

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Filipa de Oliveira Guardado

**ESTUDOS *EX VIVO* DE PERMEAÇÃO
DE CICLOSPORINA A EM PELE
USANDO ONDAS FOTOACÚSTICAS**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal
orientada pelo Professor Doutor Luís Guilherme da Silva Arnaut
Moreira e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Julho de 2023

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Estudos *ex vivo* de permeação de Ciclosporina A em pele usando ondas fotoacústicas

Catarina Filipa de Oliveira Guardado

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pelo Professor Doutor Luís Guilherme da Silva Arnaut Moreira e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

A elaboração desta Dissertação de Mestrado consistiu numa longa viagem que incluiu inúmeros desafios e percalços pelo caminho que só foram ultrapassáveis com o apoio e contributo de várias pessoas indispensáveis à concretização deste sonho.

Assim, quero expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, permitiram e contribuíram para a realização desta Dissertação, bem como para o meu desenvolvimento académico e pessoal.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Luís Guilherme da Silva Arnaut Moreira, do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, toda a orientação prestada, incentivo, disponibilidade, todo o conhecimento transmitido e por todas as ideias e sugestões propostas para levar este projeto a um bom porto. Obrigada Professor pela oportunidade de realizar esta Dissertação e por fomentar em mim a procura pelo saber e o espírito crítico.

Agradeço, de igual forma, ao Doutor Renato Cardoso, que me acompanhou nos primeiros meses, e à Mestre Sofia Guímaro, da empresa LaserLeap Technologies, a disponibilidade e orientação diária demonstrada nos trabalhos de laboratório, a ínfima paciência e incentivo prestado que nunca permitiram que o desalento se instalasse, e todo o conhecimento transmitido ao longo destes meses.

À Dra. Maria Inês Pimentel agradeço pela ajuda na técnica de DLS e por se mostrar sempre disponível a ajudar.

Ao Dr. Celso João agradeço a disponibilidade prestada para esclarecer dúvidas acerca da tecnologia da LaserLeap.

À LaserLeap Technologies e a toda a equipa que faz parte desta empresa, agradeço o acolhimento e acompanhamento prestado ao longo da realização deste projeto.

Ao Professor Doutor Luís Arnaut e ao Professor Doutor Carlos Serpa, agradeço pela oportunidade de fazer parte da equipa LaserLeap nestes últimos meses.

A todos os Professores de Liceu, Licenciatura e Mestrado, agradeço todos os conhecimentos e competências que me transmitiram ao longo deste percurso académico, e que culminam com a elaboração desta Dissertação.

Aos meus amigos, agradeço todas as palavras de apoio e incentivo, e acima de tudo, todo o carinho e amizade.

A toda a equipa Alpha Soure 2023, em especial à Mesa 4, agradeço por terem entrado na minha vida durante esta etapa. Obrigada a todos por trazerem mais equilíbrio e leveza à minha vida e por se terem tornado família.

À minha família, agradeço todo o apoio e amabilidade com que sempre me presentearam.

Um agradecimento especialmente à minha tia Almerinda por acreditar em mim desde o primeiro dia e por ter feito com que nunca desistisse.

Às tias Cristina e Teresa agradeço todo o cuidado que têm comigo e por todo o apoio incondicional durante esta etapa.

Ao Tomás, o menino mais enérgico que conheço, agradeço por no alto dos seus 9 anos conseguir tirar de mim um sorriso nos momentos mais difíceis.

Embora toda a gratidão do mundo seja pouca para agradecer tudo o que tem feito por mim, agradeço especialmente à minha mãe todo o amor incondicional, apoio, incentivo, paciência, motivação, dedicação e, por todos os sacrifícios que fez para que eu chegasse até aqui. O caminho foi longo, mas só foi possível caminhar graças a ti. Ser-te-ei eternamente grata!

À minha irmã, Sandrina, agradeço por todas as gargalhadas que me ajudaram a superar momentos difíceis.

Aos meus avós paternos de quem sinto muitas saudades, quero agradecer os meus primeiros anos de vida que muito contribuíram para o que sou hoje. Nunca vos esquecerei e espero que hoje aí em cima se sintam orgulhosos de mim.

Por último, gostaria de expressar o meu eterno agradecimento ao meu namorado por ao longo dos últimos 9 anos caminhar sempre ao meu lado, apoiando-me em todos os momentos, por mais difíceis que sejam. Obrigada por todo o amor incondicional, apoio, dedicação, mas sobretudo por toda a paciência e compreensão que sempre tiveste comigo. Obrigada por me fazeres acreditar que sou capaz!

A Todos, o meu Muito Obrigada!

*“Um cientista no seu laboratório
não é apenas um técnico:
é, também, uma criança
colocada à frente de fenômenos naturais
que impressionam como se fossem
um conto de fadas.”*

Marie Curie
Cientista, Física e Química

Resumo

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, cuja prevalência tem vindo a aumentar nas últimas décadas. Estima-se que esta dermatose afeta cerca 15 a 20% das crianças em todo o mundo e 1 a 3% dos adultos. Apesar dos mecanismos exatos por trás da patogénese da DA ainda não se encontrem totalmente esclarecidos, sabe-se que esta doença da pele resulta de uma complexa interação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais, que condicionam a disfunção da barreira da pele, a desregulação imune cutânea e a modificação da colonização da pele. Todavia, apesar de todos os esforços que têm sido feitos, a DA continua a ser uma doença para a qual ainda não existe cura tendo, por isso, o seu tratamento como objetivos principais a remissão das lesões agudas, a redução e a prevenção da sua recorrência, o alívio ou eliminação dos sintomas clínicos e fatores agravantes e o tratamento das comorbidades associadas. A abordagem de tratamento não farmacológico consiste no tratamento base de todos os doentes, contudo em casos mais graves a DA é controlada através do uso de fármacos sistémicos como imunossuppressores. Contudo, e uma vez que a maior parte dos casos de DA são leves ou moderados, é normalmente recomendado o uso de fármacos tópicos anti-inflamatórios, por forma a evitar os efeitos adversos associados ao tratamento sistémico. Os corticosteroides são classicamente os fármacos anti-inflamatórios de primeira linha usados na DA, contudo quando utilizados por longos períodos de tempo estes fármacos tendem a comprometer a barreira cutânea e apresentam riscos de eventos cutâneos adversos. Por sua vez, fármacos anti-inflamatórios que são inibidores da calcineurina permitem tratar de forma eficaz a DA sem prejudicar a barreira da pele. Assim, uma estratégia promissora para o tratamento da DA e que foi alvo de investigação no presente estudo, consiste na administração tópica de Ciclosporina A (CyA), que é uma molécula que pertence à classe dos inibidores da calcineurina. No entanto, a permeação da CyA através da pele não tem sido facilmente alcançada devido à natureza físico-química desfavorável desta molécula em termos de lipofilicidade e peso molecular, que dificulta a permeação através da camada córnea. Com o intuito de ultrapassar este problema foi utilizado um método físico desenvolvido pela LaserLeap Technologies®, denominado por Piezoporação. Este método tem como objetivo diminuir a função de barreira da camada córnea da pele ao destabilizá-la, através da utilização de ondas fotoacústicas que são geradas pela conversão eficiente da luz de um estímulo laser em gradientes de pressão através da utilização de materiais piezofotónicos. Foi testada a eficácia deste tipo de ondas utilizando uma fluência laser de 69 mJ/cm² e uma fluência menor de 48 mJ/cm². Uma formulação em gel contendo 2% (m/v) de CyA foi desenvolvida e a sua capacidade de libertação da molécula em estudo foi avaliada através de estudos *in vitro* de libertação utilizando células de difusão de Franz. Posteriormente, a permeação da CyA foi avaliada através da realização de estudos de permeação *ex vivo* utilizando pele de porco como

membrana nas células de difusão de *Franz*. Para se estudar a eficácia da técnica de Piezoporação em desestabilizar a CC de forma a aumentar a sua permeabilidade, a permeação da CyA foi avaliada na presença e na ausência do método (difusão ativa *versus* difusão passiva). As amostras obtidas dos estudos *in vitro* e *ex vivo* foram analisadas por um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência desenvolvido durante este estudo. Após as 0,5 horas dos estudos de permeação verificou-se que a quantidade de CyA presente no recetor foi insignificante no caso da difusão passiva. Pelo contrário, aquando da utilização das ondas fotoacústicas com diferentes fluências, quantidades superiores de CyA foram quantificadas no líquido recetor, tendo a quantidade de CyA sido maior no caso em que foi utilizada uma fluência mais elevada.

Palavras-chave: Dermatite Atópica, formulação tópica, Ciclosporina A, pele, camada córnea, *ex vivo*, células de difusão de *Franz*, permeação, ondas fotoacústicas, CLAE

Abstract

*Atopic Dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease whose prevalence has increased in recent decades. It is estimated that this dermatosis affects about 15 to 20% of children and 1 to 3% of adults worldwide. Although the exact mechanisms behind the pathogenesis of AD are not yet fully understood, it is known that this skin disease results from a complex interaction of genetic, immunological and environmental factors that contribute to skin barrier dysfunction, dysregulation of the cutaneous immune system and alteration of skin colonisation. Despite all efforts, AD remains a disease for which there is currently no cure. The main goals of treatment are therefore the remission of acute lesions, the reduction and prevention of their recurrence, the alleviation or elimination of clinical symptoms and exacerbating factors, and the management of associated comorbidities. The non-pharmacological treatment approach serves as the basic treatment for all patients. Still, in more severe cases, AD is controlled by the use of systemic drugs such as immunosuppressants. Nevertheless, since most cases of AD are mild or moderate, the use of topical anti-inflammatory drugs is usually recommended to avoid the side effects associated with systemic treatment. Corticosteroids are the classic anti-inflammatory drugs of first choice used in AD. In spite of that, with prolonged use, these drugs tend to compromise the skin barrier and carry the risk of adverse cutaneous events. On the other hand, anti-inflammatory drugs that are calcineurin inhibitors allow effective treatment of AD without compromising the skin barrier. Therefore, a promising strategy for the treatment of AD, which was investigated in this study, involves the topical administration of Cyclosporine A (CyA), a molecule belonging to the class of calcineurin inhibitors. However, permeation of CyA through the skin is not easily achieved due to the unfavourable physicochemical properties of this molecule in terms of its lipophilicity and molecular weight, which hinder its penetration through the stratum corneum. To overcome this problem, a physical method developed by LaserLeap Technologies, Piezoporation, was used. This method aims to reduce the barrier function of the stratum corneum by destabilising it through the use of photoacoustic waves generated by efficiently converting laser light into pressure gradients using piezophotonic materials. The effectiveness of this type of wave was tested with a laser fluence of 69 mJ/cm² and a lower fluence of 48 mJ/cm². A gel formulation containing 2% (w/v) CyA was developed and the release capacity of the molecule under study was evaluated by *in vitro* Franz diffusion cell release studies. Subsequently, CyA permeation was evaluated by *ex vivo* permeation studies using pig skin as the membrane in Franz diffusion cells. To investigate the effectiveness of the Piezoporation technique in destabilising the stratum corneum to increase its permeability, the permeation of CyA was evaluated in the presence and absence of the method (active diffusion versus passive diffusion). Samples from *in vitro* and *ex vivo* studies were analysed using a High-Performance Liquid Chromatography method developed*

in this study. After 0.5 hours permeation studies, the amount of CyA present in the receptor was found to be insignificant with passive diffusion. Conversely, higher amounts of CyA were quantified in the receptor fluid when using photoacoustic waves with different fluences, with the amount of CyA being greater when a higher fluence was used.

Keywords: *Atopic Dermatitis, topical formulation, Cyclosporine A, skin, stratum corneum, ex vivo, Franz diffusion cells, permeation, photoacoustic waves, HPLC*

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvii
Acrónimos	xix
Símbolos	xxi
1. Introdução	1
1.1. Fisiologia da pele	2
1.1.1. Estrutura e função da pele.....	2
1.1.1.1. Epiderme	2
1.1.1.2. Derme	5
1.1.1.3. Hipoderme	8
1.2. Dermatite Atópica	9
1.2.1. Prevalência da Dermatite Atópica	11
1.2.2. Fisiopatologia da Dermatite Atópica	12
1.2.2.1. Disfunção da barreira cutânea	12
1.2.2.2. Desregulação do sistema imunitário.....	14
1.2.2.3. Alteração da colonização da pele na DA.....	17
1.2.3. Tratamento da DA	18
1.2.3.1. Tratamento não farmacológico.....	19
1.2.3.2. Tratamento farmacológico.....	19
1.2.3.2.1. Fármacos tópicos	19
1.2.3.2.1.1. Ciclosporina A.....	20
1.2.3.2.1.1.1. Tacrolimus como competidor da Ciclosporina A.....	23
1.3. Permeação de fármacos através da pele	24
1.3.1. Vias e mecanismos	24
1.3.2. Principais barreiras	25
1.3.3. Cinética da absorção cutânea.....	26
1.4. Sistemas tópicos de administração de fármacos.....	28

1.5. Técnicas para aumentar a entrega de fármacos através da pele	29
1.5.1. Métodos Passivos / Químicos	29
1.5.2. Métodos Ativos / Físicos	30
1.5.2.1. Ondas fotomecânicas	30
1.5.2.1.1. Método LaserLeap Technologies® - Piezoporação.....	31
2. Materiais, Métodos e Técnicas Instrumentais.....	37
2.1. Materiais	37
2.2. Formulação de Ciclosporina A	37
2.2.1. Preparação e otimização	37
2.2.2. Caracterização da formulação.....	39
2.2.2.1. Propriedades Físico - Químicas	39
2.2.2.2. Tamanho e distribuição das partículas.....	39
2.2.2.3. Estabilidade	40
2.3. Estudos <i>in vitro</i>	40
2.3.1. Estudos de liberação da formulação contendo Ciclosporina A.....	40
2.3.1.1. Quantificação analítica das amostras de Ciclosporina A obtidas nos estudos de liberação	41
2.3.1.2. Modelos matemáticos de liberação de fármacos	42
2.4. Estudos <i>ex vivo</i>	45
2.4.1. Preparação da pele	45
2.4.2. Estudo do solvente de extração da Ciclosporina A das amostras de pele.....	46
2.4.3. Estudos de permeação da formulação contendo Ciclosporina A.....	46
2.4.3.1. Quantificação analítica das amostras de Ciclosporina A obtidas nos estudos de permeação.....	47
2.5. Análise dos dados	47
3. Resultados e Discussão	49
3.1. Formulação tópica contendo Ciclosporina A	49
3.1.1. Otimização da formulação	49
3.1.2. Caracterização Físico - Química da formulação.....	50
3.1.3. Tamanho e distribuição de tamanhos das partículas que compõem a formulação de CyA	51
3.1.4. Estabilidade da formulação.....	52
3.2. Estudos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	53
3.2.1. Curva de Calibração.....	53

3.2.2. Estudos de liberação	56
3.2.2.1. Estudos de liberação para avaliar a influência da percentagem de Tween 80 na capacidade de liberação da CyA das formulações	56
3.2.2.2. Estudos de liberação para a formulação contendo 2% de Tween 80.....	60
3.2.2.2.1. Ajuste aos modelos matemáticos de liberação de fármacos.....	61
3.2.2.3. Estudos de liberação para a formulação contendo 0,2% de CyA.....	62
3.2.3. Estudos <i>ex vivo</i> de permeação	63
3.2.3.1. Estudo do solvente de extração da CyA das amostras da pele	64
3.2.3.2. Permeação usando uma fluência de 69 mJ/cm ²	65
3.2.3.2.1. Membrana biológica.....	65
3.2.3.2.2. Identificação da CyA	66
3.2.3.2.3. Perfil de permeação	68
3.2.3.3. Permeação usando uma fluência de 48 mJ/cm ²	69
3.2.3.3.1. Membrana biológica.....	69
3.2.3.3.2. Identificação da CyA	70
3.2.3.3.3. Perfil de permeação	72
3.2.3.4. Comparação da tecnologia Piezoporação utilizando fluências diferentes - 68,79 vs 48,41 mJ/cm ²	73
4. Conclusão	77
5. Bibliografia.....	81
6. Anexos.....	99

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da estrutura, divisão e composição da epiderme. Adaptado de 28	5
Figura 2. A- Representação esquemática da estrutura e composição da derme. B- Divisão da derme em derme papilar e derme reticular. Adaptado de 44 e 45	8
Figura 3. Representação esquemática da estrutura e composição da hipoderme. Adaptado de 48.9	
Figura 4. A- Visão aproximada de uma pele saudável. B- Pele com DA que não apresenta lesões. C- Pele com DA em fase aguda da doença. D- Pele com DA em fase subaguda da doença. E- Pele lesionada em fase crónica da doença. Adaptado de 59.....	10
Figura 5. Representação esquemática das anomalias que ocorrem ao nível da barreira epidérmica, ou seja, ao nível da camada córnea e ao nível das <i>Tight Junctions</i> , numa pele com DA. Adaptado de 71	14
Figura 6. Ciclo prurido-coçar-prurido que contribui ainda mais para a disfunção da barreira cutânea e para a TEWL e, conseqüentemente, para a penetração de agentes alérgenos e irritantes que promovem o estado inflamatório.....	16
Figura 7. Principais alterações fisiopatológicas que ocorrem numa pele com DA. A- Pele saudável. B- Pele com DA que não apresenta lesões, mas em que se verifica uma disfunção da barreira cutânea, o que torna a pele mais suscetível a fatores externos, bem como à alteração do seu microbioma. Adicionalmente, verifica-se a existência de uma inflamação subclínica subjacente com o aumento de células Th2 que quando estimuladas levam à sobre-expressão de citocinas inflamatórias. C- Pele com DA em fase aguda da doença. Nesta última, verifica-se uma amplificação das respostas Th2 e Th22. D- Pele com DA em fase crónica da doença. Neste caso, observa-se uma ativação contínua de células Th2 e Th22 e uma ativação das células Th1 e Th17. Adaptado de 59.....	17
Figura 8. Esquema resumo da fisiopatologia da DA. Adaptado de 66.....	18
Figura 9: Estrutura química da Ciclosporina A. Adaptado de 108	22
Figura 10: Mecanismo de ação da Ciclosporina A: inibição da ativação e da proliferação de células T pelo bloqueio da transcrição de IL-2. Adaptado de 111	22
Figura 11: Estrutura química do Tacrolimus. Adaptado de 114	24
Figura 12: Vias de penetração através da pele. Adaptado de 2.....	25
Figura 13: Representação esquemática dos processos envolvidos no transporte de fármacos para dentro e através da pele. Adaptado de 131	27

Figura 14: Aprimoramento da permeação através do uso de ondas fotomecânicas. Adaptado de 151	31
Figura 15: Configuração experimental para a geração das ondas fotoacústicas. Adaptado de 157	33
Figura 16: Aumento da permeabilidade da pele com alteração da camada córnea durante a aplicação de ondas fotoacústicas. A- Camada córnea imperturbada com camadas de corneócitos compactados com domínios hidrofílicos (azul) separados por lamelas lipídicas intercelulares (verde). B- Propagação de ondas fotoacústicas com gradientes de pressão acentuados na camada córnea. C- Camada córnea perturbada com espaços lacunares dilatados devido à desestabilização pelas ondas fotoacústicas que alteram a organização da matriz lipídica, o que facilita a difusão de fármacos através dos espaços lacunares que correspondem a poros. Adaptado de 153.	33
Figura 17: Representação esquemática do desdobramento das cadeias do polímero Carbopol após hidratação e neutralização dos grupos carboxílicos. Adaptado de 158	38
Figura 18: Aparência da formulação final de CyA que consiste num gel homogéneo de cor branca.	51
Figura 19: Representação gráfica da distribuição do tamanho das partículas em função da intensidade para cada medição executada.	51
Figura 20: Representação gráfica da percentagem de CyA presente na formulação ao fim de 15 dias e 1 mês de armazenamento à temperatura de 4°C.	53
Figura 21: Curvas de calibração da CyA. A- Cromatogramas dos padrões usados para preparar as curvas de calibração. Os cromatogramas foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H ₂ O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C. B- Representação das curvas de calibração obtidas. Curva de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 30,0 µg/mL (preto) e curva de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 3,75 µg/mL (azul).	54
Figura 22: A- Cromatogramas representativos dos resultados obtidos para a libertação nas células de difusão de Franz em períodos de tempo pré-determinados. B- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 4% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (azul escuro) com o seu respetivo controlo (azul claro) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). C- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 2% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (verde escuro) com o seu respetivo controlo (verde claro) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). D- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 1% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (amarelo escuro) com o seu respetivo controlo (amarelo claro) e	

com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). **E-** Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 0,5% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (roxo escuro) com o seu respetivo controlo (lilás) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). **F-** Comparação do perfil de libertação da CyA para cada percentagem de Tween 80 a testar (4; 2; 1 e 0,5%), em percentagem ao longo do tempo. **G-** Percentagem de CyA libertada no compartimento recetor para cada percentagem de Tween 80 a testar (4; 2; 1 e 0,5%) até às 24 horas. Os cromatogramas A, B, C, D e E foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.58

Figura 23: Perfil de libertação da formulação de CyA contendo 2% de Tween 80 ao longo do tempo, em percentagem.....60

Figura 24: Perfil de libertação da formulação contendo 0,2% de CyA ao longo do tempo, em percentagem.....63

Figura 25: Representação gráfica da percentagem de CyA que foi extraída na pele e na pele dermatomizada, utilizando como solventes de extração uma solução composta por MeOH (azul) e uma solução composta por uma mistura de solventes PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% v/v) (rosa).....64

Figura 26: Valores da perda de água transepidérmica (TEWL) e da espessura obtidos para as membranas biológicas utilizadas nos estudos de permeação utilizando uma fluência de 69 mJ/cm².66

Figura 27: Identificação da CyA. **A-** Cromatograma exemplificativo das amostras retiradas do compartimento recetor às 0,5 horas com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **B-** Cromatograma exemplificativo de amostras retiradas do compartimento recetor às 0,5 horas correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e um padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). **C-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **D-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e ao padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). Os cromatogramas A, B, C e D foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma

mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.

..... 67

Figura 28: Quantidade de CyA presente no compartimento recetor após 0,5 horas de experiência quando utilizado o método ativo Piezoporação com uma fluência de 69 mJ/cm² (azul) e na ausência deste (verde). A significância estatística foi avaliada por *One-way* ANOVA tendo-se obtido que $p > 0,05$ o que significa que não existe significância estatística..... 68

Figura 29: Valores da perda de água transepidermica (TEWL) e da espessura obtidos para as membranas biológicas utilizadas nos estudos de permeação utilizando uma fluência de 48 mJ/cm². 70

Figura 30: Identificação da CyA. **A-** Cromatograma exemplificativo de amostras retiradas do compartimento recetor às 0,5 horas com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **B-** Cromatograma exemplificativo de amostras retirada do compartimento recetor às 0,5 horas correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e um padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). **C-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **D-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e ao padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). Os cromatogramas A, B, C e D foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.

..... 71

Figura 31: Quantidade de CyA presente no compartimento recetor após 0,5 horas de experiência quando utilizado o método ativo Piezoporação com uma fluência de 48 mJ/cm² (azul) e na ausência deste (verde). A significância estatística foi avaliada por *One-way* ANOVA tendo-se obtido que $p > 0,05$ o que significa que não existe significância estatística..... 72

Figura 32: Quantidade cumulativa de CyA obtida usando a tecnologia Piezoporação com duas fluências diferentes, 69 mJ/cm² (azul escuro) e 48 mJ/cm² (azul claro). A significância estatística foi avaliada por *One-way* ANOVA tendo-se obtido que $p > 0,05$ o que significa que não existe significância estatística..... 73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Percentagem (% m/v) de cada componente para cada formulação a testar.	38
Tabela 2: Interpretação dos modelos de liberação de fármacos de sistemas poliméricos possuindo geometrias diferentes. Adaptado de 169	44
Tabela 3: Resumo da percentagem (% m/v) de cada componente da formulação de CyA a utilizar no presente estudo.	50
Tabela 4: Resumo dos valores de pH e de densidade obtidos para a formulação final de CyA e caracterização da sua aparência.	50
Tabela 5: Resumo dos valores obtidos para o tamanho e PDI através da técnica de DLS.	52
Tabela 6: Resumo da percentagem de CyA liberada de cada formulação contendo diferentes percentagens de Tween 80 (4; 2; 1 e 0,5%) até às 24 horas.	59
Tabela 7: Resumo do ajuste do perfil de liberação da formulação de CyA aos modelos matemáticos de liberação de fármacos.	62

Acrónimos

AAD	do inglês <i>American Academy of Dermatology</i>
ACN	Acetonitrilo
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno, do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>
CC	Camada Córnea
CL	Células Langerhans
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC)
CPE	Promotores Químicos de Permeação, do inglês <i>Chemical Permeation Enhancers</i>
CyA	Ciclosporina A
Cyp1	Proteína intracelular Ciclofilina 1
DA	Dermatite Atópica
DLS	Dispersão Dinâmica da Luz, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FC	Célula de <i>Franz</i> , do inglês <i>Franz cell</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FKBP	Proteína de ligação FK506
FLG	Filagrina
IFN-γ	Interferão γ
IL	Interleucina
J	Fluxo
MeOH	Metanol
MnTPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirinato
NFAT	Fator Nuclear de Células T ativadas, do inglês <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NMF	Fator de Hidratação Natural, do inglês <i>Natural Moisturizing Factor</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAW	Ondas Fotoacústicas, do inglês <i>Photoacoustic Waves</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDI	Índice de polidispersão, do inglês <i>Polidispersity Index</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
PES	Polietersulfona
pH	Potencial de Hidrogénio, do inglês <i>Potential of Hydrogen</i>

pKa	Constante de Dissociação ácida
PM	Peso Molecular
PW	Ondas Fotomecânicas, do inglês <i>Photomechanical Waves</i>
R	Coefficiente de correlação
R²	Coefficiente de determinação
TAC	Tacrolimus
TEWL	Perda de Água Transepidermica, do inglês <i>Transepidermal Water Loss</i>
TGF-β₁	Fator de Transformação de Crescimento, do inglês <i>Transformation Growth Factor</i>
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TJ	Junções apertadas, do inglês <i>Tight Junctions</i>
T_R	Tempo de Retenção
Treg	Células T reguladoras
TSLP	Linfopoiatina Estromal Tímica, do inglês <i>Thimic Stromal Lymphopoeitin</i>
Tween 80	Monooleato de polioxietileno-80-sorbitano
UV	Ultravioleta

Símbolos

β	Coeficiente de expansão
Γ	Parâmetro de Grüneisen

1. Introdução

Devido à prevalência crescente nas últimas décadas, a Dermatite Atópica (DA) tornou-se um problema de saúde global, o que tem conduzido a um interesse crescente na procura de tratamentos para esta patologia. Estima-se que esta doença inflamatória crónica da pele afete 15 a 20% das crianças e 1 a 3% dos adultos em todo o mundo, embora a sua incidência seja maior nos países desenvolvidos. Apesar dos mecanismos exatos por trás da patogénese da DA ainda não se encontrem totalmente esclarecidos, sabe-se que esta dermatose resulta de uma complexa interação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais, que condicionam a disfunção da barreira da pele, a desregulação imune cutânea e a modificação da colonização da pele. Isto culmina na alteração da aparência e estrutura da pele, pelo que se torna importante compreender a função normal deste órgão para perceber as repercussões destas mesmas disfunções. Todavia, apesar de todos os esforços que têm sido feitos, a DA continua a ser uma doença para a qual ainda não existe cura, tendo, por isso, o seu tratamento como objetivos principais a remissão das lesões agudas, a redução e a prevenção da sua recorrência, o alívio ou eliminação dos sintomas clínicos e fatores agravantes e o tratamento das comorbidades associadas. Em casos mais graves a DA é controlada através do uso de fármacos sistémicos com imunossuppressores. Contudo, uma vez que a maior parte dos casos de DA são leves ou moderados, é normalmente recomendado o uso de fármacos tópicos anti-inflamatórios, nomeadamente corticosteroides e inibidores da calcineurina, por forma a evitar os efeitos adversos associados ao tratamento sistémico. Assim, uma possível alternativa para o tratamento da DA consiste na administração tópica de Ciclosporina A (CyA), que é um inibidor da calcineurina. No entanto, a permeação da CyA na pele não tem sido facilmente alcançada devido à natureza físico-química desfavorável desta molécula em termos de lipofilicidade e peso molecular, que dificulta a permeação através da camada córnea. Por outro lado, a baixa hidrossolubilidade da CyA torna difícil a preparação de formulações para uso tópico.

Assim, os principais objetivos do presente estudo foram os seguintes:

- Desenvolvimento de uma formulação contendo Ciclosporina A com propriedades adequadas para aplicação tópica;
- Desenvolvimento de um método analítico quantitativo para identificar de forma confiável o analito usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Estudo da permeação da Ciclosporina A através da pele utilizando uma técnica física para potencializar a sua penetração.

1.1. Fisiologia da pele

1.1.1. Estrutura e função da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano representando cerca de 15 a 20 % da massa corporal total de um adulto, uma área de superfície de 1,5 a 2 m² e um peso total de aproximadamente 4 kg. [1, 2, 3, 4] É um órgão essencial para a sobrevivência e bem-estar geral, uma vez que atua como uma barreira protetora contra agentes externos (microrganismos patogênicos, radiação ultravioleta e agentes tóxicos, químicos e mecânicos), sendo também responsável por diversas funções essenciais à vida como a regulação térmica, funções sensoriais, homeostáticas, excretoras e metabólicas. [3, 4, 5, 6] De forma geral, a função de barreira da pele assenta essencialmente em dois domínios: físico contra agentes patogênicos e lesões mecânicas e químico ou bioquímico com atividade antimicrobiana, fazendo parte da imunidade inata, e controlo da regulação da perda de água e solutos para o exterior. [3, 4, 5, 6] Estruturalmente a pele é composta por três camadas confinantes: a epiderme, a derme e a hipoderme, diferindo umas das outras no que diz respeito à sua morfologia e funções. [2,3] O pH da pele desempenha um papel importante na regulação de vários processos biológicos, nomeadamente no processo de descamação, na síntese de lípidos e na função de barreira conferida pela própria pele. [7, 8] Regra geral, uma pele saudável que apresenta um microbioma cutâneo controlado exibe um pH levemente ácido, variando entre os 5,4 e os 5,9, dependendo do sexo, idade, etnia, local do corpo, condições fisiológicas e fatores externos a que se encontra sujeita. [9, 10]

1.1.1.1. Epiderme

A epiderme corresponde à camada mais superficial da pele, ou seja, à parte da pele que está diretamente em contacto com o exterior, constituindo uma barreira entre o organismo e o ambiente que o rodeia, protegendo-o deste modo contra possíveis danos físicos, químicos e imunológicos. [1, 3, 11] De forma geral, a função de barreira da pele está particularmente dependente desta camada mais externa da pele e, dentro desta da Camada Córnea (CC) e das Junções Apertadas (TJ, do inglês *Tight Junctions*). [1, 3, 11]

Esta camada mais superficial é composta por tecido epitelial estratificado queratinizado, que se encontra em contínua renovação, a cada 40 a 56 dias, motivo pelo qual é considerada a camada da pele biologicamente mais ativa. [12, 13, 14] A espessura da epiderme varia de indivíduo para indivíduo e de região para região do corpo. [2] De forma geral, a epiderme possui cerca de 75 a 150 µm de espessura, no entanto áreas da pele que se encontram sujeitas a maior atrito, como é o caso das palmas das mãos e das solas dos pés, a epiderme é mais espessa, possuindo uma espessura que pode ir até aos 600 µm. [14, 15]

A epiderme é composta por diferentes tipos de células, como queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans (CL) e células de Merkel (Figura 1). [3,4, 16] Os queratinócitos são o tipo celular mais predominante na epiderme, constituindo aproximadamente 90 a 95% das células epidérmicas. [16, 17] Estes são formados na camada basal por meio de um processo de proliferação, seguido de migração em direção à camada escamosa, à camada granulosa e à CC passando por

um processo de diferenciação que resulta na maturação final deste tipo de células que irão constituir as diferentes camadas da pele. [1, 3, 16, 17] Este processo de diferenciação desempenha um papel importante na renovação e função da epiderme. [1, 3, 16, 17, 18] Para além disso, os queratinócitos são ainda responsáveis pela produção de queratina e lípidos que constituem a barreira epidérmica. [18] Os melanócitos constituem cerca de 3% das células epidérmicas e consistem em células dendríticas derivadas das células da crista neural, que residem principalmente na camada basal. [1, 11, 12] Estes são células produtoras de melanina, uma proteína cuja principal função é a pigmentação da pele e a proteção da pele contra a radiação Ultravioleta (UV). [4, 11, 16, 19] Por sua vez, as CL são células dendríticas, derivadas da medula óssea, que constituem cerca de 2% das células epidérmicas. [1, 3, 4, 17] Na epiderme, estas células localizam-se principalmente na camada escamosa, desempenhando um papel importante na apresentação de antígenos. [11, 12, 16, 18] Finalmente, as células de Merkel são o tipo celular que constitui uma menor percentagem das células epidérmicas, cerca de 0,5%, encontrando-se sobretudo presentes na camada basal. [17, 18] Estas últimas células funcionam como recetores mecanosensoriais da epiderme, sendo responsáveis por transmitirem informações sensoriais da pele para os nervos sensoriais. [1, 4, 12]

De acordo com o grau de diferenciação destas células que constituem a epiderme, estas formam as cinco camadas distintas que compõem a epiderme, começando com a camada basal que corresponde à camada mais profunda da epiderme, seguida da camada escamosa, da camada granular e da camada clara, e, por último, da camada mais superficial da epiderme, a camada córnea também denominada por camada cornificada (Figura 1). [3, 16, 18] Segundo alguns autores estas camadas da epiderme podem ser classificadas em epiderme viável e epiderme não viável. [2, 20]

A epiderme não viável corresponde à CC, enquanto a epiderme viável é composta pelas restantes camadas que compõem a epiderme, ou seja, pelas camadas da pele que se localizam abaixo da CC e acima da derme. [2, 20]

A CC é composta por células grandes, planas, não viáveis e bem compactadas dispostas em 18 a 21 camadas que podem variar no que diz respeito à sua espessura, dependendo da localização no corpo. [15, 16, 18] A epiderme não viável é composta por queratinócitos diferenciados, ou seja, por células queratinizadas denominadas por corneócitos que compõem as 10 a 20 camadas da CC, possuindo estas células um diâmetro que pode variar entre os 30 a 40 μm e uma espessura de 0,1 a 1,0 μm . [2, 6, 15, 16] Os corneócitos, são células quase mortas, ricas em proteínas e com baixo teor de lípidos, que se apresentam conectados por corneodesmosomas, que conferem estabilidade estrutural à CC, e circundados por uma matriz lipídica extracelular contínua. [12, 20] O interior dos corneócitos consiste ainda em filamentos de queratina agregados pela proteína Filagrina (FLG), que desempenha um papel importante na manutenção da integridade estrutural da CC. [21] Os lípidios que compõem esta camada são essencialmente sintetizados pelos queratinócitos a partir dos produtos intermediários do metabolismo ou de ácidos gordos essenciais, e funcionam como uma espécie de cimento que envolve os corneócitos que

representam os tijolos, formando a CC que de uma maneira simplista se assemelha a uma “parede de tijolos”.^[4, 11] A organização da CC nesta estrutura é fundamental para o seu papel de barreira física.^[4, 11] À medida que os queratinócitos amadurecem, a maioria dos lipídios sintetizados são empacotados em pequenos organelos conhecidos como corpos ou grânulos lamelares.^[11] A substância intracelular derivada destes grânulos lamelares está presente entre as células da CC e forma o componente lipídico intercelular da barreira que compõe a CC.^[11, 20, 22, 23] Este componente lipídico tem como função impedir a penetração de substâncias provenientes do meio ambiente e a perda de fluidos corporais, nomeadamente de água, o que torna a CC o mais impermeável possível.^[11, 20, 22, 23] Assim, a função de barreira antimicrobiana conferida pela CC depende da produção de peptídeos e lípidos com propriedades antimicrobianas que limitam o crescimento de agentes patogénicos externos na superfície da pele, contribuindo assim para a colonização da pele pela flora considerada não patogénica.^[24] As composições lipídicas dos espaços intracelulares da CC incluem: 45 a 50% de ceramidas, 25% de colesterol, 15% de ácidos gordos livres de cadeia longa e 5% de outros lípidos, representando 5 a 15% do conteúdo total que compõe a CC.^[20] Na CC as proteínas representam cerca de 75 a 85% do conteúdo total desta camada, sendo o seu componente principal a queratina, que representa cerca de 80% do total de proteínas presentes nesta camada.^[1, 12, 20] No entanto, quando comparada com a epiderme viável esta camada apresenta um conteúdo hídrico relativamente pequeno, cerca de 7 a 20% da quantidade total da água da pele.^[25] Contudo, nesta camada da pele pertencente à epiderme não viável acredita-se que a água exerce funções de plasticidade, o que contribui para evitar a rutura/clivagem e a descamação da CC que pode ocorrer devido a tensões mecânicas.^[23]

Imediatamente abaixo da CC encontra-se localizada a epiderme viável que é constituída pelas restantes quatro camadas que compõem a epiderme, ou seja, pela camada clara seguida da camada granulosa e da camada escamosa e, por último, pela camada basal que corresponde à camada mais interna e profunda da epiderme.^[2, 18, 20] A camada clara é composta por 2 a 3 camadas de células lisas e aparentemente translúcidas da epiderme.^[18, 25] Esta camada é geralmente constituída por queratinócitos mortos, claros e achatados, sendo abundante na pele mais espessa, nomeadamente nas palmas das mãos e solas dos pés.^[2, 18, 25] A camada granulosa, é composta por 3 a 5 camadas de células e como o próprio nome indica possui uma aparência granulada devido a alterações que ocorrem nos queratinócitos à medida que são empurrados da camada escamosa para a camada granulosa.^[18, 25] Esta camada é constituída por células vivas, sendo composta por células achatadas que contêm grânulos de querato-hialina.^[12] Por sua vez, a camada escamosa é composta por 8 a 10 camadas de células, e como o nome sugere esta camada apresenta uma aparência espinhosa devido à abundância de desmossomas que preenchem os espaços intercelulares entre as células.^[15, 18, 25] Por último, a camada basal é composta por uma única camada de células.^[2, 18]

Outro componente fundamental da barreira epidérmica são as TJ, que são estruturas de adesão intercelular, que se encontram localizadas no espaço intercelular dos queratinócitos da camada granulosa.^[26, 27] Estas estruturas são constituídas por proteínas integrais

transmembranares, denominadas por claudinas, que também são referidas como sendo importantes na função de barreira. [26, 27] Através da sua seletividade quanto ao tamanho e caráter iônico das substâncias, as TJ regulam o transporte paracelular de água e solutos entre o meio interno e o ambiente, o que contribui para a manutenção das diferentes concentrações dos iões e solutos dos meios. [26, 27]

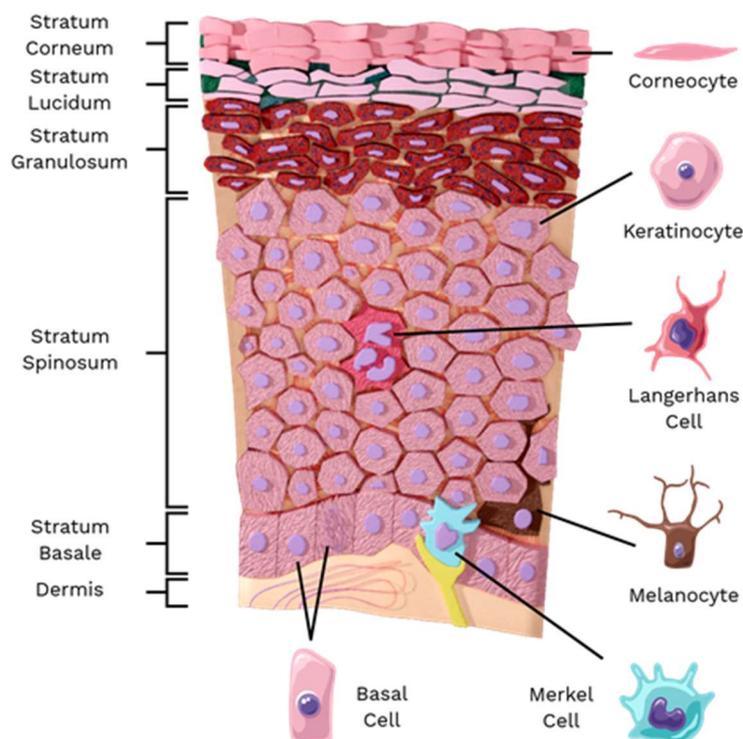


Figura 1. Representação esquemática da estrutura, divisão e composição da epiderme. Adaptado de 28

1.1.1.2. Derme

A derme corresponde à camada intermédia da pele que se situa entre a epiderme e a hipoderme, e cujas principais funções são conferir proteção, fornecer nutrição à epiderme e sustentá-la. [29, 30, 31, 32, 33] Esta camada possui uma espessura que varia entre as diferentes partes do corpo e de acordo com o sexo. [1,30, 34] A espessura média da derme é de 0,6 mm nas pálpebras, mas pode atingir até cerca de 4 mm nas palmas das mãos e nas solas dos pés, sendo a espessura desta camada maior nos homens relativamente às mulheres. [1, 14, 30, 34] A rede de tecido conjuntivo fibroso é o principal componente da derme que é composta maioritariamente por fibras conjuntivas de colagénio e elásticas de elastina. [1, 3, 11] As fibras de colagénio fornecem principalmente resistência / flexibilidade à tração, e a principal função da elastina é conferir resiliência e elasticidade à pele garantindo que esta quando esticada ou deformada retorna à sua posição original. [2, 4, 35, 36, 37] Entre os componentes fibrosos que compõem a derme encontra-se ainda uma substância fundamental extracelular amorfa, contendo glicosaminoglicanos, como o

ácido hialurônico, que é um importante componente da matriz extracelular dérmica devido à sua função na hidratação da pele. [3, 32]

Na derme existem ainda várias células especializadas, nomeadamente fibroblastos, que são o tipo celular mais predominante na derme e que são responsáveis pela síntese das proteínas estruturais extracelulares, como o colagénio, a elastina e os glicosaminoglicanos. [1, 11, 32, 34, 35] Além disso, existem ainda vários outros tipos celulares que compõem a derme como é o caso dos histiócitos, dos mastócitos e dos adipócitos que também contribuem para a manutenção da estrutura e funções normais da derme. [1, 11, 32, 34, 35] A derme contém ainda outros componentes extracelulares que incluem vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas (Figura 2 A). [1, 11, 29, 32] As glândulas sebáceas, também denominadas por glândulas holócrinas, encontram-se presentes em todas as superfícies do corpo, exceto nas palmas das mãos e nas solas dos pés, e consistem em estruturas semelhantes a um saco revestido por queratinócitos que se especializam em sebócitos. [29, 34, 38] Quando associadas aos folículos pilosos estas glândulas são responsáveis pela produção e libertação de sebo que consiste numa mistura composta por óleos complexos que incluem triglicerídeos e produtos resultantes da degradação de ácidos gordos, ésteres de cera, escalenos, ésteres de colesterol e colesterol. [34, 38] O sebo reveste a superfície da pele e do cabelo, e devido à sua composição lipídica complexa ajuda a prevenir a dessecação da pele, lubrificando-a e protegendo-a contra a ação de bactérias nocivas. [34, 36, 38] Os folículos pilosos juntamente com as glândulas sebáceas a ele associadas, com os músculos eretores e com as terminações nervosas formam uma unidade pilosebácea que só é encontrada na pele hirsuta. [34, 36] Esta unidade está envolvida na regulação da temperatura corporal, na função sensorial da pele e na manutenção da pele. [34, 36, 39] As glândulas sudoríparas têm origem na epiderme e localizam-se na derme profunda e no tecido subcutâneo, conectando-se à epiderme por meio de um canal, através do qual a secreção produzida é transportada para o exterior. [34, 36, 38] Existem dois tipos de glândulas sudoríparas: as glândulas écrinas e as glândulas apócrinas, que apresentam diferentes embriologias, histologias, distribuições e funções. [34, 39] As glândulas sudoríparas écrinas são as principais glândulas sudoríparas e encontram-se amplamente distribuídas por toda a superfície do corpo, concentrando-se sobretudo nas palmas das mãos, nas solas dos pés, testa e axilas. [34, 36, 38, 39] Estas glândulas sudoríparas são constituídas por um glomérulo secretor localizado na hipoderme e por um canal excretor que atravessa a derme e a epiderme de modo que as secreções sejam libertadas na superfície através de um pequeno poro. [34, 36, 38, 39] Estes tipos de glândulas sudoríparas estão envolvidas na regulação da temperatura corporal, pois são glândulas produtoras de suor, um líquido aquoso transparente composto principalmente por cloreto de sódio (NaCl) e água, que permite a perda de calor pelo corpo por evaporação quando a temperatura corporal aumenta. [34, 36, 38, 39] Esta atividade das glândulas sudoríparas écrinas é controlada pelo centro termorregulador no hipotálamo por meio de fibras nervosas simpáticas que enervam as glândulas sudoríparas. [38] Por sua vez, as glândulas sudoríparas apócrinas, também conhecidas como glândulas sudoríparas odoríferas, começam a funcionar na altura da puberdade e são semelhantes às anteriores, com a diferença que são mais

volumosas. ^[38] Estas encontram-se sobretudo localizadas nas axilas, nas regiões genitais, à volta dos mamilos e nas orelhas. ^[34, 38, 39] Uma vez que o tubo excretor constituinte destas glândulas sudoríparas não consegue atingir os poros específicos da superfície cutânea, a secreção produzida por estas é libertada através de um folículo piloso. ^[34, 38, 39] O suor produzido por este tipo de glândulas é muito diferente da secreção produzida pelas glândulas sudoríparas écrinas, sendo menos abundante e consistindo num produto viscoso rico em lípidos, proteínas e açúcares, que inicialmente é inodoro, mas pode desenvolver um odor após a exposição a bactérias. ^[36, 39, 40]

Para além disso, a derme possui uma rede complexa de vasos sanguíneos e linfáticos que estão envolvidos em importantes funções homeostáticas, nomeadamente na regulação da temperatura corporal, no fornecimento de nutrientes, oxigénio e metabólitos às células e na remoção de toxinas e produtos residuais produzidos pelos tecidos. ^[33, 34, 41, 42, 43] Esta troca entre os constituintes do sangue e os tecidos ocorre através da linfa intersticial. ^[41] Por sua vez, os vasos sanguíneos na derme são ainda cruciais para a manutenção da epiderme e dos apêndices epidérmicos. ^[32] Enquanto a maior parte dos vasos sanguíneos microvasculares estão localizados imediatamente abaixo da epiderme, os vasos linfáticos residem mais profundamente na derme. ^[42]

A derme é composta por duas áreas regionalmente e estruturalmente distintas, formadas a partir de diferentes linhas de fibroblastos: a derme papilar e a derme reticular, que possuem sobretudo diferenças ao nível das fibras que as compõem (Figura 2). ^[1, 14, 29, 30, 31] A derme papilar corresponde à camada mais fina da derme e pode atingir valores de espessura que rondam os 300 a 400 μm , dependendo da idade e da localização. ^[30, 31, 34] Esta corresponde à camada mais superficial da derme, que se situa imediatamente abaixo da epiderme, encontrando-se em contacto direto com a junção dermo-epidérmica. ^[1, 14, 29, 30, 32, 36] A derme papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo areolar, contendo capilares e fibras de colagénio de pequeno diâmetro (38 μm) intercaladas com fibras de elastina. ^[14, 25, 30, 31, 32, 33] Para além disso, esta camada mais superficial da derme contém ainda fibroblastos, um pequeno número de adipócitos, fagócitos que ajudam a combater bactérias ou agentes nocivos que rompem a pele, capilares linfáticos, fibras nervosas e recetores sensoriais chamados corpúsculos de Meissner. ^[25, 34] Por sua vez, os fibroblastos que constituem a derme papilar são considerados mais ativos, uma vez que proliferam rapidamente, possuem atividade metabólica aumentada e sintetizam mais proteoglicanos, mas menos colagénio quando comparados com os fibroblastos da camada reticular que existem em menor número nesta última camada. ^[31, 35, 44] Por outro lado, a derme papilar contém uma menor densidade de células e um maior teor de proteoglicanos quando comparada com a derme reticular. ^[31] A derme papilar possui ainda uma densidade polar desigual que diminui da direção da membrana basal para a derme reticular. ^[31] Subjacente à derme papilar encontra-se localizada a derme reticular que está em contacto com a hipoderme. ^[1, 25] Esta camada reticular caracteriza-se por ser mais compacta e espessa que a camada papilar, representado cerca de 80% da espessura da derme, e é constituída por fibras de colagénio de grande diâmetro (80 μm) entrelaçadas, com direção paralela à epiderme, misturadas com fibras elásticas, alinhadas com a superfície da pele. ^[14, 25, 33, 35, 37, 44] A camada reticular também contém ainda fibroblastos, distribuídos na parte superior, adipócitos,

distribuídos na parte inferior, mastócitos, terminações nervosas, vasos linfáticos e apêndices epidérmicos. [37, 45]

A epiderme encontra-se separada da derme pela zona da membrana basal cutânea também denominada por junção dermo-epidérmica. [1, 12] Esta região da pele é composta por uma rede de macromoléculas que permite a ligação dos filamentos intermediários de queratina dos queratinócitos basais presentes na epiderme com as fibras de colagénio presentes na derme superficial. [1] A principal função das proteínas e glicoproteínas presentes nesta membrana basal cutânea é conferir adesão / coesão entre a epiderme e a derme, mantendo as duas camadas unidas. [1, 12, 33]

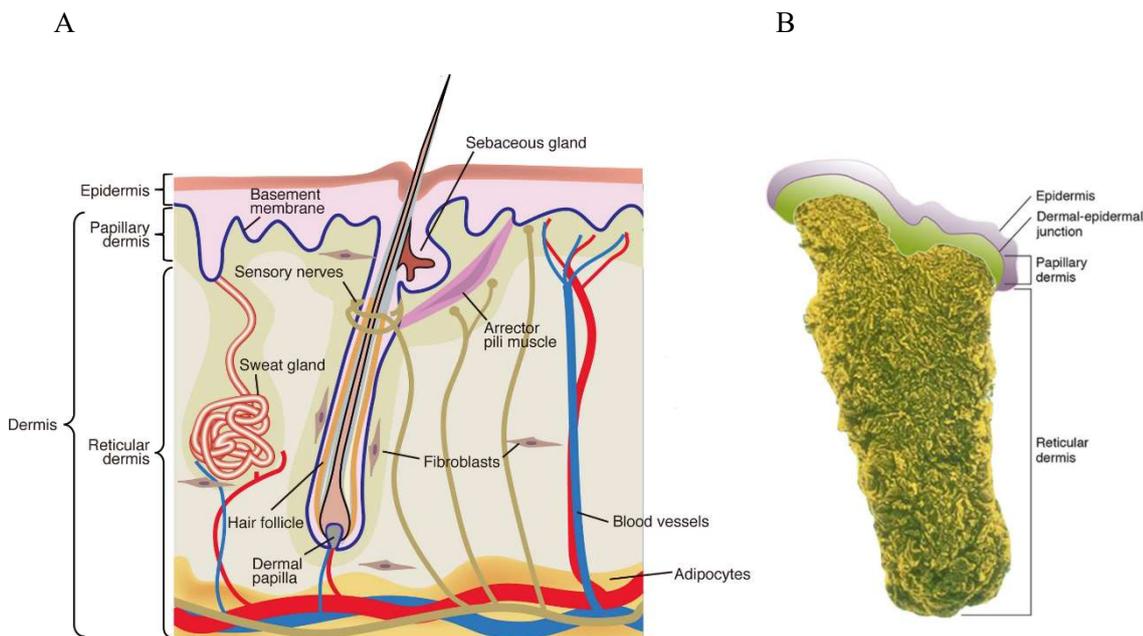


Figura 2. A- Representação esquemática da estrutura e composição da derme. B- Divisão da derme em derme papilar e derme reticular. Adaptado de 44 e 45

1.1.1.3. Hipoderme

A hipoderme, também conhecida como camada subcutânea ou tecido subcutâneo, diz respeito à camada mais interna, profunda e espessa da pele que se localiza imediatamente abaixo da derme, encontrando-se ligada a esta através das fibras de colagénio e elastina que se originam na derme e se estendem até à hipoderme. [1, 18, 25] A espessura desta camada subcutânea varia de acordo com o sexo e de região para região do corpo, podendo atingir valores que variam entre os 1,9 e os 7,1 mm. [3, 47] A hipoderme consiste em tecido conjuntivo areolar bem vascularizado onde se encontram localizados os vasos sanguíneos e linfáticos maiores, sendo composta maioritariamente por adipócitos, que permitem o armazenamento de gordura nesta camada, mas também por fibroblastos e macrófagos (Figura 3). [2, 14, 25, 47] No entanto, apesar da hipoderme poder ser vista principalmente como um tecido usado no armazenamento de gordura, esta exerce ainda outras funções importantes, uma vez que desempenha um papel importante na sustentação

da derme e da epiderme, fornece proteção e resistência mecânica, permite a regulação da temperatura corporal e está envolvida na produção de hormonas. [2, 3, 11, 14, 47]

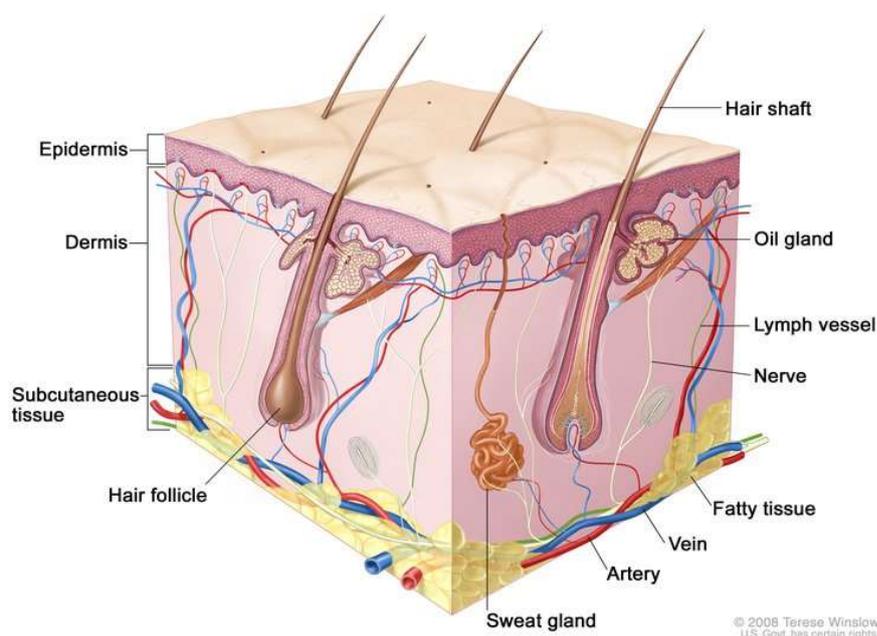


Figura 3. Representação esquemática da estrutura e composição da hipoderme. Adaptado de 48

1.2. Dermatite Atópica

A Dermatite Atópica (DA), também denominada por eczema atópico, é uma das dermatoses mais comuns em todo o mundo, com uma incidência crescente nas últimas décadas, nomeadamente nos países ocidentais desenvolvidos, e com um impacto negativo ao nível socioeconómico e na qualidade de vida dos pacientes afetados. [49, 50, 51] Contudo, esta dermatose afeta não só os doentes, mas também os seus cuidadores. [51, 52, 53] É, por isso, fundamental um controlo adequado das manifestações clínicas associadas à DA.

