PTX indicada para o tratamento de várias doenças varia entre 400 – 1200 mg/dia. Contudo, as doses mais utilizadas são as de 400 e 800 mg/dia. Sendo assim, estas foram as selecionadas para servirem de base na conversão.

A dose oral para ratos (mg/Kg) foi calculada com base na Equação 2 (ABOOD et al., 2013):

$$\text{Dose oral para rato} = \text{Dose oral humana} \times \frac{5}{56} \quad (2)$$

Considerando a baixa biodisponibilidade oral da PTX (20-30%), a dose tópica/transdérmica para este fármaco em ratos foi calculada utilizando a Equação 3 (ABOOD et al., 2013):

$$Dose\ para\ aplicação\ tópica = Dose\ oral\ para\ ratos \times \frac{Biodisponibilidade\ oral\ do\ fármaco}{100}$$

(3)

4.5.6 Análise Histológica

Após a última medida das patas, os animais foram devidamente eutanasiados segundo a metodologia proposta para roedores e outros pequenos mamíferos contida na Resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012. Amostras de pele de patas de cada grupo (n=3) foram retiradas, sendo estes fragmentos fixados por imersão em uma solução de formaldeído (10%) por 12 horas. Posteriormente, os tecidos fixados foram desidratados em séries crescentes de etanol, tratados com xilol e embebidos em parafina. Secções de 4-5 µm foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise sob microscopia óptica (SADEGHI et al., 2013).

4.5.7 Análise Estatística do Estudo *in vivo*

Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey-Kramer, com nível de significância mínimo considerado de 0,05 (p < 0,05). Os resultados obtidos foram plotados no programa GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos Componentes

A utilização de MEs para aplicação farmacêutica requer a seleção de componentes adequados à via de administração. Assim, essa escolha deve ser bastante criteriosa e deve atender alguns requisitos como não-toxicidade, não-irritabilidade, capacidade de formar o sistema desejado, bem como a capacidade de solubilização do fármaco a ser incorporado no sistema (FORMARIZ et al., 2005).

Misturas binárias de agentes tensoativos convencionais têm sido estudadas, tendo em vista que quando diferentes tipos de surfactantes são misturados, ocorre um equilíbrio complexo do resultado de forças diferentes na formação de micelas (KABIR-UD-DIN et al., 2011).

Nesse contexto, destacam-se os tensoativos não-iônicos, que são tipicamente mais hidrofóbicos do que os tensoativos iônicos e não se dissociam em íons (FRANGE; GARCIA, 2009). Assim, são menos sensíveis a precipitação na presença de altas concentrações de eletrólitos ou de cátions polivalentes. Geralmente são mais específicos, podendo ser usados em conjunto com outros surfactantes (ESTEPHAN, 2012).

Essa classe de tensoativos constitui um grupo que apresenta baixa toxicidade, menores problemas de compatibilidade com outros materiais, menor sensibilidade a mudanças de pH e força iônica e ainda contornam problemas de toxicidade, tendo uma melhor tolerância dérmica (LEITE-SILVA et al., 2013). Dessa forma, são mais aceitáveis em formulações microemulsionadas para aplicações farmacêuticas (FORMARIZ et al., 2005). Assim, para reduzir a tensão interfacial do sistema, foram selecionados os tensoativos não-iônicos Tween[®] 80 e o Brij[®] 52.

Como fase oleosa, utilizou-se o óleo sintético Triglicérides do Ácido Cáprico e Caprílico (TACC). Estes são classificados como triglicérides de cadeia média, sendo úteis como fonte nutricional, solvente, meio estabilizador de administração oral, tópica ou produtos parenterais, devido a características como baixa viscosidade, grande miscibilidade e solubilidade, compatibilidade com a pele, não é facilmente oxidado e tem uma boa espalhabilidade. Eles podem ser utilizados para o tratamento, bem como a prevenção de dermatite amoniacal e úlceras de pressão, formando uma barreira protetora sobre a pele e impedindo maceração, além de ser importante nos processos de inflamação celular,

proporcionando alívio após a primeira aplicação e aumentando a nutrição celular local, além a ter uma grande capacidade de regeneração de tecidos (FERREIRA et al., 2012).

Nessa perspectiva, para compor as formulações a serem produzidas, caracterizadas e testadas neste estudo, foram selecionados os tensoativos não-iônicos Tween[®] 80 e o Brij[®] 52, o óleo TACC como fase oleosa e Água deionizada como fase aquosa.

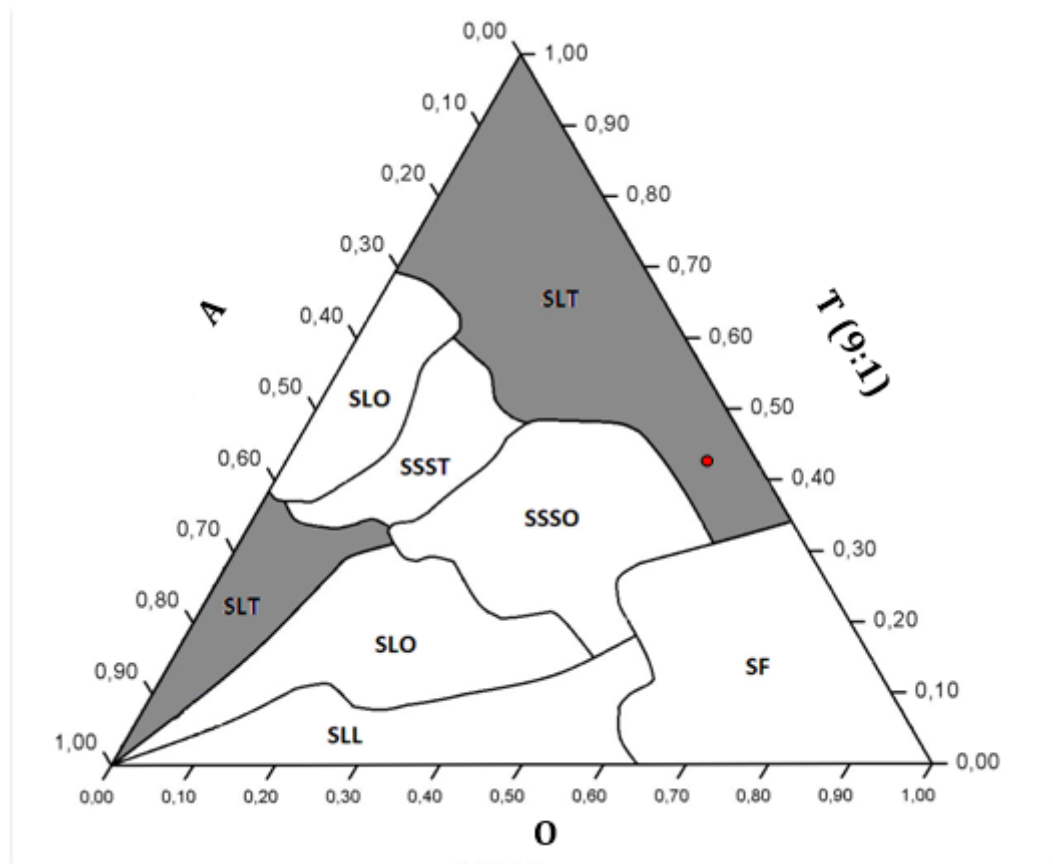
5.2. Diagrama de Fases Pseudoternário

A construção do DFPT é uma ferramenta ideal para caracterizar o domínio das regiões de ME, e a partir disso, escolher a formulação mais apropriada para o fármaco ser incorporado (DAMASCENO et al., 2011).

Os DFPTs são geralmente construídos em duas dimensões a partir de dados obtidos pela preparação de um amplo número de amostras de diferentes composições ou por titulação, a fase aquosa é adicionada, titulando com a mistura de óleo e emulsificante até a isotropia. Esta juntamente com a homogeneidade do sistema multi-componente é determinada visualmente (SCHMIDTS et al., 2009). A importância da construção deste tipo de ferramenta é determinar a área microemulsionada e assim obter MEs mais facilmente, tendo em vista que as proporções adequadas já podem ser escolhidas previamente, sendo mais viável do ponto de vista econômico (BERA et al., 2014).