De forma geral, a DA caracteriza-se por ser uma doença inflamatória crónica da pele, recorrente e heterogênea que possui um espectro clínico variável: é intermitente, de carácter recidivante e é observada em indivíduos com história pessoal ou familiar de eczema. [51, 52, 53, 54] Habitualmente esta é uma doença que se desenvolve durante a infância, mais comumente entre os 3 e 6 meses de idade, e que está associada a uma hiper-reatividade cutânea que resulta de uma complexa interação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. [49, 51, 52] Embora os mecanismos exatos por trás da patogénese desta doença ainda não se encontrem totalmente esclarecidos, considera-se que esta resulta de uma tríade que envolve: disfunção da barreira da pele, desregulação do sistema imunitário e alteração da colonização da pele. [55, 21]

No que diz respeito aos sintomas, a DA é caracterizada por surtos de lesões eczematosas localizadas ou disseminadas, geralmente acompanhadas de eritema, edema, prurido intenso, pele seca, bem como por exsudação e escoriações, devido a danos causados pelos frequentes

arranhões. ^[53, 56] No entanto, a apresentação clínica destes sintomas é altamente variável, dependendo da idade do paciente e da gravidade da doença, conforme ilustrado na Figura 4. ^[56] As lesões da DA aguda caracterizam-se pela presença de extensas áreas de pele seca, comichão incessante e vermelhidão com ou sem pele gretada, espessamento da pele em áreas mais extensas, sangramento, exsudação, fissuras e alteração da pigmentação. ^[57] A DA moderada é definida por áreas de pele seca, comichão frequente e vermelhidão com ou sem pele gretada ou espessamento localizado da pele. ^[57] Por sua vez, a DA ligeira é caracterizada por áreas de pele seca, comichão pouco frequente, com ou sem pequenas áreas de vermelhidão. ^[57] A DA surge ainda associada a outras patologias de base atópica, nomeadamente a asma, a rinite alérgica e a alergias alimentares, devido à disfunção da barreira cutânea que facilita a penetração de alérgenos, o que conduz a uma reação desregulada por parte do sistema imunológico. ^[51, 53, 57] Contudo, sendo esta uma patologia altamente pruriginosa, com impacto na qualidade de vida dos doentes e dos seus familiares, recentemente distúrbios psicológicos e até mesmo psiquiátricos têm sido relatados como comorbidades relevantes associadas à DA. ^[53, 54]

Por sua vez, o diagnóstico da DA depende da apresentação clínica, uma vez que atualmente ainda não existem biomarcadores confiáveis que possam ser usados para diagnosticar e diferenciar rotineiramente a DA. ^[51] Segundo as diretrizes da *American Academy of Dermatology* (AAD) o diagnóstico clínico deve ser baseado nas características morfológicas, no historial clínico do paciente, na distribuição das lesões cutâneas e nos sinais clínicos associados à doença. ^[51, 58]

Atualmente as estratégias de tratamento para a DA têm como objetivos fundamentais o alívio ou eliminação dos sintomas clínicos e fatores agravantes, a redução e prevenção da sua recorrência e o tratamento das comorbidades associadas, de forma a melhorar a qualidade de vida dos pacientes. ^[49, 54] Contudo, estas abordagens atuais possuem uma eficácia clínica limitada e estão associadas a efeitos adversos, o que demonstra a necessidade da descoberta de novos agentes terapêuticos para uso tópico para o tratamento da DA. ^[53]



Figura 4. A- Visão aproximada de uma pele saudável. B- Pele com DA que não apresenta lesões. C- Pele com DA em fase aguda da doença. D- Pele com DA em fase subaguda da doença. E- Pele lesionada em fase crónica da doença. Adaptado de 59

1.2.1. Prevalência da Dermatite Atópica

A prevalência da DA é complexa e varia amplamente em todo o mundo de acordo com a faixa etária e a localização geográfica. ^[50, 51]

De acordo com os dados da iniciativa *Global Burden of Diseases* da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que a DA afete pelo menos 230 milhões de pessoas em todo o mundo. ^[60] Na maioria das vezes a DA tem início na idade pediátrica. ^[49, 51] Cerca de 80% dos casos de doença geralmente começam na infância, sendo a faixa etária mais afetada a das crianças, com uma prevalência estimada que varia entre os 15 e os 20%, embora alguns estudos sugiram que possa atingir até 25%. ^[52, 57, 61, 62] Ainda dentro desta faixa etária, estima-se que 45% dos casos sejam diagnosticados nos primeiros 6 meses de vida, 60% durante o primeiro ano e 80 a 90% antes do quinto ano de vida. ^[61, 63] Por sua vez, evidências sugerem que 25% das crianças que desenvolvem DA antes dos 2 anos de idade desenvolverão sintomas persistentes da doença nos anos subsequentes. ^[60, 62]

Embora estudos iniciais tenham sugerido uma remissão da DA em 70 a 75% das crianças afetadas, com apenas casos mais graves persistindo na idade adulta, cerca de 10 a 30%, estudos mais recentes mostraram que a proporção de pacientes com doença persistente após a infância ou com início na idade adulta é muito maior. ^[21, 60, 61, 62] Assim, novas evidências mostram que a DA também é muito prevalente na idade adulta, estimando-se que afete 1 a 3% dos adultos, embora alguns estudos sugiram que possa atingir até 10%. ^[56, 61] Por sua vez, o decurso da DA pode ser contínuo ao longo dos anos, mas também pode apresentar um padrão recorrente-remitente. ^[60]

Quanto à prevalência da DA com a localização geográfica, existem diferenças relevantes entre os países de todo o mundo, e até mesmo entre populações geneticamente semelhantes. ^[50, 51]

Os países com maior prevalência de DA são os países desenvolvidos, onde o número geral de casos aumentou cerca de 2 a 3 vezes nas últimas décadas, nomeadamente nos Estados Unidos da América (EUA), na Europa e no Japão. ^[58, 60, 62] No entanto, nos países em desenvolvimento, especialmente em países da Ásia, da África, da América Latina e do Médio Oriente, a prevalência da DA também tem aumentado, nomeadamente em crianças. ^[64]

No que diz respeito à população portuguesa, de acordo com um estudo publicado no ano de 2018 sobre a prevalência da DA em Portugal, cerca de 0,7% a 1,6% da população adulta foi diagnosticada como portadora de DA no ano de 2017, dentro dos quais 40 a 45% foram diagnosticados como possuindo doença moderada ou grave. ^[65] Neste mesmo estudo, foi ainda relatado um aumento do número de casos de DA na faixa etária adulta em Portugal nos últimos 3 anos, em que a maior parte dos pacientes, cerca de 48%, são jovens adultos, com idades compreendidas entre os 18 e os 35 anos. ^[65]

1.2.2. Fisiopatologia da Dermatite Atópica

A fisiopatologia da DA é indubitavelmente complexa e multifatorial. [49, 51] Embora os mecanismos exatos da patogênese ainda não sejam compreendidos na sua totalidade, numerosos estudos consideram que esta dermatose resulta de uma tríade que envolve: disfunção da barreira cutânea, desregulação do sistema imunitário e alteração da colonização da pele. [21,51,55]

Dois teorias distintas foram propostas para explicar genericamente a fisiopatologia da DA: a teoria denominada de “fora para dentro” e a teoria denominada de “dentro para fora”. [62, 66] A primeira teoria sugere que a disfunção da barreira epidérmica, ao permitir a passagem de substâncias vindas do exterior, comporta-se como um fator desencadeante da resposta imunitária. [62, 66] Por oposição, a segunda teoria aponta que uma resposta imunológica desregulada, com aumento da predisposição para respostas inflamatórias, conduz a um dano/disfunção da barreira cutânea. [62,66] Atualmente, considera-se que estas teorias, mais do que mutuamente exclusivas, parecem ser na realidade complementares, uma vez que a base fisiopatológica da DA parece resultar da inter-relação entre estas duas hipóteses. [62,66]

1.2.2.1. Disfunção da barreira cutânea

A disfunção da barreira cutânea é uma alteração fisiopatológica comum a todos os doentes diagnosticados com DA. [67]

Na DA a disfunção da barreira cutânea depende da combinação e acumulação quer de fatores endógenos / intrínsecos quer de fatores exógenos / extrínsecos. [59] Em relação aos fatores endógenos, os principais são as alterações que ocorrem ao nível das duas maiores estruturas da barreira epidérmica, ou seja, da CC e das TJ (Figura 5). [59, 65] Em contrapartida, relativamente aos fatores exógenos, onde se podem incluir os fatores ambientais, como a poluição e poeiras, são referidos o aumento do pH da pele pela exposição a sabões e detergentes, a erosão repetida da pele em consequência do prurido associado à DA e a presença de microrganismos e alérgenos proteicos com atividade enzimática. [59,60]

No que diz respeito aos fatores endógenos relacionados com a CC, as principais alterações que ocorrem a este nível são responsáveis pelas características fisiopatológicas da DA, e incluem particularmente alterações nas suas proteínas estruturais, nomeadamente na FLG, alterações na camada lipídica e alterações ao nível dos queratinócitos. [21,49, 52, 59, 65]

Dentro das proteínas estruturais da CC, destaca-se a FLG que é considerada uma proteína-chave da barreira cutânea devido às suas propriedades agregantes, que contribuem para a integridade estrutural e mecânica da CC. [21, 65] Além disso, os produtos de degradação da FLG constituem o fator de hidratação natural da epiderme (NMF, do inglês *Natural Moisturizing Factor*) que é essencial para manter a integridade da barreira cutânea, uma vez que o NMF desempenha um papel importante na regulação da hidratação cutânea e na modulação do pH, mas também na defesa antimicrobiana, na fotoproteção, e na elasticidade da pele. [21, 54, 65, 66] Atualmente, é aceite que alterações / diminuições na proteína estrutural FLG constituem um fator crucial para a disfunção da barreira cutânea. [65] Defeitos na proteína FLG podem ser devidos a

mutações genéticas, documentadas em 10 a 50% dos doentes com DA, mas também a fatores secundários, nomeadamente causados pelo ambiente externo, que incluem irritação e dano mecânico ou até mesmo devido a ação desequilibrada de citocinas pró-inflamatórias e à presença de microrganismos colonizadores da pele. [21, 54, 59, 65, 66, 67] A deficiência na proteína FLG afeta várias vias que são relevantes para a função da barreira da pele, uma vez que uma pele com DA que é deficiente em FLG possui uma maior permeabilidade da CC, devido ao facto da matriz lipídica intracelular dos corneócitos se encontrar prejudicada, o que faz com que a função de barreira da CC se encontre também ela prejudicada. [21, 54] O resultado mais imediato da deficiência de FLG na DA é a diminuição da hidratação da CC devido à diminuição do NMF, o que gera um gradiente de água ao longo deste estrato, que culmina com o aumento da água que é capaz de passar a epiderme, denominada perda de água transepidermica (TEWL, do inglês *Transepidermal Water Loss*). As alterações da FLG conduzem ainda ao aumento do pH da CC, à alteração da formação dos lípidos, à interrupção da diferenciação dos queratinócitos, à alteração da formação das TJ e à modificação do microbioma cutâneo que conduz a uma maior suscetibilidade a infeções cutâneas. [54, 59, 65, 66]

Paralelamente à diminuição da hidratação da CC, ocorre um aumento do pH desta camada que em condições normais apresenta um pH ácido. [68] Isto deve-se à diminuição da produção de produtos da FLG resultantes da diminuição da FLG, nomeadamente de ácidos policarboxílicos, que contribuem para a manutenção do pH ácido da pele. [68] Contudo, o aumento do pH da CC estimula a atividade das serina-proteases, que promovem a diminuição da função das enzimas envolvidas na síntese de lípidos e a degradação prematura das proteínas dos corneodesmosomas que estão envolvidas na descamação adequada da CC. [54, 55, 69]

Os lípidos, em particular as ceramidas, encontram-se reduzidos em quantidade tanto na pele lesionada como na pele não lesionada de pacientes com DA. [21, 26, 66] Em pacientes com DA cuja pele se encontra lesionada, tanto as ceramidas como os ácidos gordos livres e os ácidos gordos esterificados, apresentam estruturas cujo comprimento das suas cadeias se encontra mais reduzido. [21, 26] Em consequência da redução das estruturas ocorrem modificações na organização da estrutura lipídica com diminuição da densidade de lípidos, o que se reflete num aumento da TEWL e no favorecimento da penetração de alérgenos através da barreira cutânea. [21, 26]

Por sua vez, modificações na diferenciação dos queratinócitos também podem ser encontradas na pele de pacientes com DA, o que influencia diretamente a função de barreira da CC. [70]

Relativamente às TJ que também são importantes para a função de barreira epidérmica, verifica-se que em doentes com DA existe uma menor expressão de claudina-1 comparativamente a indivíduos sem doença. [26, 66, 69] Esta redução da expressão de claudina-1 afeta significativamente a integridade das TJ, que desempenham um papel importante na retenção hídrica assim como na penetração de agentes alérgenos e patogénicos na epiderme. [66] Quando as TJ se encontram lesadas, ocorrem alterações ao nível da permeabilidade da barreira, havendo um aumento da passagem de macromoléculas que facilita a entrada de agentes irritantes, alérgenos

e patogénicos, e uma perda da permeabilidade seletiva dos iões. [71, 72] Perante as TJ lesadas, verifica-se ainda que as dendrites das CL conseguem atravessar facilmente estas estruturas atingindo a superfície da CC onde podem captar mais superficialmente antígenos exógenos (Figura 5). [71, 72] Por sua vez, a sensibilização cutânea a alérgenos exógenos é frequentemente um evento relevante na patogénese da DA e está dependente sobretudo da disfunção da barreira cutânea.

Como resultado das alterações descritas, a barreira da pele encontra-se disfuncional, o que pode conduzir à atividade da doença.

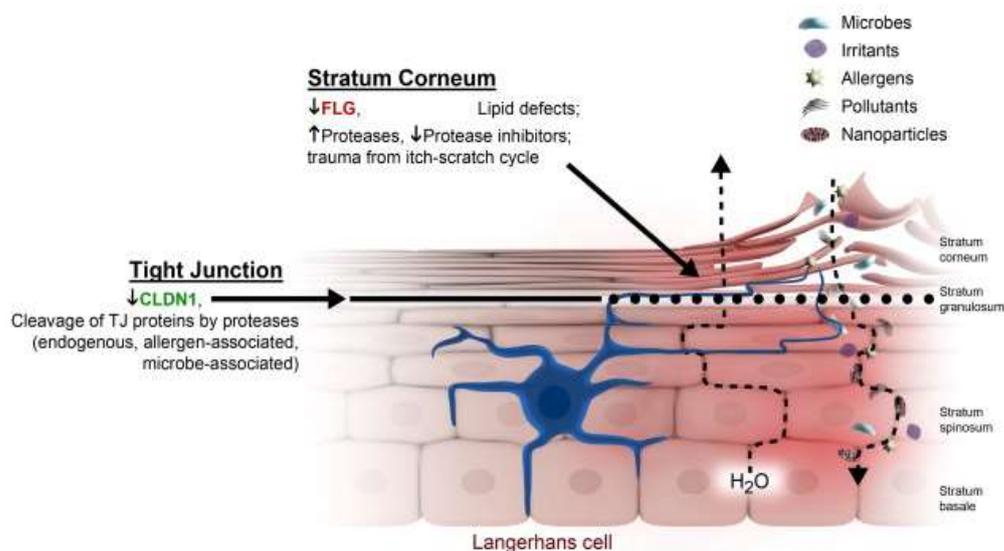


Figura 5. Representação esquemática das anomalias que ocorrem ao nível da barreira epidérmica, ou seja, ao nível da camada córnea e ao nível das *Tight Junctions*, numa pele com DA. Adaptado de 71

1.2.2.2. Desregulação do sistema imunitário

Ao nível imunológico a DA é geralmente conhecida como uma doença causada por uma resposta mediada por linfócitos T *helper* 2 (Th2). [73] No entanto, o que ocorre é um padrão de resposta T *helper* 1 (Th1) ou Th2, dependendo se se trata de uma pele lesada ou não e consoante a fase da doença e a evolução das lesões (Figura 7). [70, 74] De acordo com a resposta imune que preside, a DA pode ser diferenciada em aguda ou crónica. [75] Em comparação com indivíduos saudáveis, mesmo na pele de doentes com DA sem lesões, existe inflamação subclínica com aumento do número de células Th2, que expressam as IL-4 e IL-13, T *helper* 22 (Th22), que expressam IL-22, e em menor grau de T *helper* 17 (Th17) responsáveis pela síntese de IL-17. [66] Durante a fase aguda da doença há um aumento significativo destas células com sobre-expressão de citocinas pró-inflamatórias por elas sintetizadas. [66, 75, 76] Em oposição, durante a fase crónica da DA, há um predomínio de resposta linfocitária Th1 que expressa sobretudo IL-2, IL-12, interferão- γ (IFN- γ), fator de transformação de crescimento β_1 (TGF- β_1) e outras citocinas. [75, 76]

Assim, a DA é considerada uma doença bifásica mediada por células T, apresentando uma resposta Th2 inicial seguida de uma resposta Th1 na fase crônica. [61, 75] A acumulação de linfócitos T e o ambiente de citocinas pró-inflamatórias são os principais responsáveis pela inflamação cutânea na DA. Por sua vez, as células T reguladoras (T reg) que controlam a inflamação cutânea, encontram-se presentes em níveis inferiores na pele de pacientes com DA. [77, 78]

Na DA, os fenômenos imunológicos e pró-inflamatórios, resultantes da ativação de células Th2 na pele, irão por um lado agravar a disfunção da barreira cutânea e, por outro, iniciar ou exacerbar a inflamação subjacente à doença. [26, 79] A proliferação de células Th2 e a consequente produção de citocinas de perfil Th2 tem vários efeitos a nível local que contribuem sobretudo para a perda de integridade da barreira cutânea. [68, 77] Independentemente do genótipo da FLG, as IL-4 e IL-13 reduzem a expressão de proteínas estruturais da barreira cutânea, nomeadamente de FLG, e suprimem a diferenciação queratinócita. [26, 66, 70, 78, 79, 80, 81, 82] Além disso, também contribuem para a diminuição dos níveis séricos de ceramidas e ácidos gordos de cadeia longa e facilitam a invasão de microrganismos, o que compromete ainda mais a integridade da CC. [66, 74, 78] Tal como as IL-4 e IL-13, também a IL-22 produzida pelas células Th22 é responsável pela disfunção da barreira cutânea e pelo aumento da espessura da epiderme denominada por hiperplasia epidérmica. [66, 78] A IL-31 é outra citocina associada à resposta linfocitária Th2 que também tem sido implicada na disfunção da barreira cutânea, apresentando um papel semelhante às interleucinas produzidas pelas células Th2 e Th22. [66, 78] Contudo, atualmente a IL-31 tem sido clinicamente considerada o mediador *major* do prurido, havendo evidências de que os seus níveis séricos sejam proporcionais à gravidade da doença. [26, 66, 75] Além disto, IL-4, IL-13 e IL-31 estimulam diretamente os neurónios sensoriais, resultando num estado de prurido que contribui para o agravamento da DA. [70] Por sua vez, o coçar repetitivo no local pelo indivíduo devido ao prurido, perpetua a erosão da pele e consequentemente a lesão da barreira cutânea, promovendo a penetração de agentes alergénios e irritantes que promovem ainda mais a reação imune, através da ativação e infiltração de células pró-inflamatórias que secretam citocinas como a Linfopoiétina Estromal Tímica (TSLP, do inglês *Thimic Stromal Lymphopoeitin*), dando origem a um ciclo vicioso, como ilustrado na Figura 6. [26, 66, 70] TSLP é uma citocina que é libertada pelos queratinócitos em resposta a uma agressão ou penetração de alergénios na barreira cutânea e estimula a produção de citocinas pelas células Th2, nomeadamente de IL-4 e IL-13, sendo um fator crítico de ligação entre a disfunção da barreira cutânea e a ativação da resposta imune. [26, 66, 74] Por sua vez, a IL-17, secretada pelos linfócitos Th17 encontra-se associada a lesões agudas, estando presente em níveis mais reduzidos na DA. [75] Para além desta última citocina mediar negativamente a expressão de FLG, esta atua também como um importante regulador da produção do peptídeo antimicrobiano (AMP, do inglês *Antimicrobial Peptides*) nos queratinócitos. [74, 76] Níveis relativamente baixos de IL-17 resultam numa diminuição da produção de AMPs, o que pode explicar o aumento da suscetibilidade a

infecções bacterianas em pacientes com DA, uma vez que a função de barreira antimicrobiana depende da produção de AMP. [74,76]

Nas lesões crônicas, observa-se a par da inflamação e do dano da barreira uma remodelação da pele. [74, 76] Das citocinas segregadas pelos linfócitos Th1 destaca-se o papel do IFN- γ que é responsável pela apoptose dos queratinócitos, desempenhando um papel importante na promoção da inflamação e na estimulação da regeneração de tecidos. [67, 74, 76]

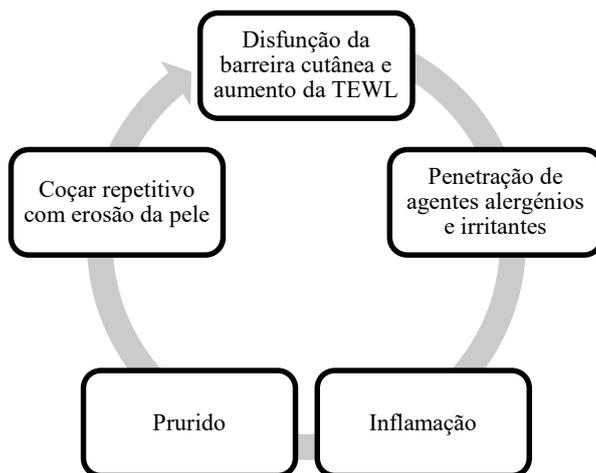


Figura 6. Ciclo prurido-coçar-prurido que contribui ainda mais para a disfunção da barreira cutânea e para a TEWL e, conseqüentemente, para a penetração de agentes alérgenos e irritantes que promovem o estado inflamatório.

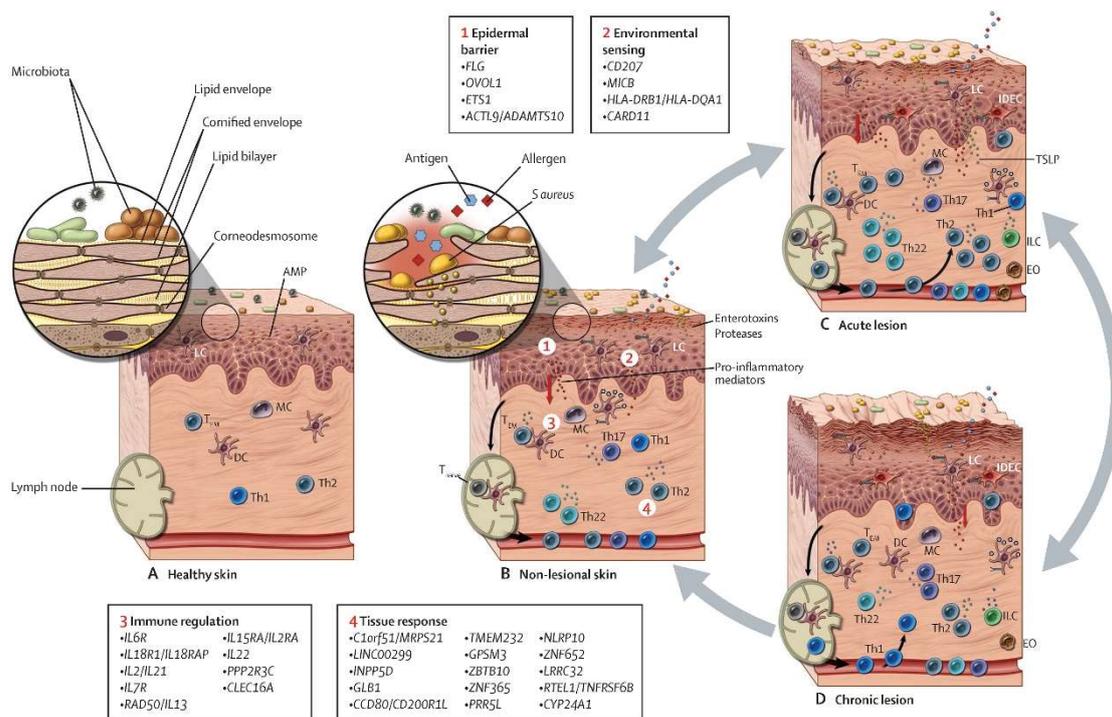


Figura 7. Principais alterações fisiopatológicas que ocorrem numa pele com DA. **A-** Pele saudável. **B-** Pele com DA que não apresenta lesões, mas em que se verifica uma disfunção da barreira cutânea, o que torna a pele mais suscetível a fatores externos, bem como à alteração do seu microbioma. Adicionalmente, verifica-se a existência de uma inflamação subclínica subjacente com o aumento de células Th2 que quando estimuladas levam à sobre-expressão de citocinas inflamatórias. **C-** Pele com DA em fase aguda da doença. Nesta última, verifica-se uma amplificação das respostas Th2 e Th22. **D-** Pele com DA em fase crónica da doença. Neste caso, observa-se uma ativação contínua de células Th2 e Th22 e uma ativação das células Th1 e Th17. Adaptado de 59

1.2.2.3. Alteração da colonização da pele na DA

A pele é colonizada por inúmeros microrganismos vivos, como bactérias, fungos e vírus, que vivem na sua superfície e que no seu conjunto formam o microbioma da pele. [83, 84] A composição desta comunidade varia entre os indivíduos, mas varia ainda mais dependendo do estado em que a pele se encontra. [83]

Contudo, a flora microbiana da pele pode entrar num estado de disbiose, que é definido como uma mudança na composição relativa dos diferentes micróbios em relação ao normal, durante um estado de doença. [83] Isto encontra-se bem descrito na DA, uma vez que a DA tem uma associação bem conhecida com o microbioma da pele alterado. [83, 85]

Devido à disfunção da barreira epidérmica e à desregulação do sistema imune, a pele de doentes com DA é suscetível a ser colonizada e infetada por agentes microbianos, o que mostra que as defesas antimicrobianas também se encontram comprometidas nesta patologia. [54, 58, 83] Assim, na pele de pacientes com DA, verifica-se uma diminuição da diversidade normal da

microflora, o que se traduz no aumento da colonização por microrganismos patogénicos. [58, 86] Esta alteração, por sua vez, aumenta a suscetibilidade a infeções cutâneas, o que constitui uma comorbidade importante que leva a um agravamento das lesões. [58, 86]

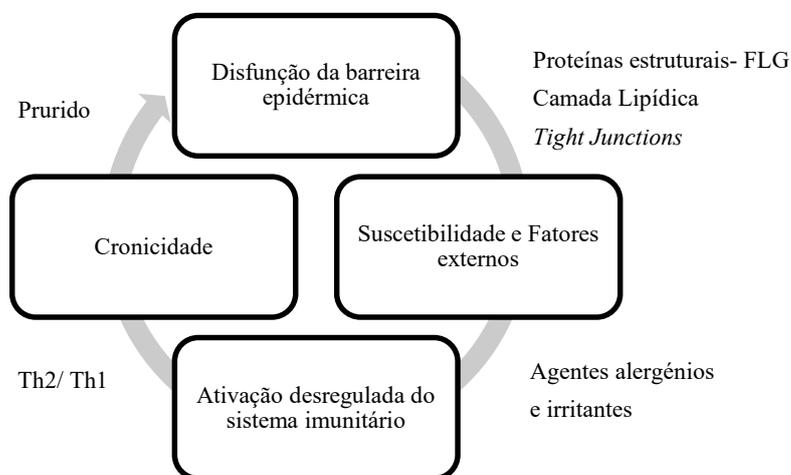


Figura 8. Esquema resumo da fisiopatologia da DA. Adaptado de 66

1.2.3. Tratamento da DA

Como referido anteriormente, a DA é das doenças atópicas com maior prevalência na sociedade, o que tem levado a um interesse crescente na prevenção e na procura de tratamentos para esta patologia. Esta continua a ser uma doença para a qual ainda não existe cura tendo, por isso, o seu tratamento como objetivos principais a remissão das lesões agudas, a redução e a prevenção da sua recorrência, o alívio ou eliminação dos sintomas clínicos e fatores agravantes e o tratamento das comorbidades associadas, nomeadamente do prurido e das infeções cutâneas. [49, 54, 87] Apesar do tratamento da DA ser complexo, os objetivos das medidas terapêuticas passam pela reparação da barreira cutânea, redução da inflamação e pela normalização do microbioma da pele através da evicção a agentes desencadeantes e exacerbadores das lesões. [60, 88] A escolha terapêutica deve considerar a variabilidade clínica individual da doença, nomeadamente o grau de severidade da doença e a identificação de fatores desencadeantes individuais, mas também o efeito dos medicamentos a longo prazo e os seus efeitos secundários, devido à natureza crónica e recidivante da DA. [60, 87, 88]

A seleção da terapia é amplamente baseada na gravidade da doença em termos clínicos, tendo por base a avaliação das lesões e dos sintomas dos doentes, bem como a presença de comorbidades associadas, e idade dos pacientes. [60, 88] Contudo, independentemente da gravidade, todos os doentes devem ter cuidados básicos essenciais com a pele, que dependem fundamentalmente de medidas tópicas não farmacológicas de hidratação e higiene da pele. [60, 87, 88, 89] A estas medidas de tratamento não farmacológico, podem ainda acrescer medidas de tratamento farmacológico, que incluem o uso de fármacos tópicos e raramente de fármacos

sistêmicos, dependendo da gravidade clínica e da idade dos doentes, com o objetivo de reprimir a inflamação da pele. [60, 88]

1.2.3.1. Tratamento não farmacológico

A abordagem não farmacológica consiste no tratamento base de todos os doentes com DA e tem como principal objetivo ajudar a restabelecer a função normal da barreira da pele. [54, 60, 75, 88] Este tipo de tratamento engloba limpeza e hidratação diária da pele. [54, 60, 75, 88, 90] A limpeza diária da pele é importante para remover antígenos e microrganismos da superfície da pele e durante as exacerbações da doença para também desbridar as crostas. [54, 87, 90] Contudo, a hidratação cutânea é um componente-chave do tratamento da DA devido à TEWL. [60, 90] Os hidratantes contribuem para o amaciamento da pele através do aporte de lípidos exógenos, redução da TEWL por formação de uma camada oclusiva, diminuição da secura e da inflamação cutânea, bem como do prurido. [88, 90] Com base nos seus efeitos específicos na pele, os hidratantes podem classificar-se em oclusivos, quando proporcionam uma camada lipídica na superfície da pele para atrasar a TEWL, humectantes, quando aumentam a capacidade de retenção de água na CC e emolientes, quando lubrificam e amaciam a superfície da pele ao ocuparem os espaços cutâneos com gotículas de óleo. [54, 60, 90] Para além da limpeza e hidratação da pele, também é importante limitar fatores de irritação cutânea, nomeadamente fatores adversos exógenos e fatores desencadeantes específicos, como alérgenos, e inespecíficos, como o vestuário, devido por exemplo à presença de materiais irritantes para a pele. [54, 60, 75, 87, 88] Por sua vez, a educação dos doentes também é importante para garantir o sucesso e a adesão a este tipo de terapêutica. [88]

1.2.3.2. Tratamento farmacológico

Na DA a terapia farmacológica, com fármacos tópicos e sistêmicos, é habitualmente destinada a casos agudos da doença e ao tratamento das comorbidades associadas à mesma. [59, 89, 90] Contudo, o tratamento farmacológico pode ainda ser usado em pacientes com DA com maior gravidade como tratamento de manutenção. [60, 87, 88]

Por sua vez, é importante referir que a maioria dos pacientes com DA não necessita de tratamento farmacológico com fármacos sistêmicos. [91] Este tipo de tratamento de terceira linha é apenas usado em casos em que o tratamento com fármacos tópicos falha ou não é suficiente. [91]

1.2.3.2.1. Fármacos tópicos

No caso dos tratamentos recorrendo ao uso de fármacos tópicos, os agentes tópicos utilizados na DA são anti-inflamatórios, esteroides ou não-esteroides, que visam suprimir o processo inflamatório local. [54, 87, 92] Este tratamento anti-inflamatório baseia-se no uso de corticosteroides e inibidores da calcineurina. [54, 87, 92] Apesar da terapêutica ser escolhida de forma individual, de acordo com a idade, fase, gravidade e local das lesões, os corticosteroides são classicamente os fármacos anti-inflamatórios de primeira linha utilizados no tratamento da DA, uma vez que proporcionam efeitos mais rápidos que levam tanto à diminuição da inflamação

como do prurido. [54, 87, 92, 93] Contudo, o uso destes fármacos é limitado devido aos efeitos adversos que originam e à segurança a longo prazo. [54, 87, 92, 93] Quando usados por longos períodos de tempo, estes tendem a comprometer a barreira cutânea e apresentam riscos de eventos cutâneos adversos, como diminuição da espessura da pele, aparecimento de estrias, hematomas e telangiectasias. Por sua vez, os inibidores da calcineurina são especialmente úteis no caso de doentes insensíveis aos corticosteroides e nos casos em que é necessária uma utilização mais prolongada da terapêutica. [54, 87, 92, 93] Por outro lado, os inibidores tópicos da calcineurina permitem tratar de forma eficaz a DA sem prejudicar a barreira da pele, estando apenas associados a reações adversas no local de aplicação, que tipicamente são reações transitórias e de natureza leve a moderada. [92, 93]

Uma das moléculas que se encontra amplamente descrita na literatura e que tem sido alvo de muitas investigações para o tratamento da DA moderada a severa é a Ciclosporina A (CyA) que pertence à classe dos inibidores da calcineurina. A administração tópica de CyA é atualmente uma estratégia promissora para tratar doenças cutâneas, nomeadamente a DA, uma vez que evita os efeitos colaterais que se encontram associados não só à administração dos corticosteroides tópicos, mas também da administração sistémica.

1.2.3.2.1.1. Ciclosporina A

A Ciclosporina A (CyA), $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$, consiste num peptídeo cíclico e lipofílico de 11 aminoácidos, com peso molecular de 1203,63 Da, cuja estrutura se encontra representada na Figura 9. [94, 95, 96, 97] Esta é uma molécula que é isolada a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, habitante do solo, e é conhecida pelas suas poderosas propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras. [95, 96, 97]

Este agente imunomodulador pertence à classe dos inibidores da calcineurina e o seu mecanismo de ação inclui a inibição da ativação e da proliferação das células T através da supressão da transcrição de mediadores inflamatórios (Figura 10). [95, 97, 99] A CyA exerce a sua atividade imunossupressora através da ligação à proteína intracelular ciclofilina-1 (Cyp1), uma proteína encontrada no citosol na maioria das células T. [97, 98, 99, 100] O complexo CyA-Cyp1, resultante desta ligação, inibe a calcineurina, uma molécula necessária para a transcrição de genes de citocinas, bloqueando a secreção de citocinas pró-inflamatórias através da inibição do fator de transcrição denominado Fator Nuclear de Células T ativadas (NFAT, do inglês *Nuclear Factor of activated T-cells*), resultando assim numa diminuição da inflamação. [97, 98, 99] O NFAT ajuda a regular a produção de várias citocinas pró-inflamatórias importantes envolvidas na DA, incluindo a IL-2, IL-4 e o IFN- γ . [97] Acredita-se que a inibição específica da IL-2, que desempenha um papel crítico na ativação e proliferação de células T, seja responsável pelo principal mecanismo de imunossupressão da CyA, uma vez que a inibição de NFAT bloqueia a transcrição de IL-2 o que leva à inibição da proliferação de células T, como ilustrado na Figura 10. [97, 100, 101, 102] Assim, o efeito global da CyA consiste na redução do número e atividade das células pró-inflamatórias nos locais de inflamação. [97, 98]

Inicialmente, devido às suas propriedades imunossupressoras, a CyA começou por ser usada sistemicamente na medicina humana para prevenir a rejeição de órgãos transplantados (fígado, rim, coração e pulmão). [95, 96, 98] Mais tarde, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em dermatologia, para o tratamento sistémico de doenças inflamatórias e imunes da pele, nomeadamente para o tratamento da DA moderada a grave e da psoríase. [95, 96, 98]

A eficácia da CyA no tratamento oral da DA, tanto pediátrica como adulta, encontra-se bem documentada em diversos estudos controlados randomizados. [91, 99] As doses de CyA usadas variam tipicamente entre os 0,5 mg/kg/dia e os 5 mg/kg/dia. [91, 99] Contudo, o uso prolongado deste fármaco é limitado a uma duração máxima de 1 a 2 anos, devido ao risco de efeitos adversos que incluem: aumento do risco de infeções, insuficiência renal, hipertensão, hipertricose, hiperbilirrubinémia e aumento do risco de neoplasias. [91, 99] Assim, apesar da potente atividade imunossupressora da CyA oral ser responsável pela sua eficácia, a administração sistémica da CyA apresenta várias deficiências muitas vezes associadas à farmacocinética variável, ao índice terapêutico estreito e ao grande número de efeitos adversos. [101]

A CyA também é usada com sucesso no tratamento da síndrome crónica do olho seco, também denominada por ceratoconjuntivite seca. [103, 104] Em 2002 Restasis®, uma emulsão oftálmica de CyA (0,05%), foi aprovado pela FDA como o primeiro medicamento de uso exclusivamente tópico contendo CyA para tratar a causa do olho seco, através do aumento da produção de lágrimas em pacientes cuja produção de lágrimas se presume estar suprimida devido à inflamação ocular associada à ceratoconjuntivite seca. [103, 104] Passado quase duas décadas, em 2022, foi aprovado o primeiro genérico de Restasis®. [105, 106]

Posto isto, a entrega tópica de CyA tem-se mostrado uma estratégia promissora para tratar várias doenças autoimunes e inflamatórias da pele, nomeadamente a DA moderada a grave. [94] Esta via de administração oferece outras vantagens face à administração oral, uma vez que permite a localização do fármaco no tecido alvo e a redução da dose. [108] No entanto, esta estratégia tem permanecido um desafio na maioria dos casos devido à baixa permeação de CyA na pele. [94] A permeação desta molécula na pele não tem sido facilmente alcançada devido ao seu elevado peso molecular (1202,63 Da), à sua elevada lipofilicidade ($\log P_{\text{octanol/água}}=2,92$ a pH de 7,4) e à sua estrutura cíclica muito rígida que fornece uma barreira arquitetónica adicional à permeação da membrana. [94, 108] Por outro lado, a alta hidrofobicidade e a baixa solubilidade aquosa da CyA (0,04 mg/g a 25°C) tornam difícil a preparação de formulações para uso tópico. [109, 110]

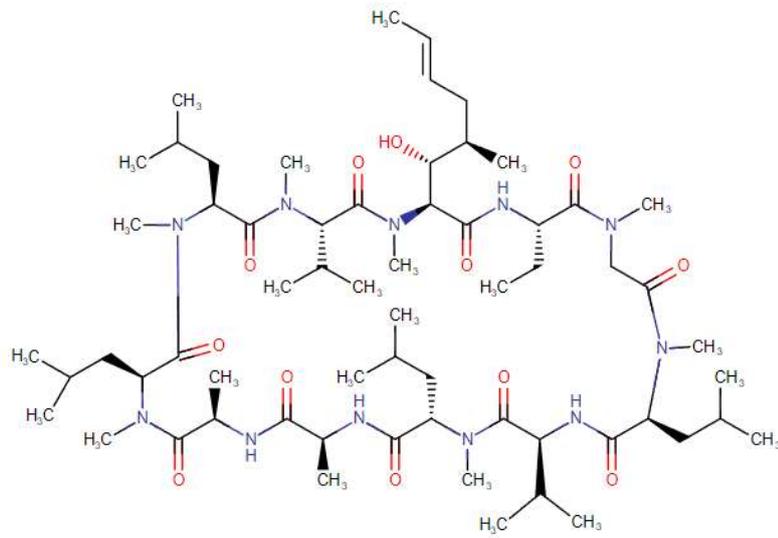


Figura 9: Estrutura química da Ciclosporina A. Adaptado de 108

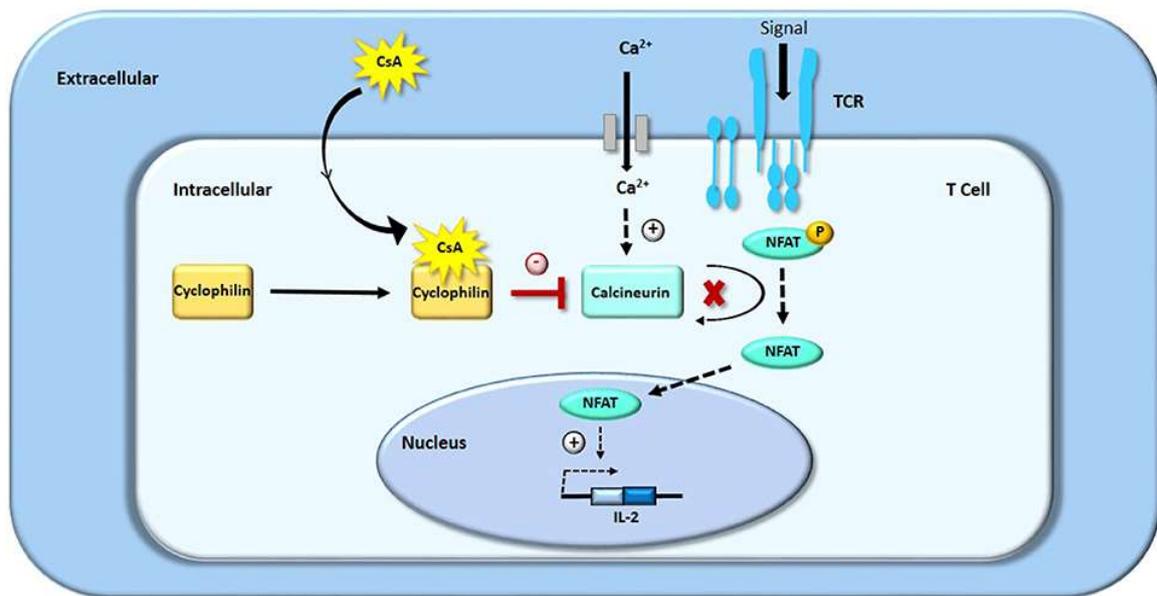


Figura 10: Mecanismo de ação da Ciclosporina A: inibição da ativação e da proliferação de células T pelo bloqueio da transcrição de IL-2. Adaptado de 111

1.2.3.2.1.1.1. Tacrolimus como competidor da Ciclosporina A

Apesar de possuírem estruturas moleculares e propriedades bioquímicas diferentes, o tacrolimus (TAC) possui ações semelhantes às da CyA, motivo pelo qual é visto como um possível competidor ao uso da molécula em estudo. ^[112] O TAC, cuja estrutura química se encontra representada na Figura 11, consiste num macrolídeo insolúvel em água, com peso molecular de 822 Da, originalmente isolado de *Streptomyces tsukabaensis*. ^[113, 114, 115] Tal como a CyA, o TAC pertence ao grupo dos inibidores da calcineurina, estando também indicado no tratamento de doenças inflamatórias da pele e na prevenção da rejeição de transplantes. ^[113, 114, 115] No entanto, apesar de ambos os fármacos pertencerem à mesma classe e possuírem mecanismos de ação similares, enquanto a CyA se liga à cyp1, o TAC liga-se a uma proteína intracelular chamada proteína de ligação FK506 (FKBP, do inglês *FK506-binding proteins*), formando um complexo fármaco-imunofilina. ^[112, 113, 114, 115] Este complexo liga-se à calcineurina inibindo a sua atividade. ^[112, 113, 114, 115] Tal como no caso da CyA, a inibição da calcineurina irá impedir a desfosforilação e translocação de NFAT evitando assim a transcrição dos genes das citocinas, sobretudo a transcrição génica da IL-2. ^[112, 113, 114, 115] Ambos os fármacos têm assim como objetivo principal a supressão das funções imunes dependentes das células T ao bloquear a ativação destas células e a apresentação de antígenos pelas CL. ^[113, 115]