Abaixo, está representado o DFPT obtido na proporção 9:1 para a mistura de tensoativos (Figura 9), sendo esta proporção escolhida, tendo em vista que entre os diagramas obtidos, este apresentou uma maior área de sistema límpido transparente, indicativo de ME (Área Hachurada). A partir da construção do mesmo, foi selecionado um ponto para a caracterização físico-química e ensaio biológico.

Figura 9 - Diagrama de Fases Pseudoternário obtido



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: Separação de Fases (SF), SLL (Sistema Líquido Leitoso), SLO (Sistema Líquido Opaco), SSSO (Sistema Semi-sólido Opaco), SSST (Sistema Semi-Sólido Transparente) e SLT (Sistema Límpido Transparente), Ponto Vermelho (Formulação 1).

5.3. Seleção da Formulação

Após a obtenção do DFPT, foi selecionado um ponto da região SLT, sendo seus respectivos percentuais de composição indicados na Tabela 1. A escolha adequada e as concentrações desses componentes tornam-se extremamente importantes para a orientação desses sistemas (FORMARIZ et al., 2005).

A formulação selecionada foi composta por 5% de água, 51% de óleo e 44% da mistura de tensoativos. A região dos SLT escolhida para a seleção do ponto localizou-se mais à direita do diagrama, sendo justificado pelo fato de que esta região, pelas proporções dos componentes da formulação, possui características que possivelmente propiciam a formação

de microemulsões do tipo A/O, ideal para a incorporação do fármaco PTX, por este possuir propriedades predominantemente hidrofílicas.

Tabela 1 - Composição percentual (m/m) da formulação selecionada.

Componentes	Composição Percentual (%)
	Formulação 1
Fase Aquosa	5,0
Fase Oleosa	51,0
Tween [®] 80 /Brij [®] 52 (9:1)	44,0

Fonte: Dados da Pesquisa.

5.4. Caracterização Físico-Química

Na tabela abaixo, encontram-se os valores referentes a condutividade, índice de refração e pH das MEs.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das formulações obtidas.

Microemulsões	pH	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Índice de Refração
ME ₁ -Branca	7,79 ± 0,07	2,19 ± 0,11	1,452 ± 0,001
ME ₁ -PTX	7,80 ± 0,01	1,79 ± 0,15	1,453 ± 0,001

Fonte: Dados da Pesquisa

O potencial hidrogeniônico (pH) é um dos parâmetros utilizados na caracterização físico-química na área farmacêutica, tendo em vista que cada região corporal tem um pH definido e sua manutenção é importante para a homeostase do organismo. Assim, a determinação e o controle do pH cutâneo, sob o ponto de vista cosmético e/ou dermatológico, são de extrema utilidade para evitar o uso de produtos tópicos inadequados (LEONARDI et al., 2002).

De forma geral, o pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância biológica para produtos

cutâneos (5,5 a 8,0) (SILVA et al., 2009). O valor de pH encontrado para a ME₁-branca foi de $7,79 \pm 0,07$, enquanto a ME₁-PTX obteve valor de $7,80 \pm 0,01$ (Tabela 2). Assim, ambos os valores de pH são biologicamente adequados para a pele. Além disso, a incorporação da PTX não alterou significativamente o pH das formulações.

A condutividade elétrica se mostra como um parâmetro muito sensível quanto à determinação das transições de fase em microemulsões, sendo a alteração na condutividade elétrica desses nanossistemas geralmente correlacionada com a alteração da sua microestrutura, gerada por drásticas mudanças nos mecanismos de transporte elétrico no material (ARAÚJO, 2009). Desse modo, a condutividade é uma propriedade frequentemente utilizada para investigar a estrutura das microemulsões, bem como alterações na mesma (MO; LI, 2007; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2011).

O valor de condutividade elétrica encontrado para a ME₁-branca foi de $2,19 \pm 0,11 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e para a ME₁-PTX obteve-se valor de $1,79 \pm 0,15 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Tabela 2). A condutividade elétrica aumenta substancialmente com o aumento da fração de volume da fase aquosa. Assim, uma quantidade pequena de água, provavelmente forma uma microestrutura do tipo A/O, com a fase oleosa contínua, resultando em uma baixa condutividade no sistema (GE et al., 2014). Caso contrário, ME com altas condutividades, sugerem um sistema O/A, ou seja, gotículas de óleo dispersas em uma fase aquosa contínua (SAHOO et al., 2014). Desse modo, os valores de condutividade obtidos corroboram com o fato de o sistema microemulsionado utilizado nesse estudo ser A/O.

As MEs apresentam-se como sistemas isotrópicos. No entanto, durante o processo de inversão de fases os agregados se tornam anisotrópicos, ou seja, apresentam dupla refração descrita pela variação do índice de refração do meio como função da direção de propagação da luz, ou seja, a birrefringência. Dessa forma, podemos relacionar a existência de birrefringência na amostra com a presença de uma fase bicontínua que antecede uma inversão de fase em microemulsões (ARAÚJO, 2009).

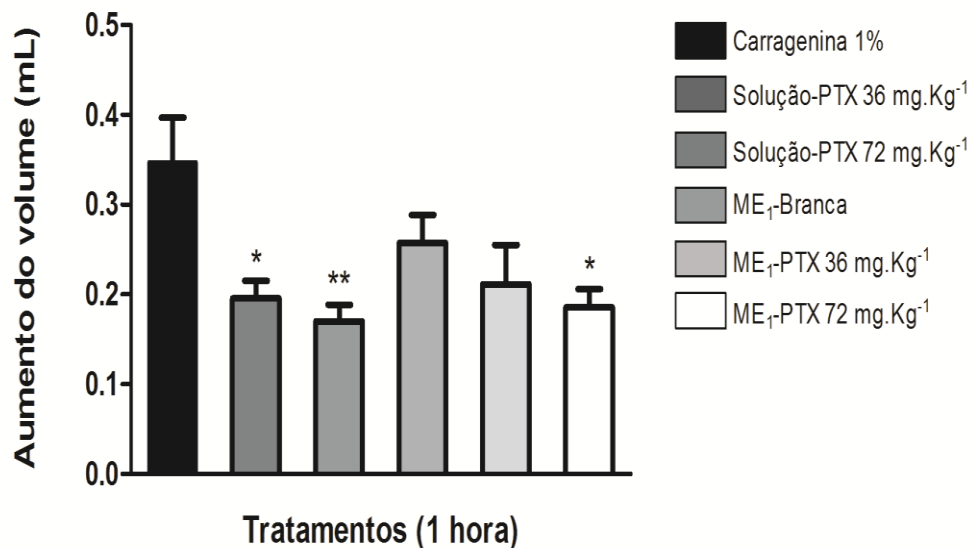
Os valores do IR encontrados para a ME₁-branca e a ME₁-PTX foram considerados como constantes e únicos, mantendo-se aproximados, $1,452 \pm 0,001$ para a branca e $1,453 \pm 0,001$ para a ME₁-PTX (Tabela 2). Assim, o IR das formulações não se alterou com a incorporação do fármaco, apresentando-se límpidas e transparentes (SAHOO et al., 2014).

5.5. Atividade Anti-inflamatória da PTX

5.5.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é muito utilizado para testar a atividade anti-inflamatória de diversos fármacos, inclusive a PTX. Abdel-Salam et al. (2003) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios da PTX em modelo de edema de pata induzido por carragenina. Para isso, utilizou as concentrações 36 e 72 mg.kg⁻¹ de solução de PTX, sendo estas correspondentes as concentrações presentes nas foras farmacêuticas disponíveis no mercado (400 e 800 mg, respectivamente). Dessa forma, o experimento foi reproduzido objetivando-se comparar o efeito anti-inflamatório da solução de PTX (nas concentrações supracitadas), ou seja, do fármaco livre e da PTX encapsulada em ME.