Quando administrado topicamente o TAC possui uma permeação cutânea significativamente maior que a da CyA, devido ao facto de possuir um peso molecular inferior (822 Da *versus* 1200 Da). ^[116] Por outro lado, dado a sua elevada permeação e a sua potência em suprimir a função das células T, o TAC tem mostrado uma boa eficácia no tratamento da DA. ^[116] Contudo, apesar de possuir efeitos imunossupressores de 10 a 100 vezes maiores que os da CyA, a administração tópica de TAC é limitada, não só devido aos inúmeros efeitos adversos a que se encontra associado, mas também ao facto de este fármaco estar associado a um risco acrescido de desenvolvimento de cancro, nomeadamente cancro da pele. ^[113, 114, 116, 117, 118] A falta de estudos de longo prazo sobre a segurança do TAC no tratamento da DA moderada a grave também tem levantado algumas dúvidas quanto ao uso deste fármaco nesta dermatose. ^[113, 118] Assim, é recomendado o uso do TAC como tratamento de segunda linha de curto prazo e intermitente, sendo ainda aconselhada a utilização de uma quantidade mínima de fármaco necessária para controlar os sintomas dos pacientes. ^[113, 119]

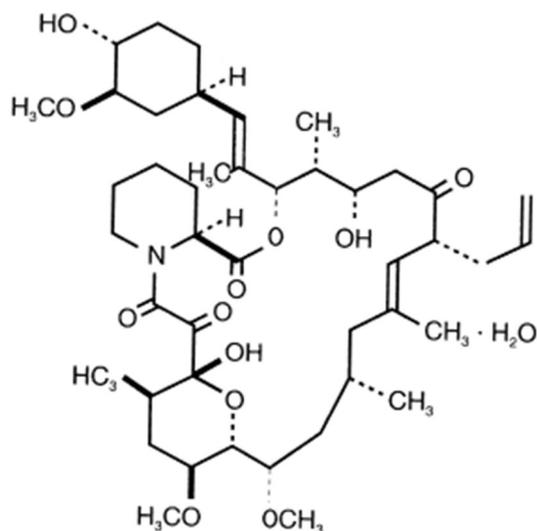


Figura 11: Estrutura química do Tacrolimus. Adaptado de 114

1.3. Permeação de fármacos através da pele

1.3.1. Vias e mecanismos

A permeação de fármacos aplicados passivamente sobre a pele é limitada principalmente pela própria barreira cutânea, uma vez que a CC é responsável pela resistência oferecida à passagem da maior parte das substâncias da pele para o interior do organismo, mas também pelas características do próprio fármaco e do local da pele onde este é aplicado. [2, 120, 121, 122]

Considerando a CC em condições de perfeita integridade, podem-se referir duas vias principais de permeação cutânea de fármacos: a via transfolicular e a via transepidérmica (Figura 12). [123]

A via transfolicular é uma via transanexial / transapêndice que utiliza os diferentes anexos que atravessam a pele até à derme (glândulas sudoríparas e folículos pilosos) permitindo a passagem / difusão de moléculas, de modo que estas possam atingir a circulação sistêmica. [122, 123] Esta via proporciona uma permeação rápida para substâncias que apresentam elevado peso molecular, nanopartículas, lipossomas e para compostos de difusão lenta. [2, 124] Contudo, esta é considerada uma via secundária de permeação de fármacos, pois representa cerca de 0,1 a 1% da absorção cutânea. [124, 125]

Em contrapartida, a via transepidérmica envolve a passagem de moléculas através da CC. [121, 123] Esta passagem pode ser feita através das células (corneócitos) - via intracelular ou transcelular - ou através da matriz lipídica existente entre os corneócitos - via intercelular ou paracelular. [2, 121, 125] A via transcelular permite a passagem completa de solutos hidrofílicos ou polares através da CC, garantindo o movimento por difusão das moléculas do fármaco através das camadas alternadas dos corneócitos hidrofílicos e das bicamadas lipídicas lipofílicas com a finalidade de atingir a circulação sistêmica. [2, 124, 125] Assim, a via transcelular requer etapas de difusão e partição do fármaco, motivo pelo qual esta via não é comumente utilizada pelas substâncias externas com tanta frequência quanto as outras vias. [3, 125] No entanto, a partição

sucessiva das moléculas entre as porções hidrofílicas e lipofílicas da CC facilita a permeação de fármacos por esta via. ^[124] Por sua vez, a via intercelular é considerada a principal via de entrega transepidérmica que permite a difusão de solutos lipofílicos ou apolares exclusivamente através da matriz lipídica contínua que rodeia os corneócitos. ^[2, 123, 124, 126] Uma vez que, a passagem de moléculas pela via intercelular ocorre através das bicamadas lipídicas, é essencial que as moléculas do fármaco que permeiam por esta via apresentem uma solubilidade lipídica / aquosa equilibrada, bem como um tamanho molecular adequado. ^[124] Contudo, uma desvantagem associada a esta via de permeação cutânea consiste nas longas distâncias que os fármacos necessitam de percorrer até atingir a circulação sistêmica. ^[2]

Por conseguinte é importante ressaltar que a permeação de moléculas externas na pele pode ocorrer simultaneamente por todas as vias de permeação acima mencionadas, dependendo amplamente das propriedades físico-químicas do fármaco que se pretende administrar. ^[125]

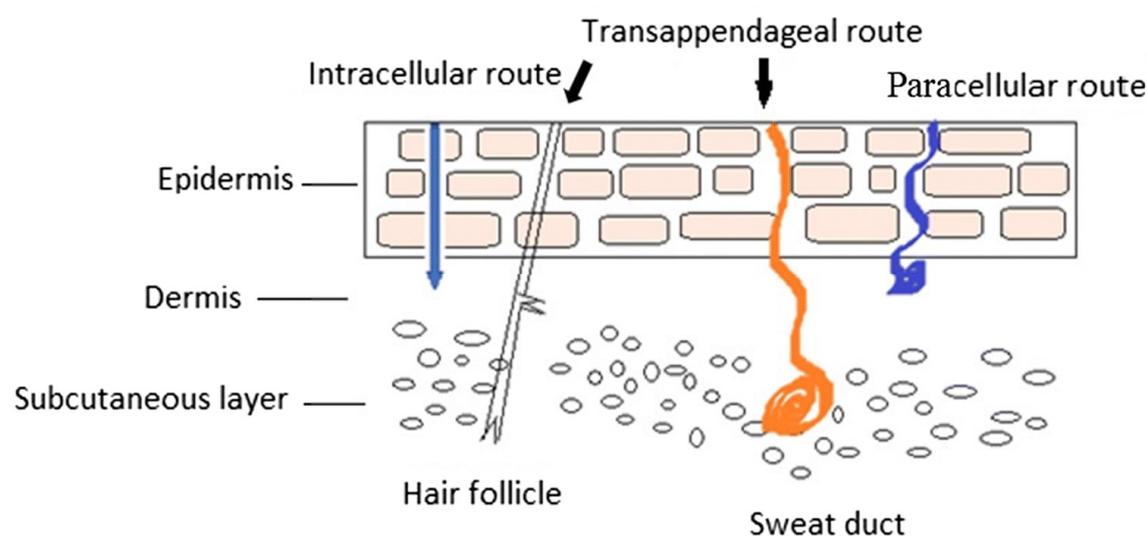


Figura 12: Vias de penetração através da pele. Adaptado de 2

1.3.2. Principais barreiras

A principal barreira de penetração da pele é fornecida pela epiderme superficial que impõe limitações físicas, químicas e biológicas a todos os tipos de agentes de permeação que a tentam atravessar. ^[127]

A organização estrutural da CC como “parede de tijolos” é fundamental para o seu papel de barreira física. ^[127] Contudo, este modelo estrutural dificulta a difusão de moléculas através da CC, dificultando a permeação e a absorção de fármacos. ^[127] Por sua vez, devido à espessura variável da CC em diferentes partes do corpo, a penetração do fármaco também varia dependendo do local de administração. ^[127, 128] Por outro lado, a taxa de permeação transcutânea além de ser influenciada pela própria barreira conferida pela CC, é também influenciada pelas condições da superfície da pele, pelo gradiente hidrofílico / hidrofóbico epidérmico, pelo valor de pH, de

temperatura e pelo grau de hidratação, que estão relacionados com a manutenção normal da barreira cutânea. [127, 128]

Do ponto de vista da proteção da pele, o gradiente hidrofóbico / hidrofílico é uma defesa adicional contra a entrada de compostos hidrofóbicos na pele, uma vez que quimicamente a CC é referido como sendo hidrofóbico. [127, 128] Assim, fármacos lipofílicos serão mais prontamente absorvidos do que substâncias hidrofílicas. [128]

O pH da pele também afeta a absorção tópica. [127, 128] Um pH da pele menos ácido pode aumentar a absorção. [127, 128] Uma vez que, a CC normal possui um pH ácido, este favorece o transporte de produtos químicos e fármacos cujos valores de constante de dissociação ácida (pKa) permitem maiores formas não ionizadas num ambiente ácido. [128] Assim, a CC será uma barreira de absorção para a maioria dos fármacos básicos e alguns fármacos ácidos. [128] Por outro lado, a composição e localização dos componentes químicos que compõem a CC são responsáveis pela variação do valor de pH entre esta e os restantes estratos, o que também limita a difusão de moléculas. [128] A superfície da CC possui um valor de pH que se situa entre os 4,5 e os 5,5, enquanto na interface entre a CC e a camada granulosa o pH varia entre 6,8 e 7,0, o que significa que moléculas que conseguem penetrar a CC possuem uma difusão limitada na interface entre a CC e a camada granulosa, e vice-versa. [127]

Por sua vez, a temperatura também parece influenciar a taxa de permeação cutânea, uma vez que o aumento desta parece aumentar significativamente a permeabilidade da pele, devido a alterações estruturais na CC e nos tecidos subjacentes que permitem que as moléculas se movam mais rapidamente nas diferentes camadas da pele. [127, 128]

Já a hidratação da pele é crucial para promover a absorção tópica e é por esse motivo que a oclusão é muitas vezes intencional nas formulações. [128]

Contudo, outros fatores como a localização da pele, a idade, o estado da pele e o seu grau de hidratação também influenciam a permeabilidade da pele aos fármacos, devido a alterações na composição química da CC. [127, 128]

1.3.3. Cinética da absorção cutânea

A absorção percutânea consiste na penetração de substâncias nas várias camadas da pele e na permeação através da pele para a circulação sistémica. [123] Numa primeira etapa ainda na forma farmacêutica, o fármaco dissolve-se e difunde-se através do veículo em direção à superfície cutânea. [129, 130] Posteriormente, ocorre a libertação do fármaco em virtude da instabilidade termodinâmica deste no veículo. [129, 130] Depois de libertado da forma farmacêutica e até ser absorvido na circulação sistémica, o fármaco percorre a epiderme e a derme passando por diferentes etapas:

- i) Penetração e difusão do fármaco na CC;
- ii) Partição do fármaco da CC para a epiderme viável devido à saturação da CC;
- iii) Difusão através da epiderme viável para a derme superior;

- iv) Permeação que compreende a penetração de moléculas de uma camada para a outra, que é diferente tanto a nível funcional como estrutural;
- v) Absorção da substância na circulação sistémica através da microcirculação sanguínea presente na derme (Figura 13). [123, 129, 130]

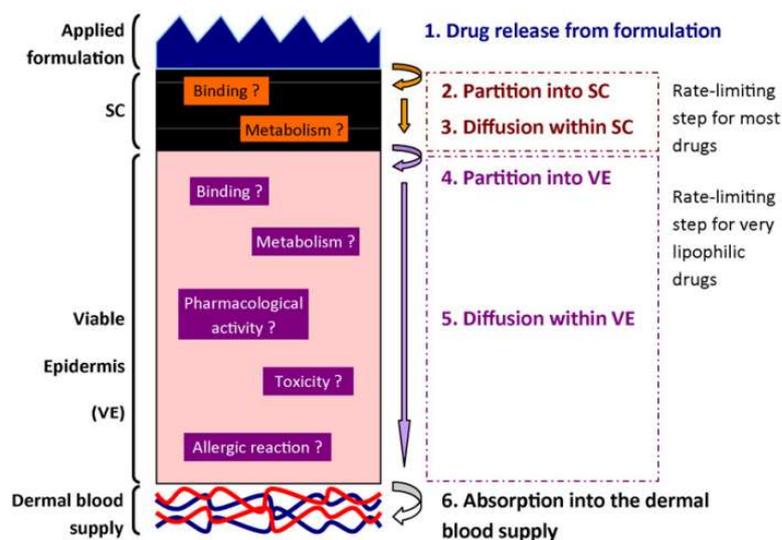


Figura 13: Representação esquemática dos processos envolvidos no transporte de fármacos para dentro e através da pele. Adaptado de 131

A permeação da pele é determinada pela 1ª Lei de Fick. [123, 129, 130, 131] Segundo esta lei a difusão de um fármaco é definida como o movimento aleatório das moléculas por meio de um domínio impulsionado por um gradiente de concentração, ou seja, de uma concentração mais elevada para uma concentração mais baixa. [129, 130, 131] Assim, a quantidade de fármaco que permeia a CC por unidade de área e de tempo é denominada por o fluxo (J) que é tipicamente expresso em unidades de $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Equação 1.3.3.1). [123] O fluxo com que um fármaco atravessa a CC, é diretamente proporcional ao coeficiente de difusão do fármaco (D) na CC, ao coeficiente de partição entre a formulação e a pele (K_m) e ao gradiente de concentração através da barreira (C_v). [140, 130, 131] Por outro lado, o fluxo é inversamente proporcional ao comprimento da via de difusão (L). [129, 130, 131]

$$J = \frac{D \cdot K_m \cdot C_v}{L} \quad (1.3.3.1)$$

Contudo, a permeação cutânea de fármacos é afetada pelas próprias características da pele, tais como, a espessura, a temperatura, o grau de hidratação, o número de folículos pilosos, mas também pelas características do próprio fármaco, tais como peso molecular e coeficiente de partição. [132]

1.4. Sistemas tópicos de administração de fármacos

A administração tópica de fármacos contendo princípios ativos de interesse tem por objetivo proporcionar uma ação terapêutica mais ou menos profunda na pele, podendo ir para além desta. ^[133, 134] Assim, a pele pode ser usada para fornecer compostos com o objetivo de se obterem resultados terapêuticos na pele, nos tecidos subjacentes ou sistemicamente. ^[135] Por sua vez, os sistemas tópicos de administração de fármacos oferecem inúmeras vantagens significativas sobre outras vias convencionais de entrega de fármacos:

- Evitam o metabolismo hepático de primeira passagem onde moléculas ativas do fármaco podem ser convertidas em moléculas inativas ou em moléculas responsáveis por determinados efeitos colaterais;
- Reduzem as dificuldades associadas à absorção dos fármacos ao nível gastrointestinal;
- Podem substituir a administração oral de medicamentos quando a via oral não é adequada, como no caso de vômitos e diarreia;
- Evitam os inconvenientes associados à administração através da via intravenosa, uma vez que não são invasivos, são indolores e podem ser autoadministrados, tornando-se mais confortável para os pacientes;
- Reduzem a frequência de administração, o que se traduz numa melhoria da biodisponibilidade, níveis plasmáticos do fármaco mais uniformes (importante no caso de medicamentos com janelas terapêuticas estreitas), maior duração de ação e numa minimização dos efeitos colaterais;
- Permitem uma libertação contínua, controlada e sustentada do fármaco por longos períodos de tempo;
- Permitem a entrada contínua de medicamentos com meias-vidas biológicas curtas, contribuindo para a manutenção dos níveis plasmáticos do fármaco, evitando assim efeitos colaterais indesejáveis;
- Permitem uma maior facilidade na adesão por parte dos pacientes;
- Possuem facilidade de interrupção a qualquer momento de forma rápida e simples. ^[123, 140, 137, 138, 139, 140, 141, 142]

Contudo, os fármacos destinados à administração tópica devem cumprir alguns pré-requisitos físico-químicos e biológicos para poderem ser aplicadas sobre a pele, por forma a exercerem o efeito terapêutico pretendido:

- Peso molecular inferior a 500 Da, uma vez que quanto menor o tamanho da molécula, mais a absorção é facilitada;
- Lipofilicidade e hidrofiliicidade equilibradas, com um coeficiente de partição n-octanol / água ($\log P_{\text{octanol/água}}$) entre 1 e 3, uma vez que o fármaco deve ser capaz de permear a CC, que contém um ambiente extremamente lipofílico, e a epiderme viável que é composta por cerca de 70% água;
- Ponto de fusão menor que 200°C, uma vez que a solubilidade nos lípidos intercelulares da CC é influenciada por este;

- Doses baixas e diárias determinadas (dose < 10 mg/dia);
- Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) curto;
- Não causar irritação cutânea. [121, 123, 125, 136, 139, 141, 142, 143]

Por sua vez, embora a pele possa ser um local ideal para atingir quer efeitos locais quer efeitos sistêmicos por meio da entrega de fármacos, existem vários fatores ao nível desta que afetam a permeação de fármacos, de entre os quais se destacam a barreira cutânea proporcionada pela CC que limita a absorção de substâncias, como referido anteriormente, o local de aplicação na pele, a variabilidade de indivíduo para indivíduo, a idade, o grau de hidratação, a temperatura e o pH da pele. [120, 123, 139] Por outro lado, a aplicação tópica não está isenta de desvantagens, uma vez que os fármacos aplicados topicamente podem causar irritação no local de aplicação, reações alérgicas e existem limitações na entrega de fármacos que possuem elevado peso molecular e elevado log P. [139, 140] Com o objetivo de ultrapassar estas limitações, têm sido exploradas e desenvolvidas várias tecnologias para melhorar a entrega tópica de fármacos. [140]

1.5. Técnicas para aumentar a entrega de fármacos através da pele

Com o objetivo de melhorar a entrega tópica de fármacos, uma vez que a CC se apresenta como uma barreira à penetração, têm sido desenvolvidas metodologias / estratégias de aprimoramento que garantem a penetração eficiente, permitindo que quantidades terapêuticas de fármaco atinjam o local de ação desejado. [2, 19, 93] Estas estratégias / tecnologias desenvolvidas visam reduzir a função de barreira conferida pela CC e podem ser divididas em metodologias passivas / químicas (sistemas de nanotransportadores e intensificadores de penetração química), ou ativas / físicas (ablação térmica, iontoforese, eletroporação, magnetoforese, microagulhas, sonoforese e ondas fotomecânicas). [2, 96, 95] Tais metodologias têm-se mostrado atraentes, apresentando uma vantagem competitiva sobre outros métodos de administração de medicamentos, em termos de dose administrada, eficácia terapêutica e custo-benefício. [95]

1.5.1. Métodos Passivos / Químicos

Os métodos passivos de aprimoramento de penetração através da pele envolvem a modificação da estrutura da CC com o objetivo de melhorar o transporte do fármaco através da CC, por meio da manipulação / otimização da formulação, do aumento da atividade termodinâmica do fármaco nas formulações, da modificação do fármaco (por exemplo sistemas de nanotransportadores) ou do uso de promotores químicos de permeação (CPE, do inglês *Chemical Penetration Enhancers*) que interagem com os constituintes da pele para promover o fluxo de fármaco. [2, 123, 144, 145, 146] Contudo, apesar das suas características promissoras, estas técnicas possuem algumas limitações, uma vez que o potenciador de permeação ideal deve ser farmacologicamente inerte, não tóxico, não irritante, não alergénico, deve possuir compatibilidade química e física com o fármaco e os restantes excipientes da formulação e, idealmente, deve ter uma ação reversível na pele. [123, 125, 139]

1.5.2. Métodos Ativos / Físicos

Ao contrário dos métodos passivos / químicos, os métodos ativos / físicos utilizam a energia externa (calor, elétrica e magnética) ou uma abordagem mecânica para atuar como uma força motriz, por forma a reduzir / alterar a função de barreira da CC, a fim de aumentar a permeação de fármaco na pele. [2, 123, 125, 145] Assim, forças físicas como tensão elétrica (iontoforese e eletroporação), ultrassom (sonoforese), microagulhas, ablação térmica, magnetoforese e ondas fotomecânicas, têm sido utilizadas com a finalidade de auxiliar os fármacos a superarem a barreira da pele, permitindo que uma classe mais ampla de moléculas seja entregue na pele. [123, 125] Por outro lado, estes métodos permitem superar os tempos de atraso entre a aplicação e a chegada do fármaco ao local desejado, permitindo assim acelerar a eficácia terapêutica dos fármacos entregues, quando comparados com os métodos passivos. [123, 138] Além disso, estas técnicas ativas / físicas permitem a permeação de moléculas com elevado peso molecular que de outra forma não seria possível. [123, 138]

Contudo, apesar das vantagens acima enumeradas, alguns destes métodos possuem algumas desvantagens quando aplicados no problema principal da DA, que reside no comprometimento da função de barreira da pele. Assim, processos físicos como eletroporação, sonoforese, microagulhas e ablação térmica foram excluídos deste projeto, pois é inconcebível utilizar técnicas cujo objetivo principal consiste na criação de poros / rompimento da bicamada lipídica da CC, uma vez que estas comprometem ainda mais a função de barreira da pele. [145, 146] Por outro lado, métodos físicos como iontoforese e a magnetoforese também foram excluídos, uma vez que estes não são aplicáveis à CyA. No caso da iontoforese, sabe-se que a força eletroforética, que é o principal componente da entrega iontoforética para moléculas ionizadas, não permite a entrega da CyA através da pele, uma vez que esta molécula consiste num peptídeo neutro. [147] Por sua vez, a magnetoforese, um método de aprimoramento que utiliza um campo magnético que atua como força motriz externa para promover o aumento da penetração através da pele, não pode ser aplicado ao caso da CyA, uma vez que este método é apenas aplicado no caso de fármacos com propriedades diamagnéticas. [145, 146, 147]

1.5.2.1. Ondas fotomecânicas

As ondas fotomecânicas (PW, do inglês *Photomechanical Waves*) são ondas de pressão geradas por radiação laser pulsada. [145, 148] Estas podem tanto permeabilizar transitoriamente a CC ao induzirem a rutura da estrutura lipídica, o que leva à criação de poros temporários que permitem a entrega transdérmica de fármacos, como podem afetar a membrana celular levando à criação de rotas transcelulares. [145, 148] Na prática, para que ocorra a conversão da luz em energia mecânica é comumente usado um material alvo, que absorve praticamente toda a luz do laser pulsado. [137, 148, 150] Este material quando colocado sobre a solução de fármaco previamente espalhado sobre a pele e irradiado com um pulso de laser, permite aumentar a permeação do fármaco (Figura 14). [137, 148, 150] As características das PW produzidas dependem das características / parâmetros pré-estabelecidos do laser e das propriedades óticas e mecânicas do material alvo. [141,

^{148]} Por sua vez, a entrega transdérmica de fármacos auxiliada por PW possui várias vantagens associadas, uma vez que esta é uma técnica transitória, reversível e indolor que permite facilitar a entrega de fármacos na pele. ^[138, 145, 149]

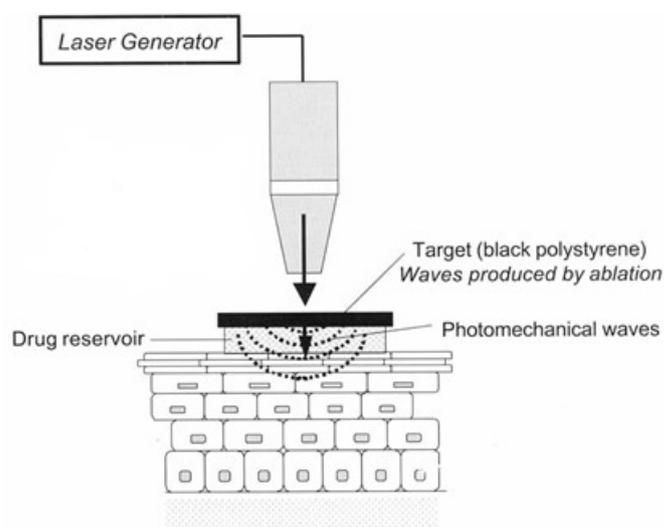


Figura 14: Aprimoramento da permeação através do uso de ondas fotomecânicas. Adaptado de 151

1.5.2.1.1. Método LaserLeap Technologies® - Piezoporação

Com o intuito de facilitar a entrega de fármacos e moléculas através da pele, substituindo assim as injeções hipodérmicas, a empresa LaserLeap Technologies®, com sede em Coimbra, desenvolveu um método físico baseado na geração de ondas de ultrassom de ultra-alta frequência (acima de 100 MHz) com gradientes de pressão acentuados que perturbam de forma transitória a barreira externa da pele, facilitando a permeação de fármacos na pele. ^[152, 153] Por outras palavras, este método tem como objetivo a permeabilização da CC através do uso de ondas fotoacústicas geradas pela expansão termoelástica de materiais e pela conversão eficiente e ultrarrápida da luz em pressão, a partir de pulsos de lasers. ^[154] Contudo, esta tecnologia depende da utilização de conversores, materiais transdutores da luz em ondas de pressão. ^[152, 153, 154] Estes materiais são tipicamente filmes muito finos (espessura <math><150 \mu\text{m}</math>) e com elevada capacidade de absorção de luz. ^[153, 155] Geralmente, estes filmes são constituídos por materiais com características particulares que são denominados materiais piezofotônicos ou optoacústicos. ^[153, 155] Os materiais piezofotônicos normalmente são compostos por um cromóforo com coeficiente de absorção muito alto no comprimento de onda do laser, disperso num material com elevado coeficiente de expansão térmica, β (ou mais precisamente um grande parâmetro de Grüneisen Γ , parâmetro este relacionado com a eficiência da conversão da luz em pressão). ^[154, 155] Na prática, estes materiais piezofotônicos encontram-se confinados entre um espelho, que permite a reflexão da luz do laser para o material piezofotónico evitando que esta atinja a pele, e um vidro rígido que lhe assegura

as condições físicas à geração de ondas fotoacústicas de elevada amplitude, como ilustrado na Figura 15. ^[153, 156]

Quando irradiados por pulsos de laser curtos (duração de ~20 ns), os filmes transformam a energia ótica em ondas de ultrassom de grande largura de banda e alta intensidade. ^[155] Este processo de conversão envolve uma sequência de três processos muito rápidos: (i) a absorção da energia ótica pelo cromóforo; (ii) a transformação da energia ótica em energia térmica que é rapidamente transferida para o material circundante; (iii) a expansão termoelástica do material aquecido gerando ondas de pressão, ondas essas que são designadas por ondas fotoacústicas, (PAW, do inglês *Photoacoustic Waves*). ^[153, 154] Tipicamente a pressão das PAW geradas pode ser descrita de acordo com a Equação 1.5.2.1.1. ^[157]

$$P_0 = \eta \Gamma F \mu \quad (1.5.2.1.1.)$$

onde, P_0 corresponde à pressão da PAW, η diz respeito à eficiência de absorção da luz, Γ é o parâmetro de Grüneisen, F é a fluência, ou seja, a energia por unidade de área, e μ corresponde ao coeficiente de absorção do material.

Ao expor a pele às PAW, a propagação destas ondas, gera gradientes de pressão que, desestabilizam de forma transitória a estrutura da CC, provocando uma alteração na organização da matriz lipídica, que conduz à criação de espaços lacunares entre as células constituintes da CC, que correspondem a poros que permitem facilitar a difusão de fármacos através da pele (Figura 16). ^[152, 153] Desta forma, a CC torna-se muito permeável a grandes moléculas e proteínas por alguns minutos (~ 2 minutos) após a aplicação das PAW, recuperando totalmente a sua função de barreira, após o estímulo. ^[153]

Atualmente, este método desenvolvido pela empresa LaserLeap Technologies® pode ser aplicado tanto a comprimentos de onda de excitação de 532 nm, como mais recentemente a comprimentos de onda de 1064 nm. ^[154] Porém, independentemente do comprimento de onda de excitação usado, os materiais utilizados na produção dos transdutores luz-pressão devem absorver no comprimento de onda do laser utilizado. ^[154] No caso do comprimento de onda de 532 nm os transdutores luz-pressão comercializados pela LaserLeap Technologies são compostos por Mn(III) 5,10,15,20-tetrafenilporfirinato (MnTPP) dispersos homogeneamente numa matriz de poliestireno que possui um parâmetro de Grüneisen (Γ) de 0,7. ^[154] Já os transdutores luz-pressão comercializados para trabalhar no comprimento de onda do laser de 1064 nm, são essencialmente compostos por nanopartículas de carbono, que absorvem fortemente a radiação e dissipam rapidamente o excesso de energia em calor, dispersas em polidimetilsiloxano (PDMS), um polímero que possui propriedades termoelásticas superiores ($\Gamma = 0,9$). ^[154]

Comparativamente a outros métodos físicos usados com o intuito de aumentar a permeabilidade das barreiras biológicas, esta é uma tecnologia vantajosa no mundo científico e clínico, pois é uma técnica indolor e transitória, que permite que a pele, através da sua

elasticidade, recupere totalmente a sua organização celular em poucos minutos após o estímulo e, portanto, recupere a sua função de barreira. [2, 153, 155]

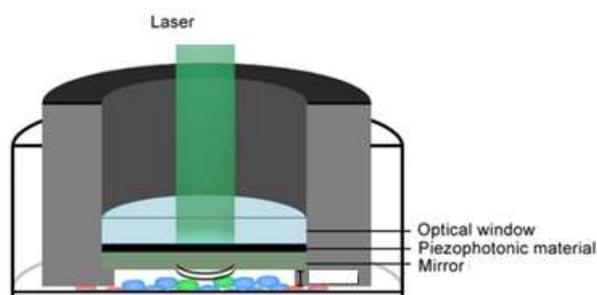


Figura 15: Configuração experimental para a geração das ondas fotoacústicas. Adaptado de 157

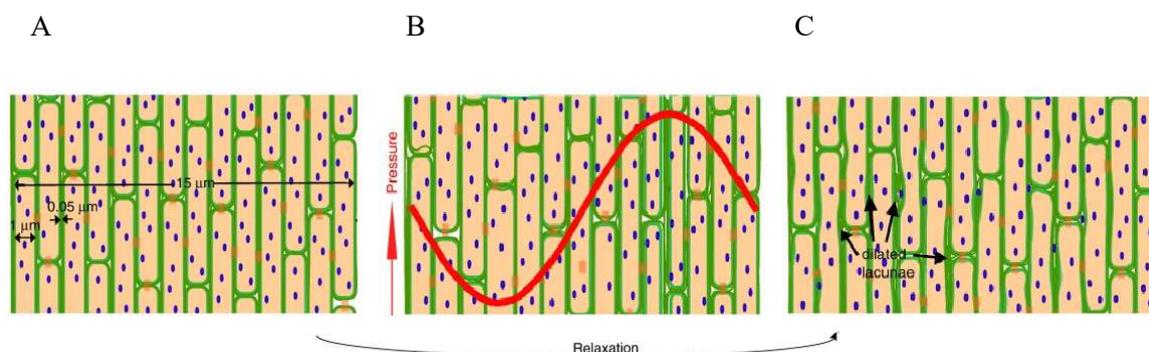


Figura 16: Aumento da permeabilidade da pele com alteração da camada córnea durante a aplicação de ondas fotoacústicas. **A-** Camada córnea imperturbada com camadas de corneócitos compactados com domínios hidrofílicos (azul) separados por lamelas lipídicas intercelulares (verde). **B-** Propagação de ondas fotoacústicas com gradientes de pressão acentuados na camada córnea. **C-** Camada córnea perturbada com espaços lacunares dilatados devido à desestabilização pelas ondas fotoacústicas que alteram a organização da matriz lipídica, o que facilita a difusão de fármacos através dos espaços lacunares que correspondem a poros. Adaptado de 153.

2. Materiais, Métodos e Técnicas Instrumentais

Neste capítulo encontram-se descritas todas as informações relativas aos materiais, equipamentos, reagentes e procedimentos que foram essenciais para a realização de todo o trabalho experimental.

2.1. Materiais

O Tween® 80 (Monooleato de polioxietileno-80-sorbitano) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O Castor oil foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O Etanol foi adquirido de Los Productos de ALDO S.L. (Arganda del Rey, Madrid, Espanha). A Ciclosporina A foi adquirida da Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). A Trietanolamina foi adquirida da PanReac Applichem (Chicago, EUA). O polímero Carbopol® 940 foi gentilmente fornecido pelo Departamento de Química da Universidade de Coimbra (Coimbra, Portugal). O Acetonitrilo foi adquirido da Fisher Scientific (Geel, Bélgica). As pastilhas de Tampão Fosfato Salino foram adquiridas da PanReac Applichem (Chicago, EUA). O Metanol foi adquirido da Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, EUA). A água usada foi desionizada usando um sistema de filtração.

2.2. Formulação de Ciclosporina A

2.2.1. Preparação e otimização

Foram desenvolvidas quatro formulações contendo CyA, com a mesma constituição, onde apenas variou a percentagem de emulsificante, Tween 80, e conseqüentemente a percentagem de água que aumenta ou diminui sempre na mesma proporção, Tabela 1, de forma a se comparar a influência da percentagem de emulsificante na capacidade da CyA se libertar da formulação.

A preparação das formulações contendo 2% de CyA (m/v) realizou-se usando um método isotérmico de baixa energia baseado num procedimento de emulsificação espontânea, com pequenas modificações. Inicialmente a CyA foi completamente dissolvida em Etanol (EtOH), tendo a solução resultante sido adicionada a uma solução previamente preparada contendo Tween 80 e Castor oil. Esta mistura resultante atuou como a fase óleo / orgânica. A emulsificação espontânea foi assim realizada por adição da fase orgânica, gota a gota, a uma fase aquosa, composta por água desionizada, que se encontrava sob agitação contínua a uma velocidade de 1500 rpm à temperatura ambiente. Após 10 minutos da adição, a velocidade do agitador foi diminuída para 500 rpm. Ao fim de 30 minutos foi adicionado o Carbopol que foi deixado a hidratar durante a noite a 500 rpm. Após a mistura com a água, o polímero Carbopol forma uma

dispersão ácida onde as cadeias poliméricas fortemente enroladas se começam a desdobrar após a hidratação e desprotonação dos grupos carboxílicos. ^[158] Por sua vez, a desprotonação dos grupos funcionais do ácido carboxílico resulta no desenvolvimento de uma carga negativa dependente do pH. ^[158] Uma vez que, estes grupos funcionais são responsivos a mudanças de pH, uma solução de Trietanolamina foi adicionada gota a gota à solução contendo CyA que se encontrava sob agitação, com o intuito de se atingir a viscosidade máxima. ^[158, 159, 160] Este último passo permitiu a neutralização dos grupos carboxílicos do Carbopol, que se encontravam carregados negativamente, uma vez que o aumento do pH aumenta a repulsão eletrostática entre estas cargas, o que leva ao desdobramento da cadeia polimérica, produzindo um gel viscoso (Figura 17). ^[158, 159, 160]

Tabela 1: Percentagem (% m/v) de cada componente para cada formulação a testar.

	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4
	Percentagem (% m/v)			
Ciclosporina A	2	2	2	2
Etanol	10	10	10	10
Tween 80	4	2	1	0,5
Castor oil	1	1	1	1
Água	81,5	83,5	84,5	85
Carbopol	1	1	1	1
Trietanolamina	0,5	0,5	0,5	0,5

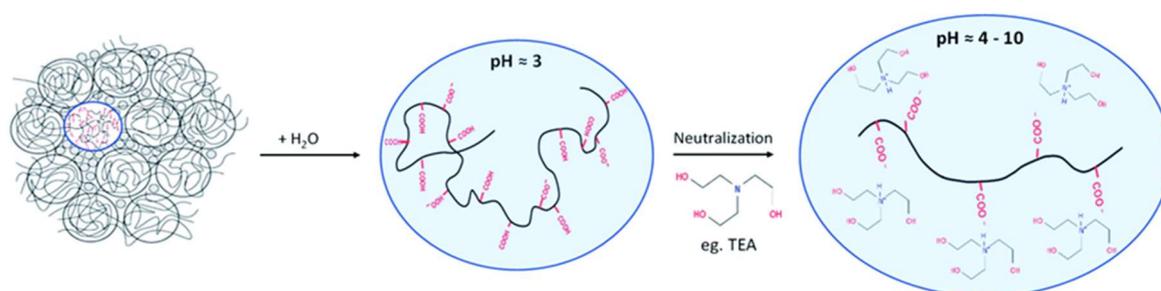


Figura 17: Representação esquemática do desdobramento das cadeias do polímero Carbopol após hidratação e neutralização dos grupos carboxílicos. Adaptado de 158

2.2.2. Caracterização da formulação

2.2.2.1. Propriedades Físico - Químicas

As formulações tópicas devem apresentar uma faixa de pH adequada, uma vez que o pH pode influenciar a solubilidade e estabilidade do fármaco e potencializar a irritação da pele. [161]

Após a otimização da formulação foi determinado o pH da formulação final. Os valores de pH foram obtidos a uma temperatura de 20°C utilizando um medidor de pH digital (Milwaukee Mi 150, EUA) previamente calibrado com soluções tampão padrão (4,01 e 7,01). O valor de pH foi determinado em triplicado, tendo para tal sido realizada uma diluição de dez vezes para cada formulação usando água desionizada.

Foi ainda determinada a densidade da formulação final otimizada, tendo para isso sido pesado um volume fixo de formulação e, através da massa sido calculada a densidade da formulação.

2.2.2.2. Tamanho e distribuição das partículas

A Dispersão Dinâmica da Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) consiste numa técnica amplamente utilizada para medir o tamanho e a distribuição de tamanho de moléculas e partículas dispersas. [162, 163, 164] Esta técnica consiste em iluminar a amostra com um feixe de luz laser e medir a intensidade da luz dispersa que chega ao detetor em função do tempo. [161, 162, 163] Devido ao movimento browniano de partículas ou moléculas dispersas a luz do laser é difundida pelas partículas com diferentes intensidades. [162, 163, 164] Tal diferença na intensidade da luz difundida fornece informações sobre a velocidade do movimento browniano e, portanto, sobre o tamanho das partículas. [162, 163, 164] Para determinar com precisão o tamanho das partículas é importante conhecer o valor exato da temperatura e da viscosidade do solvente. [162, 164]

Outra informação útil que é possível retirar da técnica de DLS é o Índice de Polidispersão (PDI, do inglês *Polidispersity Index*) que fornece informações sobre a agregação das partículas. [165] Quando o PDI obtido é elevado significa que na amostra em análise há uma população de partículas polidispersas, ou seja, quando ocorre agregação das partículas e a distribuição de tamanhos não é uniforme. [165] Por outro lado, quando o PDI obtido é baixo, significa que na amostra estamos perante uma população de partículas monodispersas, ou seja, quando ocorre agregação das partículas e a distribuição de tamanhos é uniforme. [165] O valor de PDI pode variar entre 0 e 1. [166] No caso das dispersões monodispersas o valor ideal é $< 0,300$. [166] Quando este valor é igual ou superior a 0,500 as distribuições são consideradas polidispersas. [166]

Neste caso, a técnica de DLS foi utilizada para avaliar o tamanho e determinar o PDI da formulação em estudo. Para tal, utilizou-se um equipamento Malvern Nano ZS, utilizando como solvente a água. A temperatura utilizada na execução da técnica de DLS foi de 37°C que é a temperatura utilizada nos estudos de libertação e permeação, tendo sido realizadas três medições nestas condições.

2.2.2.3. Estabilidade

Os estudos de estabilidade permitem estabelecer um período de tempo e de condições de armazenamento que garantem que as formulações não tenham sofrido alterações ou degradações nas suas características.

Por forma a avaliar a qualidade da formulação de CyA ao longo do tempo, sob influência de diversos fatores como temperatura e exposição à luz, foi realizado um estudo de estabilidade. Para a realização deste estudo de estabilidade foi preparada uma formulação contendo CyA que foi sujeita a uma temperatura de 4°C. Durante este estudo a formulação de CyA não se encontrou exposta à luz. A estabilidade da formulação foi monitorizada durante 1 mês tendo sido ao fim de 15 dias e de 1 mês avaliada a aparência da formulação e a quantidade de CyA presente nesta após o tempo de armazenamento. Para tal, procedeu-se à recolha de 300 µL de amostras de CyA que foram dissolvidas em 3mL de PBS/EtOH (70/30) / Metanol (MeOH) (50/50) (% v/v) e colocadas a agitar durante 12 a 16 horas. Após este período de tempo as amostras foram filtradas usando um filtro de seringa de polietersulfona (PES) com um tamanho de poro de 0,45 µm e um diâmetro de 25 mm adquirido de Los Productos de ALDO S.L. (Arganda del Rey, Madrid, Espanha). A quantidade de CyA presentes nas amostras foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.3. Estudos *in vitro*

2.3.1. Estudos de libertação da formulação contendo Ciclosporina A

Para avaliar a capacidade da substância ativa, CyA, se libertar das formulações em estudo, foram realizados estudos de libertação *in vitro*. Estes testes *in vitro* permitem avaliar alguns fenómenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacologicamente, de modo rápido e sem interferência de fatores biológicos.^[167] Para tal, foi usado um método aprovado pela FDA que consiste na utilização de células de difusão de *Franz*, que tem como vantagem a aplicabilidade da 1ª lei de Fick. Neste ensaio foi utilizado um sistema de células de difusão de *Franz* verticais de 15 mm, composto por nove células individuais, contendo um volume de compartimento recetor de 12 mL e uma área de difusão de 1,77 cm². O sistema usado encontrava-se conectado a um banho termostatizado a uma temperatura de 37°C e sob uma agitação magnética constante de 600 rpm (agitador V9-CB, PermeGear, EUA). Entre os compartimentos dador e recetor foi colocada uma membrana sintética de celulose com um tamanho de poro de 6-8 kDa que foi adquirida da Spectra/Por® (Soho, Westminster, Londres) e que foi previamente colocada a hidratar em água desionizada durante 30 minutos.

O compartimento recetor deve ser preenchido com uma solução capaz de criar uma condição de não saturação, ou seja, uma solução que garanta que não haja problemas de solubilidade da molécula ao longo de todo o tempo experimental (condição *sink*).^[167] Para tal, este compartimento foi preenchido com uma solução contendo tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*, pH=7,4), com o objetivo de mimetizar o ambiente fisiológico, e Etanol (EtOH) como co-solvente, nas proporções 70/30 (% v/v).^[167] No compartimento dador,

através do uso de uma seringa, foi aplicada uma quantidade de 200 μL de cada formulação a testar que foi distribuída uniformemente sobre a superfície da membrana, tendo também sido preparada uma formulação controlo que não continha CyA. O compartimento dador e o braço de amostragem do compartimento recetor foram cuidadosamente cobertos com Parafilm® para evitar a evaporação e para que os estudos fossem realizados sob condições oclusivas. Bolhas de ar foram removidas da interface.

Em tempos pré-definidos (0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas) foram retiradas alíquotas de 500 μL do compartimento recetor que foram imediatamente substituídas pelo mesmo volume de solução recetora, que se encontrava à temperatura de 37°C. Depois de efetuadas todas as recolhas, as amostras foram congeladas para posterior quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Após as 24 horas da experiência, com o objetivo de extrair a CyA que ficou retida nas membranas, estas foram retiradas das células de difusão de *Franz* e colocadas a agitar em 3 mL de (PBS/EtOH) (70/30) / MeOH (50/50) (% v/v) durante um período de 12 a 16 horas. Após este período de tempo as amostras foram filtradas usando um filtro de seringa de polietersulfona (PES) com um tamanho de poro de 0,45 μm e um diâmetro de 25 mm adquirido de Los Productos de ALDO S.L. (Arganda del Rey, Madrid, Espanha). A quantidade de CyA presentes nas amostras foi quantificada por CLAE.

2.3.1.1. Quantificação analítica das amostras de Ciclosporina A obtidas nos estudos de libertação

Com o intuito de analisar qualitativamente e quantitativamente as amostras obtidas nos estudos *in vitro*, foi usado um sistema de CLAE de fase reversa (Agilent 1260 Infinity II, EUA), composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm (Phenomenex, EUA) e uma pré-coluna (P.N. 820888- 901, Agilent Technologies, EUA). Embora a adsorção seja o princípio base da cromatografia, a separação real da amostra nos seus componentes ocorre quando o composto adsorvido é eluído usando uma fase móvel com a polaridade necessária. [168] Para tal, a seleção da fase móvel é feita em combinação com a seleção da coluna, fase estacionária, uma vez que a polaridade de ambas as fases influenciam os tempos de retenção (T_R). [168] Assim, a fase móvel foi composta por uma mistura de solventes, Acetonitrilo (ACN) e água (H_2O), (ACN/ H_2O) (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante durante a análise - eluição isocrática. Por forma a evitar problemas ao nível dos capilares e da coluna, inicialmente procedeu-se à filtração dos solventes utilizados e à remoção das bolhas de ar utilizando um sistema de ultrassons. Por outro lado, a taxa do fluxo também é um parâmetro importante, uma vez que a separação é influenciada por esta. [168] Assim, a taxa de fluxo foi definida para 1 mL/min e o volume de injeção para 50 μL . A temperatura é outro critério que deve ser tido em conta para qualquer amostra, uma vez que a taxa de fluxo e de adsorção variam com esta. [168] Assim, com base na literatura a temperatura foi definida para 60°C. Como na literatura, o comprimento de onda de deteção usado foi de 210 nm. Uma vez que, a quantificação de um composto teste pode ser feita a partir da intensidade da área do composto usando curvas de

calibração, com base num *stock* de CyA de 30 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) foi definida uma reta de calibração linear numa gama de concentrações de 0 a 30 µg/mL. [168]

Para obtenção de espectros mais evidentes as condições cromatográficas apresentadas foram previamente otimizadas.

2.3.1.2. Modelos matemáticos de libertação de fármacos

A libertação cumulativa de fármacos é um processo complexo que pode resultar da conjugação de vários fenómenos, por exemplo, difusão, dissolução, particionamento, osmose, inchaço e erosão, pelo que é benéfico avaliar / explicar o mecanismo de cinética de libertação de fármacos em função do tempo recorrendo a modelos matemáticos. [169] Uma vez que, não existe nenhum modelo na literatura que cubra todos os cenários de libertação de fármacos, os dados obtidos foram ajustados através de quatro modelos matemáticos de libertação de fármacos. Os modelos utilizados foram os seguintes: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, modelo de Higuchi e modelo de Korsmeyer-Peppas.

O **modelo de ordem zero** descreve a libertação de um fármaco a uma taxa constante ao longo do tempo, independentemente da concentração do fármaco. [169, 170, 171.] Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução de fármacos de diversos tipos de formas farmacêuticas de libertação modificada, por exemplo, de sistemas transdérmicos, comprimidos de matriz com fármacos de baixa solubilidade, formas revestidas e sistemas osmóticos. [169, 171] As formas farmacêuticas que seguem este perfil de libertação são adequadas para produzirem uma ação farmacológica prolongada. [169, 170] O modelo de ordem zero é descrito pela Equação 2.3.1.2.1. [169]

$$C_t = C_0 + k_0 t \quad (2.3.1.2.1.)$$

onde, C_t é a quantidade de fármaco libertado em função do tempo, C_0 é a concentração inicial de fármaco libertado (geralmente, $C_0 = 0$) e k_0 é a constante de libertação de ordem zero.

Para estudar este modelo, é necessária a construção de um gráfico de concentração descrita pela percentagem acumulada de fármaco libertado *versus* o tempo de libertação. [168]

Por outro lado, o **modelo de primeira ordem** descreve a libertação de um fármaco ao longo do tempo, dependendo da concentração do fármaco. [169, 171] Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução de fármacos nas formas farmacêuticas como as que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas. [169, 170, 171] O modelo de primeira ordem é descrito pela Equação 2.3.1.2.2. [169]

$$\log Q_1 = \log Q_0 + \frac{k_1 t}{2,303} \quad (2.3.1.2.2.)$$

onde, Q_1 é a quantidade de fármaco libertado em função do tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco dissolvido e k_1 é a constante de libertação de primeira ordem.

Para estudar este modelo, é necessária a construção de um gráfico do logaritmo da percentagem da concentração resultante do fármaco *versus* o tempo. [169]

O **modelo de Higuchi** descreve a libertação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependendo da raiz quadrada do tempo. [169, 170] Apesar de ter sido inicialmente projetado para modelar a cinética de libertação de fármacos aplicados na pele através de pomadas, filmes ou sistemas planares, este modelo tem sido usado para formas de dosagem tridimensionais onde a libertação do fármaco é conduzida apenas por um processo de difusão. [169, 170, 171] Assim, esta relação permite descrever a dissolução de fármacos em vários tipos de formas farmacêuticas, por exemplo, em sistemas transdérmicos e comprimidos de matriz com fármacos solúveis em água. [170, 171] O modelo de Higuchi é descrito pela Equação 2.3.1.2.3. [169]

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad (2.3.1.2.3.)$$

onde, Q é a quantidade de fármaco libertado em função do tempo t por unidade de área e K_H é a constante de libertação do modelo de Higuchi.

O modelo de Higuchi permitiu o desenvolvimento de uma variedade de modelos matemáticos importantes para classificar o perfil de libertação de agentes ativos em formas farmacêuticas, como é o caso do modelo Korsmeyer-Peppas, descrito de seguida. [169]

Para estudar este modelo, é necessária a construção de um gráfico de percentagem acumulada de fármaco libertado *versus* a raiz quadrada do tempo. [169]

O **modelo de Korsmeyer-Peppas** foi desenvolvido especificamente para descrever a libertação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, quando o mecanismo de libertação do fármaco não é conhecido ou quando estão envolvidos mais que um tipo de fenômenos de libertação de fármacos. [169] O modelo de Korsmeyer-Peppas é descrito pela Equação 2.3.1.2.4. [169]

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K t^n \quad (2.3.1.2.4.)$$

onde, Q_t é a quantidade de fármaco libertado em função do tempo t , Q_∞ é a quantidade de fármaco no estado de equilíbrio, n é o expoente de libertação em função do tempo, e K é a constante cinética de Korsmeyer-Peppas.