Figura 10 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após uma hora de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: Os resultados estão demonstrados como média ± desvio padrão de 7 animais por grupo. (*) - p< 0,05 (**) – p< 0,01 (***) – p< 0,001.

Na primeira hora após a indução do edema (Figura 10), o grupo que recebeu apenas a carragenina obteve um aumento do volume da pata de 0,35 ± 0,13 mL. O grupo que recebeu o

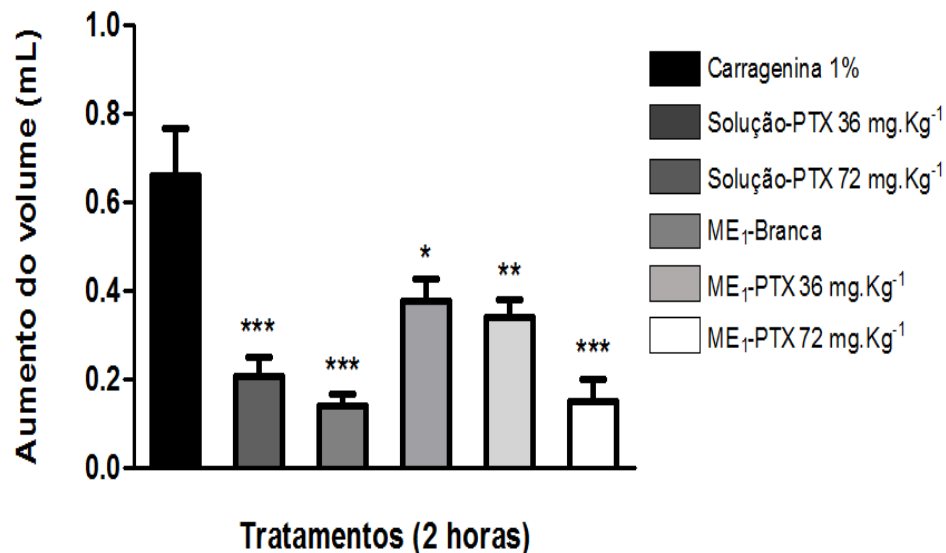
tratamento com a solução de PTX na concentração de 36 mg.kg^{-1} obteve uma diminuição do edema em 42,85% (correspondente a um volume de pata de $0,20 \pm 0,05 \text{ mL}$), enquanto o grupo que recebeu a solução de PTX da concentração de 72 mg.kg^{-1} obteve uma redução do edema em 51,42% (Tabela 3), explicado pela maior concentração do fármaco disponível no local de ação. Observa-se que o tratamento com solução de PTX em 36 mg.kg^{-1} propiciou uma redução no edema significativa, diferindo do que foi observado por Abdel-Salam et al. (2003), onde essa dose não apresentou redução significativa do edema nesta etapa do experimento. Já a concentração de 72 mg.kg^{-1} obteve um resultado correspondente ao observado no referido estudo, tendo em vista que obteve uma atividade significativa na diminuição no edema.

A ME branca não apresentou atividade significativa, bem como a ME com a PTX incorporada na concentração de 36 mg.kg^{-1} . Esse último resultado pode ser explicado pelo fato de que o fármaco está encapsulado em um nanocarreador, sendo portanto, liberado gradativamente e de modo mais lento, se comparado com o fármaco livre. A acumulação e o efeito do fármaco nas camadas mais profundas da pele são ligeiramente adiados para a droga nanoencapsulada em comparação à droga livre após períodos de incubação mais curtos. Após períodos de incubação mais longos, o transporte do fármaco é aprimorado para o fármaco nanoencapsulado em comparação com o fármaco livre (GUTERRES et al., 2007).

A ME com a PTX incorporada na concentração de 72 mg.kg^{-1} apresentou uma redução do edema em 45,71% (correspondente a um volume de pata de $0,19 \pm 0,05 \text{ mL}$), podendo isto ser explicado pela maior concentração do fármaco na formulação. Observa-se que a inibição do edema de pata nos grupos tratados com a PTX nessa concentração foi maior no grupo tratado com o fármaco nanoencapsulado, se comparado com o fármaco livre, destacando assim uma maior efetividade do sistema microemulsionado.

Na Figura 11, observam-se os resultados obtidos pelos grupos com seus respectivos tratamentos após duas horas do edema induzido por carragenina. O grupo que recebeu apenas a carragenina para a indução do edema apresentou um volume da pata de $0,66 \pm 0,28$. O grupo que recebeu o tratamento com a solução de PTX na concentração de 36 kg.mg^{-1} obteve uma redução do edema de 68,14% (correspondente a um volume de $0,21 \pm 0,12 \text{ mL}$). Já o grupo que recebeu o tratamento com a solução de PTX na concentração de 72 kg.mg^{-1} obteve uma redução do edema de 78,78% (correspondente a um volume de $0,14 \pm 0,07 \text{ mL}$). Esse comportamento corrobora os dados obtidos por Abdel-Salam et al. (2003), sendo que a inibição encontrada neste estudo foi ainda maior, se comparado aos resultados do mesmo (18,9% - 17,4%).

Figura 11 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após duas horas de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: Os resultados estão demonstrados como média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. (*) - $p < 0,05$ (**) - $p < 0,01$ (***) - $p < 0,001$.

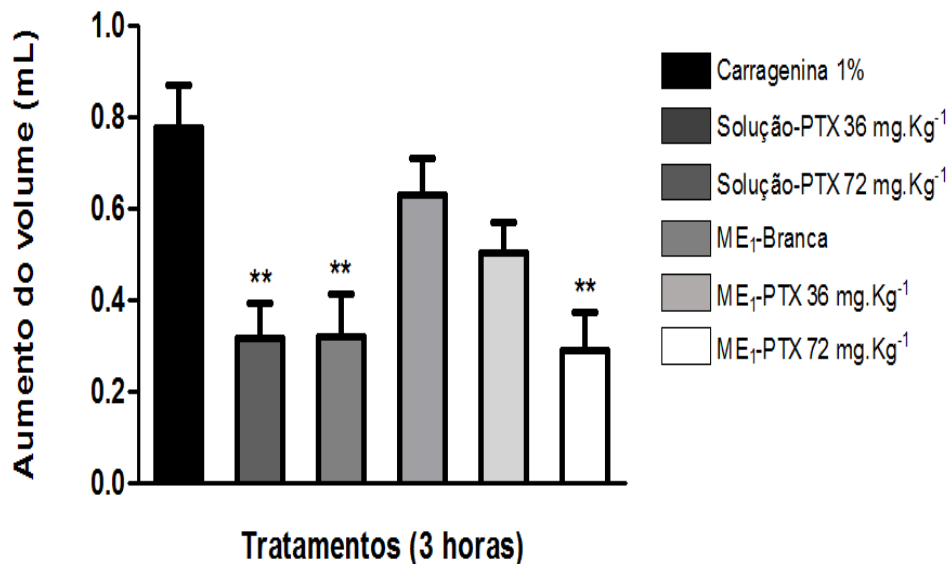
O grupo tratado com a ME branca obteve uma redução significativa no volume do edema, correspondendo a uma diminuição em 42,42% (correspondendo a um volume de pata de $0,38 \pm 0,14$). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que um dos componentes utilizados para compor o sistema microemulsionado, o óleo TACC, apresenta atividade antiedematogênica, já descrita na literatura (NABAS, 2009). Além disso, estudos com o referido óleo relatam sua atividade anti-inflamatória, já que o mesmo inibe a produção de IL-8 em monócitos THP1 e interrompe a transdução de sinais através da via NF-kB, uma importante via de propagação de sinais anti-inflamatórios (HUANG et al., 2014). Outros estudos relatam ainda sua ação anti-inflamatória em infecções bacterianas cutâneas (SKRIVANOVÁ et al., 2008; SKRIVANOVÁ; MAROUNEK, 2006). Assim, a formulação atua de modo sinérgico com o referido fármaco incorporado.

O grupo tratado com a ME-PTX na concentração de 36 mg.kg⁻¹ obteve uma redução do volume do edema em 48,48%, enquanto o grupo tratado com a ME com a PTX

incorporada na concentração de 72 kg. mg^{-1} obteve uma redução do volume do edema em 77, 27% (correspondente a um volume de pata de $0,34 \pm 0,11$ e $0,15 \pm 0,13$, respectivamente). Assim, a ME-PTX (36 kg. mg^{-1}) que não havia apresentado atividade anti-inflamatória na primeira hora após a indução do edema, passa a apresentar atividade após duas horas, e a ME-PTX (72 kg. mg^{-1}) aumenta significativamente a inibição do edema nesta etapa do experimento.

A Figura 12 exhibe os resultados obtidos nos respectivos grupos de animais 3 horas após a indução do edema por carragenina. O volume da pata apresentado pelo grupo que recebeu apenas a carragenina foi de $0,78 \pm 0,25$ (Tabela 3). O grupo tratado com a solução de PTX na concentração de 36 kg.mg^{-1} obteve uma redução do edema em 58, 97% e o grupo tratado com a solução de PTX na concentração de 72 kg.mg^{-1} obteve uma redução do edema em 58,97%, em concordância, mais uma vez, com os resultados obtidos por Abdel-Salam et al. (2003), onde as duas referidas doses apresentaram atividade antiedematogênica significativa.

Figura 12 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após três horas de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Dados da Pesquisa.

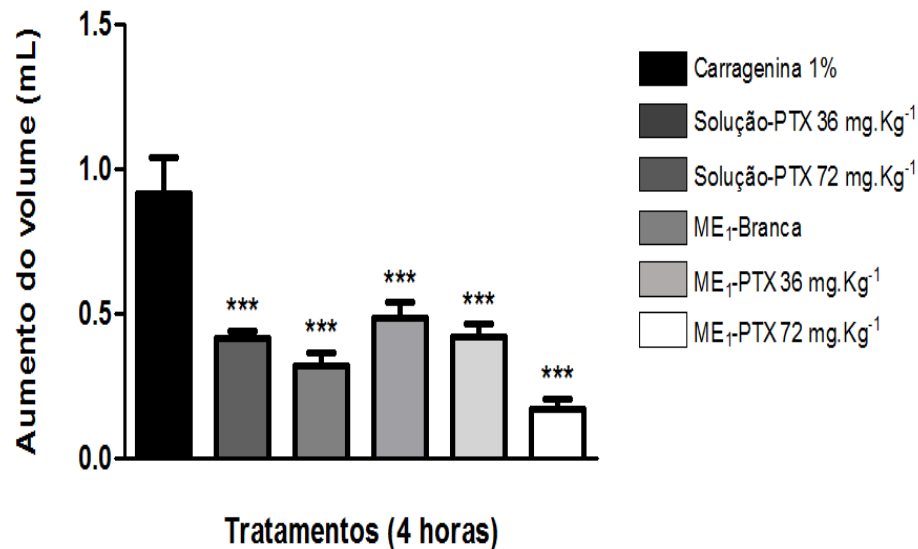
Legenda: Os resultados estão demonstrados como média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. (*) - $p < 0,05$ (**) - $p < 0,01$ (***) - $p < 0,001$.

Os grupos tratados com a ME-branca e a ME-PTX (36 mg. kg^{-1}) não obtiveram atividade anti-inflamatória significativa após três horas da indução do edema. Tal evento pode ser justificado por um menor crescimento do edema de pata induzido por carragenina, se comparado proporcionalmente com as etapas anteriores. Nota-se, de modo semelhante, uma diminuição do perfil de inibição do edema das soluções de PTX nas duas concentrações, se comparado à inibição propiciada por estes tratamentos nas etapas anteriores do experimento. Assim, embora não tenha sido uma inibição significativa estatisticamente, não se pode afirmar que as referidas formulações (ME-branca e a ME-PTX/ 36 mg. kg^{-1}) não apresentaram atividade anti-inflamatória.

Já o grupo que recebeu o tratamento com o fármaco na concentração de 72 mg. kg^{-1} incorporado ao sistema microemulsionado obteve uma redução no edema da pata em 62, 82% (correspondente a um volume de $0,29 \pm 0,22$), diminuição esta menor que etapa anterior do experimento, podendo ser reflexo da redução proporcional do crescimento do edema no grupo controle positivo.

A Figura 13 mostra os resultados obtidos após a quarta hora da indução do edema. O grupo de animais que recebeu apenas a carragenina obteve um volume de pata de $0,92 \pm 0,32$. O grupo que foi tratado com a solução de PTX na concentração de 36 mg. kg^{-1} apresentou uma redução no edema de pata em 55, 43%, enquanto que grupo que foi tratado com a solução de PTX na concentração de 72 mg. kg^{-1} apresentou uma redução no edema de pata em 65,21% (que corresponde a um volume de $0,41 \pm 0,07$ e $0,32 \pm 0,11$, respectivamente). Esses valores continuam corroborando os resultados do estudo realizado por Abdel-Salam et al. (2003), onde também foi constatado uma diminuição significativa do edema nesta etapa do experimento para as duas doses supracitadas.

Figura 13 - Efeito anti-inflamatório da PTX nos diferentes grupos experimentais após quatro horas de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: Os resultados estão demonstrados como média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. (*) - $p < 0,05$ (**) - $p < 0,01$ (***) - $p < 0,001$.

O grupo tratado com a ME-branca obteve uma redução de 47,82% no edema da pata (correspondente a um volume de $0,48 \pm 0,15$), sendo isso atribuído as propriedades antiedematogênica do TACC já citadas. Já o grupo tratado com a PTX incorporada ao sistema microemulsionado na concentração de 36 mg. kg^{-1} apresentou uma diminuição de 54,34% do edema (o correspondente a um volume de $0,42 \pm 0,11$), enquanto que o grupo tratado com a PTX incorporada ao sistema microemulsionado na concentração de 72 mg. kg^{-1} apresentou uma diminuição de 81,52 % do edema (o correspondente a um volume de $0,17 \pm 0,09$).

Esses resultados demonstraram que a PTX quando incorporada ao sistema microemulsionado foi eficaz na redução do edema, apresentando um desempenho (confirmado em percentual) semelhante ao fármaco em solução, se compararmos às concentrações de 36 mg. kg^{-1} e 72 mg. kg^{-1} livres. Salienta-se ainda que os componentes do sistema microemulsionado atuam de modo sinérgico para a atividade anti-inflamatória do referido fármaco.

A tabela abaixo sumariza os percentuais obtidos durante o experimento de avaliação da atividade anti-inflamatória da PTX (em solução e em sistema microemulsionado) em modelo de edema de pata induzido por carragenina.