De acordo com o valor do expoente de libertação, n , usado neste modelo, pode-se determinar o mecanismo de libertação, que se encontra descrito na Tabela 2. [169, 170] Para determinar este valor do expoente é recomendado usar a porção da curva de libertação apenas até ao ponto em que $\frac{Q_t}{Q_\infty} < 0,60$. [169, 170] Por sua vez, esta equação tem sido utilizada para a linearização de dados de libertação de diversas formulações de microcápsulas e microesferas. [170, 171]

Tabela 2: Interpretação dos modelos de libertação de fármacos de sistemas poliméricos possuindo geometrias diferentes. Adaptado de 169

Mecanismos de libertação	Geometria	Valor do expoente (n)
Difusão Fickiana	Planar (filmes finos)	0,50
	Cilindros	0,45
	Esferas	0,43
Transporte anómalo	Planar (filmes finos)	$0,50 < n < 1$
	Cilindros	$0,45 < n < 0,89$
	Esferas	$0,43 < n < 0,85$
Caso I transporte	Planar (filmes finos)	1
	Cilindros	0,89
	Esferas	0,85
Super Caso II transporte	Planar (filmes finos)	$n > 1$
	Cilindros	$n > 0,89$
	Esferas	$n > 0,85$

Para estudar este modelo, é necessária a construção de um gráfico do logaritmo da percentagem de libertação acumulada de fármaco *versus* o logaritmo do tempo. [169]

Com base nas equações teóricas de cada modelo, acima representadas, foi construído um gráfico. A partir do gráfico obtido foi examinada a equação correspondente ao melhor ajuste com base no valor do coeficiente R^2 . [172]

2.4. Estudos *ex vivo*

2.4.1. Preparação da pele

Os estudos de permeação *ex vivo* utilizando células de difusão de *Franz* podem ser realizados com recurso à pele humana ou à pele animal. ^[173] A pele humana deve ser utilizada sempre que possível. ^[173] No entanto, uma vez que a abundância de pele humana em condições saudáveis é limitada, possui grande variabilidade e a sua obtenção pode levantar questões éticas, é comum estes estudos serem realizados alternativamente com pele proveniente de animais. ^[173, 174] A pele de porco é a mais recomendada devido à sua similaridade com a pele humana, em termos de morfologia (estrutura, espessura, composição lipídica) e função. ^[173, 174] Por outro lado, a pele de suíno é amplamente utilizada como substituto da pele humana devido ao seu menor custo e facilidade de obtenção. ^[173]

Assim, para a realização destes estudos de permeação foi utilizada como membrana natural, pele de porco. Esta foi extraída de um leitão fêmea branca com idade compreendida entre 5 e 7 meses fornecida por um matadouro local. Inicialmente, procedeu-se ao corte dos pelos do leitão utilizando uma tosquiadora. De seguida, com o auxílio de um bisturi removeu-se cuidadosamente a pele do leitão, que foi cortada em secções das quais foi removida a gordura subcutânea. Posteriormente, procedeu-se à dermatomização da pele para 760 µm usando um dermatomo elétrico (Integra LifeSciences, Massachusetts, EUA). As amostras de pele obtidas foram cortadas em pedaços de 3 × 3 cm e armazenadas a uma temperatura de -20°C nas instalações da LaserLeap Technologies[®], por um período máximo de 3 meses.

Antes da realização dos estudos de permeação, os pedaços de pele congelados foram descongelados numa tina contendo gaze humedecida. Para acelerar este processo a tina foi colocada em banho a 37°C durante 30 minutos. Após descongeladas, as amostras de pele foram colocadas entre os compartimentos dador e recetor das células de *Franz*, com a CC voltada para o compartimento dador e a derme voltada para o compartimento recetor, de modo que a pele se equilibrasse com a solução recetora, durante um período de 15 minutos. Para evitar a desidratação da CC durante este período, foi ainda colocado um pedaço de gaze humedecido sobre a pele.

Segundo as diretrizes da Agência Europeia do Medicamento (EMA), a espessura da pele e a integridade da CC são dois parâmetros que devem ser tidos em conta antes da realização dos estudos de permeação. ^[175] Assim, a espessura da pele foi medida usando um micrómetro, e as amostras de pele com maior variabilidade de espessura foram substituídas. Já a integridade da barreira foi avaliada através da medição da TEWL usando um *Tewameter* (MPA, WTEC, Alemanha). As amostras de pele que apresentaram valores de TEWL superiores a 1 g/m²/h e inferiores a 10 g/m²/h foram consideradas viáveis, tendo as restantes sido substituídas

2.4.2. Estudo do solvente de extração da Ciclosporina A das amostras de pele

Após a obtenção da pele de porco e antes da realização dos estudos de permeação procedeu-se ao estudo do solvente de extração da CyA da pele, com o intuito de perceber a partir de qual dos solventes se conseguiria extrair maior quantidade de substância ativa da pele. Como solventes de extração optou-se pelo uso de uma solução composta por uma mistura de PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% , v/v) e uma solução de MeOH. Para a realização deste procedimento, procedeu-se ao recorte da pele utilizando um *punch* para biópsia estéril e descartável de 8 mm de diâmetro (Kai Medical, Solingen, Alemanha), e posteriormente, à injeção de uma quantidade conhecida da formulação de CyA, 20 µL, em pele dermatomizada e em pele sem estar dermatomizada, utilizando uma seringa. A agulha penetrou a pele com um ângulo baixo, de aproximadamente 15°, ângulo comumente utilizado no caso da aplicação intradérmica e, a formulação foi injetada lentamente. Após 24 horas deste procedimento e, com o objetivo de extrair a CyA que ficou retida na pele, procedeu-se ao corte da pele dermatomizada e não dermatomizada em porções mais pequenas com o auxílio de um bisturi. Depois da obtenção da pele em pedaços mais pequenos estes foram colocados a agitar em 3 mL de cada solvente de extração a testar por um período de 12 a 16 horas. Após este período, as amostras foram filtradas usando um filtro de seringa de polietersulfona (PES) com um tamanho de poro de 0,45 µm e um diâmetro de 25 mm adquirido de Los Productos de ALDO S.L. (Arganda del Rey, Madrid, Espanha). A quantidade de CyA presente nas amostras foi quantificada por CLAE.

2.4.3. Estudos de permeação da formulação contendo Ciclosporina A

Os estudos de permeação *ex vivo* da CyA foram realizados sob condições ativas e passivas. A permeação da CyA sob condições ativas foi avaliada usando a tecnologia denominada Piezoporação da LaserLeap Technologies®, que visa promover a desestabilização da CC e, portanto, facilitar a permeação da CyA. Para tal, foi utilizado um laser que emite radiação eletromagnética a um comprimento de onda de 1064 nm, irradiando o filme piezofotónico com duas fluências distintas, uma fluência de 69 mJ/cm² e uma fluência de 48 mJ/cm². A permeação sob cada uma das condições foi promovida pela aplicação de estímulos do laser durante 5 minutos.

Para a realização destes estudos de permeação foi utilizado um sistema de células de difusão de *Franz* verticais de 15 mm, composto por nove células individuais, contendo um volume de compartimento recetor de 12 mL e uma área de difusão ajustada para a área ativa do laser de 0,8640 cm². O sistema usado encontrava-se conectado a um banho termostaticado a uma temperatura de 37°C e sob agitação magnética constante de 600 rpm (agitador V9-CB, PermeGear, EUA). O compartimento recetor foi preenchido com uma solução contendo PBS (pH=7,4) e EtOH, como co-solvente, nas proporções 70/30 (% , v/v), tendo sido removidas possíveis bolhas de ar existentes entre esta solução e a pele. No compartimento dador, através do uso de uma seringa, foram aplicados 300 µL de cada formulação a testar, tendo também sido

preparada uma formulação controlo que não continha CyA. Estes estudos foram realizados sob condições de oclusão.

Num tempo pré-definido (0,5 horas) foram retiradas alíquotas de 500 µL do compartimento recetor. Depois de efetuadas todas as recolhas, as amostras foram congeladas para posterior quantificação por CLAE.

Com o objetivo de quantificar a CyA que ficou retida nas camadas mais profundas da pele, as amostras de pele foram recolhidas das células de *Franz*, ao fim de 0,5 horas de experiência, e limpas 6 vezes com gazes húmidas para remover a restante formulação. Após a pele estar limpa, a área ativa foi extraída usando um *punch* para biópsia estéril e descartável de 8 mm de diâmetro (Kai Medical, Solingen, Alemanha). Para remover a CC da restante pele, procedeu-se à técnica de *Tape Stripping* (TS), que consiste na aplicação sucessiva de fitas adesivas na pele seguida da sua remoção. ^[174] Esta técnica foi realizada 20 vezes aplicando um peso de 1 kg por um período de 10 segundos após a aplicação da fita adesiva (Scotch®) e antes da sua remoção. A restante pele foi cortada em porções mais pequenas, com o auxílio de um bisturi, e colocadas em 3 mL de (PBS/EtOH) (70/30) / MeOH (50/50) (% v/v) a agitar por um período de 12 a 16 horas. Após este período, as amostras foram filtradas usando um filtro de seringa de polietersulfona (PES) com um tamanho de poro de 0,45 µm e um diâmetro de 25 mm adquirido de Los Productos de ALDO S.L. (Arganda del Rey, Madrid, Espanha). A quantidade de CyA presentes nas amostras foi quantificada por CLAE.

2.4.3.1. Quantificação analítica das amostras de Ciclosporina A obtidas nos estudos de permeação

Com o intuito de analisar qualitativamente e quantitativamente as amostras obtidas nos estudos *ex vivo*, foi usado um sistema de CLAE de fase reversa (Agilent 1260 Infinity II, EUA), composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm (Phenomenex, EUA) e uma pré-coluna (P.N. 820888- 901, Agilent Technologies, EUA). A fase móvel foi composta por uma mistura de solventes, ACN/H₂O (65/35) (% v/v) cuja composição foi constante durante a análise. A taxa de fluxo foi definida para 1 mL/min, o volume de injeção para 50 µL e a temperatura para 60°C. O comprimento de onda de deteção usado foi de 210 nm. A curva de calibração foi definida linearmente numa gama de concentrações de CyA situadas entre 0 a 3,75 µg/mL, partindo de um *stock* de CyA de 30 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

2.5. Análise dos dados

Após a identificação do sinal de CyA nos cromatogramas estes foram ajustados através de uma reta, $y = mx + b$, onde se fez variar manualmente o valor do declive, m , e da ordenada na origem, b . Após ajustados, os sinais dos cromatogramas foram integrados pela regra dos trapézios que permite obter a área do pico do analito. Com base na curva de calibração, a

concentração das amostras foi obtida em $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, a concentração foi convertida em quantidade acumulada (μg) por unidade de área (cm^2), de acordo com a Equação 2.5.1. ^[177]

$$Q = \left\{ C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i S \right\} / A \quad (2.5.1.)$$

onde, Q é a quantidade de fármaco por unidade de área de superfície ($\mu\text{g/cm}^2$), C_n é a concentração de fármaco retirado num ponto de tempo específico ($\mu\text{g/mL}$), V corresponde ao volume da célula de difusão de *Franz*, que neste caso específico é de 12 mL, $\sum_{i=1}^{n-1} C_i$ diz respeito à soma da concentração das amostras de fármaco nos pontos de tempo anteriores, S é o volume da amostra, neste caso específico 0,5 mL e A equivale à área de difusão.

Os resultados dos estudos *in vitro* são apresentados em percentagem, tendo sido calculados de acordo com a Equação 2.5.2.

$$\% CyA = \frac{q(t)}{q(t_0)} \times 100 \quad (2.5.2)$$

onde, $q(t)$ corresponde à quantidade de fármaco num ponto de tempo específico e $q(t_0)$ equivale à quantidade de fármaco inicial colocada no compartimento dador da célula de difusão de *Franz*.

Todos os resultados apresentados correspondem a valores médios \pm erro padrão.

A presença de possíveis *outliers* foi avaliada através do teste de Grubbs com um intervalo de confiança de 95%, de acordo com a Equação 2.5.3. ^[199, 200]

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{\sigma} \quad (2.5.3.)$$

onde x_i corresponde ao valor suspeito, \bar{x} corresponde à média e σ corresponde ao desvio padrão. Os valores de G obtidos são comparados com o valor crítico (Tabela apresentada no anexo 4). Quando se verifica que o valor calculado é superior ao valor crítico, esse valor é considerado um *outlier*. ^[199, 200] Caso o valor suspeito não corresponda a um *outlier*, considera-se que a amostra está validada, e pode-se considerar que não existem mais valores discrepantes. ^[199, 200] Por outro lado, caso um *outlier* tenha sido identificado e removido, o teste não deve ser repetido sem a adaptação do valor crítico. ^[199, 200]

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo encontram-se descritos todos os resultados obtidos ao longo deste projeto, incidentes no desenvolvimento e otimização de uma formulação contendo CyA, bem como nos estudos *in vitro* e *ex vivo*, realizados em células de difusão de *Franz*, que incluem, respetivamente, estudos de libertação e estudos de permeação onde foi avaliada a eficácia da tecnologia da LaserLeap Technologies®.

3.1. Formulação tópica contendo Ciclosporina A

3.1.1. Otimização da formulação

A composição da formulação de CyA para aplicação tópica a utilizar no presente estudo, foi escolhida com base em estudos relatados na literatura para aplicação tópica. Nesta formulação a CyA foi utilizada como substância ativa, tendo sido utilizada uma percentagem de 2% desta molécula. Conforme foi demonstrado por Kumar *et al.* (2016) uma formulação lipossomal tópica contendo 2% (m/m) de CyA num gel de Carbopol foi eficaz no tratamento da psoríase. [178] Por sua vez, percentagens semelhantes de CyA também foram usadas por outros autores para administração tópica. [179] Devido à baixa solubilidade da CyA em água, foi utilizado EtOH como co-solvente, com o objetivo de aumentar a solubilidade da CyA. [94, 180] A percentagem de EtOH utilizada na formulação foi previamente otimizada, tendo sido utilizada uma percentagem final de 10%, percentagem essa que não compromete as propriedades da pele. [180] Por sua vez, o Tween 80 foi utilizado como surfactante devido ao seu elevado equilíbrio hidrofílico-lipofílico (>10). [181] A percentagem final de surfactante utilizada foi de 2%, tendo esta sido escolhida com base em estudos *in vitro* de libertação utilizando células de difusão de *Franz*. Os resultados da escolha da melhor percentagem de Tween 80 encontram-se apresentados mais à frente na secção 3.2.2. Como óleo foi utilizado Castor oil, uma vez que este possui grandes efeitos de oclusão na pele ajudando a inibir a TEWL ao formar uma barreira eficaz para o meio ambiente. [182] Por outro lado, este é um óleo comumente utilizado em estudos relatados na literatura. [182, 183, 184] A restante formulação foi composta por 1% de polímero Carbopol, 0,5% Trietanolamina e a restante percentagem de água (83,5%). A composição da formulação final encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Resumo da percentagem (% m/v) de cada componente da formulação de CyA a utilizar no presente estudo.

Componente	Percentagem (% m/v)
Ciclosporina A	2
Etanol	10
Tween 80	2
Castor oil	1
Água	83,5
Carbopol	1
Trietanolamina	0,5

3.1.2. Caracterização Físico - Química da formulação

Após a escolha de cada componente e da sua percentagem a utilizar na formulação contendo CyA, procedeu-se à avaliação do pH e da aparência da mesma, bem como à medição da densidade, por forma a garantir as propriedades físico-químicas adequadas para a aplicação tópica. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resumo dos valores de pH e de densidade obtidos para a formulação final de CyA e caracterização da sua aparência.

pH	6,26 ± 0,14
Densidade (g/cm³)	0,9896 ± 0,0061
Aparência	Branca e homogénea

O valor do pH da formulação foi medido imediatamente após a sua preparação. A formulação de CyA apresenta um valor de pH de 6,26 ± 0,14, valor este que está dentro da faixa de pH considerado ideal para formulações tópicas (5 – 7). [161]

Os valores da densidade foram obtidos pesando um volume de 0,5 mL de formulação. A formulação possui uma densidade de 0,9896 ± 0,0061 g/cm³, valor que se encontra muito próximo do valor da densidade da água (1,00 g/cm³), o que seria de esperar, uma vez que a formulação consiste num gel à base de água, sendo esta o principal componente da formulação (83,5%).

No que diz respeito à aparência, a formulação de CyA preparada apresenta uma consistência de gel homogéneo de cor branca, como é visível na Figura 18.



Figura 18: Aparência da formulação final de CyA que consiste num gel homogêneo de cor branca.

3.1.3. Tamanho e distribuição de tamanhos das partículas que compõem a formulação de CyA

Neste projeto, a execução da técnica de DLS teve como objetivo determinar o tamanho das partículas que compõem a formulação em estudo e determinar o grau de homogeneidade destas através do valor do PDI. Para tal, foram realizadas três medições através da técnica de DLS, cujos resultados são apresentados na Figura 19.

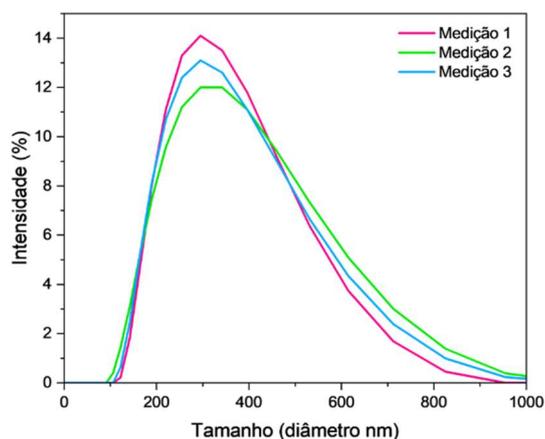


Figura 19: Representação gráfica da distribuição do tamanho das partículas em função da intensidade para cada medição executada.

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios \pm erro padrão do tamanho das partículas e do PDI, correspondentes às três medições efetuadas através da técnica de DLS.

Tabela 5: Resumo dos valores obtidos para o tamanho e PDI através da técnica de DLS.

Tamanho (diâmetro em nm)	292,0 ± 3,4
Índice de Polidispersão (PDI)	0,1570 ± 0,0079

As emulsões consistem numa classe de sistemas dispersos compostos por dois líquidos imiscíveis, em que um dos líquidos se encontra disperso, fase dispersa, no outro, fase contínua, na forma de gotículas, na presença ou não de um emulsificante. ^[185] Apesar de poderem ser quaisquer líquidos, as emulsões são normalmente compostas por água e por um óleo. ^[185] As emulsões podem ser classificadas em termos de tamanho das partículas que as compõem em macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões. ^[185] As macroemulsões geralmente têm uma faixa de tamanho que varia de 100 a 5000 nm, com uma média de 1000 a 2000 nm. ^[185] As nanoemulsões por sua vez, possuem uma faixa de tamanho que vai dos 20 aos 100 nm. ^[185] Por fim, as microemulsões usualmente possuem um tamanho que varia dos 5 aos 50 nm. ^[185] Uma vez que a formulação em estudo é composta por uma fase água e uma fase óleo na presença de emulsificante, podemos admitir que estamos perante uma emulsão, mais concretamente, uma macroemulsão devido ao diâmetro que as partículas que a compõem possuem, cerca de 292,0 ± 3,4 nm.

Por outro lado, tendo em conta o PDI de 0,1570 ± 0,0079 podemos concluir que as partículas que compõem a formulação se encontram monodispersas nesta, ou seja, pouco dispersas, uma vez que o PDI resultante é <0,300.

3.1.4. Estabilidade da formulação

De forma a avaliar a estabilidade da formulação de CyA em estudo, esta foi armazenada durante 1 mês no frigorífico a uma temperatura de 4°C. A formulação foi analisada em termos de aparência e percentagem de CyA que se encontrava presente ao fim de 15 dias e ao fim de 1 mês de armazenamento. Os resultados correspondentes à percentagem de CyA presente na formulação ao fim de 15 dias e 1 mês encontram-se apresentados na Figura 20.

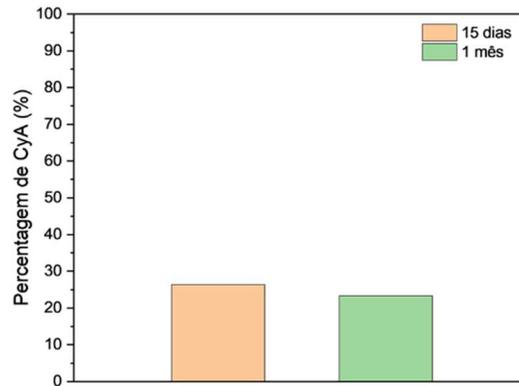


Figura 20: Representação gráfica da porcentagem de CyA presente na formulação ao fim de 15 dias e 1 mês de armazenamento à temperatura de 4°C.

Ao fim de 15 dias verifica-se que a formulação em estudo possui cerca de 26,4% de CyA, enquanto ao fim de 1 mês, a porcentagem de CyA presente na formulação é de 23,3%. Por sua vez, é possível afirmar que tanto ao fim de 15 dias como ao fim de 1 mês a porcentagem de CyA presente na formulação é baixa. Contudo, uma vez que não foi feita uma recolha de amostras no dia em que a formulação foi preparada e armazenada, não se consegue saber com exatidão a porcentagem de CyA que se degradou na formulação em estudo. Por outro lado, é de salientar que a preparação da formulação está sujeita a erros experimentais que podem interferir com os valores obtidos. Todavia, é de realçar que tanto ao fim de 15 dias como ao fim de 1 mês não foram visíveis alterações significativas na aparência da formulação.

3.2. Estudos *in vitro* e *ex vivo*

Os estudos *in vitro* utilizando membranas sintéticas são importantes, pois contribuem para a caracterização, compreensão e validação das formulações a analisar posteriormente em estudos *ex vivo* utilizando membranas biológicas. Por outro lado, os estudos de permeação devem ser precedidos por este tipo de testes para avaliar a capacidade da substância ativa se difundir do seu dador, ou seja, da formulação contendo excipientes. Neste projeto, os estudos *in vitro* e *ex vivo* tiveram início com a realização de uma curva de calibração, essencial para quantificar a CyA presentes nas amostras resultantes dos estudos de libertação e de permeação.

3.2.1. Curva de Calibração

Por forma a quantificar a CyA presente nas amostras provenientes das células de difusão de *Franz* ao longo do tempo experimental, foram preparadas oito curvas de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 30 µg/mL. Cada curva de calibração foi realizada a partir de uma solução *stock* de 30 µg/mL, para a qual foi pesada uma quantidade de 0,003 g de CyA que foi dissolvida em 100 mL de PBS/EtOH (70/30) (% v/v). A partir desta solução *stock*, foram preparadas as várias soluções padrão utilizando o método de diluições sucessivas.

Com base nos cromatogramas provenientes da CLAE, foi possível correlacionar a área do pico de interesse dos sinais analíticos de cada solução padrão de CyA com a sua concentração, Figura 21 A. A partir desta correlação foi obtida uma curva de calibração, num total de oito curvas neste caso. As curvas de calibração finais que se encontram apresentadas na Figura 21 B foram construídas com base nas médias das oito curvas de calibração anteriormente preparadas.

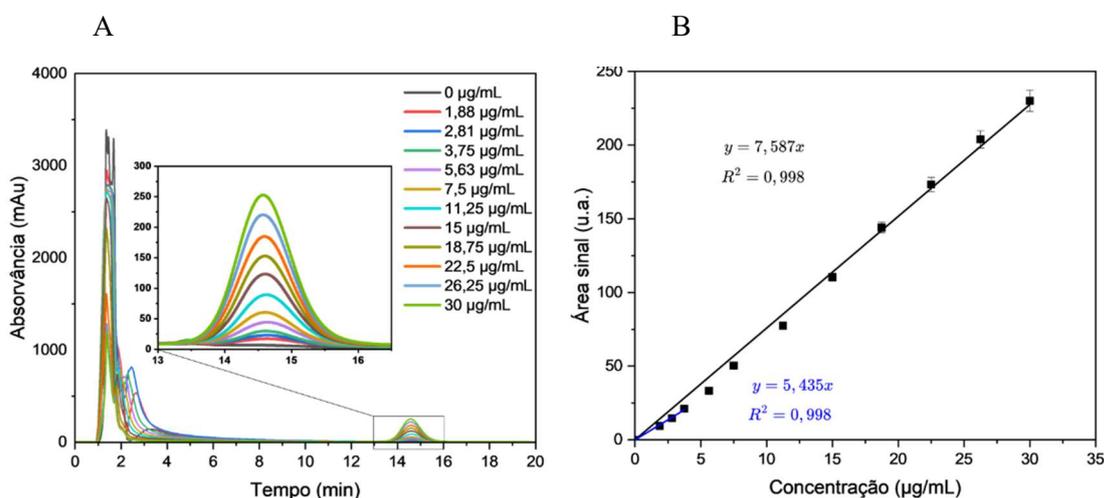


Figura 21: Curvas de calibração da CyA. **A-** Cromatogramas dos padrões usados para preparar as curvas de calibração. Os cromatogramas foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C. **B-** Representação das curvas de calibração obtidas. Curva de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 30,0 µg/mL (preto) e curva de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 3,75 µg/mL (azul).

Na Figura 21 B são representadas duas curvas de calibração, uma curva de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 30,0 µg/mL (preto) que foi usada para quantificar a CyA nas amostras provenientes do compartimento recetor nos estudos *in vitro* de libertação e uma curva de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 3,75 µg/mL (azul) que foi usada para quantificar a CyA nas amostras provenientes dos estudos *ex vivo* de permeação.

Um parâmetro importante a avaliar numa curva de calibração é a linearidade. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse (analito), dentro de uma gama analítica específica. [186, 187, 188] Inicialmente, a linearidade deve ser avaliada pela observação do gráfico dos sinais analíticos em função da concentração do analito. [187] Caso se verifique a existência de uma relação linear, os resultados do teste devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, por exemplo, pelo método dos desvios quadrados (regressão linear) que permite obter o valor do declive, da intersecção, do coeficiente de correlação (R) e do coeficiente de determinação (R²).

[187, 188] Para se verificar a existência de linearidade é essencial que o R^2 apresente valores superiores a 0,995, pois desta forma é possível garantir um melhor ajuste dos resultados. [186]

Os dados da curva analítica, representados na Figura 21 B, foram ajustados pela análise de regressão linear, tendo sido obtidas duas curvas que são definidas pela Equação 3.2.1.1. no caso em que é utilizada uma gama de concentrações de 0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (curva a preto) e pela Equação 3.2.1.2. no caso em que é utilizada uma gama de concentrações de 0 a 5,63 $\mu\text{g/mL}$ (curva a azul).

$$y = 7,587x \quad (3.2.1.1.)$$

$$y = 5,435x \quad (3.2.1.2.)$$

A curva realizada numa gama de concentrações de 0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (preto) apresenta um declive de 7,587, enquanto a curva realizada numa gama de concentrações de 0 a 5,63 $\mu\text{g/mL}$ (azul) apresenta um declive de 5,435. Ambas as curvas possuem uma ordenada na origem de 0. No que diz respeito ao coeficiente de determinação, R^2 , as duas curvas possuem um R^2 de 0,998 o que indica a existência de linearidade dentro do intervalo de concentrações estudadas para ambas as curvas de calibração.

Foram também determinados os Limites de Detecção e de Quantificação para o método analítico em estudo. O Limite de Detecção (LD) de um procedimento analítico diz respeito à menor concentração de analito presente numa amostra que pode ser estatisticamente detetado, mas não necessariamente quantificado, uma vez que a quantificação a este nível está sujeita a erros significativos. [186, 187, 188] Em termos quantitativos o LD pode ser obtido através da Equação 3.2.1.3. [186]

$$LD = X_0 + 3,3 \cdot \sigma_0 \quad (3.2.1.3.)$$

onde, X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos, preparados de forma independente e σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

Já o Limite de Quantificação (LQ) de um procedimento analítico diz respeito à menor concentração de analito presente numa amostra que pode ser estatisticamente quantificado com precisão e exatidão. [186, 187, 188] Quantitativamente, o LQ pode ser determinado através da Equação 3.2.1.4. [186]

$$LQ = X_0 + 10 \cdot \sigma_0 \quad (3.2.1.4)$$

onde, X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos, preparados de forma independente e σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

A partir das equações acima apresentadas foram determinados os Limites de Detecção e de Quantificação, tendo sido obtido o valor de 1,70 $\mu\text{g/mL}$ para o LD e o valor de 4,35 $\mu\text{g/mL}$ para o LQ.

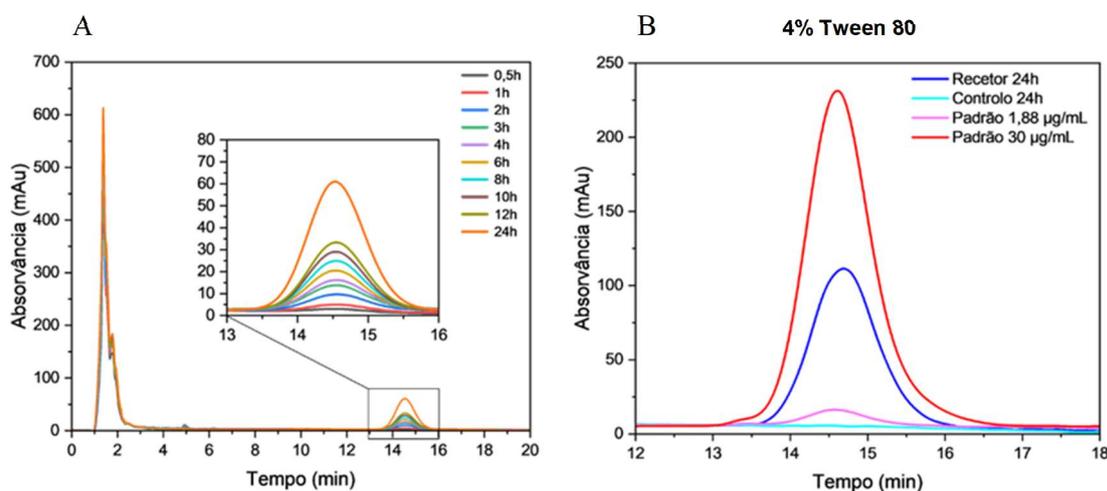
3.2.2. Estudos de libertação

A libertação da CyA das formulações contendo excipientes foi avaliada através de estudos *in vitro* realizados com membranas sintéticas de acetato de celulose, contendo um poro com um tamanho que varia entre 6 e 8 kDa, utilizando um sistema de células de difusão de *Franz* composto por nove células individuais.

Numa primeira etapa estes estudos de libertação tiveram como objetivo avaliar o perfil de libertação de quatro formulações de CyA desenvolvidas contendo diferentes percentagens de surfactante (4; 2; 1 e 0,5%), por forma a perceber a influência da percentagem de Tween 80 na capacidade da CyA se libertar das formulações contendo excipientes. Posteriormente, após a análise do perfil de libertação de cada formulação, foi escolhida a melhor percentagem de Tween 80 a utilizar na formulação final, tendo o perfil de libertação desta última, posteriormente sido avaliado em mais detalhe. Os resultados obtidos encontram-se apresentados e são discutidos nos subtópicos seguintes.

3.2.2.1. Estudos de libertação para avaliar a influência da percentagem de Tween 80 na capacidade de libertação da CyA das formulações

Na Figura 22 encontram-se representados os resultados obtidos nos estudos *in vitro* de libertação para cada formulação de CyA contendo diferentes percentagens de Tween 80.



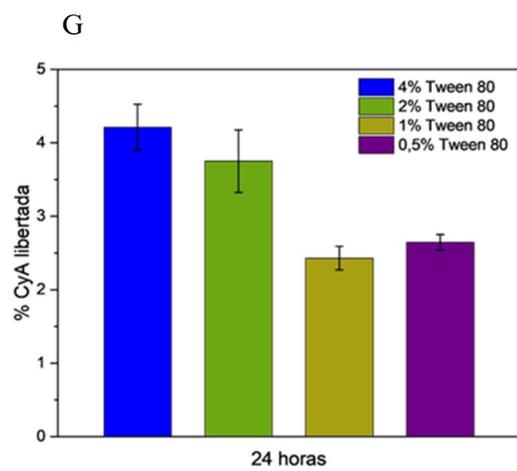
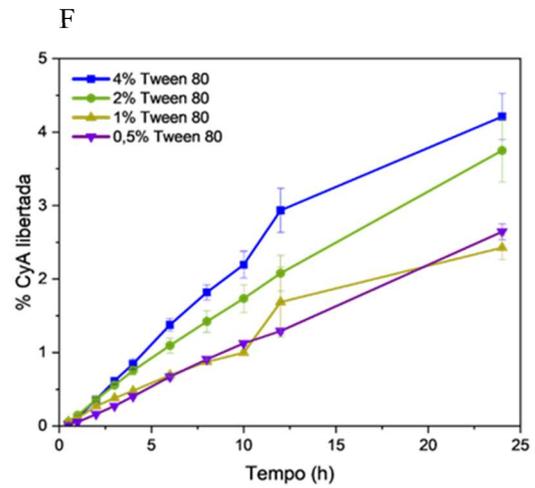
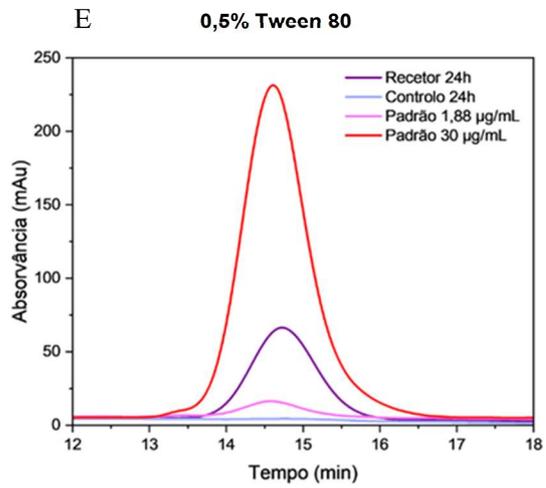
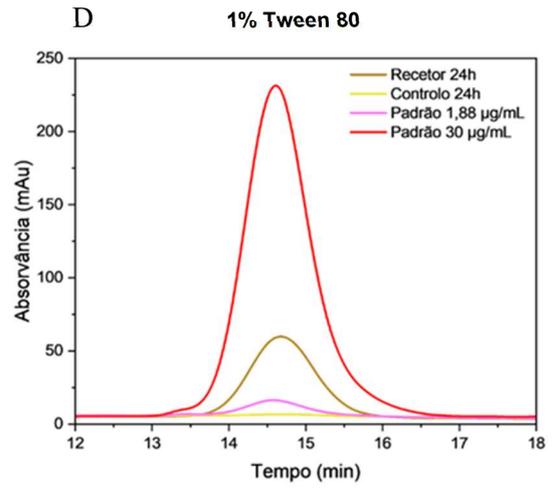
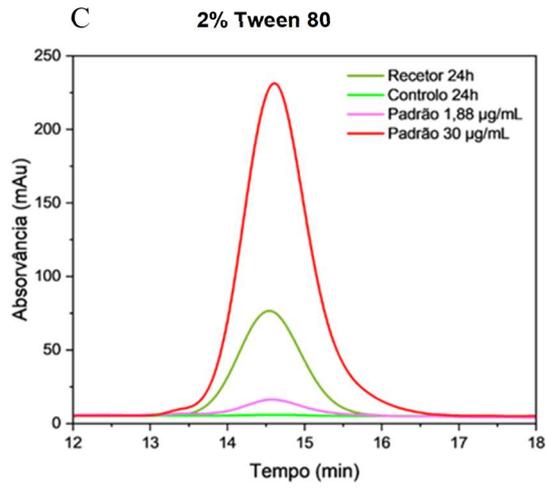


Figura 22: A- Cromatogramas representativos dos resultados obtidos para a libertação nas células de difusão de *Franz* em períodos de tempo pré-determinados. B- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 4% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (azul escuro) com o seu respetivo controlo (azul claro) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). C- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 2% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (verde escuro) com o seu respetivo controlo (verde claro) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). D- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 1% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (amarelo escuro) com o seu respetivo controlo (amarelo claro) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). E- Comparação dos cromatogramas correspondentes a uma amostra que contém 0,5% de Tween 80 recolhida às 24 horas do compartimento recetor (roxo escuro) com o seu respetivo controlo (lilás) e com os padrões de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho). F- Comparação do perfil de libertação da CyA para cada percentagem de Tween 80 a testar (4; 2; 1 e 0,5%), em percentagem ao longo do tempo. G- Percentagem de CyA libertada no compartimento recetor para cada percentagem de Tween 80 a testar (4; 2; 1 e 0,5%) até às 24 horas. Os cromatogramas A, B, C, D e E foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.

Na Figura 22 A encontram-se apresentados os cromatogramas, provenientes da CLAE, que são representativos das amostras retiradas do compartimento recetor das células de difusão de *Franz*, em tempos específicos, para cada formulação de CyA a testar contendo 4; 2; 1 e 0,5% de Tween 80. A partir destes cromatogramas é possível verificar a existência de picos intensos, cujos sinais analíticos aumentam com o tempo. Este aumento dos sinais com o tempo pensa-se que corresponde à passagem da CyA do compartimento dador para o compartimento recetor através da membrana de celulose, ou seja, à libertação da CyA da formulação.

Com o intuito, de se confirmar que os picos acima mencionados correspondem à CyA, foi feita uma comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras recolhidas às 24 horas do compartimento recetor para cada percentagem de Tween 80 a testar (4; 2; 1 e 0,5%) com os cromatogramas correspondentes das amostras padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e 30 µg/mL (vermelho), Figura 22 B, C, D e E. Os mesmos cromatogramas foram também comparados com o respetivo controlo. Através da análise dos cromatogramas correspondentes a cada formulação contendo diferentes percentagens de surfactante, Figura 22 B, C, D e E, verifica-se que as amostras recolhidas do compartimento recetor às 24 horas, para cada caso, possuem um sinal intenso num tempo de retenção semelhante às amostras padrão (rosa e vermelho), ou seja,

aos 14,6 minutos. Por sua vez, esse sinal possui uma intensidade que fica situada entre a intensidade do sinal do padrão de concentração 1,88 µg/mL (rosa) e a intensidade do sinal do padrão de concentração 30 µg/mL (vermelho). Por outro lado, em todos os casos representados, observa-se que nesta mesma região que corresponde ao R_T da CyA, existe um sinal menos intenso que corresponde à amostra controle, conforme seria de esperar devido à ausência de CyA na formulação controle. Assim, confirma-se que os picos acima mencionados correspondem ao analito em estudo, ou seja, à CyA.

Avaliando o perfil de libertação para cada formulação, Figura 22 F, verifica-se que há um aumento da quantidade de CyA que é libertada em função do tempo. Contudo, este aumento que é dado pela percentagem cumulativa de CyA, face à quantidade inicial de CyA que é colocada no compartimento dador, não é igual para as quatro formulações em estudo. Inicialmente e até à 1 hora verifica-se que a percentagem de CyA que é libertada por cada formulação é semelhante entre si. Contudo, após as 2 horas e até às 24 horas o que se observa é que as formulações que detêm percentagens superiores de Tween 80 (4% (azul) e 2% (verde)) possuem um aumento maior da percentagem de CyA que é libertada, em comparação com as formulações que contêm menores percentagens de Tween 80 (1% (amarelo escuro) e 0,5% (roxo)). Dentro das formulações que contêm quantidades superiores de Tween 80, a partir das 4 horas verifica-se que a percentagem de CyA que é libertada aumenta de forma diferente, sendo que o aumento é maior no caso da formulação que possui 4% de surfactante (azul), enquanto a formulação que contém 2% de surfactante (verde) possui um aumento linear. Quanto às formulações que apresentam menores percentagens de Tween 80, o que se observa é que estas possuem uma percentagem de libertação semelhante até às 10 horas. No entanto, após este tempo o que se observa é que a formulação que possui 1% Tween 80 (amarelo escuro) apresenta um aumento da percentagem libertada acentuado, entre as 10 e as 12 horas, quando comparada com a formulação que tem 0,5% (roxo) que apresenta um comportamento linear ao longo do tempo.

A percentagem cumulativa de CyA que foi libertada por cada formulação até às 24 horas encontra-se representada na Figura 22 G e é descrita na Tabela 6.

Tabela 6: Resumo da percentagem de CyA libertada de cada formulação contendo diferentes percentagens de Tween 80 (4; 2; 1 e 0,5%) até às 24 horas.

Percentagem de Tween 80 da formulação (%)	Percentagem de CyA libertada da formulação até às 24 horas (%)
4	4,21 ± 0,32
2	3,75 ± 0,43
1	2,43 ± 0,16
0,5	2,64 ± 0,11

De acordo com a Figura 22 G e os dados da Tabela 6, verifica-se que até às 24 horas a CyA possuiu maior capacidade de se libertar da formulação contendo 4% de Tween 80, seguida

da formulação contendo 2% de Tween 80. Em contrapartida, às 24 horas as formulações contendo 0,5 e 1% de Tween 80 são as que apresentam percentagens mais baixas de CyA libertada. Assim, conclui-se que a percentagem de Tween 80 tem um impacto significativo na percentagem de CyA que é libertada da formulação e se difunde através da membrana sintética.

Contudo, este estudo *in vitro* de libertação tinha como principal propósito a escolha da percentagem de Tween 80 e, portanto, da formulação final, para a qual se verificou maior percentagem de libertação de CyA. Um dos objetivos impostos era que a formulação possuísse a menor percentagem de surfactante possível, mas ao mesmo tempo apresentasse uma percentagem de libertação de CyA satisfatória. Apesar de todas as formulações apresentarem uma baixa libertação de CyA até às 24 horas, a formulação contendo 4% de Tween 80 apresenta uma percentagem de CyA que foi libertada cerca de 1,12 vezes superior à da formulação composta por 2% de Tween 80. Todavia, considerou-se que a diferença entre a percentagem de CyA libertada da formulação contendo 4 e 2% de surfactante não era significativa, tendo-se optado por escolher a formulação composta por 2% de Tween 80 para avançar para os estudos *ex vivo* de permeação.

Antes da realização dos estudos de permeação foi analisado com mais detalhe, no subtópico seguinte, o perfil de libertação da formulação final de CyA.

3.2.2.2. Estudos de libertação para a formulação contendo 2% de Tween 80

Na Figura 23 encontra-se representado o perfil de libertação para a formulação final de CyA.

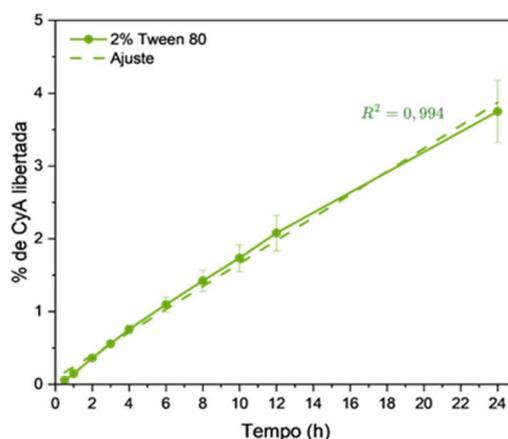


Figura 23: Perfil de libertação da formulação de CyA contendo 2% de Tween 80 ao longo do tempo, em percentagem.

Analisando com mais detalhe o perfil de libertação para a formulação final de CyA, que contem 2% de CyA e 2% de Tween 80, Figura 23, o que se verifica é que esta formulação possui uma libertação praticamente linear ($R^2 = 0,994$) até às 24 horas, ou seja, a percentagem de CyA que se libertou da formulação e passou a membrana sintética aumentou de forma linear ao longo do tempo, não se verificando a existência de sinais de saturação no compartimento recetor. Contudo, após as 24 horas de experiência, verifica-se que apenas uma percentagem

consideravelmente baixa de fármaco passou através da membrana sintética para o compartimento recetor, cerca de $3,75 \pm 0,43$ %.

Na literatura, não foram encontrados estudos equivalentes com CyA. No entanto, a partir de um estudo publicado por Musa *et al.* envolvendo experiências de libertação de duas formulações contendo CyA, foi possível retirar algumas conclusões.^[189] No estudo de Musa *et al.* foi avaliado o perfil de libertação de duas formulações de CyA. Ambas continham 0,3% de CyA, mas diferentes proporções de óleo, surfactante e água. A formulação designada por E1 continha 5% de óleo de moringa oleífera e 13% de uma mistura composta por Tween 80/Span 80, enquanto que a formulação designada por E2 continha 10% de óleo de moringa oleífera e 15% de Tween 80/Span 80. Para avaliar a libertação *in vitro* da CyA, os autores utilizaram células de difusão de *Franz* usando uma membrana de acetato de celulose de 13 mm. No compartimento dador foi colocado 1 mL de cada formulação a testar, enquanto no compartimento recetor foi colocada uma solução de PBS. Amostras de CyA foram recolhidas do compartimento recetor às 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 horas de experiência. Segundo Musa *et al.* ao fim das 6 horas de libertação E2 exibiu uma alta percentagem de libertação de CyA cerca de, 80,2%, enquanto E1 possuiu uma percentagem de libertação de 66,7%.

Juntamente com outros estudos publicados na literatura foi possível verificar que a maior parte dos estudos de libertação que utilizam formulações de CyA para aplicação tópica utilizam baixas percentagens desta molécula nas suas constituições e atingem percentagens de libertações mais elevadas que as que foram atingidas no presente estudo. Assim, conclui-se que a baixa capacidade da CyA se libertar da formulação em estudo pode ser devido ao facto de eventualmente existir uma sobressaturação de CyA na formulação, o que faz com que a percentagem de CyA que se consegue libertar da formulação e atravessar a membrana sintética para chegar ao líquido recetor seja pequena. Com intuito de se perceber melhor esta última suposição, foi ainda realizado um estudo de libertação para uma formulação contendo 0,2% de CyA, o qual será discutido mais adiante no subtópico 3.2.2.3.

Contudo, apesar da percentagem de CyA que se difundiu para o compartimento recetor nos estudos *in vitro* de libertação ter sido baixa, foram realizados estudos de permeação *ex vivo* utilizando membranas biológicas naturais com a formulação que contem 2% de CyA e 2% de Tween 80, com o intuito de se avaliar a capacidade da molécula em estudo penetrar a CC e atingir as camadas mais profundas da pele. Todavia, é de salientar que os estudos de permeação serão influenciados pela baixa percentagem de CyA que se liberta da formulação em estudo.

3.2.2.2.1. Ajuste aos modelos matemáticos de libertação de fármacos

A fim de melhor compreender o mecanismo de libertação da CyA, o perfil de libertação obtido para a formulação final foi submetido a um ajuste com diferentes modelos matemáticos.

Os valores obtidos após a aplicação destes modelos matemáticos encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Resumo do ajuste do perfil de liberação da formulação de CyA aos modelos matemáticos de liberação de fármacos

Modelo	Fórmula	Equação	Constante (K)	R ²	n
Ordem zero	$C_t = C_0 + k_0t$	$y = 0,164x$	0,1640	0,9962	-
Primeira ordem	$\log Q_1 = \log Q_0 + \frac{k_1t}{2,303}$	$y = -0,0007x + 2$	-0,0016	0,9953	-
Higuchi	$Q = K_H\sqrt{t}$	$y = 0,5809x$	0,5809	0,9269	-
Korsmeyer-Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n$	$y = 1,0722x - 0,8236$	0.1501	0,9901	1,07

Através do valor do coeficiente de determinação, R², é possível avaliar a qualidade do ajuste, uma vez que este é tão melhor quanto mais próximo de 1 se encontrar. Assim, e com base na Tabela 7 é possível afirmar que o modelo de ordem zero é o que apresenta maior R² e, portanto, a função de regressão que indicou o melhor ajuste é a que corresponde ao modelo de ordem zero. De salientar que os fármacos que seguem um perfil de liberação de ordem zero têm o potencial de superar os problemas enfrentados pelos sistemas de liberação imediata, uma vez que a liberação do fármaco acontece a uma taxa constante, o que permite manter as concentrações do fármaco dentro da janela terapêutica por um longo período de tempo. [169, 170, 201] Por sua vez, este perfil de liberação permite limitar a ocorrência de efeitos colaterais adversos, reduzir a frequência da dosagem e potencialmente melhorar a adesão do paciente. [169, 170, 201]

3.2.2.3. Estudos de liberação para a formulação contendo 0,2% de CyA

A liberação da CyA através do uso de membranas sintéticas foi também estudada utilizando uma formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80. Contudo, neste caso os tempos pré-definidos para a retirada das alíquotas de 500 µL do compartimento recetor ocorreram a partir da 1 hora de experiência. Além da mudança na percentagem de CyA e nos tempos de retirada das alíquotas do compartimento recetor, todas as condições experimentais foram mantidas semelhantes às do estudo de liberação em que foi utilizada uma percentagem de 2% de CyA.

Na Figura 24 encontra-se representado o perfil de liberação para a formulação contendo 0,2% de CyA.

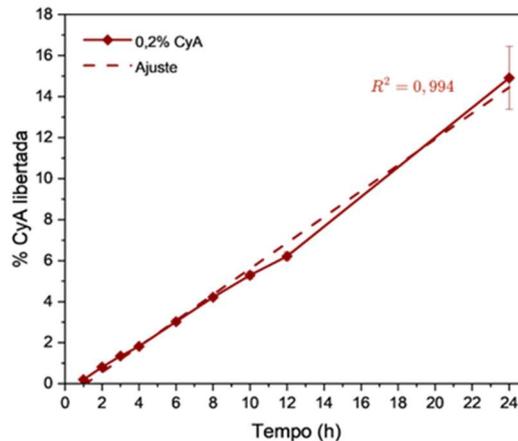


Figura 24: Perfil de liberação da formulação contendo 0,2% de CyA ao longo do tempo, em percentagem.

Analisando o perfil de liberação para a formulação contendo 0,2% de CyA, Figura 24, o que se verifica é que esta formulação possui um perfil de liberação praticamente linear ($R^2 = 0,994$), ou seja, a percentagem de CyA que se libertou da formulação e passou a membrana sintética aumentou de forma linear ao longo do tempo, tal como no caso da formulação contendo 2% de CyA, não se verificando, de igual modo, a existência de sinais de saturação. Após as 24 horas de experiência uma percentagem de $14,9 \pm 1,5$ % de CyA passou através da membrana para o compartimento recetor. Comparando com o estudo de Musa *et al.* em que ao fim de 6 horas de liberação de duas formulações contendo 0,3% de CyA foram atingidas percentagens de 80,2% para a formulação E2 e 66,7% para a formulação E1, verifica-se que no presente estudo a percentagem de CyA que passou a membrana sintética para o recetor ainda foi muito baixa. [189] No entanto, é de salientar que apesar da percentagem de CyA que se libertou ainda ter permanecido baixa, houve um aumento de aproximadamente 4 vezes da percentagem de CyA libertada da formulação contendo 0,2% de CyA, até às 24 horas, em relação à formulação contendo 2% de CyA.