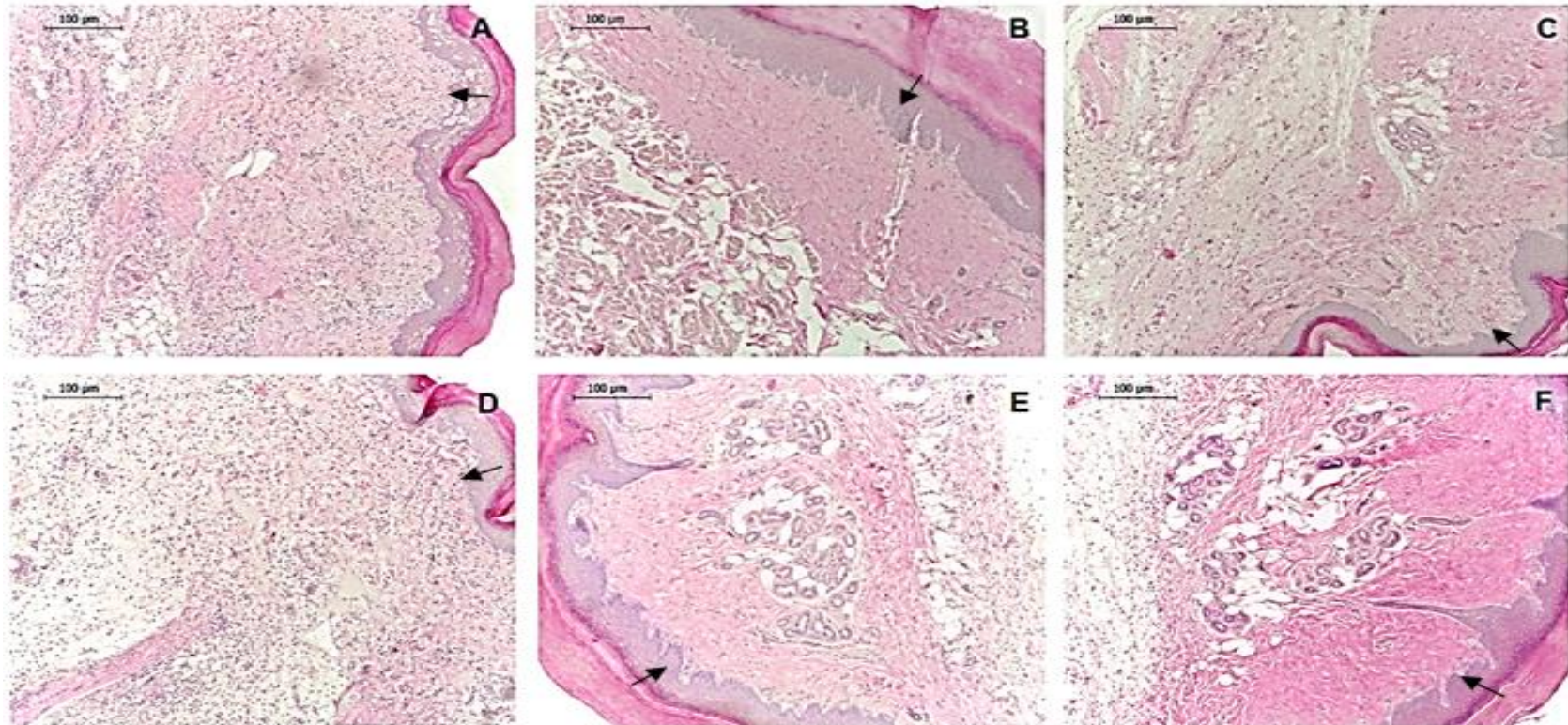
Tabela 3 - Percentual de inibição do edema na pata dos grupos experimentais.

Horas após a indução do edema	Percentual de inibição do edema na pata dos grupos experimentais				
	Grupo Sol-PTX (36 mg. kg ⁻¹)	Grupo Sol-PTX (72 mg. kg ⁻¹)	ME-Branca	ME-PTX (36 mg. kg ⁻¹)	ME-PTX (72 mg. kg ⁻¹)
1h	42,85%	51,42%	Não significativo	Não significativo	45,71%
2h	68,18%	78,78%	42,42%	48,48%	77,27%
3h	58,97%	58,97%	Não significativo	Não significativo	62,82%
4h	55,43%	65,21%	47,82%	54,34%	81,52%

Fonte: Dados da Pesquisa.

5.5.2. Análise Histológica

Figura 14 - Microscopia óptica da região edematosa da pata dos animais experimentais sob aumento na objetiva de 10x.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: (A) Grupo Carragenina; (B) Grupo solução PTX-36 mg. kg⁻¹; (C) Grupo solução PTX-72 mg. kg⁻¹; (D) Grupo ME-branca; (E) Grupo ME PTX- 36 mg. kg⁻¹; (F) Grupo ME PTX-72 mg. kg⁻¹. As setas indicam a desestruturação das camadas da pele.

A análise histológica auxiliou para explorar ainda mais a eficácia da atividade anti-inflamatória da PTX incorporada ao sistema microemulsionado. Na figura 14A, observa-se que no grupo que recebeu apenas a carragenina ocorre a presença intensa do infiltrado epidérmico, ou seja, a invaginação da epiderme desorganizando a estrutura cutânea. Tal evento é característico do processo inflamatório da pele, sendo um critério analisado no âmbito histológico. Além disso, destaca-se ainda a presença de um grande infiltrado de neutrófilos, sendo estas células a primeira linha de defesa celular contra algum fator invasor exógeno (ABBAS et al., 2011).

O grupo que foi tratado com a solução de PTX na concentração de 36 mg. kg⁻¹ (Figura 14B) apresentou uma menor desestruturação cutânea e um menor número de neutrófilos recrutados, corroborando o percentual de inibição do edema superior a 42,85% propiciado pelo fármaco em solução. Quanto ao grupo tratado com a solução de PTX na concentração de 72 mg. kg⁻¹ (Figura 14C), este corrobora histologicamente o percentual de inibição do edema analisado (superior a 51, 42%) ainda maior que o grupo tratado com o fármaco na concentração de 36 mg. kg⁻¹. Observa-se que, neste grupo, além de haver um menor número de neutrófilos, existe uma maior organização das camadas da pele, sendo explicado pela maior concentração da PTX (se compararmos com a imagem 14B).

O grupo tratado com a ME branca (Figura 14D) apresentou um maior número de neutrófilos recrutados, se comparado com os grupos tratados com o fármaco em solução, embora tenha apresentado atividade anti-inflamatória em dois intervalos de tempo do experimento (Tabela 4). Isso se justifica pelo fato de que a atividade anti-inflamatória do óleo TACC, componente da formulação, é apenas um fator sinérgico, não sendo mais eficaz que o fármaco testado.

O grupo tratado com a PTX incorporada ao sistema microemulsionado na concentração de 36 mg. kg⁻¹ (Figura 14E) apresentou uma maior redução na quantidade de neutrófilos e uma maior estruturação das camadas cutâneas se comparado ao grupo que foi tratado com a solução de PTX na mesma concentração (14B), embora tenha obtido um menor percentual de inibição do edema. Assim, histologicamente, percebe-se que o sistema de ME obteve uma maior eficácia na inibição do recrutamento neutrofilico. O grupo tratado com a PTX incorporada ao sistema microemulsionado na concentração de 72 mg. kg⁻¹ (Figura 14F) apresentou, histologicamente, o menor número de neutrófilos observados, além de recuperar a organização estrutural das camadas da pele. O resultado da microscopia óptica para este grupo esta em concordância com os dados percentuais de redução do edema, tendo em vista que esse

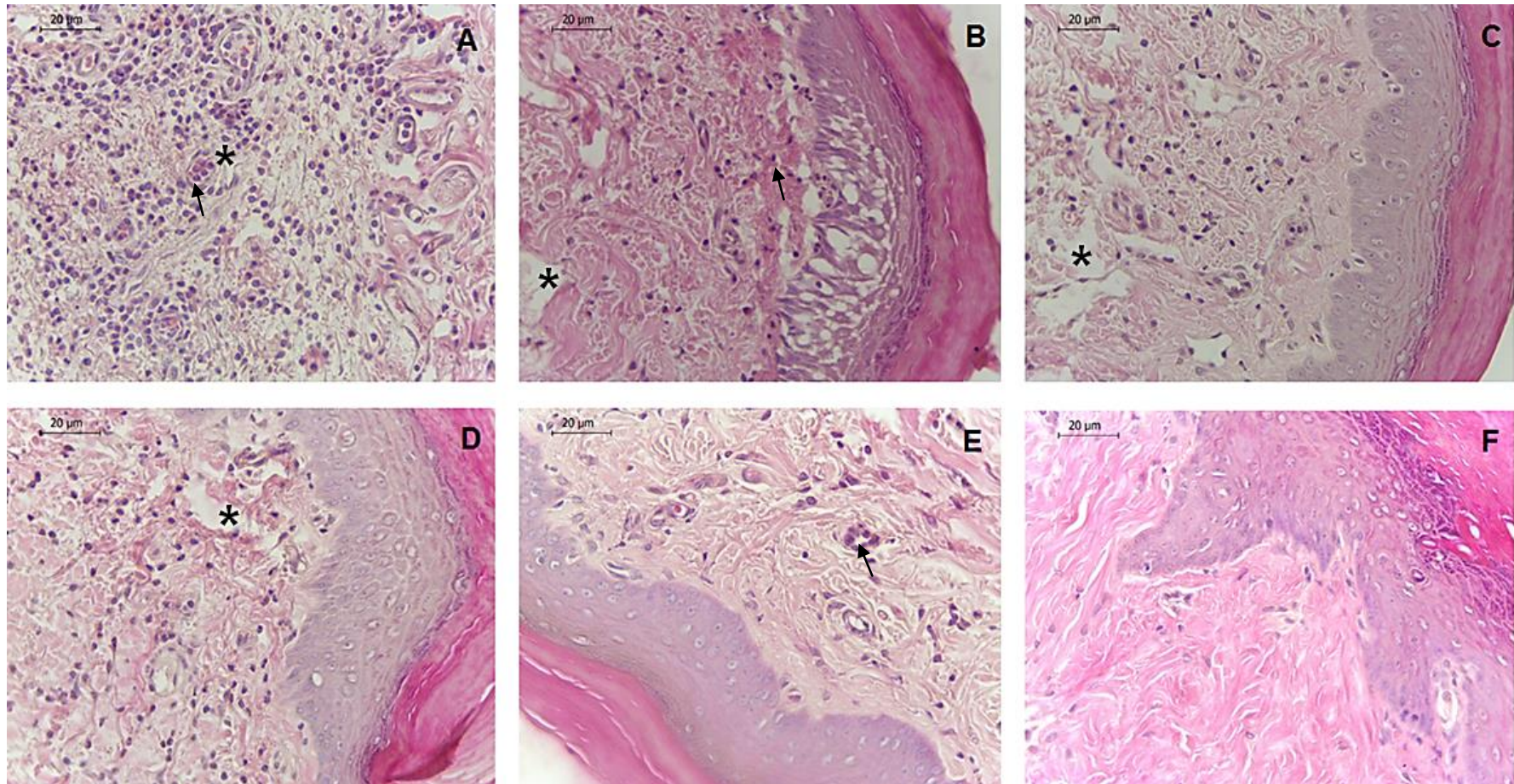
tratamento apresentou o maior percentual de inibição do mesmo, chegando a 81,52% na quarta hora após a indução do edema pela carragenina.

A Figura 15 demonstra um corte histológico da região da pata edematosa dos animais experimentais sob um aumento da objetiva de 400x. Observa-se com mais exatidão a distribuição dos neutrófilos pelo tecido seccionado. Estas células, como já referido, são a primeira linha de defesa contra uma injúria na pele.

Os neutrófilos desempenham um papel importante na imunidade inata, exercendo influência sobre uma variedade de células, quer do sistema imunitário ou de outras células, por exemplo, epiteliais ou musculares e antimicrobiana, ou seja, contra patógenos. Essa função é desempenhada devido à produção de uma ampla gama de citocinas e de mediadores inflamatórios, tais como IL-9, TNF- α , IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , entre outros (CIEPIELA et al., 2014).

Desse modo, uma menor quantidade de neutrófilos indica um menor quadro inflamatório, sendo estas células marcadores importantes nas análises histológicas. Em suma, os dados obtidos tanto no experimento do edema de pata induzido por carragenina, quanto na análise histológica dessa região edematosa indicam que a PTX é um potencial fármaco anti-inflamatório para o tratamento de patologias inflamatórias cutâneas e que o sistema microemulsionado potencializa a ação do fármaco, sendo eficaz na entrega tecidual do mesmo.

Figura 15 - Microscopia óptica da região edematosa da pata dos animais experimentais sob aumento na objetiva de 40x.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: (A) Grupo Carragenina; (B) Grupo solução PTX-36 mg. kg⁻¹; (C) Grupo solução PTX-72 mg. kg⁻¹; (D) Grupo ME-branca; (E) Grupo ME PTX- 36 mg. kg⁻¹; (F) Grupo ME PTX-72 mg. kg⁻¹. *Fenômenos de infiltrado celular ou edema local. As setas indicam os neutrófilos.

6. CONCLUSÃO

- Os componentes selecionados foram capazes de formar sistemas líquidos e transparentes, característicos de MEs;
- O DFPT mostrou ser uma ferramenta reprodutível para a obtenção de MEs, além de possibilitar a formação de prováveis sistemas A/O, ideais para a incorporação do fármaco hidrofílico;
- Os parâmetros físico-químicos encontrados mostraram-se compatíveis com a pele e indicativo de ME A/O;
- A PTX incorporada em sistema microemulsionado exerce potente atividade anti-inflamatória em longo prazo, devido à propriedade de liberação modificada do fármaco;
- A formulação desenvolvida é inovadora e pode ser um nanocarreador promissor para uso tópico da PTX.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p.
- ABDEL-SALAM, O. M. M. E.; BAIUOMY, A. R.; EL-SHENAWY, S. M.; ARBID, M. S. The anti-inflammatory effects of the fosfodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 331–340, 2003.
- ABOOD, R. M. A.; TALEGAONKAR, S.; TARIQ, M.; AHMAD, F. J. Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 143– 151, 2013.
- ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, p. 189–212, 2013.
- ARAÚJO, E. S. **Caracterização elétrica e óptica de transições de fase em colóides e microemulsões**. Juazeiro, 2009. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Bahia, 2009.
- ATANASKOVA, N.; TOMECKI, K. J. Innovative Management of Recurrent Furunculosis. **Dermatologic Clinics**, v. 28, p. 479–487, 2010.
- BERA, A.; KUMAR, T.; OJHA, K.; MANDAL, A. Screening of microemulsion properties for application in enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 121, p. 198–207, 2014.
- BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugsthrough skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156–165, 2012.
- BUFFONE, M. G.; WERTHEIMER, E. V.; VISCONTI, P. E.; KRAPP, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology, **Biochimica et Biophysica Acta** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.013>
- BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 351–358, 2014.
- CADDEO, C.; SALES, O. D.; VALENTI, D.; SAURI, A. R.; FADDA, A. M.; MANCONI, M. Inhibition of skin inflammation in mice by diclofenac in vesicular carriers: Liposomes, ethosomes and PEVs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, p.128-136, 2013.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XUB, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p. 427–436, 2004.

CIEPIELA, O.; OSTAFIN, M.; DEMKOW, U. Neutrophils in asthma—A review. **Respiratory Physiology & Neurobiology** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.004>.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carregador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DEMIR, E.; PAYDAS, S.; BALAL, M.; KURT, C.; SERTDEMIR, Y.; ERKEN, U. Effects of Pentoxifylline on the Cytokines That May Play a Role in Rejection and Resistive Index in Renal Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, Turquia, v. 38, p. 2883–2886, 2006.

DESAI, P. R.; MAREPALLY, S.; PATEL, A. R.; VOSHAVAR, C.; CHAUDHURI, A.; SINGH, M. Topical delivery of anti-TNF α siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 170, p. 51-63, 2013.

ELFERINK, J. G. R.; HUIZINGAF, T. W. J.; KOSTER, B. M. The Effect of Pentoxifylline on Human Neutrophil Migration: A Possible Role for Cyclic Nucleotides. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 475-480, 1997.

ESTEPHAN, E. C. **Microemulsão do sistema água – etanol – isoctano**. Rio de Janeiro, 2012. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FANTIN, M.; QUINTIERI, L.; KÚSZ, E.; KIS, E.; GLAVINAS, H.; FLOREANI, M.; PADRINI, R.; DUDA, E.; VIZLER, C. Pentoxifylline and its major oxidative metabolites exhibit diferente pharmacological properties. **European Journal of Pharmacology**, Hungria, v. 535, p. 301–309, 2006.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 306–313, 2012.