3.2.3. Estudos *ex vivo* de permeação

A penetração de um fármaco na pele é uma etapa crucial na caracterização de formulações para administração tópica. [190] Geralmente fármacos lipofílicos, como é o caso da CyA ($\log P = 2,92$), apresentam alta partição na CC. [94, 108] Contudo, esta molécula possui um peso molecular elevado (1203,64 Da), o que dificulta a sua penetração através da CC. [94, 108] Por outro lado, a permeação da CyA na epiderme viável e na derme é influenciada pela sua lipofilicidade, uma vez que estas camadas são essencialmente hidrofílicas. [94, 191] Portanto, o uso de técnicas desestabilizadoras da CC são úteis para promover a permeação de CyA através da pele, o que contribui para uma melhoria da eficácia do tratamento tópico. Assim, com o intuito de aumentar a difusão da CyA através da pele, recorreu-se à utilização do método ativo da LaserLeap Technologies® denominado por Piezoporação, que visa interagir com as pequenas células da CC

destabilizando a sua organização por forma a reduzir a função de barreira conferida por esta camada, aumentando a sua permeabilidade. Este método utiliza ondas fotoacústicas que são geradas pela conversão eficiente da luz, proveniente de estímulos de um laser, em pressão por transdutores que são constituídos por materiais piezofotónicos. Contudo, a eficiência da destabilização da CC depende da intensidade que as ondas fotoacústicas produzidas possuem. Por sua vez, a intensidade das ondas fotoacústicas é influenciada pela fluência com que o filme piezofotónico é irradiado pelos estímulos do laser. Quando irradiado por fluências elevadas é expectável que a intensidade das ondas fotoacústicas produzidas também seja elevada e, portanto, a desestabilização da CC seja mais eficiente, uma vez que são gerados gradientes de pressão mais acentuados. Neste estudo o filme piezofotónico foi irradiado utilizando duas fluências de laser distintas, uma fluência de 69 mJ/cm² e uma fluência menor de 48 mJ/cm². Para além de ter sido avaliada a permeação sob condições ativas, foram também realizados estudos de permeação sob condições passivas, o que permitiu avaliar a eficácia do método Piezoporação.

Antes da realização dos estudos de permeação utilizando a pele como barreira física, foi estudado o melhor solvente a se utilizar na extração da CyA das amostras de pele.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados e discutidos nos subtópicos seguintes.

3.2.3.1. Estudo do solvente de extração da CyA das amostras da pele

Por forma a se extrair a maior de quantidade possível de CyA retida nas amostras de pele após os estudos de permeação, foi injetada uma quantidade conhecida de CyA em pele dermatomizada e em pele sem estar dermatomizada. Após 24 horas da CyA ter sido injetada na pele esta foi colocada a extrair utilizando dois solventes diferentes, uma mistura PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% , v/v) e uma solução de MeOH. Os resultados da extração encontram-se representados na Figura 25.

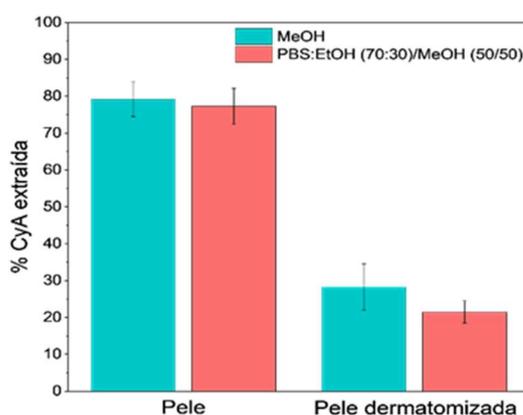


Figura 25: Representação gráfica da percentagem de CyA que foi extraída na pele e na pele dermatomizada, utilizando como solventes de extração uma solução composta por MeOH (azul) e uma solução composta por uma mistura de solventes PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% , v/v) (rosa).

A partir da Figura 25, o que se verifica é que tanto no caso da pele dermatomizada como no caso da pele não dermatomizada, ambos os solventes conseguiram extrair quantidades semelhantes de CyA das amostras de pele, o que significa que não houve uma diferença que se considerasse significativa na extração utilizando os diferentes solventes. Por outro lado, verifica-se que foi possível extrair uma quantidade superior de CyA no caso da pele não dermatomizada, comparativamente à pele dermatomizada, o que terá sido devido a erros experimentais, uma vez que foi mais fácil injetar a CyA no caso da pele não dermatomizada devido à sua maior espessura. Por outro lado, é de salientar que quando a CyA foi injetada na pele dermatomizada não se conseguiu que toda a quantidade desejada permanecesse no interior da pele, o que contribui para que uma quantidade menor de CyA ficasse retida na pele e, por conseguinte, uma menor quantidade de CyA fosse extraída.

Para extrair a CyA retida nas amostras de pele, em ambos os estudos de permeação à frente discutidos, optou-se por utilizar como solvente de extração a mistura contendo PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% , v/v).

3.2.3.2. Permeação usando uma fluência de 69 mJ/cm²

O presente estudo de permeação da CyA teve como objetivo avaliar a capacidade da CyA penetrar a CC e atingir as camadas mais profundas da pele. A permeação da CyA foi assim avaliada através de estudos *ex vivo* realizados com membranas biológicas naturais, pele de porco, utilizando um sistema de células de difusão de *Franz* composto por nove células individuais. Com o intuito de facilitar a permeação da CyA recorreu-se à utilização da tecnologia Piezoporação, que permite a geração de ondas fotoacústicas através conversão da luz por materiais piezofónicos quando estes são irradiados por estímulos de laser, neste caso utilizando uma fluência de 69 mJ/cm². A tecnologia foi utilizada durante 5 minutos. Foi ainda estudada a permeação de CyA na ausência desta técnica física, o que corresponde a uma difusão passiva. A permeação da CyA foi avaliada durante um período de 0,5 horas para ambas as condições de difusão ativa e passiva.

3.2.3.2.1. Membrana biológica

Antes de se iniciarem os estudos de permeação usando pele como barreira física, procedeu-se à avaliação de dois parâmetros importantes, a integridade e a espessura da pele. A integridade da pele foi avaliada através da medição da TEWL, que para uma pele não comprometida e viável deve apresentar valores entre 1 e 10 g/m²/h. O segundo parâmetro avaliado foi a espessura que deve ser o mais próxima possível entre cada grupo, ativo, passivo e controlo ativo e passivo.

Nos estudos de permeação utilizando um laser com fluência de 69 mJ/cm², a pele utilizada no caso da permeação para as condições ativa, passiva, controlo ativo e controlo passivo apresentou valores de TEWL de 8,73 ± 0,64; 9,00 ± 0,46; 7,40 e 11,6 g/m²/h, respetivamente. No que diz respeito à espessura as mesmas membranas biológicas apresentaram valores de 830 ± 37;

837 ± 55; 960 e 880 μm, para a permeação ativa, passiva, controlo ativo e controlo passivo, respetivamente. Os resultados destas medições encontram-se apresentados na Figura 26.

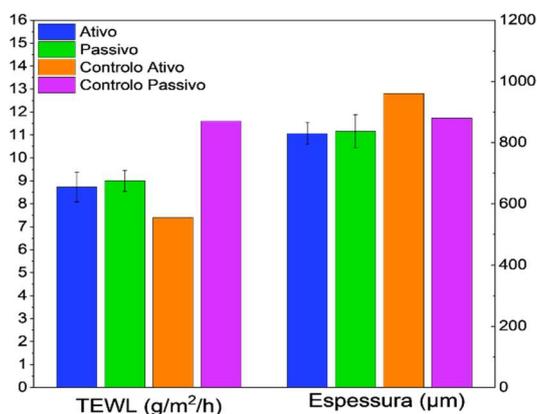


Figura 26: Valores da perda de água transepidérmica (TEWL) e da espessura obtidos para as membranas biológicas utilizadas nos estudos de permeação utilizando uma fluência de 69

3.2.3.2.2. Identificação da CyA

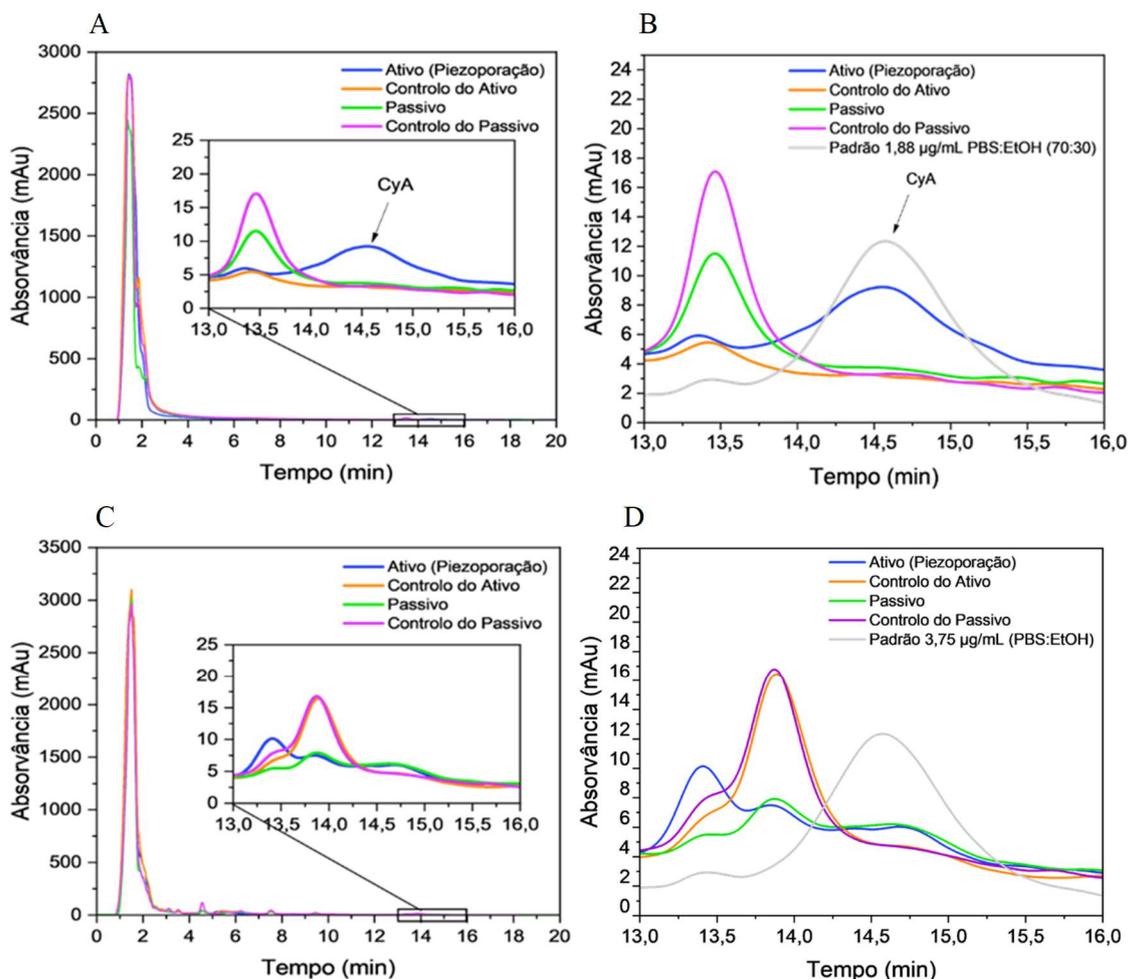


Figura 27: Identificação da CyA. **A-** Cromatograma exemplificativo das amostras retiradas do compartimento recetor às 0,5 horas com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **B-** Cromatograma exemplificativo de amostras retiradas do compartimento recetor às 0,5 horas correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e um padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). **C-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **D-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e ao padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). Os cromatogramas A, B, C e D foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.

A utilização de membranas biológicas, para realização dos estudos de permeação, pode levar à obtenção de amostras complexas contendo componentes da pele. Por sua vez, estes componentes da pele podem ter polaridades semelhantes aos da molécula de interesse e, portanto, apresentar um tempo de retenção semelhante. No caso da CyA esta é uma substância caracterizada por uma faixa de absorção de 195 a 215 nm o que pode causar interferência com outros componentes da pele, nomeadamente com alguns lipídios, proteínas ou outros constituintes que em alguns casos absorvem comprimentos de onda semelhantes. ^[180] Por outro lado, outros fatores como contaminações, podem levar ao aparecimento de sinais extra nos cromatogramas próximo do tempo de retenção da CyA. Para além disso, o facto da CyA poder adotar diferentes conformações, dependendo do ambiente químico em que se encontra, também pode contribuir para a complexidade dos cromatogramas resultantes, pelo que se torna importante proceder à identificação correta do sinal do analito. ^[192]

Para identificar a CyA nas amostras biológicas foi feita uma comparação em termos da presença de sinal e do tempo de retenção entre amostras padrão de CyA e as amostras resultantes do estudo de permeação. O padrão de CyA usado foi o padrão de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v). Por outro lado, os picos das amostras resultantes do estudo de permeação também foram comparados com as respetivas condições controlo que não possuem CyA.

No que diz respeito às amostras proveniente do compartimento recetor, como exemplificado na Figura 27 B, é perceptível a existência de um sinal intenso, que corresponde à condição ativa (azul), num tempo de retenção semelhante ao do padrão de CyA (cinzento), $R_T=14,6$ min. Por outro lado, nesta mesma região observa-se ainda uma fraca intensidade do sinal

da amostra do controlo ativo (laranja), conforme seria de esperar, devido à ausência de analito. Não obstante, é ainda perceptível a existência de um sinal mais forte de CyA no caso da condição ativa (azul) quando comparada com a condição passiva (verde), sendo que para esta última condição, o sinal é muito semelhante ao do seu respetivo controlo (roxo). Contudo, apesar de ser possível identificar o sinal correspondente à CyA nas amostras provenientes do compartimento recetor, é essencial que o método de quantificação utilizado seja melhorado, visto que este não aparente ser satisfatório para proceder a uma correta separação do pico da CyA dos restantes.

Quanto às amostras provenientes da extração de CyA da pele, Figura 27 D, os cromatogramas obtidos são complexos, uma vez que existem picos próximos do tempo de retenção da CyA, o que torna difícil a sua identificação e, posteriormente, a sua quantificação. Neste caso, o ideal seria utilizar um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massa, por forma a obter uma separação mais eficaz dos picos e, por conseguinte, uma melhor identificação e, posterior, quantificação da CyA retida nas amostras de pele.

Não sendo possível proceder à identificação correta da CyA nas amostras de pele, apenas serão apresentados e discutidos os resultados que dizem respeito às amostras de CyA provenientes do compartimento recetor.

3.2.3.2.3. Perfil de permeação

Na Figura 28 encontram-se apresentados os resultados obtidos nos estudos de permeação para as amostras provenientes do compartimento recetor, quando utilizada uma fluência de 69 mJ/cm².

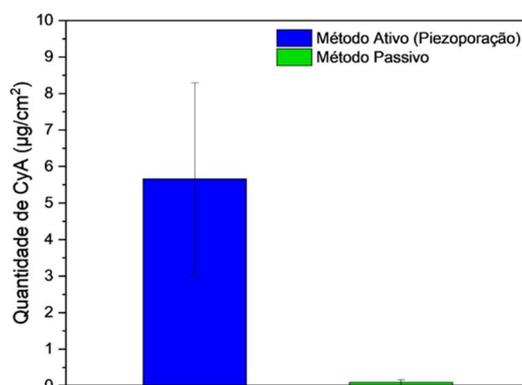


Figura 28: Quantidade de CyA presente no compartimento recetor após 0,5 horas de experiência quando utilizado o método ativo Piezoporação com uma fluência de 69 mJ/cm² (azul) e na ausência deste (verde). A significância estatística foi avaliada por *One-way* ANOVA tendo-se obtido que $p > 0,05$ o que significa que não existe significância estatística.

Após o intervalo de tempo de duração dos estudos de permeação (0,5 horas), a quantidade de CyA quantificada no compartimento recetor foi diferente para ambas as difusões ativa e passiva, como é possível verificar através da Figura 28. No caso da permeação recorrendo

à utilização do método ativo, a quantidade de CyA no recetor às 0,5 horas foi de $5,7 \pm 2,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, enquanto que no caso da difusão passiva foi de $0,084 \pm 0,078 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Assim, verifica-se que a quantidade de CyA quantificada no líquido recetor após as 0,5 horas no caso da permeação passiva foi praticamente nula, como seria de esperar, uma vez que devido às propriedades físico-químicas da CyA (PM: 1202,63 Da; log P=2,92 e baixa hidrossolubilidade) era esperado que apenas uma quantidade insignificante de fármaco conseguisse penetrar através da CC na ausência de um método físico. ^[193] Em contrapartida, verifica-se que quantidades superiores de CyA foram quantificadas no recetor após as 0,5 horas no caso do método ativo, o que permite demonstrar uma eficácia da tecnologia de Piezoporação na entrega transdérmica de CyA. Contudo, no caso do método ativo é evidente que existe uma grande variabilidade nos resultados obtidos, que por ventura podem ter sido influenciados por erros experimentais, pela presença de possíveis bolhas de ar entre a membrana biológica e o líquido recetor, mas também pela utilização de diferentes peles de porco. Por outro lado, é de realçar que após o uso da tecnologia Piezoporação verificou-se que os filmes se encontravam descolados do suporte, ou seja, houve um descolamento do PDMS do vidro, o que conduziu a uma alteração das condições de confinamento do filme. Isto aconteceu devido à elevada fluência com que os filmes foram irradiados pela luz laser. Contudo, apesar dos filmes terem descolado estes continuaram a gerar ondas fotoacústicas. No entanto, uma vez que as condições de confinamento dos filmes foram alteradas, a intensidade das ondas fotoacústicas geradas também sofreu uma variação, o que faz com que estas não tenham tido uma intensidade constante ao longo dos 5 minutos de uso da tecnologia, tendo após os impulsos laser que contribuíram para o descolamento dos filmes sido geradas ondas fotoacústicas de menor intensidade. Assim, o descolamento dos filmes também poderá ter sido um fator que contribuiu para a variabilidade existente nos resultados no caso do método ativo, uma vez que não se sabe em que altura do uso da tecnologia se deu este descolamento.

3.2.3.3. Permeação usando uma fluência de 48 mJ/cm²

A permeação de CyA através da pele foi também estudada utilizando a mesma tecnologia do estudo acima referido, onde apenas variou a fluência com que o material transdutor foi irradiado que neste caso foi menor, 48 mJ/cm². Além da mudança na fluência do laser, todas as condições experimentais foram mantidas semelhantes às do estudo de permeação em que foi utilizada uma fluência de 69 mJ/cm².

3.2.3.3.1. Membrana biológica

Tal como no estudo de permeação anterior, para este estudo de permeação utilizando um laser com fluência de 48 mJ/cm² também se procedeu numa fase inicial à avaliação da integridade e espessura da pele a utilizar como barreira.

As membranas a utilizar neste estudo de permeação apresentaram valores de TEWL de $8,98 \pm 0,39$; $9,37 \pm 0,44$; 13 e 11,5 g/m²/h para o caso da permeação ativa, passiva, controlo ativo e controlo passivo, respetivamente. Quanto à espessura as membranas de permeação ativa,

passiva e controlo ativo e passivo apresentaram valores de 810 ± 27 ; 680 ± 23 ; 880 e $830 \mu\text{m}$, respetivamente. Os resultados destas medições encontram-se apresentados na Figura 29.

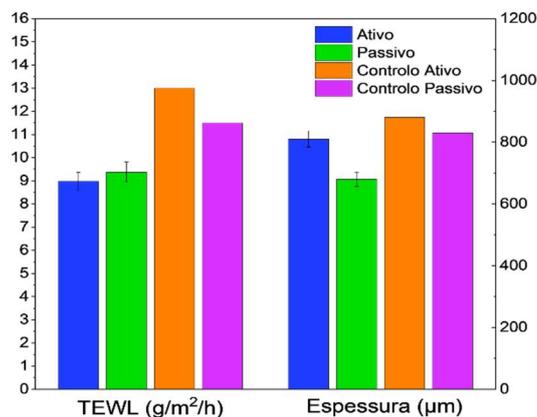


Figura 29: Valores da perda de água transepidermica (TEWL) e da espessura obtidos para as membranas biológicas utilizadas nos estudos de permeação utilizando uma fluência de 48 mJ/cm^2 .

3.2.3.3.2. Identificação da CyA

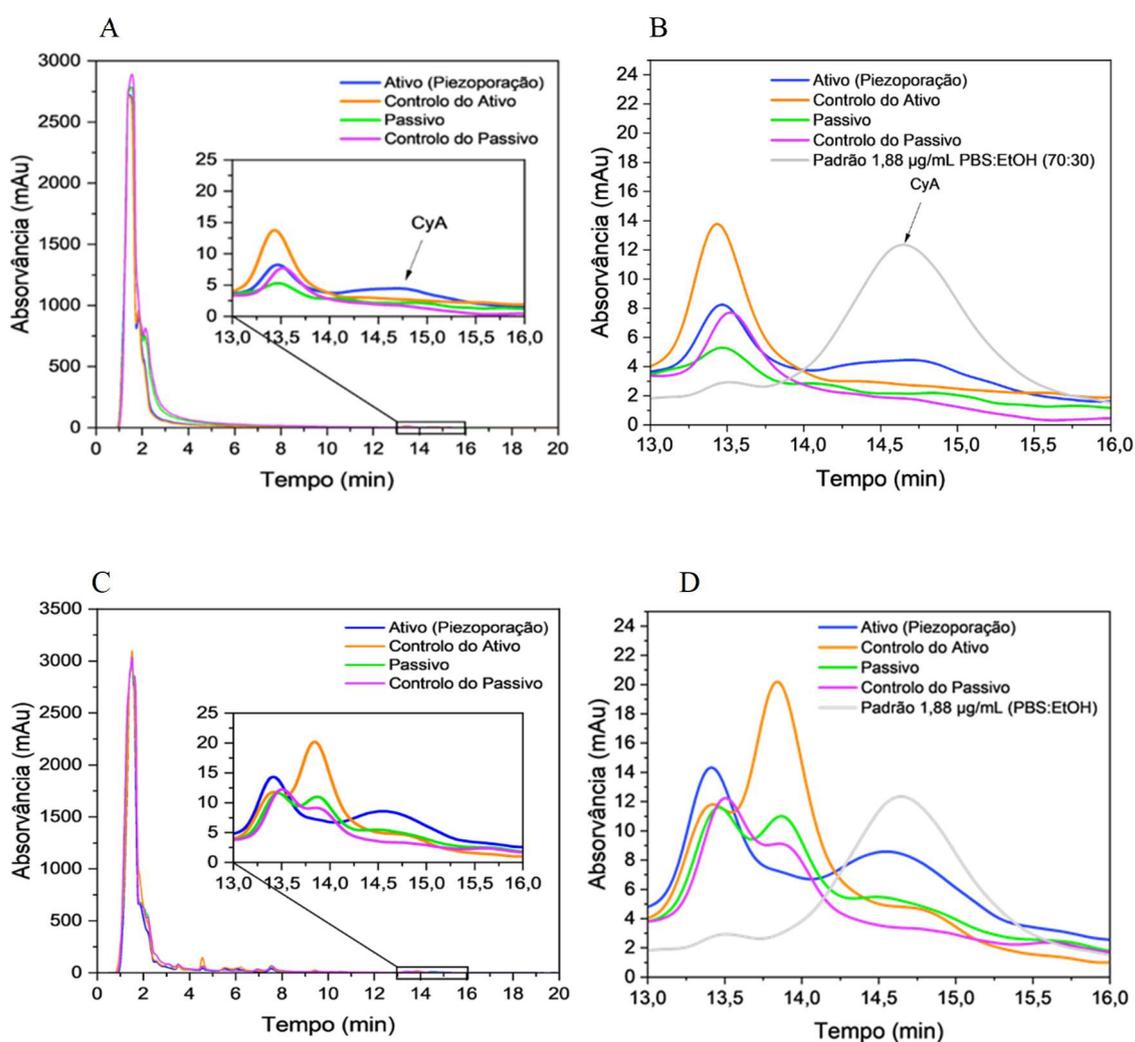


Figura 30: Identificação da CyA. **A-** Cromatograma exemplificativo de amostras retiradas do compartimento recetor às 0,5 horas com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **B-** Cromatograma exemplificativo de amostras retirada do compartimento recetor às 0,5 horas correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e um padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). **C-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência com ampliação correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde) e ao controlo passivo (roxo). **D-** Cromatograma exemplificativo de amostras de pele (epiderme viável + derme) após 0,5 horas de experiência correspondente à difusão ativa (azul), ao controlo ativo (laranja), à difusão passiva (verde), ao controlo passivo (roxo) e ao padrão de 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento). Os cromatogramas A, B, C e D foram obtidos usando um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.

Da mesma forma que no estudo de permeação anterior, neste mesmo estudo de permeação também se procedeu à identificação do sinal da CyA nas amostras biológicas, comparando a presença de sinal e o tempo de retenção da amostra padrão de CyA com as amostras resultantes do estudo de permeação. Neste caso, a comparação também foi feita utilizando o padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v). De igual forma, os picos das amostras resultantes do estudo de permeação também foram comparados com as respetivas condições controlo que não possuem CyA.

No que diz respeito às amostras proveniente do compartimento recetor, como exemplificado na Figura 30 B, verifica-se a existência de um sinal intenso, que corresponde à condição ativa (azul), num tempo semelhante ao tempo de retenção do padrão de CyA (cinzento), ou seja, aos 14,6 min. Nesta mesma região também se observa uma fraca intensidade do sinal da amostra do controlo ativo (laranja), conforme seria de esperar, devido à ausência de analito. Por outro lado, é perceptível a existência de um sinal mais intenso de CyA no caso da condição ativa (azul) quando comparada com a condição passiva (verde), sendo que para esta última condição, o sinal é muito semelhante ao do seu respetivo controlo (roxo). Contudo, apesar de ser possível identificar o sinal correspondente à CyA nas amostras provenientes do compartimento recetor, tal como no estudo de permeação anterior, verifica-se que é essencial que o método de quantificação utilizado seja otimizado, visto que este não aparente ser satisfatório para proceder a uma correta separação do pico da CyA dos restantes.

Quanto às amostras provenientes da extração de CyA da pele, Figura 30 D, verifica-se, que tal como aconteceu no estudo de permeação anterior, os cromatogramas obtidos também são

muito complexos, devido à existência de picos num tempo próximo do tempo de retenção da CyA, o que torna difícil a sua identificação. Assim, para ultrapassar este problema, o ideal seria a utilização de um método de qualificação e quantificação que permitisse obter uma separação mais eficiente dos picos, como é o caso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa.

Não sendo possível proceder à identificação correta da CyA nas amostras de pele, apenas serão apresentados e discutidos os resultados que dizem respeito às amostras de CyA provenientes do compartimento recetor.

3.2.3.3.3. Perfil de permeação

Na Figura 31 encontram-se apresentados os resultados obtidos nos estudos de permeação para as amostras provenientes do compartimento recetor, quando utilizada uma fluência de 48 mJ/cm².

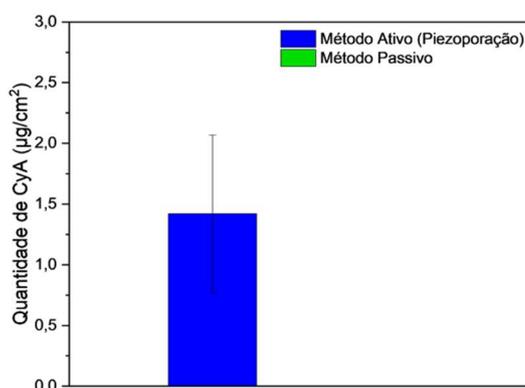


Figura 31: Quantidade de CyA presente no compartimento recetor após 0,5 horas de experiência quando utilizado o método ativo Piezoporação com uma fluência de 48 mJ/cm² (azul) e na ausência deste (verde). A significância estatística foi avaliada por *One-way* ANOVA tendo-se obtido que $p > 0,05$ o que significa que não existe significância estatística.

Após 0,5 horas dos estudos de permeação, a quantidade de CyA quantificada no compartimento recetor foi diferente para ambos os casos de permeação ativa e passiva, como é possível verificar através da Figura 31. Neste caso, apenas foram quantificadas quantidades significativas de CyA no recetor no caso da permeação com o método ativo, cerca de $1,42 \pm 0,65$ µg/cm², não tendo sido quantificada nenhuma CyA no recetor aquando da difusão passiva, como seria de esperar devido às características físico químicas altamente desfavoráveis desta molécula que tornam difícil a sua penetração na pele na ausência de técnicas físicas que reduzam a resistência à difusão do fármaco na CC. Assim, verifica-se uma eficácia na utilização da técnica de Piezoporação, visto que esta permitiu aumentar a entrega transdérmica de CyA. Contudo, tal como no estudo de permeação anterior, verifica-se que no caso do método ativo existe uma grande variabilidade nos resultados obtidos, que de igual forma podem ter sido influenciados por erros experimentais, pela presença de possíveis bolhas de ar entre a membrana biológica e o

líquido recetor, mas também pela utilização de diferentes peles de porco. É importante referir que utilizando esta fluência não se verificou descolamento dos filmes do suporte, o que significa que as condições de confinamento do filme não sofreram qualquer alteração e, portanto, acabaram por serem produzidas ondas fotoacústicas de igual intensidade ao longo dos 5 min de utilização da tecnologia.

3.2.3.4. Comparação da tecnologia Piezoporação utilizando fluências diferentes - 69 versus 48 mJ/cm²

Além da mudança na fluência do laser, todas as condições experimentais foram mantidas semelhantes em ambos os estudos de permeação realizados, pelo que é possível comparar os resultados obtidos da permeação transdérmica em que foram utilizadas fluências de laser diferentes.

Na Figura 32 encontram-se apresentados os resultados obtidos nos estudos de permeação para as amostras provenientes do compartimento recetor, quando é utilizada a tecnologia Piezoporação com duas fluências diferentes, 69 versus 48 mJ/cm².

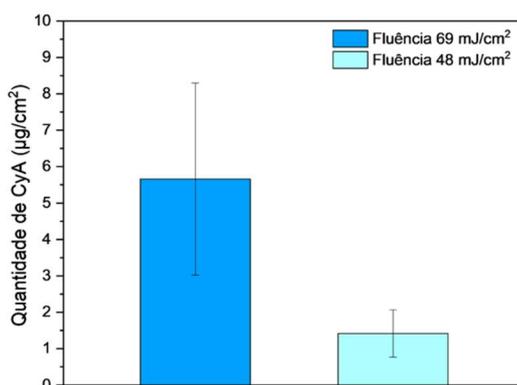


Figura 32: Quantidade cumulativa de CyA obtida usando a tecnologia Piezoporação com duas fluências diferentes, 69 mJ/cm² (azul escuro) e 48 mJ/cm² (azul claro). A significância estatística foi avaliada por *One-way* ANOVA tendo-se obtido que $p > 0,05$ o que significa que não existe significância estatística.

Ao comparar os resultados obtidos nos estudos de permeação transdérmica para os quais foi utilizada a tecnologia Piezoporação com diferentes fluências, verifica-se uma diferença dos valores obtidos e, portanto, uma eficácia diferente em promover a permeação de CyA através da pele por diminuição das suas propriedades de barreira, Figura 32. As duas fluências utilizadas diferem entre si na intensidade que as ondas fotoacústicas produzidas possuem, ou seja, utilizando uma fluência mais elevada é expectável que sejam produzidas ondas fotoacústicas mais intensas e, portanto, ocorra uma destabilização mais eficiente da CC, uma vez que são gerados gradientes de pressão mais acentuados. Portanto, o que se espera é que com a utilização da fluência de 69 mJ/cm² ocorra uma maior eficácia na entrega transdérmica de CyA.

Após as 0,5 horas, cerca de $5,7 \pm 2,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $1,42 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CyA passou as amostras de pele e chegou ao recetor ao utilizar a tecnologia ativa com uma fluência de $69 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ e $48 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, respetivamente. Assim, ao comparar a quantidade de CyA quantificada no líquido recetor após as 0,5 horas de estudo, verifica-se que quando o filme é irradiado com uma fluência de $69 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ocorre a permeação transdérmica de maiores quantidades de CyA, aproximadamente 4 vezes mais, quando comparado com o caso em que o filme é irradiado com uma fluência de $48 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. Por outro lado, é importante realçar que a permeação transdérmica passiva da CyA é desprezável, uma vez que foram obtidas quantidades insignificantes de CyA no compartimento recetor aquando da permeação passiva.

Posto isto, os estudos realizados provaram que a tecnologia utilizada possui eficácia na entrega transdérmica de CyA. Contudo, esta eficácia é superior quando a tecnologia é utilizada com uma fluência laser superior. Porém, foi observado que quando são utilizadas fluências mais elevadas ocorre um descolamento do filme do suporte, o que faz com que as condições de confinamento do filme sejam alteradas e, portanto, sejam geradas ondas fotoacústicas diferentes. No entanto, é importante referir que a eficiência de conversão dos filmes ainda está a ser otimizada.

Apesar de na literatura não haver relatos de estudos semelhantes com CyA, foi feita uma pesquisa com o intuito de comparar o método da LaserLeap a outros métodos ativos que visam facilitar a entrega tópica de CyA.

Wang *et al.* publicou um estudo envolvendo experiências de permeação de CyA *in vitro* usando eletroporação com o objetivo de aumentar a entrega transdérmica desta molécula. ^[194] Para este estudo de permeação *in vitro* foi utilizada pele de rato sem pelos, tendo sido avaliada a integridade da mesma antes da realização das experiências. Aquando da realização do estudo, a pele de rato foi colocada entre o compartimento dador, que continha numa solução de 0,3% de CyA, e o compartimento recetor, que consistia numa solução de PBS, com a CC voltada para o compartimento dador. A área ativa de difusão foi de $0,87 \text{ cm}^2$. Antes da realização da técnica de eletroporação, que visa criar poros transitórios na CC através do uso de pulsos elétricos, foram previamente estudadas várias condições experimentais para se chegar a uma condição de entrega transdérmica otimizada, nomeadamente a tensão aplicada nos elétrodos (100, 160, 200, 300 e 370 V), a duração do pulso (0,9; 5; 5,6; 7,5 e 10 ms), o número de pulsos (único ou múltiplo com 25 pulsos com 1 minuto de intervalo entre pulsos) e a duração do contacto (2, 4, 6 e 12 horas). Com base nisso, a tensão aplicada foi de 200 V, a duração do pulso de 10 ms, tendo sido usados pulsos únicos e múltiplos. Após 4 horas de contacto, os autores do estudo, verificaram que a quantidade de CyA presente na pele foi de $3,3 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o caso do pulso único, de $34 \pm 23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o caso de pulsos múltiplos e de $0,55 \pm 0,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o caso do método passivo. No que diz respeito à CyA quantificada no recetor esta foi de $0,28 \pm 0,34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no caso em que foi aplicado um único pulso, $1,18 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no caso do pulso múltiplo e de $0,32 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no caso do método passivo. Assim, o que foi concluído é que apenas uma pequena quantidade de CyA foi quantificada no líquido recetor. Por outro lado, ao fim de 4 horas de contacto com o uso

de pulsos múltiplos os autores verificaram uma maior eficiência na entrega de CyA na pele, cerca de 60 vezes, em comparação com o passivo.

Apesar de no presente estudo a permeação ter tido uma duração de 0,5 horas e ter sido utilizada pele de porco, contrariamente ao estudo de permeação de *Wang et al.* onde foi utilizada pele de rato, foi feita uma comparação dos resultados obtidos. Assim, comparando a quantidade de CyA presente no líquido recetor no caso da eletroporação em que apenas foi usado um único pulso ($0,28 \pm 0,34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e no caso em que foram utilizados múltiplos pulsos ($1,18 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) com os valores obtidos no presente estudo, onde foi utilizada uma fluência de $69 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ($5,7 \pm 2,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e uma fluência de $48 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ($1,42 \pm 0,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), verifica-se que independentemente da fluência utilizada a técnica de Piezoporação permitiu a passagem de maiores quantidades de CyA para o líquido recetor, em comparação com a técnica de eletroporação. Por outro lado, vale a pena salientar que processos físicos como a eletroporação apresentam algumas desvantagens quando o intuito é a entrega tópica de CyA para tratar a DA, uma vez que uma pele com DA já possui uma barreira prejudicada e ao ser utilizada esta técnica física há a possibilidade de serem causados ainda mais danos na pele devido às altas tensões que são utilizadas. Assim, quando sujeita à técnica de eletroporação a pele pode demorar algum tempo a voltar às suas condições normais, o que dificulta ainda mais o tratamento da DA.

De igual modo, estudos que envolvem o uso de microagulhas para facilitar a entrega cutânea de CyA, têm também sido publicados na literatura. Jitu Halder *et al.*, publicaram um estudo em 2022 utilizando microagulhas revestidas com CyA para administração transcutânea.^[195] Para este estudo de permeação foi utilizada pele de orelha de porco que foi colocada entre o compartimento dador da célula de difusão de *Franz* e o compartimento recetor contendo uma mistura de PBS/MeOH (70/30). Após este estudo, o que os autores verificaram foi que ao fim de 1 hora de experiência de permeação cerca de 85,4% da CyA tinha sido entregue na camada dérmica, o que permitiu concluir que as microagulhas conseguem facilmente superar a CC e depositar o fármaco diretamente na derme, apresentando elevada eficácia na entrega de fármacos que possuem altos pesos moleculares, como é o caso da CyA.

Contudo, associado ao uso de microagulhas têm sido relatados casos de irritação cutânea, inflamação e alergias temporárias, uma vez que são necessárias algumas horas, cerca de 24 a 48 horas, para a pele recuperar dos danos causados, pelo que esta técnica também apresenta desvantagens para ser usada numa pele com DA.^[196, 197, 198]

Posto isto, uma vez que o objetivo da entrega tópica da CyA é o tratamento da DA, é inconcebível sujeitar a pele ao uso de técnicas físicas, como por exemplo eletroporação ou microagulhas, que comprometam ainda mais a função de barreira da pele. Pelo contrário, a tecnologia da LaserLeap consiste numa técnica não invasiva e indolor que permite que a pele recupere totalmente a sua função de barreira poucos minutos (~ 2 minutos) após o estímulo. Assim, a técnica de Piezoporação aparenta ser uma tecnologia mais vantajosa para o tratamento da pele com DA, devido à sua natureza transitória e indolor.

4. Conclusão

O presente estudo teve como etapa inicial o desenvolvimento de uma formulação de CyA com propriedades adequadas para aplicação tópica. A formulação em causa possuiu várias etapas de otimização que culminaram com a realização de estudos *in vitro* de libertação onde foram testadas diferentes percentagens de surfactante a utilizar. Após desenvolvida, esta foi caracterizada em termos de pH, densidade e aparência. Quanto ao pH a formulação de CyA apresentou um valor de $6,26 \pm 0,14$, valor esse que se encontra dentro da gama de pH considerada ideal para formulações destinadas a aplicação tópica. No que diz respeito à densidade foi obtido o valor de $0,9896 \pm 0,0061 \text{ g/cm}^3$, que se encontra muito próximo do valor da densidade da água, uma vez que esta é o principal componente da formulação (83,5%). Em termos de aparência esta formulação consiste num gel homogêneo de cor branca. Com o objetivo de determinar o tamanho das partículas que compõem a formulação em estudo e determinar o grau de homogeneidade desta, procedeu-se à execução da técnica de DLS. Quanto ao valor do diâmetro das partículas o valor obtido foi de $292,0 \pm 3,4 \text{ nm}$, o que permitiu concluir, tendo em conta os componentes da formulação, que estamos perante uma macroemulsão. Por outro lado, o valor obtido para o PDI foi de $0,1570 \pm 0,0079$, o que indica que as partículas que compõem a formulação se encontram pouco dispersas. Foi também avaliada a estabilidade da formulação de CyA quando esta foi armazenada a uma temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante o período de tempo de 1 mês. O que se concluiu após a recolha de amostras ao fim de 15 dias e 1 mês é que a percentagem de CyA presente na formulação foi de 26,4% e 23,3%, respetivamente. Contudo, não foram visíveis quaisquer alterações na aparência da formulação no fim do tempo de armazenamento da formulação.

De modo a identificar e quantificar de forma confiável a molécula de interesse nas amostras provenientes dos estudos *in vitro* e *ex vivo* em que foram utilizadas células de difusão de Franz, foi desenvolvido um método de CLAE. O analito foi identificado verificando-se que este possui um tempo de retenção de 14,6 min. Para determinar a concentração de CyA nas amostras provenientes dos estudos *in vitro* de libertação foi feita uma curva de calibração linear ($R^2=0,998$) numa gama de concentrações de 0 a $30,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Enquanto para determinar a concentração de CyA nas amostras provenientes dos estudos *ex vivo* de permeação foi utilizada uma curva de calibração linear ($R^2=0,998$) com uma gama de concentrações de 0 a $3,75 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Com base em equações definidas que relacionam a média aritmética do teor medido de uma série de brancos e o desvio padrão associado a essa média, foram calculados os Limites de Detecção e Quantificação, tendo sido obtido o valor de $1,97 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para o LD e o valor de $4,35 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para o LQ.

Com o intuito de avaliar a capacidade da CyA se libertar da formulação em estudo contendo excipientes foram realizados testes *in vitro* de libertação utilizando membranas sintéticas de celulose num sistema de células de difusão de Franz. Numa primeira etapa foi

avaliada a libertação de quatro formulações contendo diferentes percentagens de Tween 80 (4; 2; 1 e 0,5%), com o intuito de se perceber de acordo com a libertação de CyA da formulação a melhor percentagem de surfactante a utilizar na formulação final. Após 24 horas de estudo o que se concluiu foi que, apesar da formulação contendo 4% de Tween 80 ter consigo libertar maior percentagem de CyA, a diferença libertada não foi significativa quando comparada com a libertação de CyA da formulação contendo 2% de Tween 80, tendo-se optado por utilizar esta última percentagem de surfactante na formulação final. Após realizada esta escolha, foi analisado com maior pormenor o perfil de libertação da formulação final contendo 2% de CyA, tendo-se verificado que após as 24 horas de experiência apenas uma pequena percentagem de CyA presente na formulação foi capaz de passar a membrana de celulose, cerca de $3,75 \pm 0,43$ %, o que leva a querer que a CyA se encontra sobressaturada na presente na formulação. O perfil de libertação da CyA foi ainda ajustado a diferentes modelos matemáticos de libertação de fármacos, tendo o melhor ajuste sido obtido no caso em que foi usado o modelo de ordem zero. Foi ainda realizado um estudo de libertação para uma formulação contendo 0,2% de CyA. Apesar da percentagem de CyA que se libertou neste último estudo de libertação, após as 24 horas, ainda ter permanecido baixa, cerca de $14,9 \pm 1,5$ %, verificou-se um aumento de cerca de 4 vezes da percentagem de CyA libertada, em comparação com a libertação de CyA na formulação contendo 2% de CyA.

A permeação da CyA através da pele não tem sido facilmente alcançada devido à natureza físico-química altamente desfavorável que esta molécula possui e que dificulta a sua penetração na CC. Com o intuito de se ultrapassar este problema recorreu-se à utilização do método ativo da LaserLeap Technologies[®], que visa facilitar a entrega de moléculas e fármacos na pele através da destabilização transitória da estrutura da CC, por meio da produção de ondas fotoacústicas geradas pela expansão termoelástica de materiais e pela conversão eficiente da luz em pressão. Neste estudo a tecnologia foi usada durante 5 minutos utilizando duas fluências distintas, uma fluência de 69 mJ/cm^2 e uma fluência menor de 48 mJ/cm^2 . Apesar de não ter sido possível identificar a CyA nos cromatogramas correspondentes às amostras de pele devido à complexidade destes, foi feita a identificação e posterior quantificação da CyA que se encontrava presente no líquido recetor após os estudos que tiveram a duração de 0,5 horas. O que se verificou foi que no caso do método passivo a quantidade de CyA que foi entregue transdermicamente foi insignificante. Pelo contrário, após as 0,5 horas de permeação com o método ativo Piezoporação, cerca de $5,7 \pm 2,6 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ e $1,42 \pm 0,68 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ de CyA foi quantificada no recetor quando se utilizou uma fluência de 69 mJ/cm^2 e 48 mJ/cm^2 , respetivamente. Assim, verificou-se que quando utilizada a tecnologia da LaserLeap houve um aumento da quantidade de CyA que atravessou a pele e chegou ao líquido recetor, para ambas as fluências, o que permite verificar a eficácia da utilização da Piezoporação na entrega transdérmica de CyA para o tratamento de diversas doenças, tais como a DA. Por sua vez, este aumento foi maior no caso da experiência de permeação em que foi utilizada a fluência de 69 mJ/cm^2 , cerca de 4 vezes quando comparada com a permeação em que foi utilizada uma fluência de 48 mJ/cm^2 , como seria de esperar. Por outro

lado, quando a tecnologia utilizada no presente estudo foi comparada a outras técnicas físicas, no contexto da DA, concluiu-se que esta aparenta ser mais vantajosa para os pacientes com DA, uma vez que é técnica indolor e não invasiva, que permite que a pele recupere totalmente a sua função de barreira poucos minutos após os estímulos.

5. Bibliografia

- [1] Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, 45(6), 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2017.03.004>
- [2] Parhi, R., & Mandru, A. (2021). Enhancement of skin permeability with thermal ablation techniques: concept to commercial products. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(3), 817–841. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00823-3>
- [3] Risueño, I., Valencia, L., Jorcano, J. L., & Velasco, D. (2021). Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives. *APL Bioengineering*, 5(3), 1–12. <https://doi.org/10.1063/5.0046376>
- [4] Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia, “A pele”. https://www.spdv.pt/_a_pele (acesso a 24 de fevereiro de 2022).
- [5] Ahmed, I. A., Mikail, M. A., Zamakshshari, N., & Abdullah, A. S. H. (2020). Natural anti-aging skincare: role and potential. *Biogerontology*, 21(3), 293–310. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09865-z>
- [6] Abdo, J. M., Sopko, N. A., & Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*, 28 (September 2019), 100179. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>
- [7] Hawkins, S., Dasgupta, B. R., & Ananthapadmanabhan, K. P. (2021). Role of pH in skin cleansing. *International Journal of Cosmetic Science*, 43(4), 474–483. <https://doi.org/10.1111/ics.12721>
- [8] Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>
- [9] Matousek, J. L., & Campbell, K. L. (2002). A comparative review of cutaneous pH. *Veterinary Dermatology*, 13(6), 293–300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2002.00312.x>
- [10] Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *Journal of Dermatology*, 45(9), 1044–1052. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>
- [11] Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- [12] Dehdashtian, A., Stringer, T. P., Warren, A. J., Mu, E. W., Amirlak, B., & Shahabi, L. (2018). Anatomy and physiology of the skin. *Melanoma: A Modern Multidisciplinary Approach*, 15–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78310-9_2

- [13] Koster, M. I. (2009). Making an epidermis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 7–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04363.x>
- [14] Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, 25(2), 92–98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- [15] Menon, G. K. (2002). New insights into skin structure: Scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(SUPPL.), S3. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00121-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00121-7)
- [16] Bollag, W. B., Aitkens, L., White, J., & Hyndman, K. A. (2020). Aquaporin-3 in the epidermis: more than skin deep. *American journal of physiology. Cell physiology*, 318(6), C1144–C1153. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00075.2020>
- [17] Tobin, D. J. (2017). Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*, 26(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>
- [18] Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2022). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls Publishing*, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/abstract/MED/29262154>
- [19] Britannica, “A epiderme”. <https://www.britannica.com/science/human-skin/Pigmentation> (acesso a 26 de fevereiro de 2022).
- [20] Tsakovska, I., Pajeva, I., Al Sharif, M., Alov, P., Fioravanzo, E., Kovarich, S., Worth, A. P., Richarz, A. N., Yang, C., Mostrag-Szlichtyng, A., & Cronin, M. T. D. (2017). Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology*, 387(March), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>
- [21] Kim, J., Kim, B. E., & Leung, D. Y. M. (2019). Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(2), 84–92. <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4202>
- [22] Jia, Y., Gan, Y., He, C., Chen, Z., & Zhou, C. (2018). The mechanism of skin lipids influencing skin status. *Journal of Dermatological Science*, 89(2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.0064>
- [23] Rawlings, A. V., & Matts, P. J. (2005). Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An update in relation to the dry skin cycle. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(6), 1099–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1747.2005.23726.x>
- [24] Chambers, E. S., & Vukmanovic-Stejic, M. (2020). Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, 160(2), 116–125. <https://doi.org/10.1111/imm.13152>
- [25] Oregon State University, “Camadas da pele”. <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/5-1-layers-of-the-skin/> (acesso a 26 de fevereiro de 2022)
- [26] Nakahara, T., Kido-Nakahara, M., Tsuji, G., & Furue, M. (2021). Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Journal of Dermatology*, 48(2), 130–139. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15664>

- [27] Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M., & Brandner, J. M. (2016). The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of Controlled Release*, 242, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.007>
- [28] Labster Theory, “Camadas da epiderme”.
https://theory.labster.com/epidermis_layers/ (acesso a 28 de fevereiro de 2022)
- [29] Sehgal, V. (2011). Skin Structure. *Textbook of Clinical Dermatology*, 239–239. https://doi.org/10.5005/jp/books/11454_50
- [30] Kenhub, “Derme”:
<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/dermis> (acesso a 28 de fevereiro de 2022)
- [31] Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of dermis: Scarring and cells involved. *Cells*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/cells8060607>
- [32] Brown TM, Krishnamurthy K. (2022). Histology, Dermis. *StatPearls Publishing*, Treasure Island (FL).
- [33] Nursing Times, “Pele 1: a estrutura e as funções da pele”.
<https://www.nursingtimes.net/clinical-archive/dermatology/skin-1-the-structure-and-functions-of-the-skin-25-11-2019/> (acesso a 8 de março de 2022)
- [34] Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, 32(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- [35] The Cosmetic Chemist, “Estrutura e função da pele humana, Derme”.
http://www.thecosmeticchemist.com/education/skin_science/dermis.html (acesso a 8 de março de 2022)
- [36] Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
- [37] Medscape, “Anatomia da pele, derme”.
<https://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview?isSocialFTC=true#a3> (acesso a 8 de março de 2022)
- [38] Medscape, “Anatomia da pele, Apêndices epidérmicos”.
<https://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview#a5> (acesso a 8 de março de 2022)
- [39] TeachMe Anatomy, “Skin”.
<https://teachmeanatomy.info/the-basics/ultrastructure/skin/> (acesso a 8 de março de 2022)
- [40] Bonnie D. Hodge, Terrence Sanvictores, Robert T. Brodell. (2022). Anatomy, Skin Sweat Glands. *StatPearls Publishing*, Treasure Island (FL).
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482278/?report=reader#_NBK482278_pubdet_
- [41] Orsted, H. L., Bn, R. N., Keast Bsc, D. H., Dip, M., Md, E., Fcfp, C., Kuhnke, J. L., Ba, R. N., Msc, B., Jin, S., Cde, R., Cgp, C., Haley, J., Msc, B., & Evans, R. (2018). Foundations of Best Practice for Skin and Wound, Management Skin: Anatomy, Physiology and Wound

- Healing. Wounds Canada. <https://www.woundscanada.ca/docman/public/health-care-professional/bpr-workshop/166-wc-bpr-skin-physiology/file>
- [42] Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. *In Nanoscience in Dermatology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- [43] Verywell Health, “Anatomia e função da derme”. <https://www.verywellhealth.com/what-is-the-dermis-1069315?print> (acesso a 8 de março de 2022)
- [44] Woodley, D. T. (2017). Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatologic Clinics*, 35(1), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.07.004>
- [45] Fujiwara, H., Tsutsui, K., & Morita, R. (2018). Multi-tasking epidermal stem cells: Beyond epidermal maintenance. *Development Growth and Differentiation*, 60(9), 531–541. <https://doi.org/10.1111/dgd.12577>
- [46] Medscape, “Anatomia da pele, Junção dermoepidérmica”. <https://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview#a4> (acesso a 10 de março de 2022)
- [47] Verywell Health, “O que é a hipoderme?”. <https://www.verywellhealth.com/the-hypodermis-is-the-lowermost-layer-of-skin-2710144> (acesso a 11 de março de 2022)
- [48] National Cancer Institute, “Anatomia da pele”. <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7280> (acesso a 11 de março de 2022)
- [49] Yang, X., Kambe, N., Takimoto-Ito, R., & Kabashima, K. (2021). Advances in the pathophysiology of atopic dermatitis revealed by novel therapeutics and clinical trials. *Pharmacology and Therapeutics*, 224, 107830. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107830>
- [50] Leung D. Y. (2016). Clinical implications of new mechanistic insights into atopic dermatitis. *Current opinion in pediatrics*, 28(4), 456–462. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000374>
- [51] Eichenfield, L. F., Stripling, S., Fung, S., Cha, A., O’Brien, A., & Schachner, L. A. (2022). Recent Developments and Advances in Atopic Dermatitis: A Focus on Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment in the Pediatric Setting. *Pediatric Drugs*, 24(4), 293–305. <https://doi.org/10.1007/s40272-022-00499-x>
- [52] Lifschitz, C. (2015). The impact of atopic dermatitis on quality of life. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66, 34–40. <https://doi.org/10.1159/000370226>
- [53] Bieber, T. (2022). Atopic dermatitis: an expanding therapeutic pipeline for a complex disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(1), 21–40. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00266-6>

- [54] Li, H., Zhang, Z., Zhang, H., Guo, Y., & Yao, Z. (2021). Update on the Pathogenesis and Therapy of Atopic Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 61(3), 324–338. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08880-3>
- [55] Tsakok, T., Woolf, R., Smith, C. H., Weidinger, S., & Flohr, C. (2019). Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *British Journal of Dermatology*, 180(3), 464–474. <https://doi.org/10.1111/bjd.16934>
- [56] Hadi, H. A., Tarmizi, A. I., Khalid, K. A., Gajdács, M., Aslam, A., & Jamshed, S. (2021). The epidemiology and global burden of atopic dermatitis: A narrative review. *Life*, 11(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/life11090936>
- [57] Sanofi, “Dermatite Atópica”. https://www.sanofi.pt/pt/atividade-portugal/Imunologia/dermatite_atopica (acesso a 13 de outubro de 2022)
- [58] IntraMed, “Dermatite Atópica”. <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=99914&pagina=1> (acesso a 13 de outubro de 2022)
- [59] Weidinger, S., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *The Lancet*, 387(10023), 1109–1122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X)
- [60] Torres, T., Ferreira, E. O., Gonçalo, M., & Mendes-bastos, P. (2019). Update on Atopic Dermatitis A Dermatite Atópica em Revisão. *Ordem Dos Médicos*, 32(9), 606–613. <https://doi.org/10.20344/amp.11963>
- [61] Nutten, S. (2015). Atopic dermatitis: Global epidemiology and risk factors. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66, 8–16. <https://doi.org/10.1159/000370220>
- [62] Nakayama, H. (1996). Overview of Atopic Dermatitis. *Skin Research*, 38(5), 484–490. <https://doi.org/10.11340/skinresearch1959.38.484>
- [63] Kowalska-Olędzka, E., Czarnecka, M., & Baran, A. (2019). Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *Journal of Drug Assessment*, 8(1), 126–128. <https://doi.org/10.1080/21556660.2019.1619570>
- [64] Lopez Carrera, Y. I., Al Hammadi, A., Huang, Y. H., Llamado, L. J., Mahgoub, E., & Tallman, A. M. (2019). Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Atopic Dermatitis in the Developing Countries of Asia, Africa, Latin America, and the Middle East: A Review. *Dermatology and Therapy*, 9(4), 685–705. <https://doi.org/10.1007/s13555-019-00332-3>
- [65] IQVIA Portugal, “Patients under atopic dermatitis treatment in Portugal: Results from a physicians’ survey”. <https://www.iqvia.com/-/media/iqvia/pdfs/isporbarcelona2018posters/november-12/patients-under-atopic-dermatitis-treatment-in-portugal.pdf>
- [66] Deckers, I., Mclean, S., Linssen, S., Mommers, M., & Schayck, C. P. (2018). Investigating International Time Trends in the Incidence and Prevalence of Atopic Eczema 1990–2010: A Systematic Review of Epidemiological Studies. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 73(6), 1–24.

- [67] Peng, W., & Novak, N. (2015). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 45(3), 566–574. <https://doi.org/10.1111/cea.12495>
- [68] Elias, P. M., & Wakefield, J. S. (2011). Skin barrier function. *Nutrition for Healthy Skin: Strategies for Clinical and Cosmetic Practice*, 8(4), 35–48. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12264-4_4
- [69] Pelc, J., Czarnecka-Operacz, M., & Adamski, Z. (2018). Structure and function of the epidermal barrier in patients with atopic dermatitis - treatment options. *Advances in Dermatology and Allergology*, 35(1), 1–5. <https://doi.org/10.5114/ada.2018.73159>
- [70] Grobe, W., Bieber, T., & Novak, N. (2019). Pathophysiology of atopic dermatitis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 17(4), 433–440. <https://doi.org/10.1111/ddg.13819>
- [71] De Benedetto, A., Rafaels, N. M., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Georas, S. N., Cheadle, C., Berger, A. E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L. C., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T. H., Leung, D. Y. M., ... Beck, L. A. (2011). Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 773–786.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.018>
- [72] Kezic, S., Novak, N., Jakasa, I., Jungersted, J. M., Simon, M., Brandner, J. M., Middelkamp-Hup, M. A., & Weidinger, S. (2014). Skin barrier in atopic dermatitis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19(3), 542–556. <https://doi.org/10.2741/4225>
- [73] Chieosilapatham, P., Kiatsurayanon, C., Umehara, Y., Trujillo-Paez, J. V., Peng, G., Yue, H., Nguyen, L. T. H., & Niyonsaba, F. (2021). Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 204(3), 296–309. <https://doi.org/10.1111/cei.13575>
- [74] Wang, A. X., & Xu Landén, N. (2015). New insights into T cells and their signature cytokines in atopic dermatitis. *IUBMB Life*, 67(8), 601–610. <https://doi.org/10.1002/iub.1405>
- [75] Kader, H. A., Azeem, M., Jwayed, S. A., Al-Shehhi, A., Tabassum, A., Ayoub, M. A., Hetta, H. F., Waheed, Y., Iratni, R., Al-Dhaheri, A., & Muhammad, K. (2021). Current insights into immunology and novel therapeutics of atopic dermatitis. *Cells*, 10(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cells10061392>
- [76] Kim, J. E., Kim, J. S., Cho, D. H., & Park, H. J. (2016). Molecular mechanisms of cutaneous inflammatory disorder: Atopic dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081234>
- [77] Kalekar, L. A., & Rosenblum, M. D. (2019). Regulatory T cells in inflammatory skin disease: From mice to humans. *International Immunology*, 31(7), 457–463. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz020>
- [78] Campione, E., Lanna, C., Diluvio, L., Cannizzaro, M. V., Grelli, S., Galluzzo, M., Talamonti, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Mancini, M., Melino, G., Candi, E., Schiavone, G., Wang, Y., Shi, Y., & Bianchi, L. (2020). Skin immunity and its dysregulation in atopic

- dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo. *Cell Cycle*, 19(3), 257–267. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1707455>
- [79] Le Lamer, M., Pellerin, L., Reynier, M., Cau, L., Pendaries, V., Leprince, C., Méchin, M. C., Serre, G., Paul, C., & Simon, M. (2015). Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis. *Biological Chemistry*, 396(11), 1163–1179. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0141>
- [80] Gavrilova, T. (2018). Immune Dysregulation in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Dermatitis*, 29(2), 57–62. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000340>
- [81] Mu, Z., Zhao, Y., Liu, X., Chang, C., & Zhang, J. (2014). Molecular Biology of Atopic Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 47(2), 193–218. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8415-1>
- [82] Adkinson, N. F., Bochner, B. S., Burks, A. W., Busse, W. W., Holgate, S. T., Lemanske, R. F., & O'Hehir, R. E. (2013). *Middleton's Allergy: Principles and Practice: Eighth Edition*. Elsevier Inc.
- [83] Williams, M. R., & Gallo, R. L. (2015). The Role of the Skin Microbiome in Atopic Dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(11). <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0567-4>
- [84] Edslev, S. M., Agner, T., & Andersen, P. S. (2020). Skin microbiome in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, 100(100-year theme Atopic dermatitis), 358–366. <https://doi.org/10.2340/00015555-3514>
- [85] Wollenberg, A., Oranje, A., Deleuran, M., Simon, D., Szalai, Z., Kunz, B., Svensson, A., Barbarot, S., Von Kobyletzki, L., Taieb, A., De Bruin-Weller, M., Werfel, T., Trzeciak, M., Vestergaard, C., Ring, J., & Darsow, U. (2016). ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(5), 729–747. <https://doi.org/10.1111/jdv.13599>
- [86] yons, J. J., Milner, J. D., & Stone, K. D. (2015). Atopic dermatitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Immunology and allergy clinics of North America*, 35(1), 161–183. <https://doi.org/10.1016/j.iaac.2014.09.008>
- [87] Lio, P. A. (2013). Non-pharmacologic therapies for atopic dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(5), 528–538. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0371-y>
- [88] Ana, A., & Mendes, P. (2018). Dermatite atópica I Cuidados Não Farmacológicos. *Ordem dos farmacêuticos- cim*. <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/publicacoes/e-publicacoes/dermatite-atopica-i/>
- [89] Megna, M., Napolitano, M., Patrino, C., Villani, A., Balato, A., Monfrecola, G., Ayala, F., & Balato, N. (2017). Systemic Treatment of Adult Atopic Dermatitis: A Review. *Dermatology and Therapy*, 7(1), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0170-1>
- [90] Ring, J., Alomar, A., Bieber, T., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gelmetti, C., Gieler, U., Lipozencic, J., Luger, T., Oranje, A. P., Schäfer, T., Schwennesen, T., Seidenari, S., Simon,

- D., Ständer, S., Stingl, G., Szalai, S., Szepietowski, J. C., Taïeb, A., ... Darsow, U. (2012). Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) Part i. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(8), 1045–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04635.x>
- [91] Johnson, B. B., Franco, A. I., Beck, L. A., & Prezzano, J. C. (2019). Treatment-resistant atopic dermatitis: Challenges and solutions. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, 181–192. <https://doi.org/10.2147/CCID.S163814>
- [92] Draelos, Z. D. (2008). Use of topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis in thin and sensitive skin areas. *Current Medical Research and Opinion*, 24(4), 985–994. <https://doi.org/10.1185/030079908X280419>
- [93] Patient, “Esteróides tópicos para o eczema”.
<https://patient.info/health/atopic-eczema/topical-steroids-for-eczema> (acesso a 3 de janeiro de 2023)
- [94] Lopes, L. B., Collett, J. H., & Bentley, M. V. L. B. (2005). Topical delivery of cyclosporin A: An in vitro study using monoolein as a penetration enhancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.12.003>
- [95] Gelbard, C. M., & Hebert, A. A. (2009). New and emerging trends in the treatment of atopic dermatitis. *Patient Preference and Adherence*, 2, 387–392. <https://doi.org/10.2147/PPA.S3345>
- [96] Dehesa, L., Abuchar, A., Nuno-Gonzalez, A., Vitiello, M., & Kerdel, F. A. (2012). The use of cyclosporine in dermatology. *Journal of Drugs in Dermatology*, 11(8), 979–987.
- [97] Forsythe, P., & Paterson, S. (2014). Ciclosporin 10 years on: Indications and efficacy. *Veterinary Record*, 174(SUPPL.2), 13–21. <https://doi.org/10.1136/vr.102484>
- [98] Kaaz, K., & Reich, A. (2017). Zastosowanie cyklosporyny a w terapii atopowego zapalenia skóry - Opis przypadku. *Przegląd Dermatologiczny*, 104(4), 432–438. <https://doi.org/10.5114/dr.2017.69950>
- [99] Ponte, P. (2018). Tratamento da Dermite Atópica Moderada a Grave em Adultos. *Revista SPDV*, 76(June), 373–392. <https://revista.spdv.com.pt/index.php/spdv/article/download/958/598/>
- [100] Akhavan, A., & Rudikoff, D. (2008). Atopic Dermatitis: Systemic Immunosuppressive Therapy. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 27(2), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2008.04.004>
- [101] Puigdemont, A., Brazis, P., Ordeix, L., Dalmau, A., Fuertes, E., Olivar, A., Pérez, C., & Ravera, I. (2013). Efficacy of a new topical cyclosporine A formulation in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Journal*, 197(2), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.018>
- [102] Kim, J. E., Shin, J. M., Ko, J. Y., & Ro, Y. S. (2016). Importance of concomitant topical therapy in moderate-to-severe atopic dermatitis treated with cyclosporine. *Dermatologic Therapy*, 29(2), 120–125. <https://doi.org/10.1111/dth.12333>

- [103] Paiva, C. S., Pflugfelder, S. C., Ng, S. M., & Akpek, E. K. (2019). Topical cyclosporine a therapy for dry eye syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010051.pub2>
- [104] Donnenfeld, E., & Pflugfelder, S. C. (2009). Topical Ophthalmic Cyclosporine: Pharmacology and Clinical Uses. *Survey of Ophthalmology*, 54(3), 321–338. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2009.02.002>
- [105] Viatris, Comunicado de imprensa “Viatris é o primeiro a receber a aprovação do FDA para o genérico Restasis”.
<https://newsroom.viatris.com/2022-02-03-Viatris-is-First-to-Receive-FDA-Approval-of-Generic-Restasis-R-Cyclosporine-Ophthalmic-Emulsion-0-05-to-Treat-Dry-Eye-Disease> (acesso a 27 de dezembro de 2022)
- [106] Eyeworld, “Primeira Ciclosporina genérica para olho seco”.
<https://www.eyeworld.org/2022/first-generic-cyclosporine-for-dry-eye/> (acesso a 27 de dezembro de 2022)
- [107] Carreras, J. J., Tapia-Ramirez, W. E., Sala, A., Guillot, A. J., Garrigues, T. M., & Melero, A. (2020). Ultraflexible lipid vesicles allow topical absorption of cyclosporin A. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(2), 486–497. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00693-4>
- [108] Drugbank, “Ciclosporina”.
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00091> (acesso a 17 de outubro de 2022)
- [109] Chen, M., Kumar, S., Anselmo, A. C., Gupta, V., Slee, D. H., Muraski, J. A., & Mitragotri, S. (2015). Topical delivery of Cyclosporine A into the skin using SPACE-peptide. *Journal of Controlled Release*, 199, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.015>
- [110] Dubey, P., Barker, S. A., & Craig, D. Q. M. (2020). Design and Characterization of Cyclosporine A-Loaded Nanofibers for Enhanced Drug Dissolution. *ACS Omega*, 5(2), 1003–1013. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02616>
- [111] Flores, C., Fouquet, G., Moura, I. C., Maciel, T. T., & Hermine, O. (2019). Lessons to learn from low-dose cyclosporin-A: A new approach for unexpected clinical applications. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00588>
- [112] Maes, B. D., & Vanrenterghem, Y. F. C. (2004). Cyclosporine: Advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. *Transplantation Proceedings*, 36(2 SUPPL.), S40–S49. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.038>
- [113] Mattsson, U., Magnusson, B., & Jontell, M. (2010). Squamous cell carcinoma in a patient with oral lichen planus treated with topical application of tacrolimus. *Oral Medicine*, 110(1), e19–e25. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.02.030>
- [114] Assmann, T., Homey, B., & Ruzicka, T. (2000). Applications of tacrolimus for the treatment of skin disorders. *Immunopharmacology*, 47(2–3), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(00\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(00)00187-9)

- [115] Yamashita, H., Ito, T., Kato, H., Asai, S., Tanaka, H., Nagai, H., & Inagaki, N. (2010). Comparison of the efficacy of tacrolimus and cyclosporine A in a murine model of dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. *European Journal of Pharmacology*, 645(1–3), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.031>
- [116] Niwa, Y., Terashima, T., & Sumi, H. (2003). Topical application of the immunosuppressant tacrolimus accelerates carcinogenesis in mouse skin. *British Journal of Dermatology*, 149(5), 960–967. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2003.05735.x>
- [117] Berger, T. G., Duvic, M., Van Voorhees, A. S., & Frieden, I. J. (2006). The use of topical calcineurin inhibitors in dermatology: Safety concerns. Report of the American Academy of Dermatology Association Task Force. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(5), 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.01.054>
- [118] Wang, L., Ma, K., Yao, Y., Yu, L., Wu, J., Zhao, Q., & Ye, Z. (2022). Carcinogenicity risk associated with tacrolimus use in kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Translational Andrology and Urology*, 11(3), 358–366. <https://doi.org/10.21037/tau-22-138>
- [119] Castellsague, J., Kuiper, J. G., Pottegård, A., Berglind, I. A., Dedman, D., Gutierrez, L., Calingaert, B., van Herk-Sukel, M. P. P., Hallas, J., Sundström, A., Gallagher, A. M., Kaye, J. A., Pardo, C., Rothman, K. J., & Perez-Gutthann, S. (2018). A cohort study on the risk of lymphoma and skin cancer in users of topical tacrolimus, pimecrolimus, and corticosteroids (Joint European longitudinal lymphoma and skin cancer evaluation – JOELLE study). *Clinical Epidemiology*, 10, 299–310. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S146442>
- [120] Zsikó, S., Csányi, E., Kovács, A., Budai-Szűcs, M., Gácsi, A., & Berkó, S. (2019). Methods to evaluate skin penetration in vitro. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3). <https://doi.org/10.3390/scipharm87030019>
- [121] Yu, Y. Q., Yang, X., Wu, X. F., & Fan, Y. Bin. (2021). Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.646554>
- [122] Richard, C., Cassel, S., & Blanzat, M. (2020). Vesicular systems for dermal and transdermal drug delivery. *RSC Advances*, 11(1), 442–451. <https://doi.org/10.1039/d0ra09561c>
- [123] Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>
- [124] Elmowafy, M. (2021). Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 203 (September 2020), 111748. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111748>

- [125] Kim, B., Cho, H.-E., Moon, S. H., Ahn, H.-J., Bae, S., Cho, H.-D., & An, S. (2020). Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomedical Dermatology*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>
- [126] Honari, G., Andersen, R., & Maibach, H.L. (Eds.). (2017). Sensitive Skin Syndrome (2nd ed.). *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/9781315121048>
- [127] Souto, E. B., Figueiro, J. F., Fernandes, A. R., Cano, A., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M. L., Severino, P., Paganelli, M. O., Chaud, M. V., & Silva, A. M. (2022). Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. *Heliyon*, 8(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08938>
- [128] Law, R. M., Ngo, M. A., & Maibach, H. I. (2020). Twenty Clinically Pertinent Factors/Observations for Percutaneous Absorption in Humans. *American Journal of Clinical Dermatology*, 21(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00480-4>
- [129] Iyer, A., Jyothi, V. G. S. S., Agrawal, A., Khatri, D. K., Srivastava, S., Singh, S. B., & Madan, J. (2021). Does skin permeation kinetics influence efficacy of topical dermal drug delivery system?: Assessment, prediction, utilization, and integration of chitosan biomacromolecule for augmenting topical dermal drug delivery in skin. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 12(4), 345–355. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_82_21
- [130] Bhowmick, M., & Sengodan, T. (2013). Mechanisms , kinetics and mathematical modelling of transdermal permeation. *Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 2(6), 636–641.
- [131] Lane, M. E. (2013). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1–2), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.040>
- [132] Wokovich, A. M., Prodduturi, S., Doub, W. H., Hussain, A. S., & Buhse, L. F. (2006). Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.03.009>
- [133] Robert L. Wilbur. (2017). The Difference Between Topical and Transdermal Medications - Gensco Pharma. *Gensco Pharma*, May, 1–2. <https://genscopharma.com/difference-topical-transdermal-medications/>
- [134] Narasimha Murthy, S., & Shivakumar, H. N. (2010). Topical and Transdermal Drug Delivery. *In Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems II*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-8155-2025-2.10001-0>
- [135] Benson, H. A. E., Grice, J. E., Mohammed, Y., Namjoshi, S., & Roberts, M. S. (2019). Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies. *Current Drug Delivery*, 16(5), 444–460. <https://doi.org/10.2174/1567201816666190201143457>

- [136] Kováčik, A., Kopečná, M., & Vávrová, K. (2020). Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(2), 145–155. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>
- [137] Marwah, H., Garg, T., Goyal, A. K., & Rath, G. (2016). Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery*, 23(2), 564–578. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.935532>
- [138] Jeong, W. Y., Kwon, M., Choi, H. E., & Kim, K. S. (2021). Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review. *Biomaterials Research*, 25(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00226-6>
- [139] Tanwar, H., & Jambheshwar, G. (2016). Transdermal Drug Delivery System: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(6), 2274–2290. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(6\).2274-90](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(6).2274-90)
- [140] Audumbar Digambar Mali, V. (2015). An updated review on transdermal drug delivery systems. *International Journal of Advances in Scientific Research*, 1(06), 244-254. <https://doi.org/10.7439/ijasr>
- [141] Akhtar, N., Singh, V., Yusuf, M., & Khan, R. A. (2020). Non-invasive drug delivery technology: Development and current status of transdermal drug delivery devices, techniques and biomedical applications. *Biomedizinische Technik*, 65(3), 243–272. <https://doi.org/10.1515/bmt-2019-0019>
- [142] Jain, A. K., Jain, S., Abourehab, M. A. S., Mehta, P., & Kesharwani, P. (2022). An insight on topically applied formulations for management of various skin disorders. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(18), 2406–2432. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2103625>
- [143] Bhowmik, D., Pusupoleti, K. R., Duraivel, S., & Sampath Kumar, K. (2013). Recent Approaches in Transdermal Drug Delivery System. *The Pharma Innovation- Journal*, No: 7725, 2(3), 99–108. https://www.thepharmajournal.com/vol2Issue3/Issue_may_2013/3.pdf
- [144] Moradi, L., Javanmardi, S., Abolmaali, S., & Mohammadi Samani, S. (2019). Passive Enhancement of Transdermal Drug Delivery: Lipid-Based Colloidal Carriers as an Emerging Pharmaceutical Technology Platform. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 25–40. http://tips.sums.ac.ir/article_44987.html
- [145] Vitorino, C., Sousa, J., & Pais, A. (2015). Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities. *Current Pharmaceutical Design*, 21(20), 2698–2712. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150428124053>
- [146] Bharkatiya, M., & Nema, R. (2009). Skin penetration enhancement techniques. *Journal of Young Pharmacists*, 1(2), 110. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.55741>
- [147] Benson, H.A.E., McIldowie, M., Prow, T. (2017). Magnetophoresis: Skin Penetration Enhancement by a Magnetic Field. In: Dragicevic, N., I. Maibach, H. (eds) Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement. *Springer*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7_12

- [148] Alexander, A., Dwivedi, S., Ajazuddin, Giri, T. K., Saraf, S., Saraf, S., & Tripathi, D. K. (2012). Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 164(1), 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.017>
- [149] Wong, T. W. (2014). Electrical, magnetic, photomechanical and cavitational waves to overcome skin barrier for transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 193, 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.045>
- [150] Lee, S., McAuliffe, D. J., Flotte, T. J., Kollias, N., & Doukas, A. G. (1998). Photomechanical transcutaneous delivery of macromolecules. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(6), 925–929. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00415.x>
- [151] Cross, S., & Roberts, M. (2005). Physical Enhancement of Transdermal Drug Application: Is Delivery Technology Keeping up with Pharmaceutical Development?. *Current Drug Delivery*, 1(1), 81–92. <https://doi.org/10.2174/1567201043480045>
- [152] laserLeap, “Your skin, our expertise”.
<http://www.laserleap.com/>
- [153] Sá, G. F. F., Serpa, C., & Arnaut, L. G. (2013). Stratum corneum permeabilization with photoacoustic waves generated by piezophotonic materials. *Journal of Controlled Release*, 167(3), 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.005>
- [154] Silva, A. D., Henriques, C. A., Malva, D. V., Calvete, M. J. F., Pereira, M. M., Serpa, C., & Arnaut, L. G. (2020). Photoacoustic generation of intense and broadband ultrasound pulses with functionalized carbon nanotubes. *Nanoscale*, 12(40), 20831–20839. <https://doi.org/10.1039/d0nr04986g>
- [155] Pereira, D. A., Silva, A. D., Martins, P. A. T., Piedade, A. P., Martynowych, D., Veysset, D., Moreno, M. J., Serpa, C., Nelson, K. A., & Arnaut, L. G. (2021). Imaging of photoacoustic-mediated permeabilization of giant unilamellar vesicles (GUVs). *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82140-4>
- [156] Silva, A. D., Serpa, C., & Arnaut, L. G. (2019). Photoacoustic transfection of DNA encoding GFP. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37759-1>
- [157] Lee, T., Baac, H. W., Li, Q., & Guo, L. J. (2018). Efficient Photoacoustic Conversion in Optical Nanomaterials and Composites. *Advanced Optical Materials*, 6(24), 1–30. <https://doi.org/10.1002/adom.201800491>
- [158] Houlleberghs, M., Verheyden, L., Voorspoels, F., Chandran, C. V., Duerinckx, K., Radhakrishnan, S., Martens, J. A., & Breynaert, E. (2022). Dispersing carbomers, mixing technology matters!. *RSC Advances*, 12(13), 7830–7834. <https://doi.org/10.1039/d2ra00176d>
- [159] Lubrizol. (2009). Neutralizing carbopol and pemulen polymers in aqueous and hydroalcoholic systems. *Lubrizol Advanced Materials*. Inc, 1–3. https://www.lubrizol.com/-/media/Lubrizol/Health/TDS/TDS-237_Neutralizing_Carbopol_Pemulen_in_Aqueous_Hydroalcoholic_Systems--PH.pdf

- [160] Cosmetics & Toiletries, “Profile of Carbomer”.
<https://www.cosmeticsandtoiletries.com/cosmetic-ingredients/rheology-thickener/blog/21837741/profile-of-carbomer> (acesso a 12 de dezembro de 2022)
- [161] Simões, A., Veiga, F., & Vitorino, C. (2020). Progressing towards the sustainable development of cream formulations. *In Pharmaceutics*, (Vol. 12, Issue 7).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070647>
- [162] Microtrac, “Dispersão Dinâmica de Luz (DDL)”.
<https://www.microtrac.pt/pt/produtos/analise-de-dimensao-e-formato-de-particulas/difusao-dinamica-de-luz/> (acesso a 2 de março de 2023)
- [163] Malvern Panalytical, “Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)”
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering> (acesso a 2 de março de 2023)
- [164] Anton Paar, “Os princípios da dispersão dinâmica de luz”.
<https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/> (acesso a 2 de março de 2023)
- [165] Narayanan, T. (2008). Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering. *Springer Netherlands: Dordrecht*. p. 899-952.
- [166] Pusey, P.N. (1994). Dynamic light scattering by non-ergodic media. *Macromolecular Symposia*. 79(1): p. 17-30
- [167] Da Silva, J. A., Apolinário, A. C., Souza, M. S. R., Damasceno, B. P. G. L., & Medeiros, A. C. D. (2010). Administração cutânea de fármacos: Desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31(3), 125–131. <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/357/355>
- [168] Lakka, N. S., & Kuppam, C. (2019). Principles of Chromatography Method Development. Capítulo 9. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89501>
- [169] Bruschim, M. (2015). Mathematical models of drug release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, 63–86. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9>
- [170] Cohen, A. A. (2008). Kant’s biological conception of history. *Journal of the Philosophy of History*, 2(1), 1–28. <https://doi.org/10.1163/187226308X268845>
- [171] Mohamed Rizwan I., Damodharan N. (2013). Mathematical modelling of Dissolution Kinetics in dosage forms. *Chemistry Asian Journal* (Vol. 8, pp. 1646–1660). https://rjptonline.org/HTML_Papers/Research%20Journal%20of%20Pharmacy%20and%20Technology_PID_2020-13-3-52.html
- [172] Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., Fresta, M., Sandulovici, R., & Mircioiu, I. (2019). Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140>
- [173] PermeGear, “General Catalog”.

- <https://permeagear.com/wp-content/uploads/2018/08/PermeGear-Catalog.pdf>
- [174] Barbero, A. M., & Frasch, H. F. (2009). Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicology in Vitro*, 23(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.008>
- [175] Neupane, R., Boddu, S. H. S., Renukuntla, J., Babu, R. J., & Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities. *Pharmaceutics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020152>
- [176] Keurentjes, A. J., Jakasa, I., & Kezic, S. (2021). Research Techniques Made Simple: Stratum Corneum Tape Stripping. *Journal of Investigative Dermatology*, 141(5), 1129–1133.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.004>
- [177] Jung, Y. J., Yoon, J. H., Kang, N. G., Park, S. G., & Jeong, S. H. (2012). Diffusion properties of different compounds across various synthetic membranes using Franz-type diffusion cells. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 42(5), 271–277. <https://doi.org/10.1007/s40005-012-0040-5>
- [178] Kumar R, Dogra S, Amarji B, et al. (2016). Efficacy of Novel Topical Liposomal Formulation of Cyclosporine in Mild to Moderate Stable Plaque Psoriasis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*, 152(7):807–815. doi:10.1001/jamadermatol.2016.0859
- [179] Pandey, S. S., Maulvi, F. A., Patel, P. S., Shukla, M. R., Shah, K. M., Gupta, A. R., Joshi, S. V., & Shah, D. O. (2020). Cyclosporine laden tailored microemulsion-gel depot for effective treatment of psoriasis: In vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 186(November 2019), 110681. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110681>
- [180] Trombino, S., Russo, R., Mellace, S., Varano, G. P., Laganà, A. S., Marcucci, F., & Cassano, R. (2019). Solid lipid nanoparticles made of trehalose monooleate for cyclosporin-A topic release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49(December 2018), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.12.026>
- [181] Brandelero, R. P. H., Yamashita, F., & Grossmann, M. V. E. (2010). The effect of surfactant Tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) blend films. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1102–1109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.034>
- [182] *Botanical Formulations*, “Castor oil”
<https://www.botanicalformulations.com/oil-monographs/castor-oil> (acesso a 9 de junho de 2023).
- [183] Goyal, A., Sharma, A., Kaur, J., Kumari, S., Garg, M., Sindhu, R. K., Rahman, M. H., Akhtar, M. F., Tagde, P., Najda, A., Banach-Albińska, B., Masternak, K., Alanazi, I. S., Mohamed, H. R. H., El-Kott, A. F., Shah, M., Germoush, M. O., Al-Malky, H. S., Abukhuwayjah, S. H., Altyar, A. E., ... Abdel-Daim, M. M. (2022). Bioactive-Based Cosmeceuticals: An Update on Emerging Trends. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 828. <https://doi.org/10.3390/molecules27030828>

- [184] Bayu Eko Prasetyo, Karsono, Sakro Mega Maruhawa, Lia Laila. (2018). Formulation and Physical Evaluation of Castor Oil based Nanoemulsion for Diclofenac Sodium Delivery System. *Research Journal Pharmacy and Technology*, 11(9): 3861-3865. doi: 10.5958/0974-360X.2018.00707.2
- [185] Tadros, T. F. (2013). Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In *Emulsion Formation and Stability*. <https://doi.org/10.1002/9783527647941.ch1>
- [186] Augusto, C., Cabrita, L., Marques, A., Contreiras, A., Ferreira, A., Alfaiate, B., Cartiga, B., Rola, E., Lourenço, Helena Fernandes, H., Móra, I., & Andrade, I. (2000). Validação de métodos internos de ensaio em análise química. In *Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química* (Vol. 13).
- [187] Guy, R. C. (2014). International Conference on Harmonisation. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 2 (June 1995), 1070–1072. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>
- [188] Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(23), 2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- [189] Musa, S. H., Heri, N. H., Borhan, F. A., Mustaffa, N. F. I., Rosman, N., & Razali, F. N. (2022). Fabrication of Emulsion Loaded with Cyclosporine and Moringa Oleifera Oil Potentially for Topical Psoriasis Treatment. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 15(3), 1709–1720. <https://doi.org/10.13005/bpj/2509>
- [190] Wiacek, A. E., Jurak, M., Ładniak, A., Szafran, K., & Przykaza, K. (2020). Cyclosporine csa—the physicochemical characterization of liposomal and colloidal systems. *Colloids and Interfaces*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/colloids4040046>
- [191] Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00166-7)
- [192] Ono, S., Naylor, M. R., Townsend, C. E., Okumura, C., Okada, O., Lee, H. W., & Lokey, R. S. (2021). Cyclosporin A: Conformational Complexity and Chameleonicity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(11), 5601–5613. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00771>
- [193] Benigni, M., Pescina, S., Grimaudo, M. A., Padula, C., Santi, P., & Nicoli, S. (2018). Development of microemulsions of suitable viscosity for cyclosporine skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 545(1–2), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.049>
- [194] Wang, S., Kara, M., & Krishnan, T. R. (1998). Transdermal delivery of cyclosporin-A using electroporation. *Journal of Controlled Release*, 50(1–3), 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00117-X)
- [195] Halder, J., Rath, G., & Rai, V. K. (2022). Cyclosporine coated microneedle for transcutaneous delivery: Characterization, in vitro evaluation, and in vivo anti-psoriatic

- efficacy against IMQ-induced psoriasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 73(April), 103450. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103450>
- [196] Ita, K. (2015). Transdermal delivery of drugs with microneedles—potential and challenges. *Pharmaceutics*, 7(3), 90–105. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7030090>
- [197] McCrudden, M. T. C., Mcalister, E., Courtenay, A. J., González-Vázquez, P., Raj Singh, T. R., & Donnelly, R. F. (2015). Microneedle applications in improving skin appearance. *Experimental Dermatology*, 24(8), 561–566. <https://doi.org/10.1111/exd.12723>
- [198] Jung, J. H., & Jin, S. G. (2021). Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 51(5), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00512-4>
- [199] Fundamentals of Statistics, “Teste Outlier de Grubbs”. http://www.statistics4u.com/fundstat_eng/ee_grubbs_outliertest.html (acesso a 23 de junho de 2023)
- [200] Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). The quality of analytical measurements. In *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1198/tech.2004.s248>
- [201] Laracuenta, M. L., Yu, M. H., & McHugh, K. J. (2020). Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects. *Journal of Controlled Release*, 327(September), 834–856. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.020>

6. Anexos

Neste anexo encontram-se apresentados os cromatogramas provenientes da CLAE para cada amostra, bem como a informação auxiliar necessária para a interpretação de cada um. Para a obtenção dos cromatogramas foi usado um sistema de CLAE de fase reversa, composto por uma coluna C18 Gemini® com um comprimento de 15 cm e um diâmetro interno de 4,6 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes composta por ACN/H₂O (65/35) (% v/v), cuja composição foi constante ao longo do tempo. O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção de 50 µL e a temperatura de 60°C.

1. Curvas de Calibração

Com o intuito de se obter uma curva de calibração final, foram preparadas oito curvas de calibração com uma gama de concentrações de 0 a 30 $\mu\text{g/mL}$. Cada curva de calibração foi realizada a partir de uma solução *stock* de 30 $\mu\text{g/mL}$, para a qual foi pesada uma quantidade de 0,003 g de CyA que foi dissolvida em 100 mL de PBS/EtOH (70/30), (% v/v). A partir dessa solução *stock* foram preparadas as várias soluções padrão, utilizando o método de diluições sucessivas. As soluções preparadas correspondentes a cada concentração foram analisadas por CLAE, tendo sido obtidos os cromatogramas que se encontram abaixo apresentados.

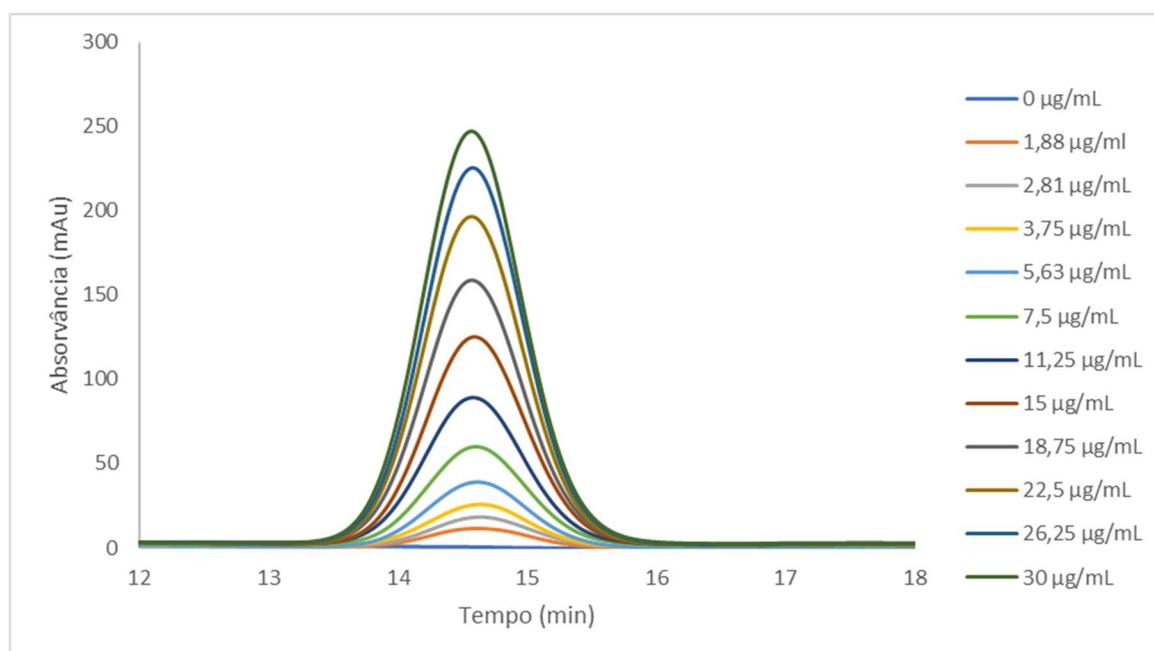


Figura 1. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 1.

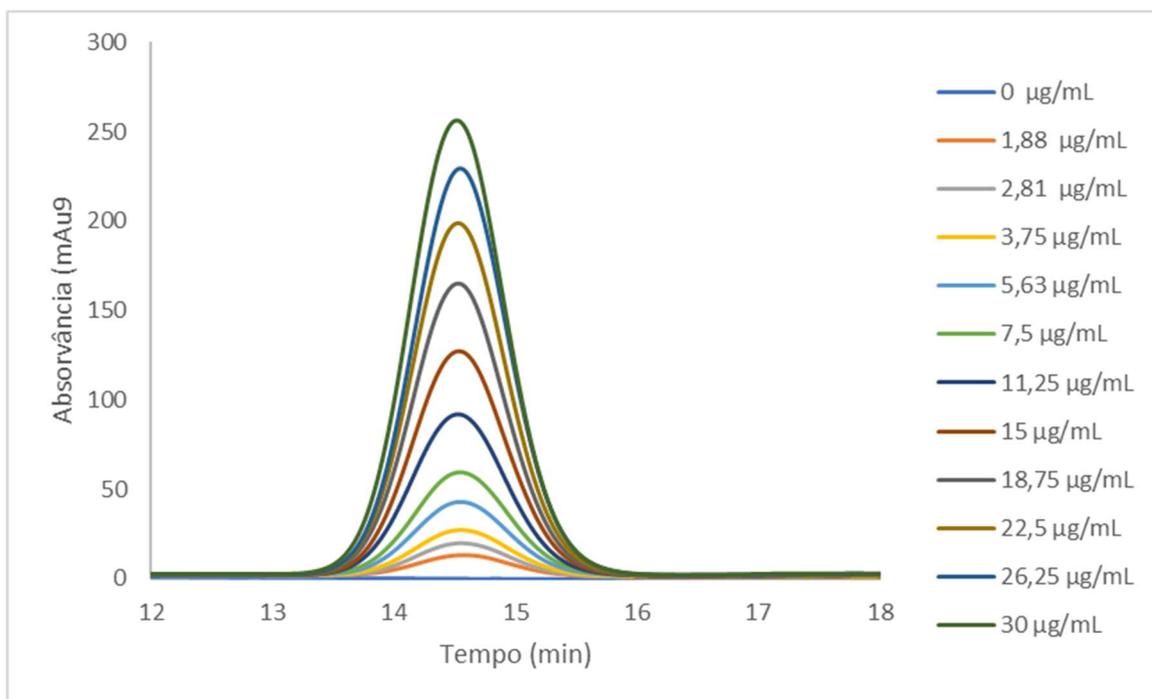


Figura 2. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 2.

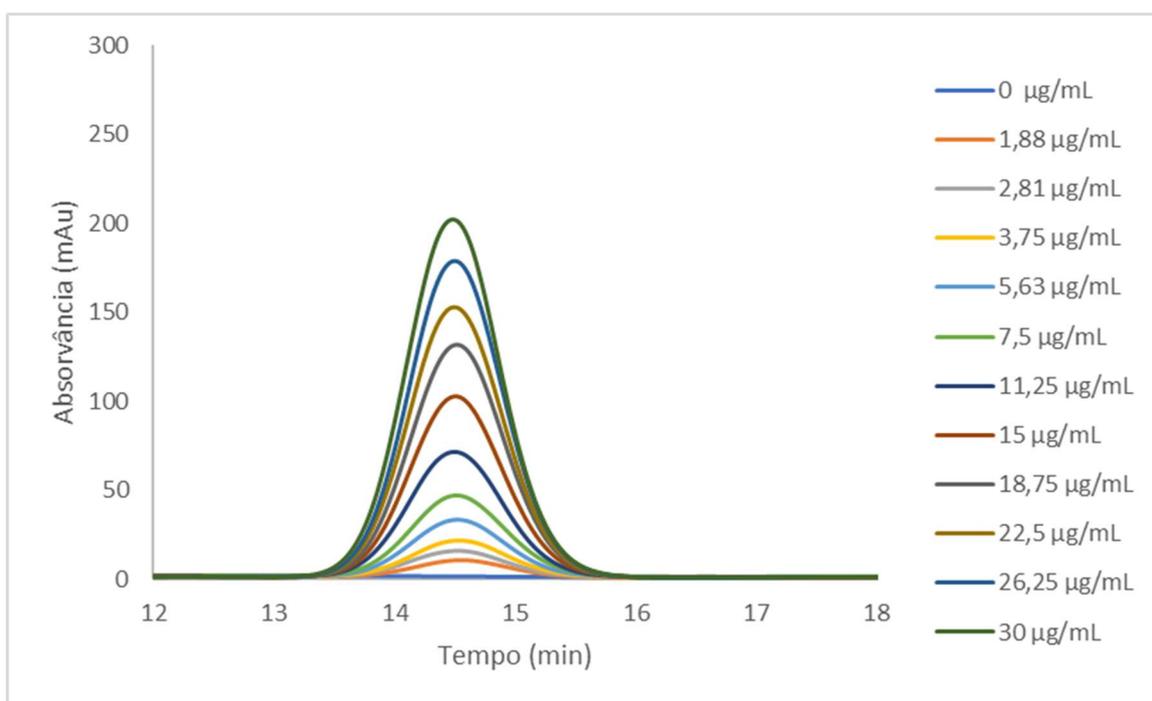


Figura 3. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 3.

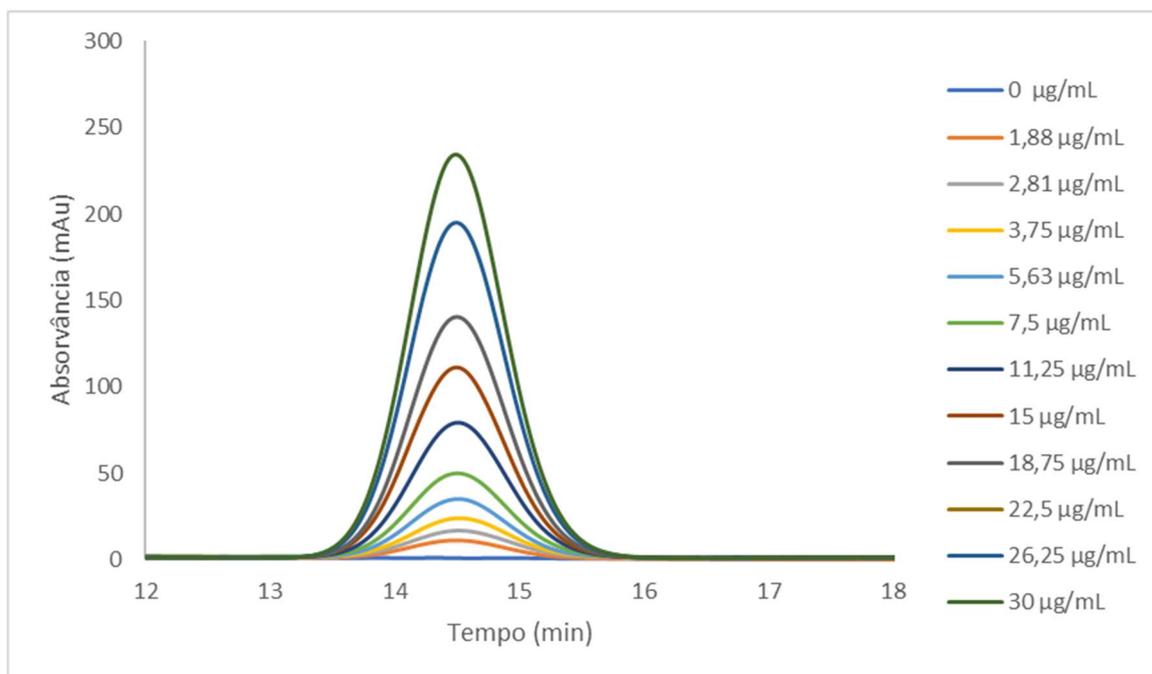


Figura 4. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 4.

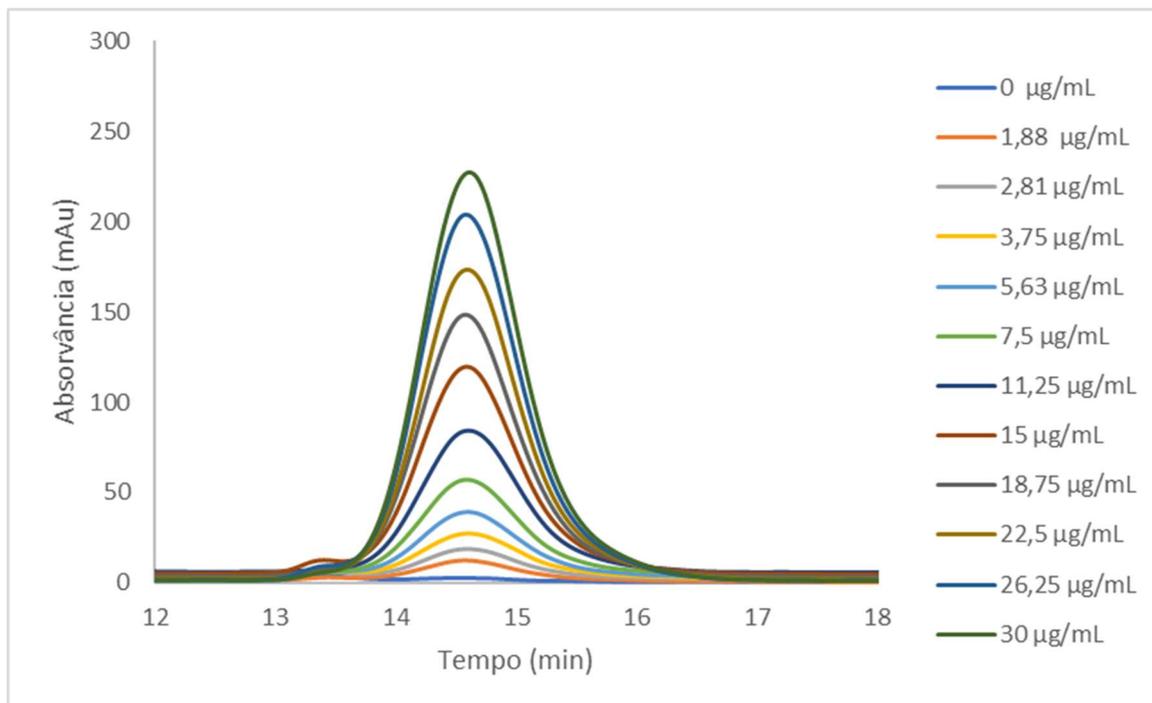


Figura 5. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 5.