FERNANDES, J. L.; OLIVEIRA, R. T. D.; MAMONI, R. L.; COELHO, O. R.; NICOLAU, J. C.; BLOTTA, M. H. S. L.; SERRANO-JR, S. V. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease - A randomized placebo-controlled study. **Atherosclerosis**, v. 196, p. 434–442, 2008.

FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V.; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 3, p. 745-753, 2012.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCIA, L. A.; SCARPA, M. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; EGITO, E. S. T.; TERRUGI, C. H. B.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, p. 47–53, 2010.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V. H.V.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 28–35, 2007.

FRANGE, R.C.C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

GASPAR, K.; KUKOVA, G.; BUNEMANN, E.; BUHREN, B. A.; SONKOLY, E.; SZOLLOSI, A. G.; MULLER, A.; SAVINKO, T.; LAUERMA, A. I.; ALENIUS, H.; KEMENY, L.; DIEU-NOSJEAN, M.; STANDER, S.; FISCHER, J. W.; RUZICKA, T.; ZLOTNIK, A.; SZEGEDI, A.; HOMEY, B. The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. **Journal of Dermatological Science**, v. 71, p. 12–21, 2013.

GE, S.; LIN, Y.; LU, H.; LI, Q.; HE, J.; CHEN, B.; WU, C.; XU, Y. Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: Formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, p. 120–131, 2014.

GHOSH, M.N. **Fundamentals of Experimental pharmacology**. Hilton and company, Kolkata, India, 2005 (Chapter 30).

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.1152–1161, 2007.

GRAGNANI, A.; CEZILLO, M. V. B.; SILVA, I. D. C. G.; NORONHA, S. M. R.; CORREA-NORONHA, S. A. A.; FERREIRA, L. M. Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. **Burns**, v. 40, p. 947 – 956, 2014.

GRELLNER, W.; GEORG, T.; WILSKE, J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. **Forensic Science International**, v. 113, p. 251–264, 2000.

GROEN, D.; BERTHAUD, F.; BOUWSTRA, J. A.; CHAPUIS, C.; GOORIS, G. S.; BONCHEVA, M. In vitro model systems for studying the impact of organic chemicals on the skin barrier lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1838, p. 310-318,2014.

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.

HALPERN, I. **Células Dendríticas Plasmocitoides, dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos, macrófagos e expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase na resposta tecidual cutânea da Leishmaniose tegumentar americana**. São Paulo, 2012. [Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo].

HANSSON, V.; SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 73, p. 81-92, 2000.

HUANG, W.; TSAI, T.; CHUANG, L.; LI, Y.; ZOUBOULIS, C. C.; TSAI, P. Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, p. 232–240, 2014.

INGARAMO, P. I.; FRANCÉS, D. E.; RONCO, M. T.; CARNOVALE, C. E. (2013). **Diabetes and Its Hepatic Complication**, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases, Dr. Monica Fedele (Ed.), ISBN: 978-953-51-1080-4, InTech, DOI: 10.5772/53684. Available from: <http://www.intechopen.com/books/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related-diseases/diabetes-and-its-hepatic-complication>. Acessado em: 02/01/2015, às 16:57.

KABIR-UD-DIN, SHARMA, G.; NAQVI, A. Z.; Micellization and interfacial behavior of binary surfactant mixtures based on cationic geminis and nonionic Tweens. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 385, p. 63-71, 2011.

KADOSHIMA-YAMAOKA, K.; GOTO, M.; MURAKAWA, M.; YOSHIOKA, R.; TANAKA, Y.; INOUE, H.; MURAFUJI, H.; KANKI, S.; HAYASHI, Y.; NAGAHIRA, K.; OGATA, A.; NAKATSUKA, T.; FUKUDA, Y. ASB16165, a phosphodiesterase 7A inhibitor, reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation model in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, p. 163–166, 2009.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 141–164, 2013. (figura)

KIM, N.; PAE, H.; KIM, Y.; CHOI, C.; RIM, J.; LEE, H.; KIM, Y.; CHUNG, H. Pentoxifylline potentiates nitric oxide production in interleukin-1 β -stimulated vascular smooth muscle cells through cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. **General Pharmacology**, Coréia do Sul, v. 35, p. 205–211, 2002.

KIM, Y.; KIM, B. H.; LEE, H.; JEON, B.; LEE, Y. S.; KWON, M.; KIM, T. Regulation of skin inflammation and angiogenesis by EC-SOD via HIF-1 α and NF- κ B pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1985–1995, 2011.

KIM, Y.; LEE, S. K.; BAE, S.; KIM, A.; PARK, Y.; CHU, N. K.; KIM, S. G.; KIM, H.; HWANG, Y.; KANG, J. S.; LEE, W. J. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. **Immunology Letters**, v. 149, p. 110–118, 2013.

KUKREJA, R. C.; SALLOUM, F. N.; DAS, A. Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling and Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Cardioprotection. **Journal of the American College of Cardiology**, Virginia, v. 59, p. 1921-1927, 2012.

KUMAR, G. K.; DHAMOTHARAN, R.; KULKARNI, M. N.; MAHAT, M. Y. A.; GUNASEKARAN, J.; ASHFAQUE, M. Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, n. 662, p. 63–69, 2011.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 41, n. 6, p. 317-320, 2013.

LEE, C.; HWANG, S. T. Pathophysiology of chemokines and chemokine receptors in dermatological science: A focus on psoriasis and cutaneous T-cell lymphoma. **Dermatologica Sinica**, v. 30, p. 128-135, 2012.

LEITE-SILVA, V. R.; ALMEIDA, M. M.; FRADIN, A.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M. S. Administração de medicamentos com aplicação tópica. **Expert Review of Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 383-397, 2012 .

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LI, X.; KUNIEDA, H. Cationic surfactants: microemulsion formation and solubilization. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, p. 327–336, 2003.

LYONS, J. J.; MILNER, J. D.; STONE, K. D. Atopic Dermatitis in Children: Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 35, p. 161–183, 2015.

MAGNUSSON, M.; GUNNARSSON, M.; BERNTORP, E.; BJÖRKMAN, S.; HÖGLUND, P. Effects of pentoxifylline and its metabolites on platelet aggregation in whole blood from healthy humans. **European Journal of Pharmacology**, Suécia, v. 581, p. 290–295, 2008.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; LAUTERBACH, R.; BOBEK, M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. **Immunopharmacology**, Polónia, v. 49, p. 335–343, 2000.

MEHATS, C.; ANDERSEN, C. B.; FILOPANTI, M.; JIN, S. C.; CONTI, M. Cyclic nucleotide fosfodiesterases and their role in endocrine cell signaling. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism**, v.13, n.1, p. 29-35, 2002.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, p. 3–9, 2012.

MO, C.; LI, X. Microstructure and structural transition in coconut oil microemulsion using semidifferential electroanalysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 312, p. 355–362, 2007.

MONE, M. K.; CHANDRASEKHAR, K. B. Degradation studies of pentoxifylline: Isolation and characterization of a novel gem-dihydroperoxide derivative as major oxidative degradation product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Índia, v. 53, p. 335–342, 2010.

MYERS, M. J.; BAARSCH, M. J.; MURTAUGH, M. P. Effects of Pentoxifylline on Inflammatory Cytokine Expression and Acute Pleuropneumonia in Swine. **Immunobiology**, USA, v. 205, p. 17–34, 2002.

NABAS, F.; CONTESINI, F. J.; MENIN, S. E. A.; ANTÔNIO, M. A.; BIGHETTI, A. E.; ARAÚJO, C. E. P.; CARVALHO, P. O. Efeito antiedematogênico de óleos contendo ácidos graxos ômega-3 e 6 em camundongos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 4, p. 92-96, 2009.

NICOLAOU, A. Eicosanoids in skin inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, p. 131–138, 2013.

NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier — Insights from molecular simulation of model membranes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 237-250, 2013.

OKUR, N. Ü.; APAYDIN, S.; YAVAS, N. Ü. K.; YAVASOGLUD, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, p. 136–144, 2011.