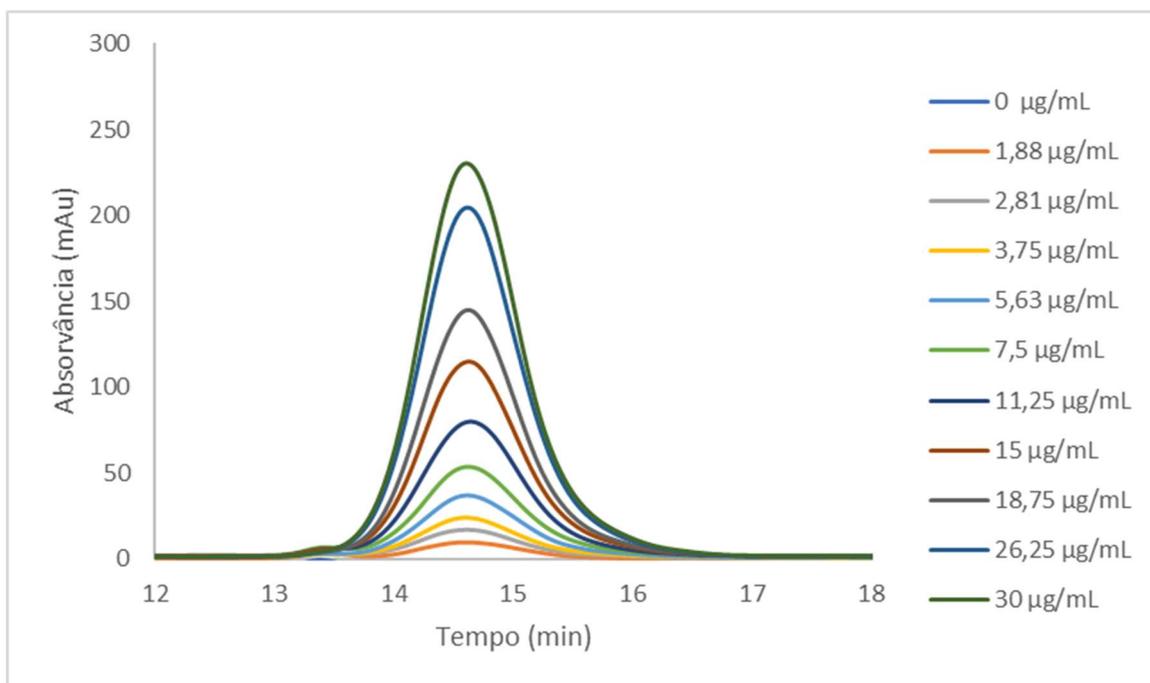


Figura 6. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 6.

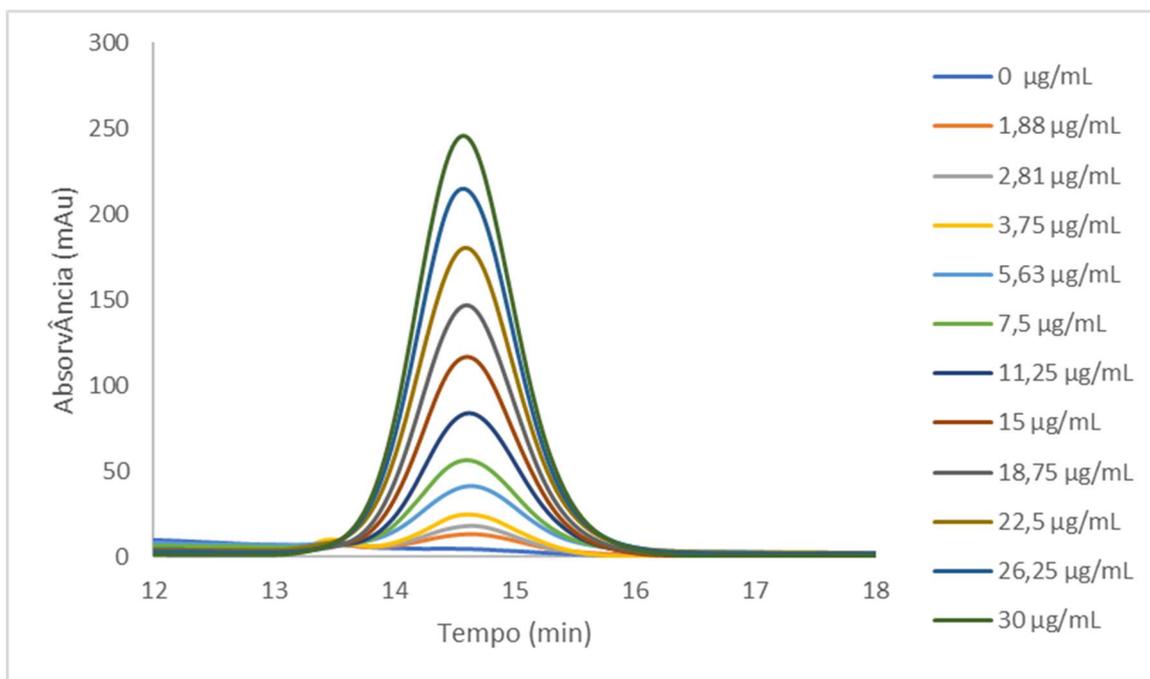


Figura 7. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 7.

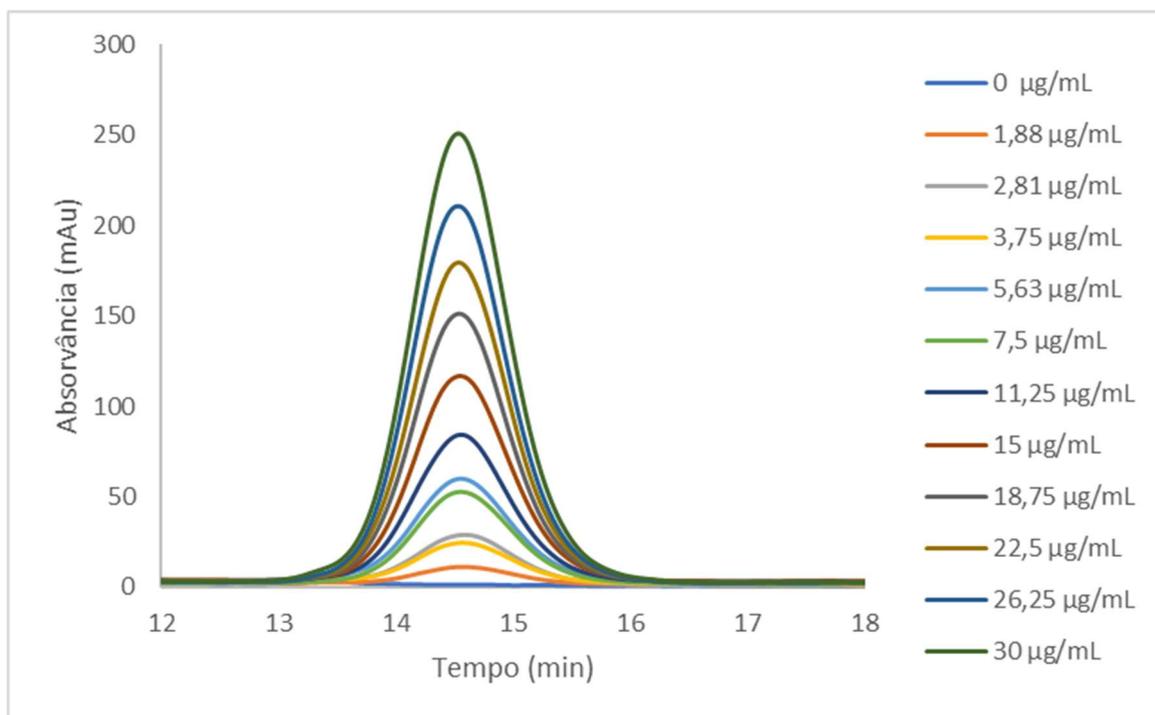


Figura 8. Cromatogramas dos padrões de CyA usados para preparar a curva de calibração designada por 8.

2. Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade tiveram como objetivo avaliar a estabilidade da formulação de CyA, durante o período de armazenamento de 1 mês à temperatura de 4°C. A formulação foi assim analisada em termos da quantidade de CyA que se encontrava presente na formulação ao fim de 15 dias e 1 mês de permanência no frio. As amostras recolhidas foram analisadas por CLAE. De seguida, encontram-se apresentados os cromatogramas obtidos através da CLAE das alíquotas retiradas da formulação em estudo ao fim de 15 dias e 1 mês de armazenamento.

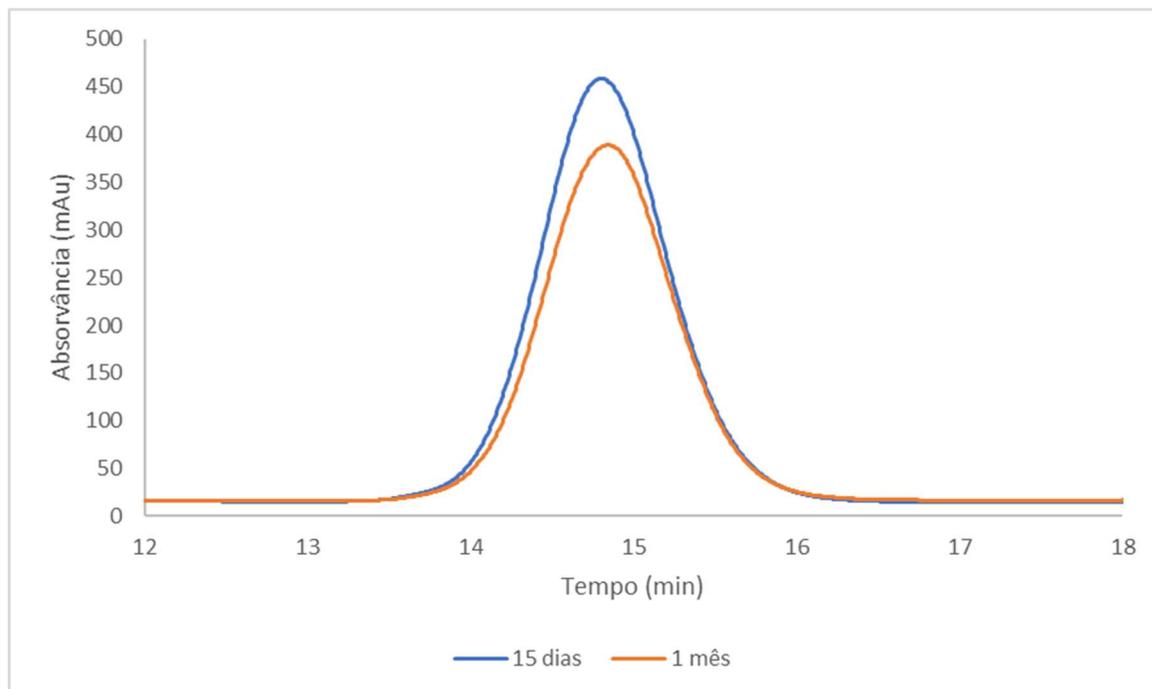


Figura 9. Cromatogramas obtidos para as amostras de estudo da estabilidade retiradas da formulação em estudo ao fim de 15 dias e 1 mês de armazenamento à temperatura de 4°C.

3. Estudos *in vitro* de libertação

Os estudos de libertação realizados tiveram como objetivo avaliar o perfil de libertação de quatro formulações de CyA desenvolvidas contendo diferentes percentagens de Tween 80 (4; 2; 1 e 0,5). Estes estudos foram realizados utilizando um sistema de células de difusão de *Franz* verticais, composto por nove células individuais. Em cada uma das células de difusão foi colocada uma quantidade de 200 μL de formulação de CyA ou formulação controlo. O compartimento recetor foi preenchido com 12 mL de PBS/EtOH (70/30) (% v/v). Em intervalos de tempo pré-determinados (0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas) foram retiradas alíquotas de 500 μL do compartimento recetor que foram analisadas por CLAE. De seguida, encontram-se apresentados os cromatogramas obtidos através da CLAE das alíquotas retiradas do compartimento recetor em cada tempo para cada célula de difusão de *Franz*.

3.1. Formulação contendo 4% de Tween 80

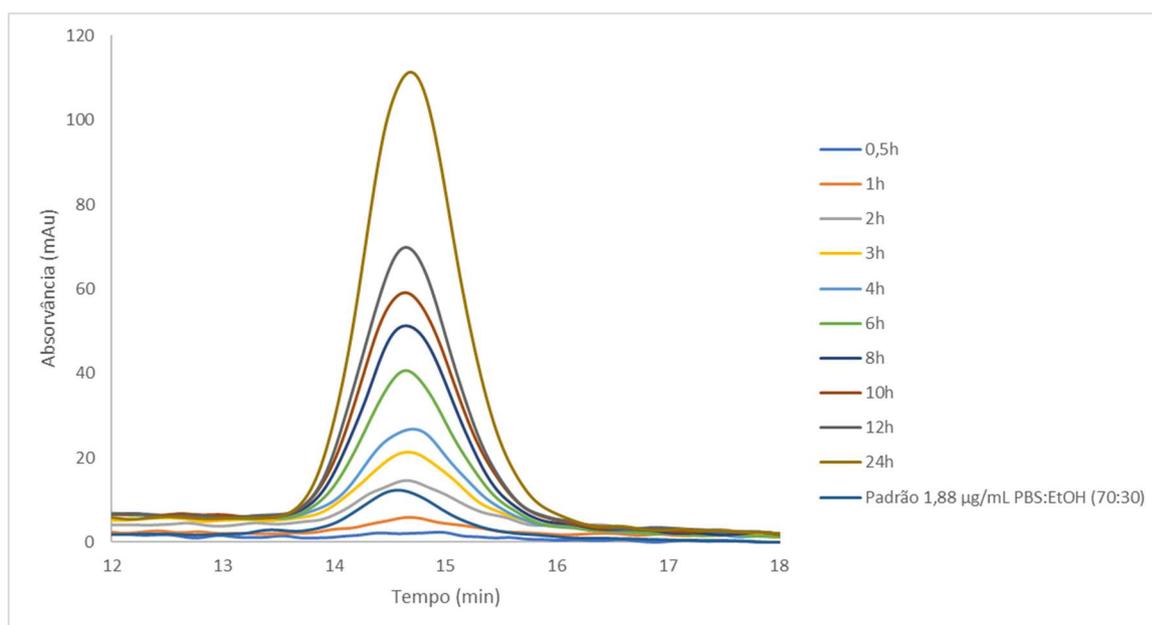


Figura 10. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 4% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

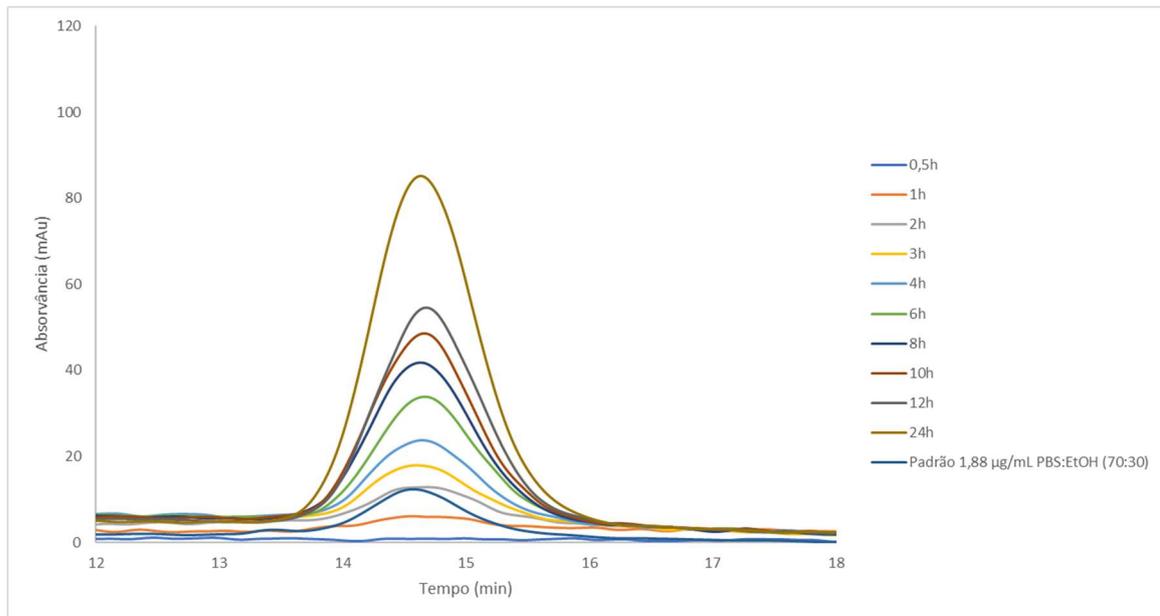


Figura 11. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 4% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

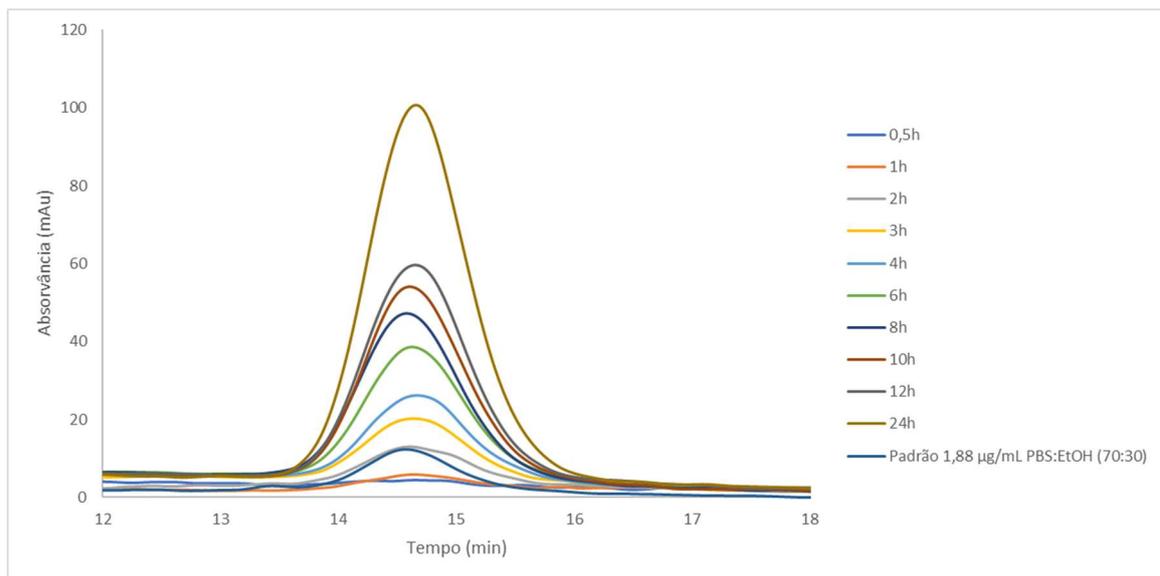


Figura 12. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 4% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

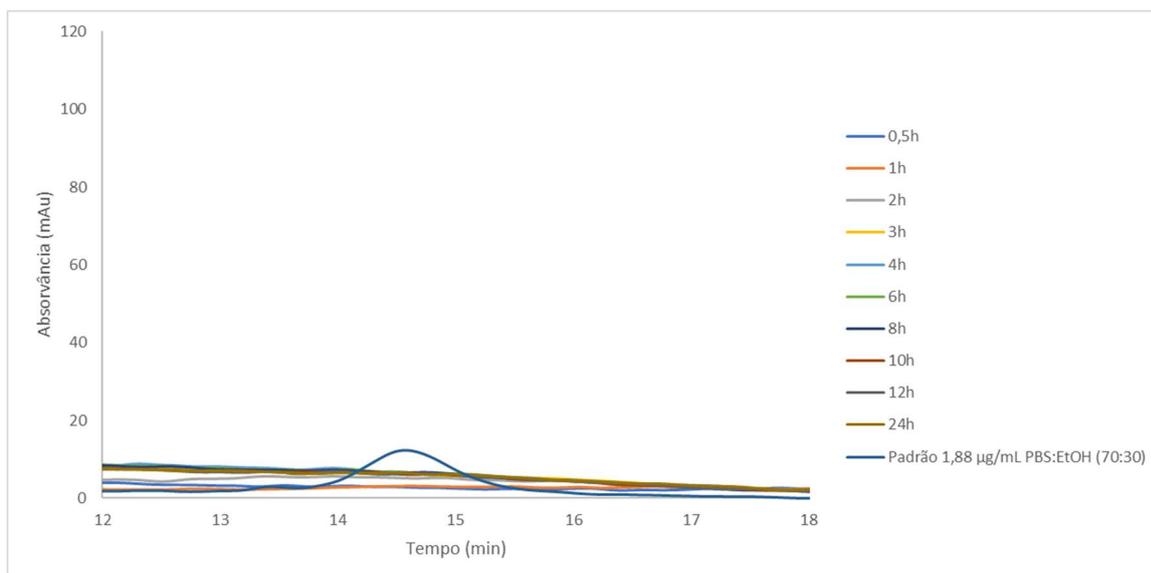


Figura 13. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC4, na qual foi colocada a formulação controlo contendo 4% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

3.2. Formulação contendo 2% de Tween 80

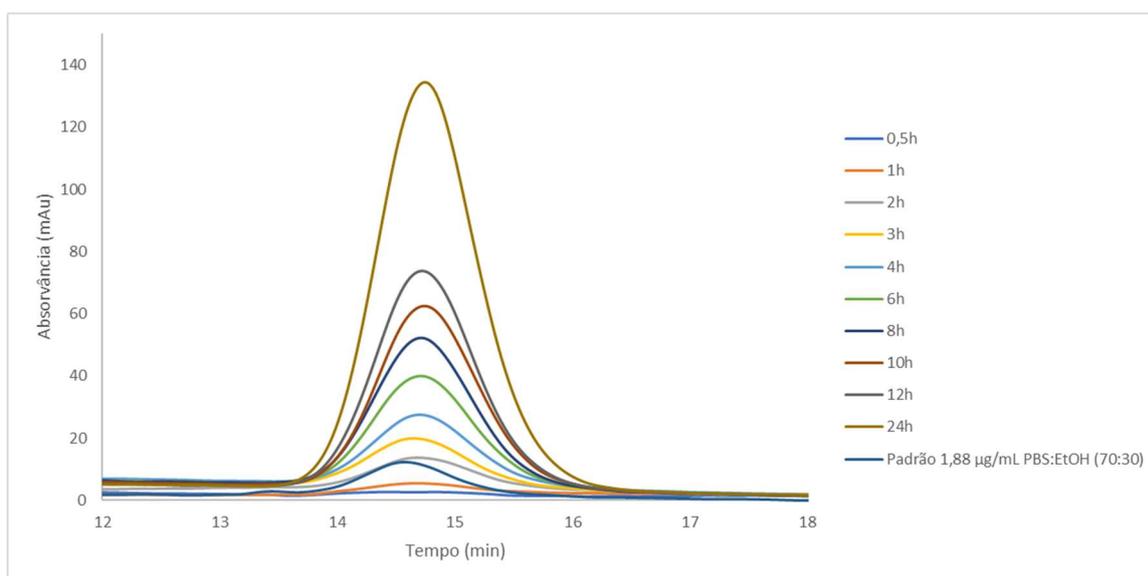


Figura 14. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC5, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

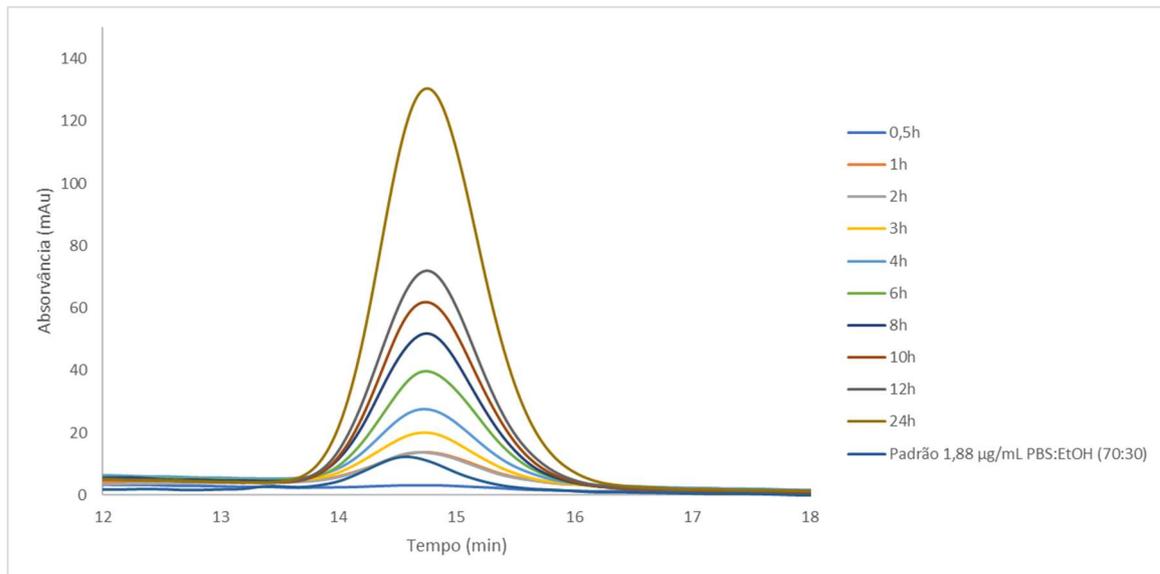


Figura 15. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

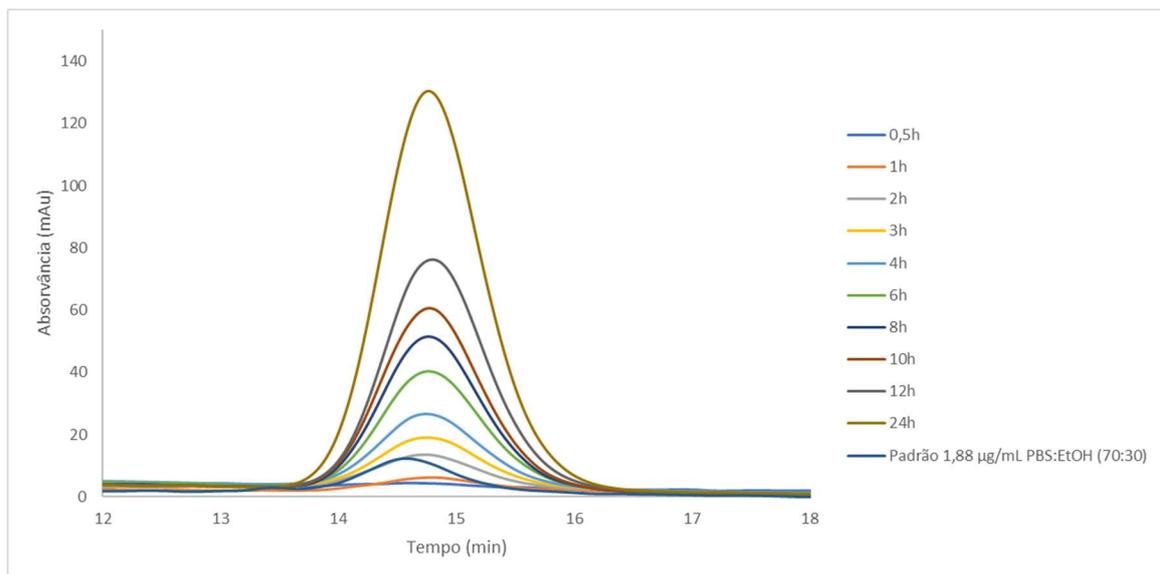


Figura 16. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

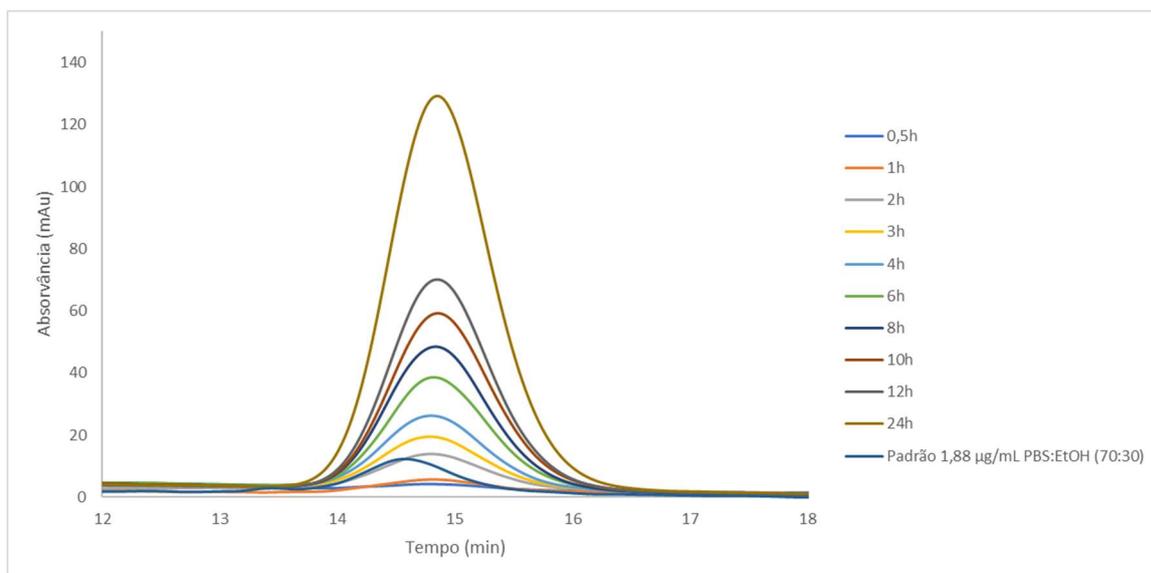


Figura 17. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

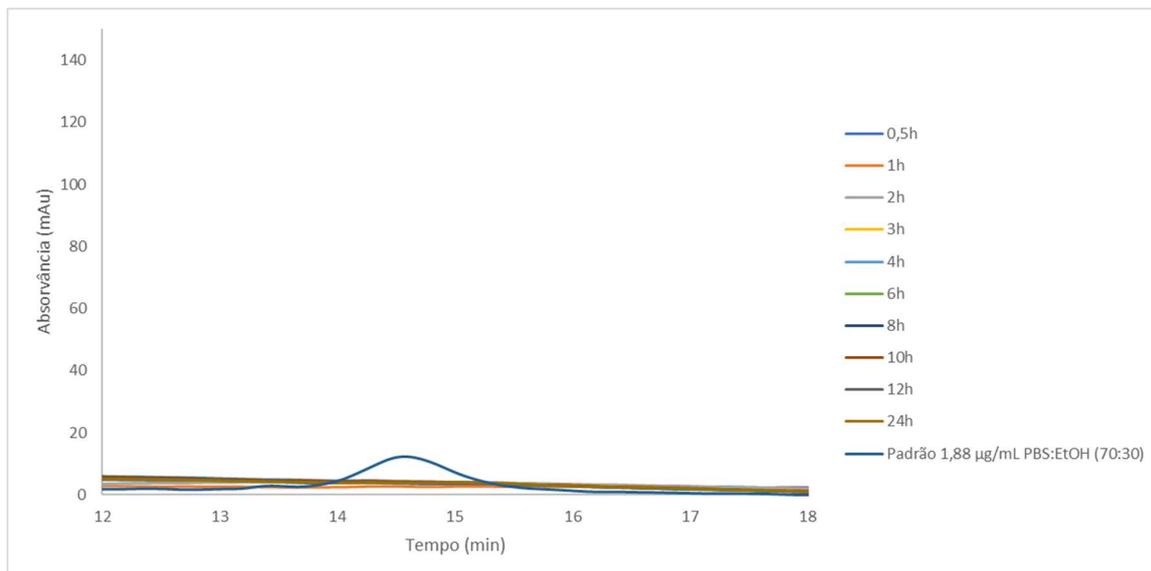


Figura 18. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC9, na qual foi colocada a formulação controlo contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

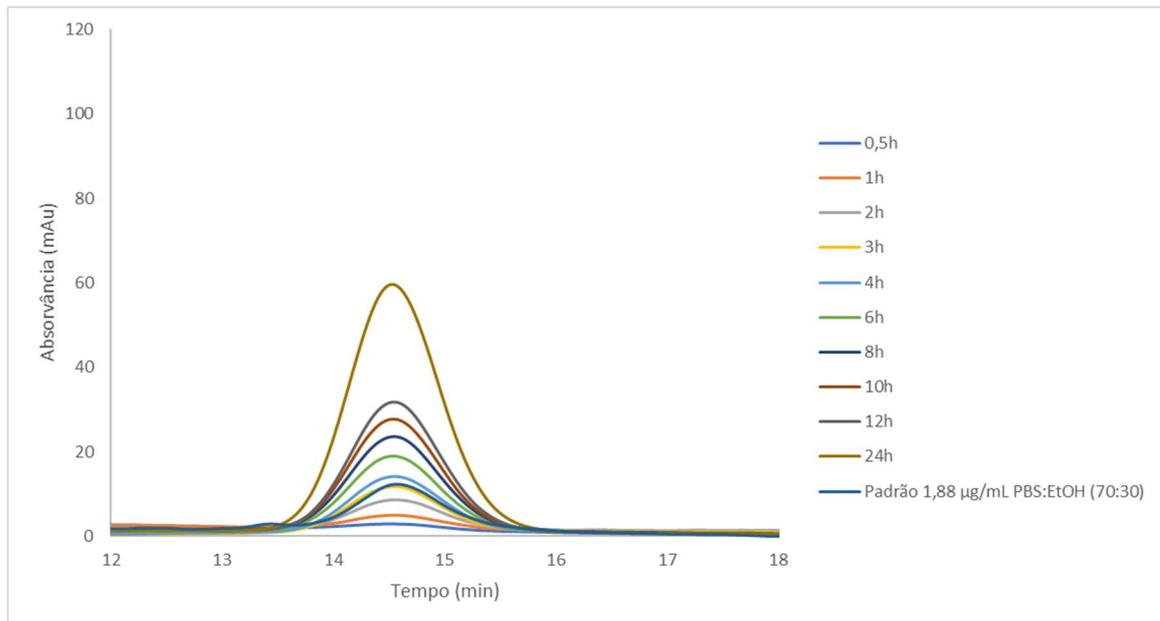


Figura 19. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

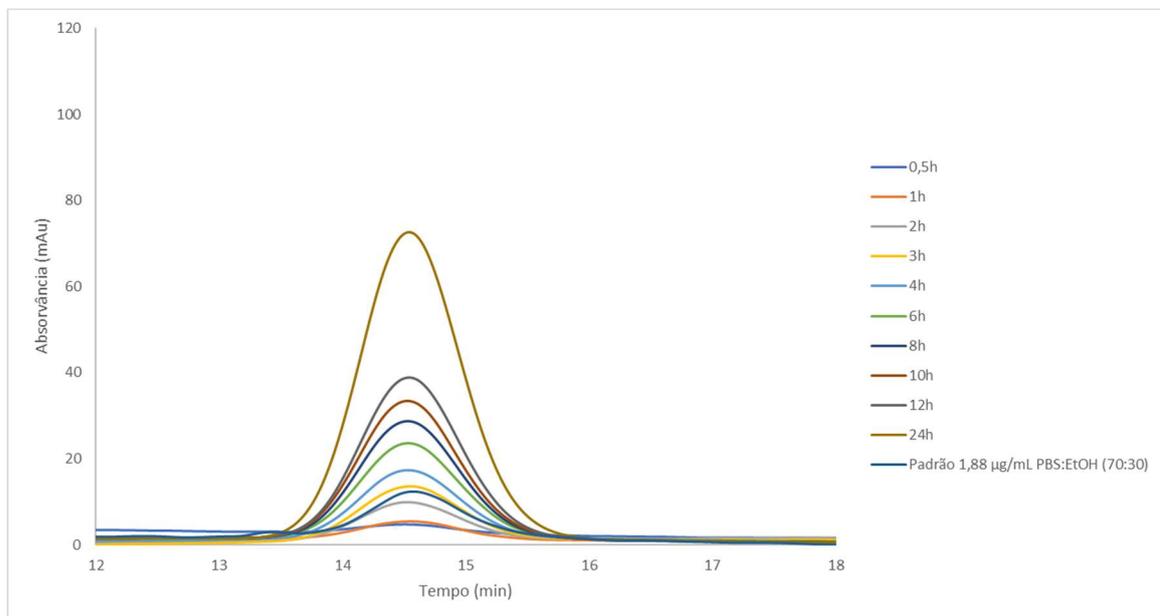


Figura 20. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

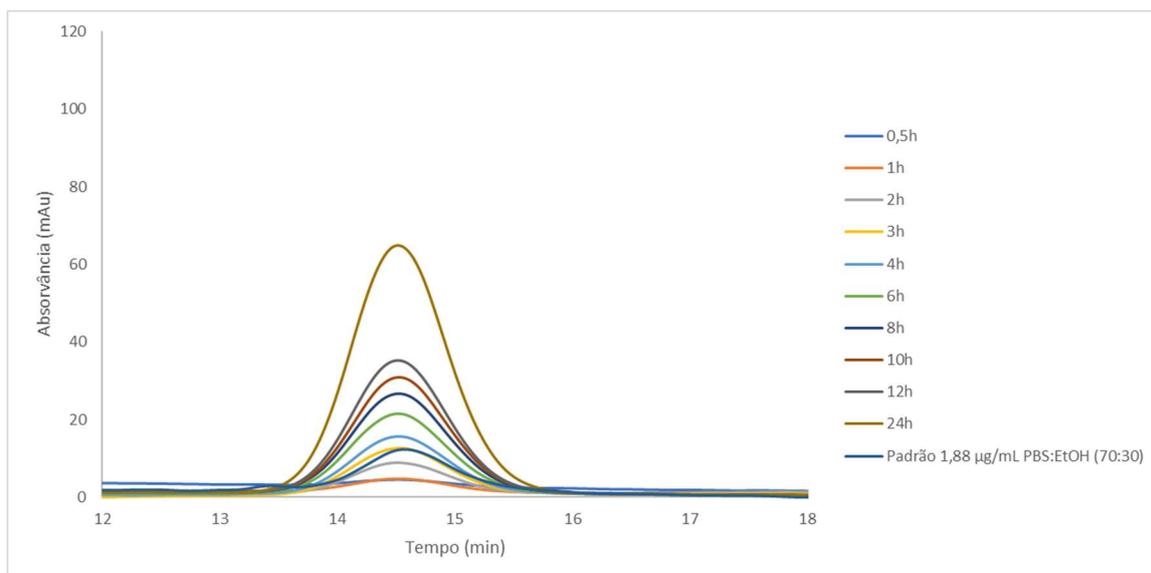


Figura 21. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

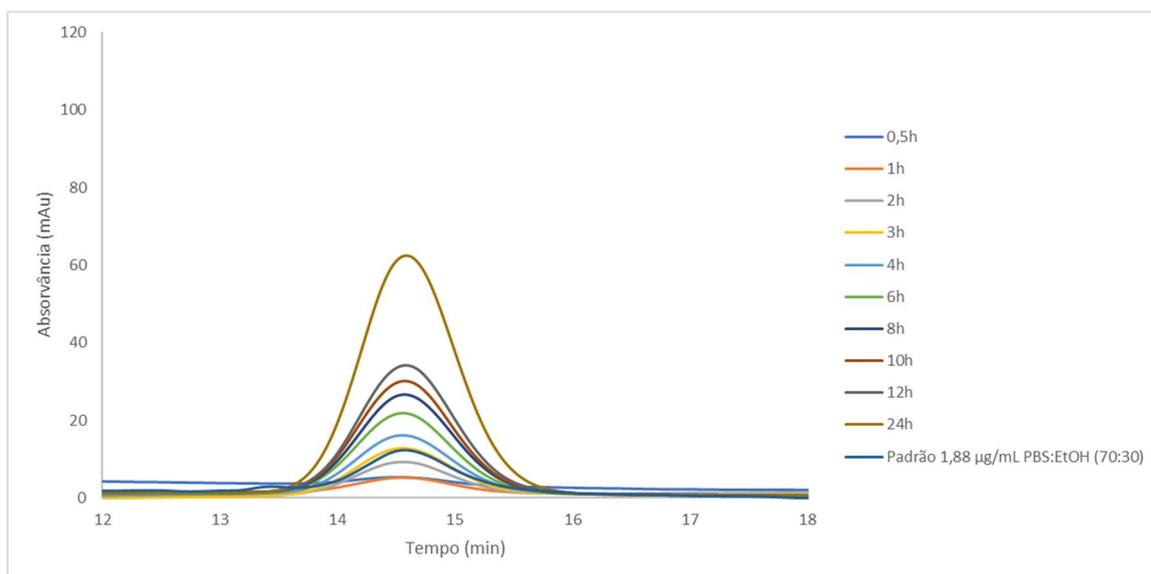


Figura 22. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC4, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

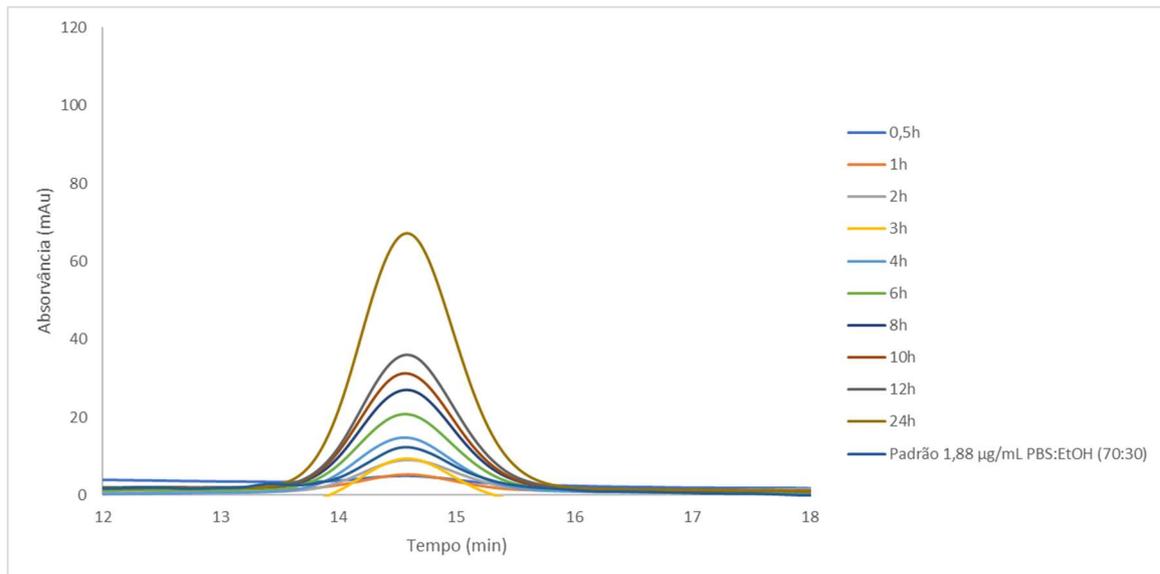


Figura 23. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados FC5, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

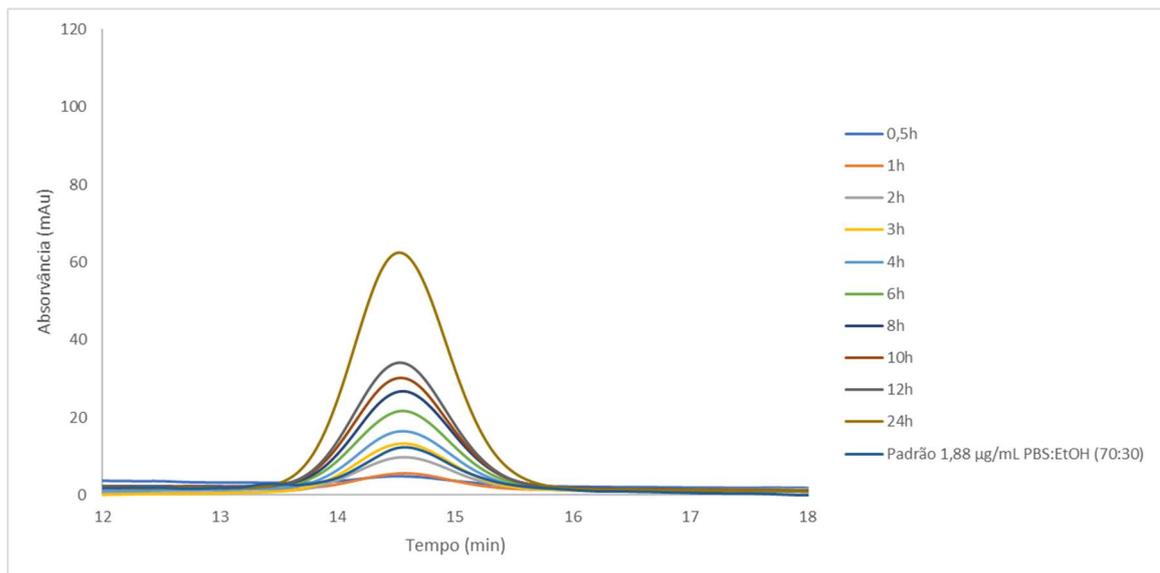


Figura 24. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

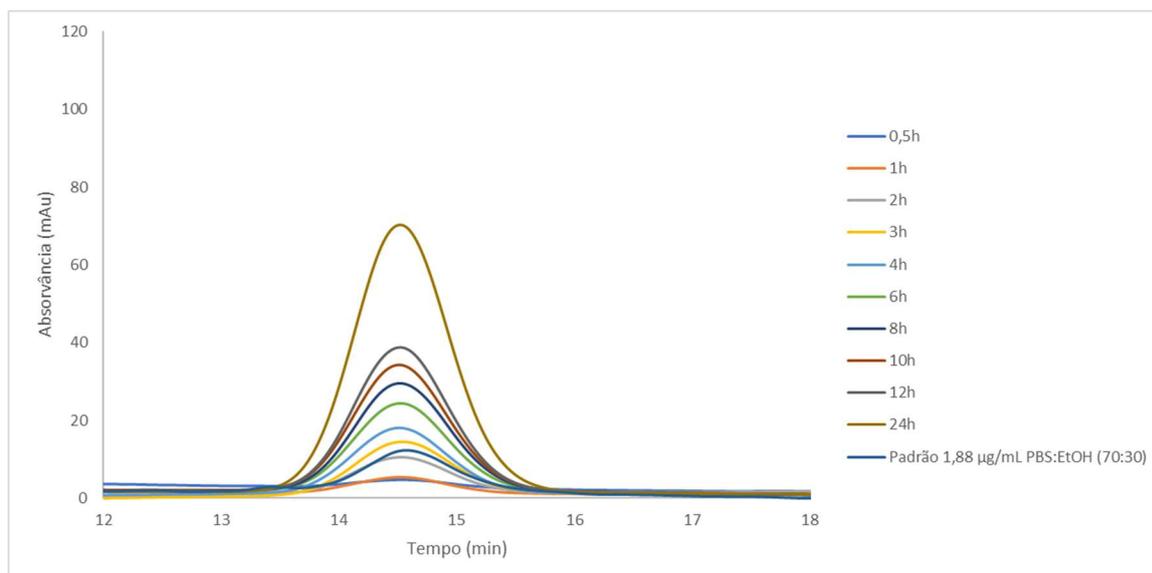


Figura 25. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

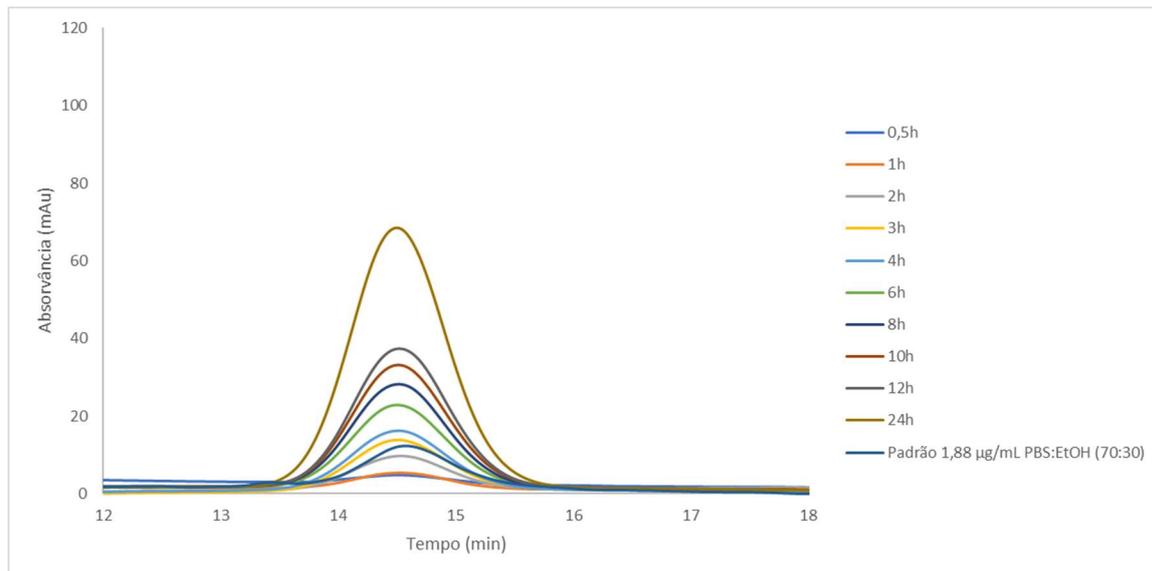


Figura 26. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

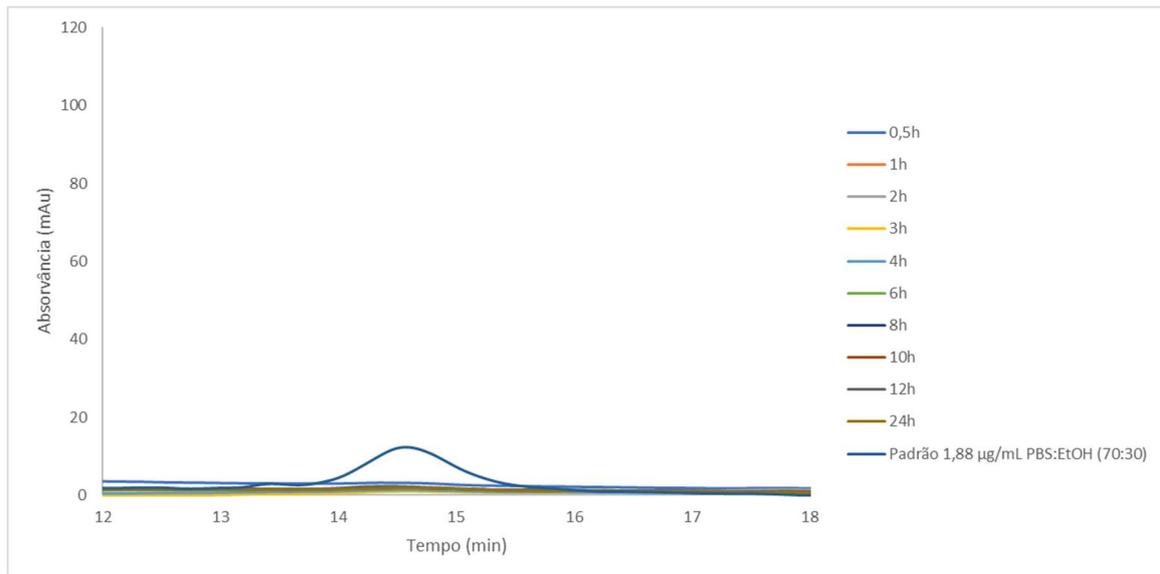


Figura 27. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC9, na qual foi colocada a formulação contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