OLAJIDE, O.A., MAKINDE, J.M., AWE, E.O. Effect of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 113–117, 1999.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PAWELEC, G.; GOLDECK, D.; DERHOVANESSIAN, E. Inflammation, Ageing and chronic disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 29, p. 23-28, 2014.

PETERSON, T. C.; PETERSON, M. R.; RAOUL, J. M. The effect of pentoxifylline and its metabolite-1 on inflammation and fibrosis in the TNBS model of colitis. **European Journal of Pharmacology**, Canadá, v. 662, p. 47–54, 2011.

PINHEIRO, T.; YNSA, M. D.; ALVES, L. C.; TEIXEIRA, P.; FERREIRA, J.; FILIPE, P. Impact of inflammation on iron stores in involved and non-involved psoriatic skin, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2014.11.042>

PLASENCIA, I.; NORLE, L.; BAGATOLLI, L. A. Direct visualization of lipid domains in human skin stratum corneum's lipid membranes: Effect of pH and Temperature. **Biophysical Journal**, v. 93, p. 3142–3155, 2007.

PRIMO, M. N.; BAK, R. O.; SCHIBLER, B.; MIKKELSEN, J. G. Regulation of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-24 by microRNA-203 in primary keratinocytes. **Cytokine**, v. 60, p. 741–748, 2012.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470-491, 2011.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; BESSONI, R. L. C.; COSTA, V. V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, T. A. Preventive and therapeutic anti-TNF- α therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. **Life Sciences**, v. 93, p. 423–428, 2013.

REBANE, A.; RUNNEL, T.; AAB, A.; MASLOVSKAJA, J.; REUCKERT, B.; ZIMMERMANN, M.; PLAAS, M.; KEARNER, J.; TREIS, A.; PIHLAP, M.; HALJASORG,

U.; HERMANN, H.; NAGY, N.; KEMENY, L.; ERM, T.; KINGO, K.; LI, M.; BOLDIN, M. P.; AKDIS, C. A. MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 4, p. 836-847, 2014.

RICH, B. E.; KUPPER, T. S. Cytokines: IL-20 — a new effector in skin inflammation. **Current Biology**, v. 11, n. 13, 2001.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 396–401, 2011.

SAHOO, S.; PANI, R. N.; SAHOO, S. K. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, p. 193–199, 2014.

SAMLASKA, M. A. J. C. P.; WINFIELD, C. P. T. E. A. Pentoxifylline. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Hawaii, n. 30, p. 603-621, 1994.

SANCHEZ, A. P. G. Imunopatogênese da psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 747-749, 2010.

SANTOS, S. I. A. C. **Cinética e Termodinâmica da Interação de Anfífilas Fluorescentes com Bicamadas Lipídicas na fase Líquido-Ordenado**. Coimbra, 2010. [Tese de Doutorado. Departamento de Química, Universidade de Coimbra].

SCHMIDTS, T.; NOCKER, P.; LAVI, G.; KUHLMANN, J.; CZERMAK, P.; RUNKEL, F. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n 340, p. 187–192, 2009.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 660-668, 2013.

SEDDER, L. M.; McDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, p. 453–472, 2014.

SHARMA, S.; KUMAR, K.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P. L. Phosphodiesterases: Regulators of cyclic nucleotide signals and novel molecular target for movement disorders. **European Journal of Pharmacology**, Índia, v. 714, p. 486–497, 2013.

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, n. 1, p.1-8, 2010.

SILVA, J. A., SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SKRIVANOVÁ, E.; MOLATOVÁ, Z.; MAROUNEK, M. Effects of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic Escherichia coli O103. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 372–376, 2008.

SKRIVANOVÁ, V.; MAROUNEK, M. A note on the effect of triacylglycerols of caprylic and capric fatty acid on performance, mortality, and digestibility of nutrients in young rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v.127, p. 161–168, 2006.

SMEDEN, J. V.; JANSSENS, M.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 295–313, 2014.

SOULA, H. A.; GÉLOËN, A.; SOULAGE, C. O. Model of adipose tissue cellularity dynamics during food restriction. **Journal of Theoretical Biology**, v. 364, p. 189–196, 2015.

SUNIL, V. R.; VAYAS, K. N.; CERVELLI, J. A.; MALAVIYA, R.; HALL, L.; MASSA, C. B.; GOW, A. J.; LASKIN, J. D.; LASKIN, D. L. Pentoxifylline attenuates nitrogen mustard-induced acute lung injury, oxidative stress and inflammation. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 97, p. 89–98, 2014.

TAHA, M. O.; AL-GHAZAWI, M.; ABU-AMARA, H.; KHALIL, E. Development of quantitative structure–property relationship models for pseudoternary microemulsions formulated with nonionic surfactants and cosurfactants: application of data mining and molecular modeling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 15, p. 461–478, 2002.

TIVERS, M. S.; CATCHPOLE, B.; GREGORY, S. P.; HOUSE, A. K. Interleukin-2 and interferon-gamma mRNA expression in canine anal furunculosis lesions and the effect of ciclosporin therapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 31–36, 2008.

UNDERWOOD, A.J.; ZHANG, Y.; METZGER, D. W.; BAI, G. Detection of cyclic di-AMP using a competitive ELISA with a unique pneumococcal cyclic di-AMP binding protein. **Journal of Microbiological Methods** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.026>

VENUS, M.; WATERMAN, J.; McNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 471-474, 2011.

WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D. M. S. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 9126-9167, 2013.

WEI, T.; SABSOVICH, I.; GUO, T.; SHI, X.; ZHAO, R.; LI, W.; GEIS, C.; SOMMER, C.; KINGERY, W. S.; CLARK, D. J. Pentoxifylline attenuates nociceptive sensitization and cytokine expression in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome. **European Journal of Pain**, USA, v. 13, p. 253–262, 2009.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. 98-110, 2006.

WINSOR, P.A. Hydrotropy, solubilization, and related emulsification processes. VIII Effect of constitution on amphiphilic properties. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 463-471, 1948.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WITTMANN, M.; MCGONAGLE, D.; WERFEL, T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, p. 443–451, 2014.

YOKOUCHI, M.; KUBO, A.; KAWASAKI, H.; YOSHIDA, K.; ISHII, K.; FURUSE, M.; AMAGAI, M. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. **Journal of Dermatological Science (2014)**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.11.007>


YOSHIZUMI, M.; NAKAMURA, T.; KATO, M.; ISHIOKA, T.; KOZAWA, K.; WAKAMATSU, K.; KIMURA, H. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1405-1411, 2008.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 421, p. 34– 44, 2011.

ZHAO, L.; WANG, Y.; ZHAI, Y.; WANG, Z.; LIU, J.; ZHAI, G. Ropivacaine loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery: Preparation,

optimization, and evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 47–56, 2014.

ANEXO A – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB



**CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/CESED**

PARECER

CEUA: n °11
NÚMERO DO PROJETO: 0038/18122013
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
APROVADO EM: 18.12.2013

1. Pesquisador Responsável:
Bolivar Ponciano Gulart de Lima Damasceno


2. Título do Projeto:
Desenvolvimento de Sistema Microemulsionado contendo Pentoxifilina para aplicação tópica.

3. Objetivo:
Desenvolver um sistema microemulsionado para incorporação de pentoxifilina visando aplicação tópica.

4. Considerações:
O projeto apresentado esta bem discriminado e coerente com as normas de utilização de animais. Cumprindo os requisitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED, porém o colegiado sugere que seja feito um grupo controle com animais que recebessem apenas a medicação estudada.

5. Parecer Final:
APROVADO

Thárcia Kiara Beserra de Oliveira
Thárcia Kiara Beserra de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED



Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Itararé
 CEP 58411-020 | Campina Grande - PB | (83) 2101.8800
 www.cesed.br | facisa@cesed.br | fcm@cesed.br | esac@cesed.br
 CNPJ: 02.108.023/0001-40