3.3. Formulação contendo 1% de Tween 80

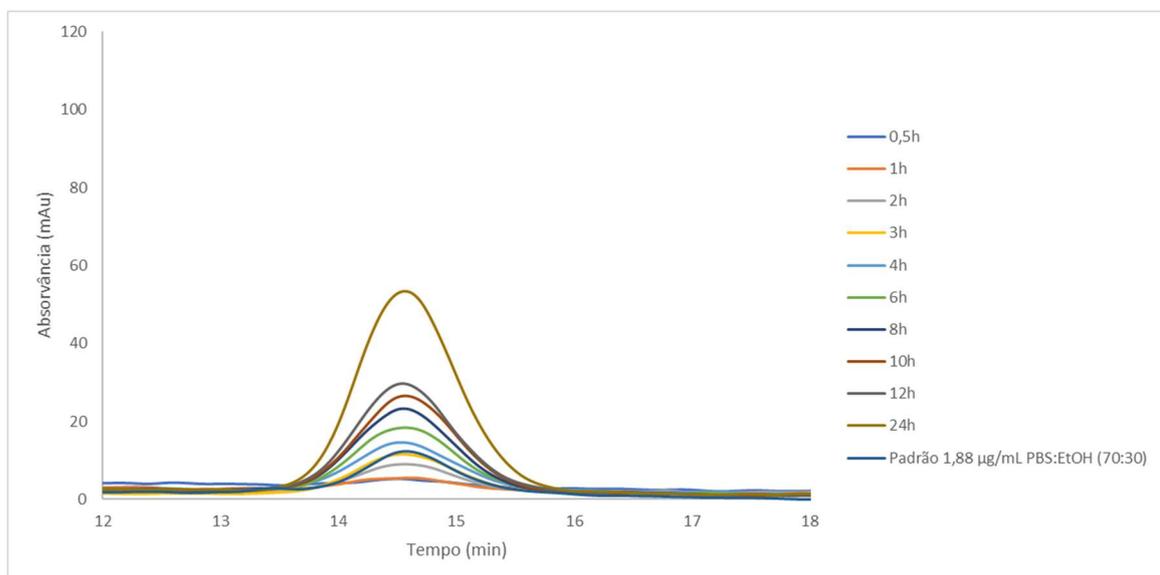


Figura 28. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 1% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

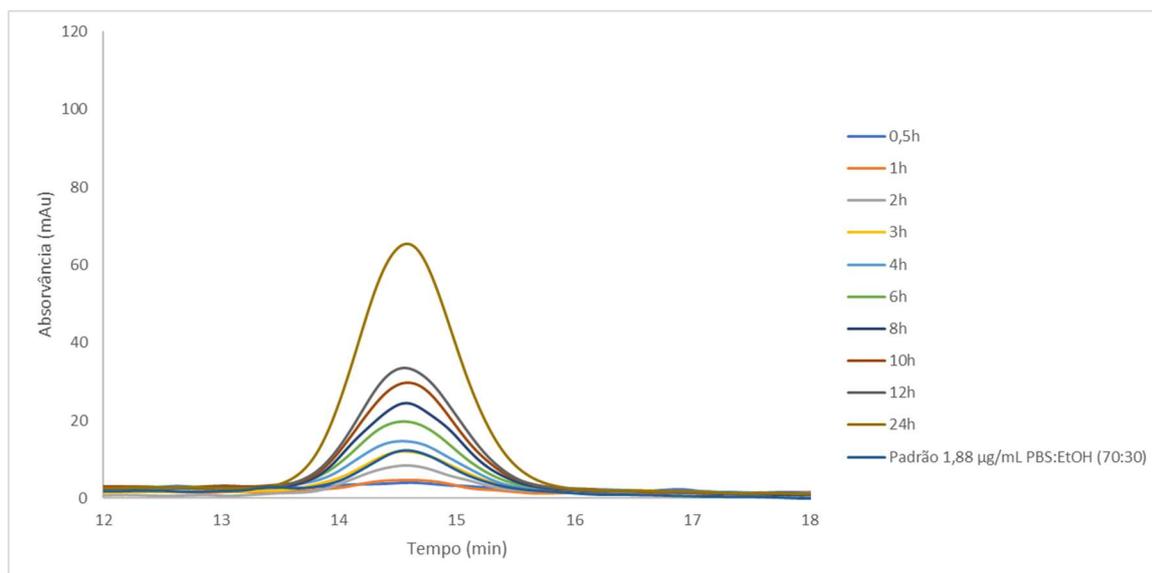


Figura 29. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 1% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

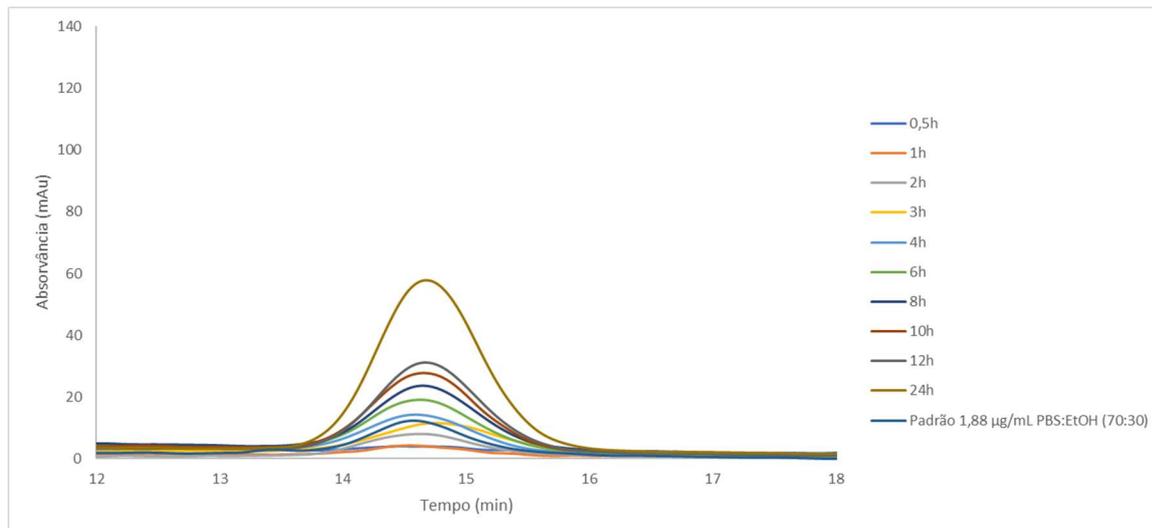


Figura 30. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 1% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

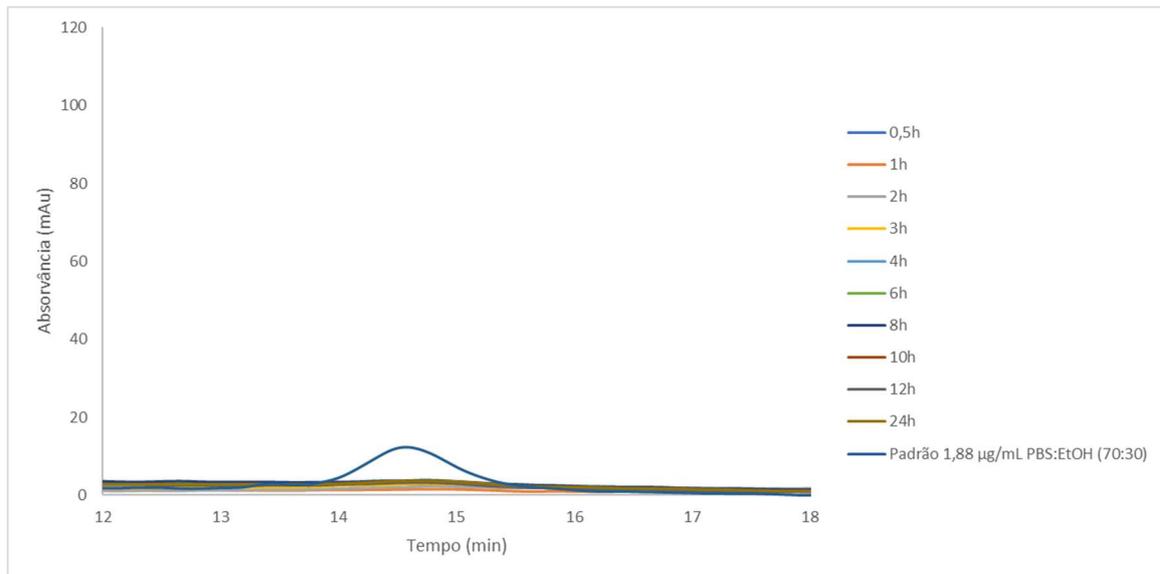


Figura 31. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC4, na qual foi colocada a formulação controlo contendo 1% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

3.4. Formulação contendo 0,5% de Tween 80

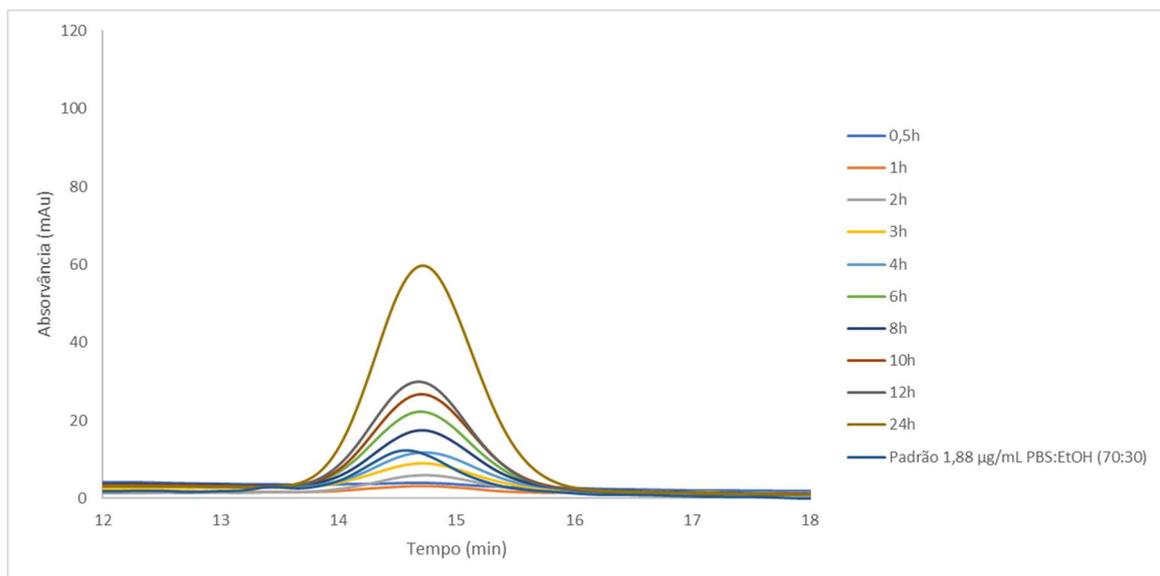


Figura 32. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC5, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 0,5% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

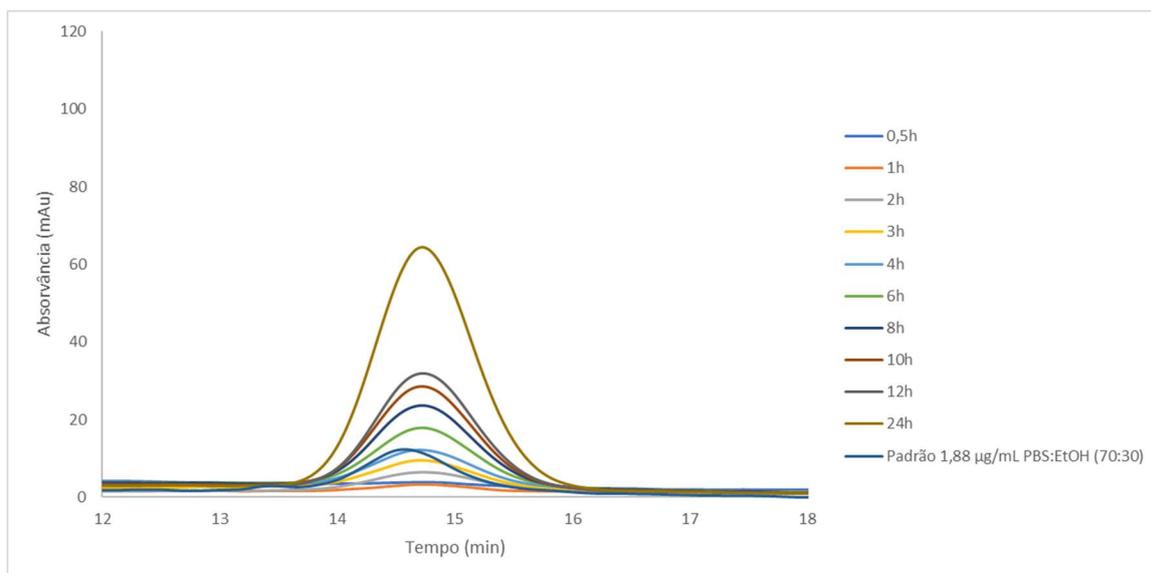


Figura 33. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 0,5% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

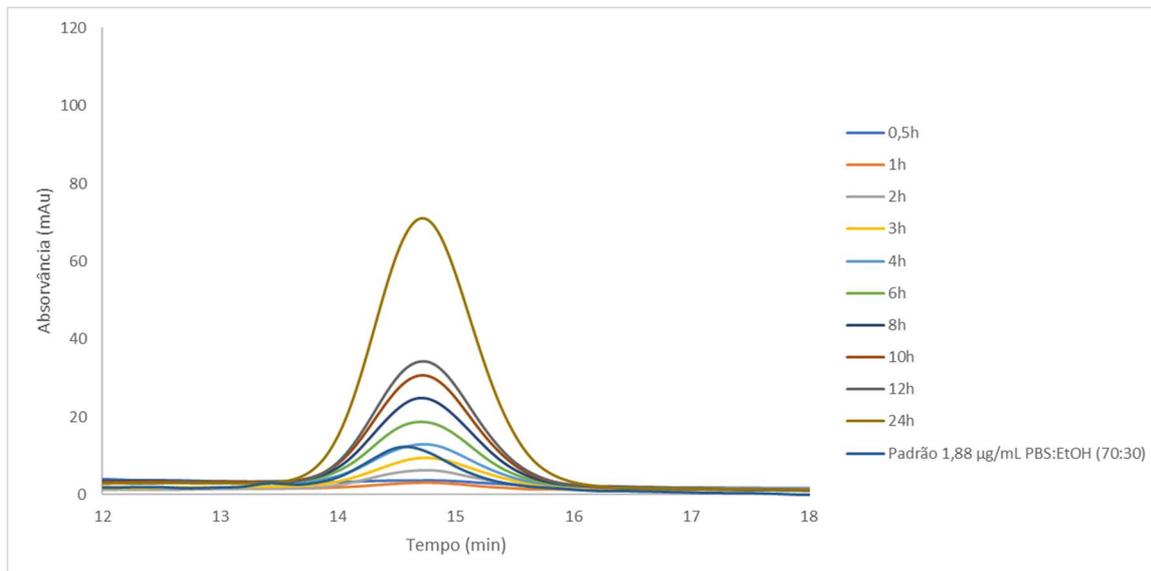


Figura 34. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 0,5% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

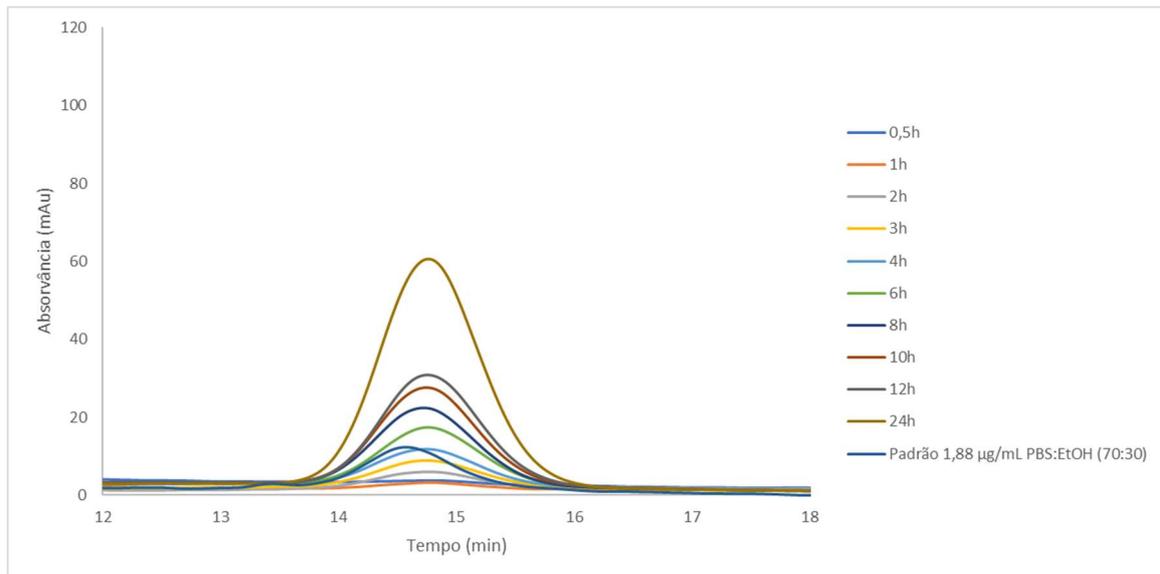


Figura 35. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA contendo 0,5% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

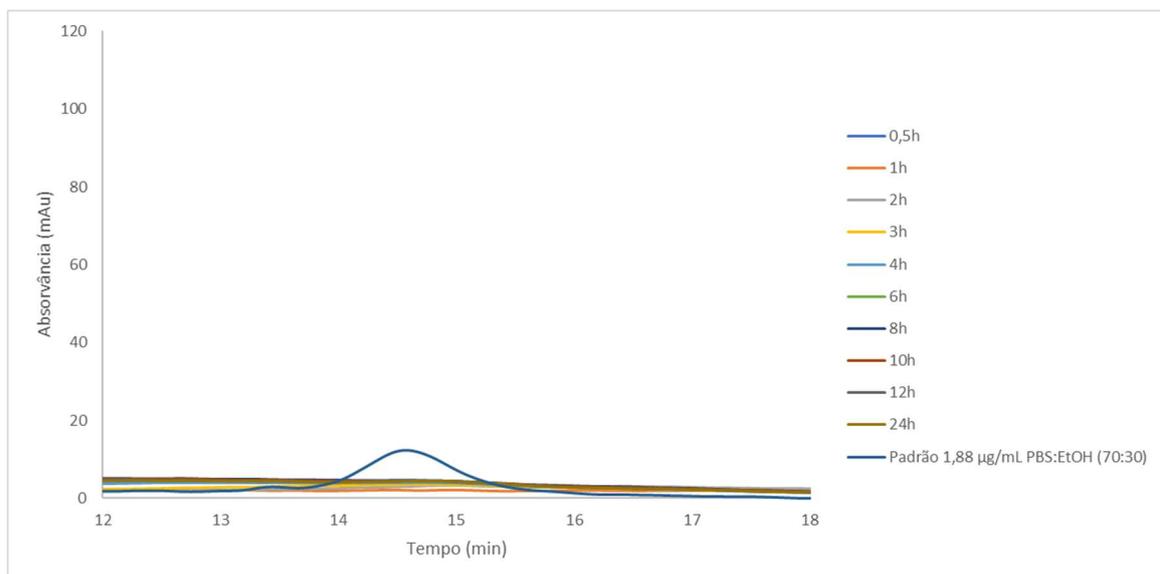


Figura 36. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC9, na qual foi colocada a formulação controlo contendo 0,5% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

3.5. Formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80

Foram ainda realizados estudos de liberação para uma formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80 utilizando igualmente, como nos estudos anteriores, um sistema de células de difusão de *Franz* verticais, composto por nove células individuais. Em cada uma das células de difusão foi colocada uma quantidade de 200 μ L de formulação de CyA ou formulação controle. O compartimento recetor foi preenchido com 12 mL de PBS/EtOH (70/30) (% v/v). Em intervalos de tempo pré-determinados (1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas) foram retiradas alíquotas de 500 μ L do compartimento recetor que foram analisadas por CLAE. De seguida, encontram-se apresentados os cromatogramas obtidas através da CLAE das alíquotas retiradas do compartimento recetor em cada tempo para cada célula de difusão de *Franz*.

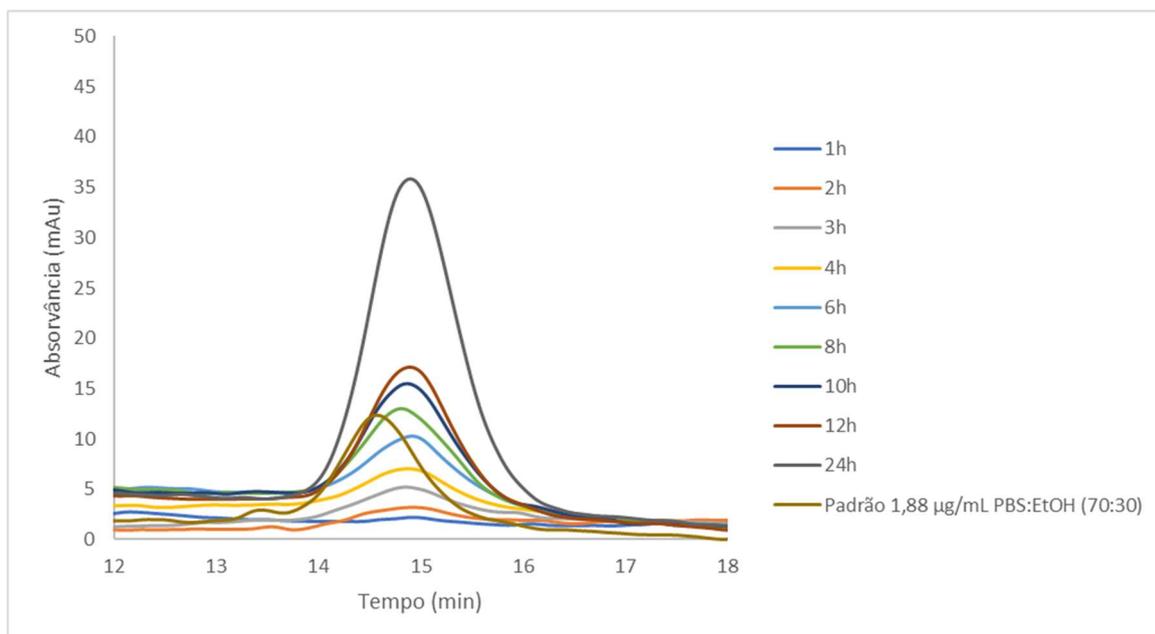


Figura 37. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC5, na qual foi colocada a formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 μ g/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v).

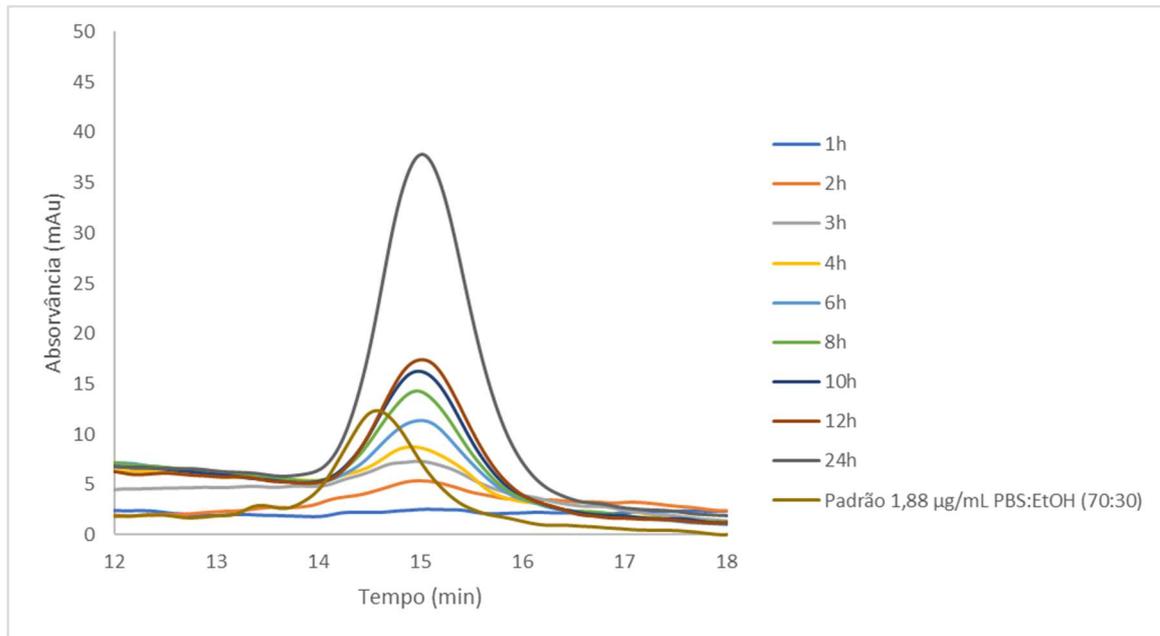


Figura 38. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC6, na qual foi colocada a formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

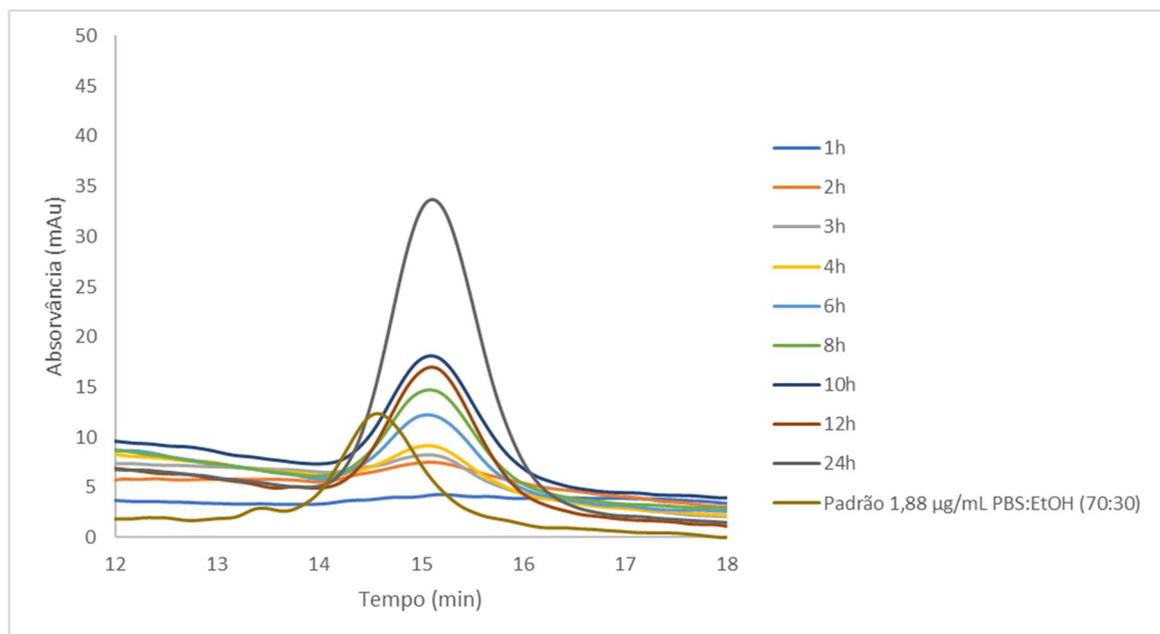


Figura 39. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC7, na qual foi colocada a formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

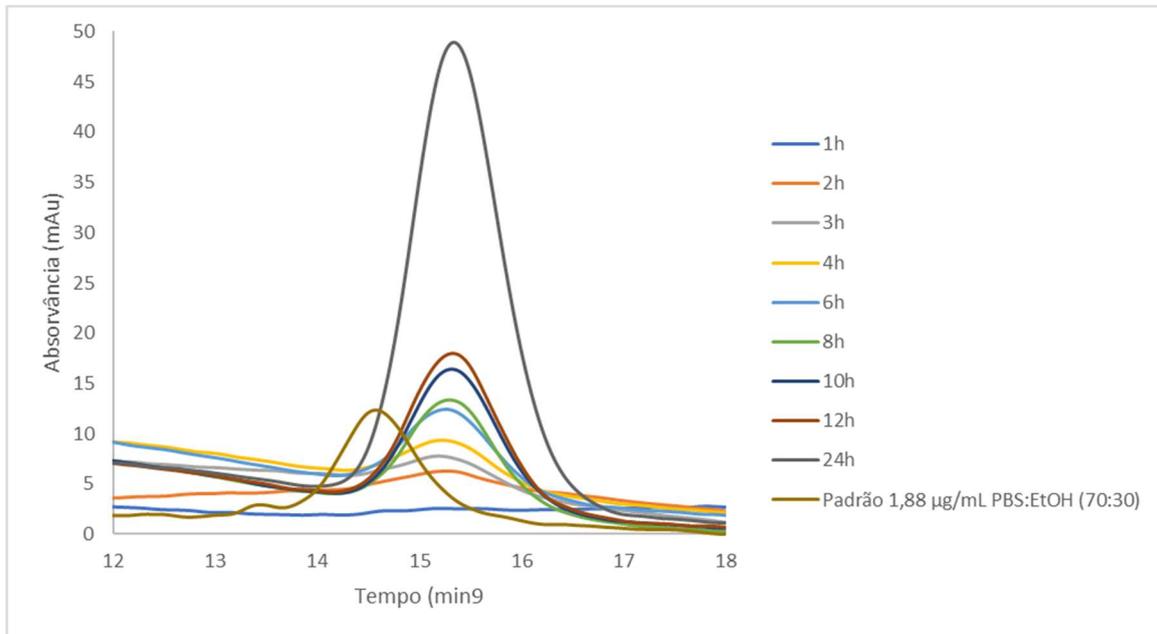


Figura 40. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC8, na qual foi colocada a formulação contendo 0,2% de CyA e 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

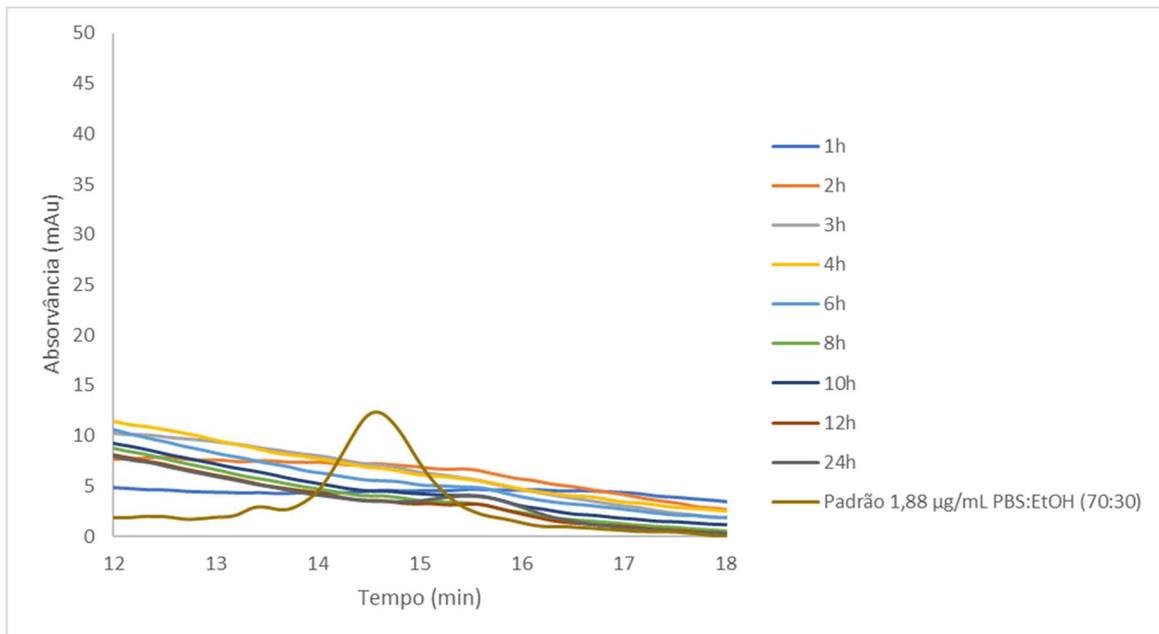


Figura 41. Cromatograma obtido para as amostras retiradas nos tempos assinalados da FC9, na qual foi colocada a formulação controlo contendo 2% de Tween 80. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% , v/v).

3.6. Estudo do solvente de extração

Com o objetivo de determinar qual o melhor solvente para extrair a CyA das amostras de pele (epiderme viável + derme), antes da realização dos estudos de permeação, procedeu-se ao estudo do solvente de extração. Para tal, injetou-se uma quantidade conhecida de CyA em pele dermatomizada e não dermatomizada. Após 24 horas, a CyA foi colocada a extrair das amostras de pele, utilizando dois solventes de extração distintos, uma solução de MeOH e uma mistura de solventes contendo PBS/EtOH(70/30) / MeOH (50/50) (% , v/v). Após a extração as amostras resultantes foram quantificadas por CLAE, com o intuito de quantificar a CyA que foi extraída por cada solvente. De seguida, encontram-se apresentados os cromatogramas obtidos.

3.6.1. Extração da CyA em pele não dermatomizada com MeOH

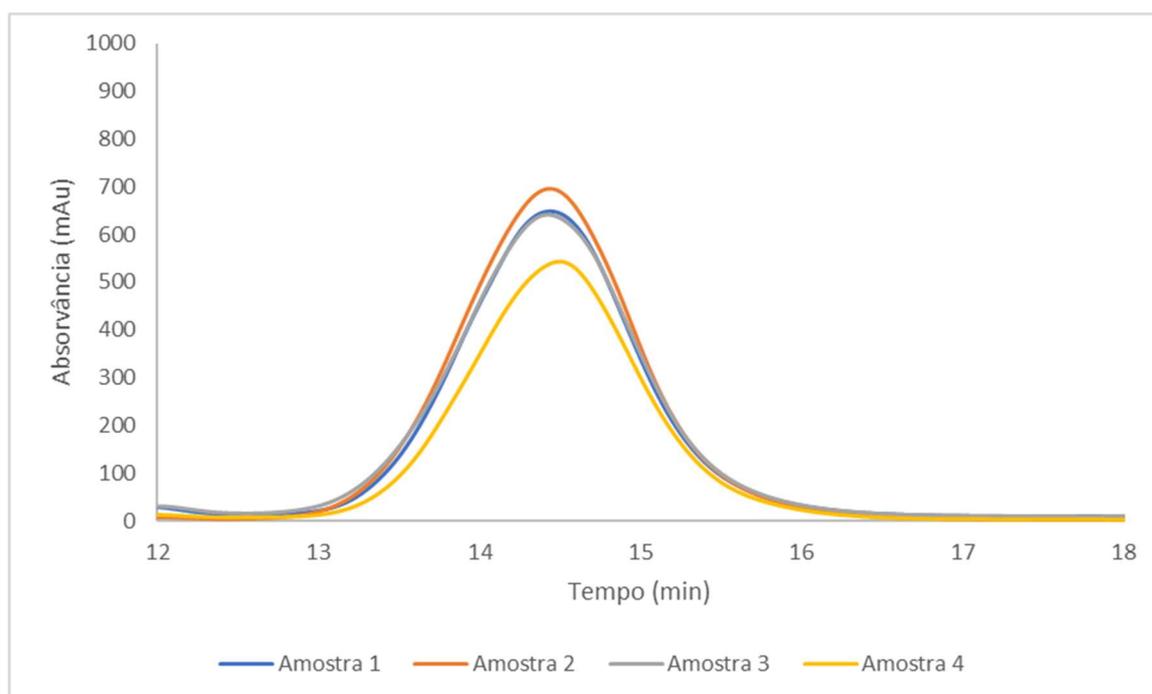


Figura 42. Cromatograma obtido para as amostras resultantes da extração da CyA em pele não dermatomizada com MeOH.

3.6.2. Extração da CyA em pele não dermatomizada com PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% , v/v)

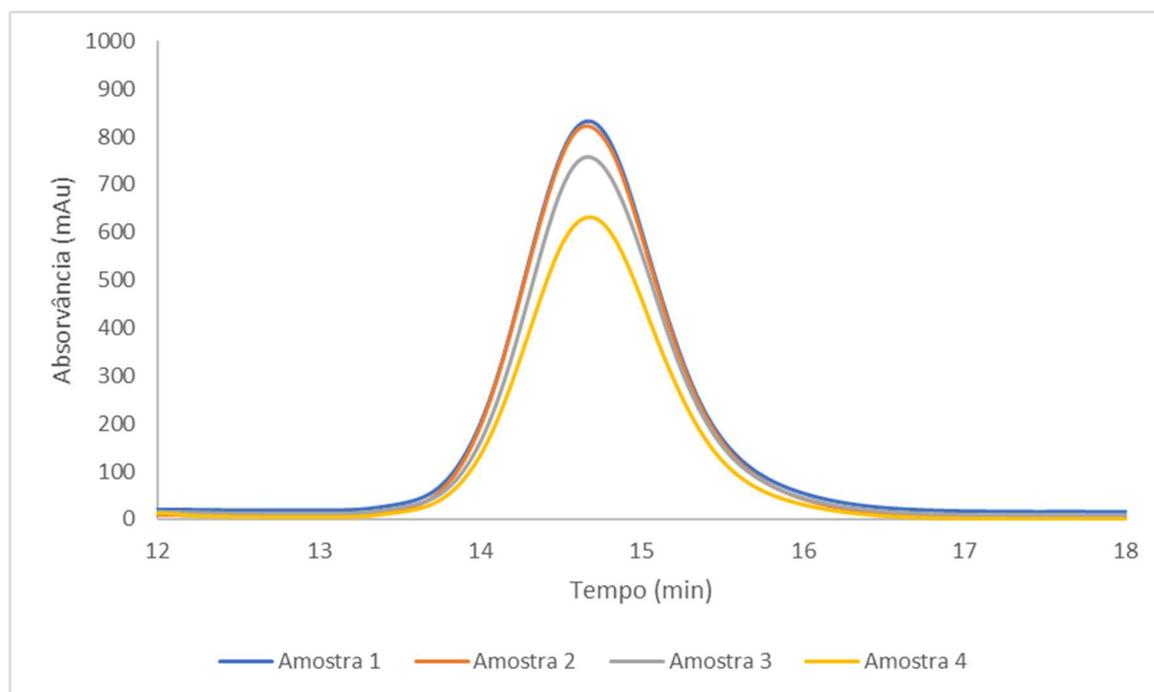


Figura 43. Cromatograma obtido para as amostras resultantes da extração da CyA em pele não dermatomizada com PBS/EtOH(70/30)/MeOH (50/50) (% , v/v).

3.6.3. Extração da CyA em pele dermatomizada com MeOH

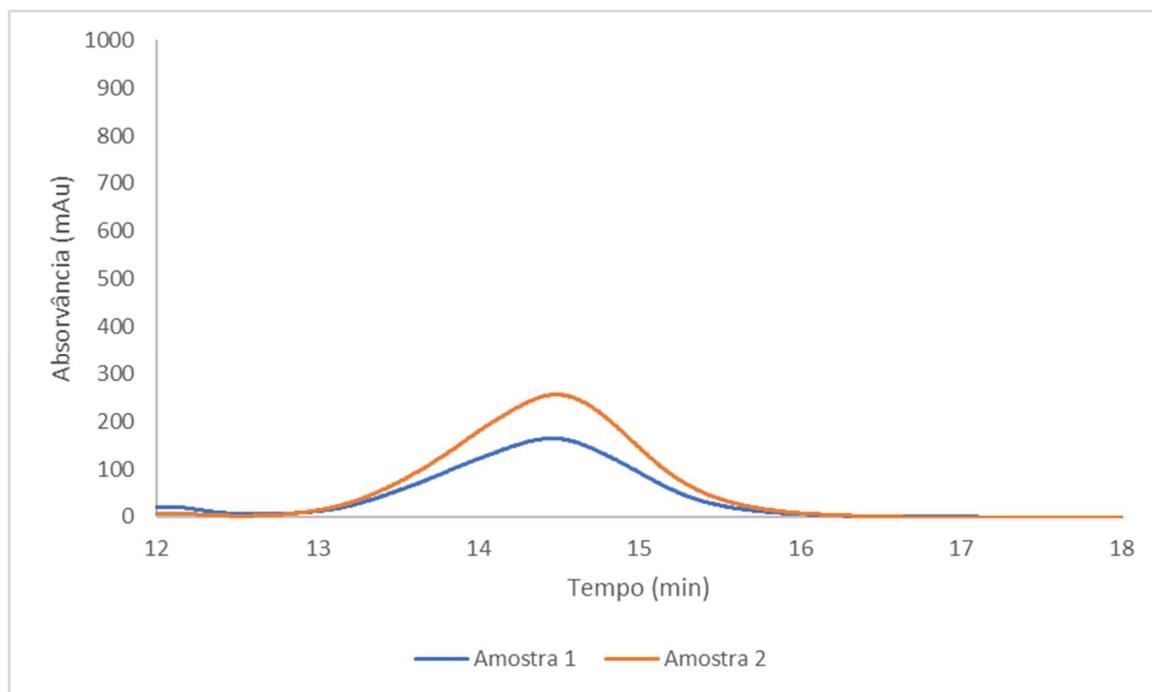


Figura 44. Cromatograma obtido para as amostras resultantes da extração da CyA em pele dermatomizada com MeOH.

3.6.4. Extração da CyA em pele dermatomizada com PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% v/v)

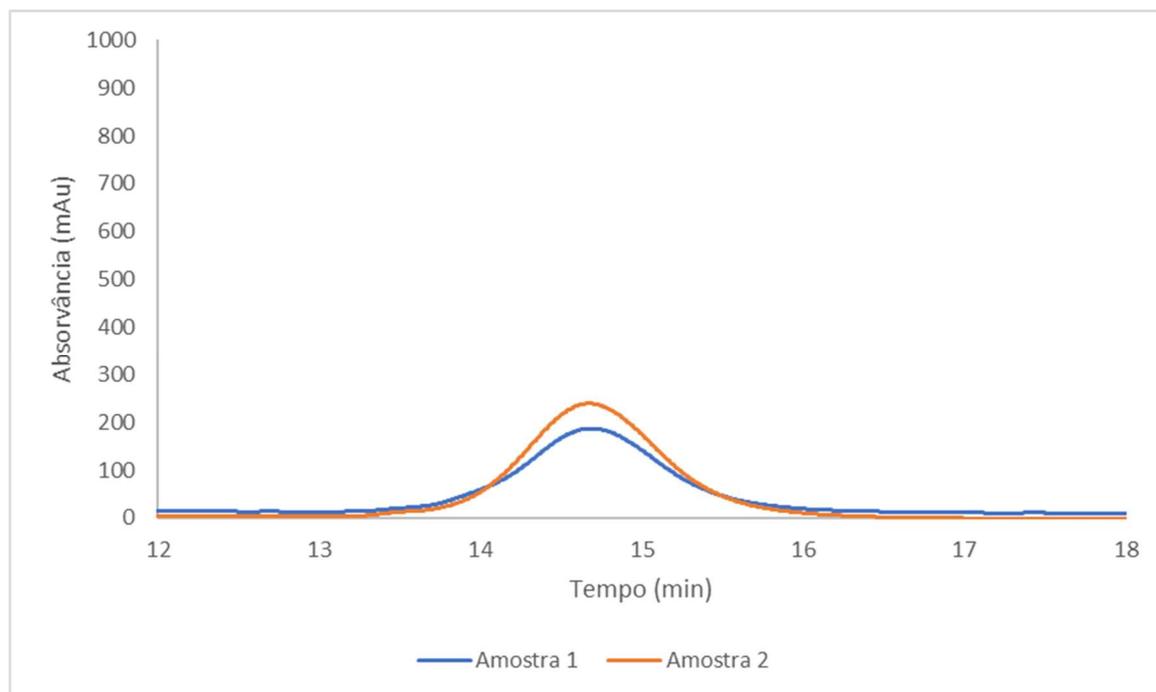


Figura 45. Cromatograma obtido para as amostras resultantes da extração da CyA em pele dermatomizada com PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% v/v).

3.7. Estudos *ex vivo* de permeação

Os estudos de permeação *ex vivo* da CyA foram realizados sob condições ativas e passivas. No caso da permeação sob condições ativas o filme piezofotónico foi irradiado durante 5 minutos por estímulos de um laser com duas fluências distintas, uma fluência de 69 mJ/cm² e uma fluência de 48 mJ/cm².

Para ambas as condições ativas e passivas foram utilizadas membranas biológicas (pele de porco) num sistema de células de difusão de *Franz* verticais, composto por nove células individuais. Em cada uma das células de difusão foi colocada uma quantidade de 300 µL de formulação de CyA ou formulação controlo. O compartimento recetor foi preenchido com 12 mL de PBS/EtOH (70/30) (% v/v). Num tempo pré-determinado (0,5 horas) foram retiradas alíquotas de 500 µL do compartimento recetor de cada célula de difusão que foram analisadas por CLAE. Ao fim de 0,5 horas de experiência foi também recolhida a pele que se encontrava em cada célula de difusão. Após o procedimento descrito na secção dos materiais e métodos para limpar a CyA da pele, esta foi colocada a extrair em 3 mL de PBS/EtOH (70/30) / MeOH (50/50) (% v/v). As amostras de pele foram quantificadas por CLAE, com o intuito de quantificar a CyA que ficou retida nas camadas mais profundas da pele. De seguida, encontram-se apresentados os cromatogramas obtidos através da CLAE das alíquotas retiradas do compartimento recetor no tempo 0,5 horas para cada célula de difusão de *Franz* e das amostras da pele.

3.7.1. Permeação sob condições ativas com um laser com fluência de 69 mJ/cm² para o caso das amostras proveniente do compartimento recetor

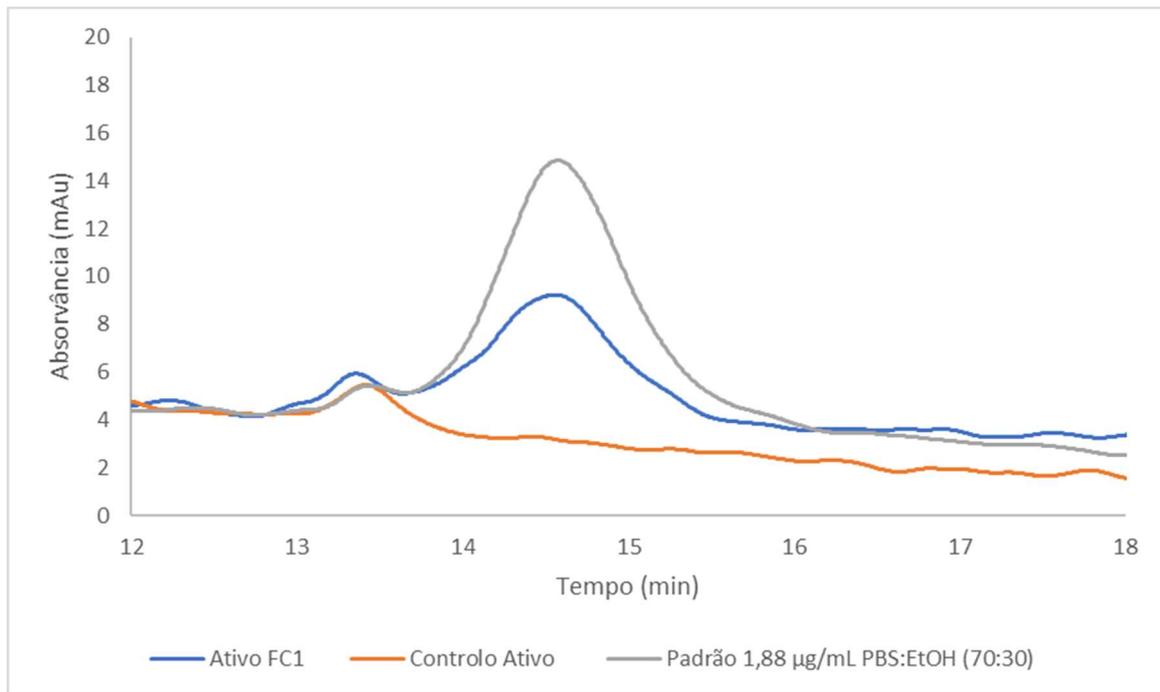


Figura 46. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

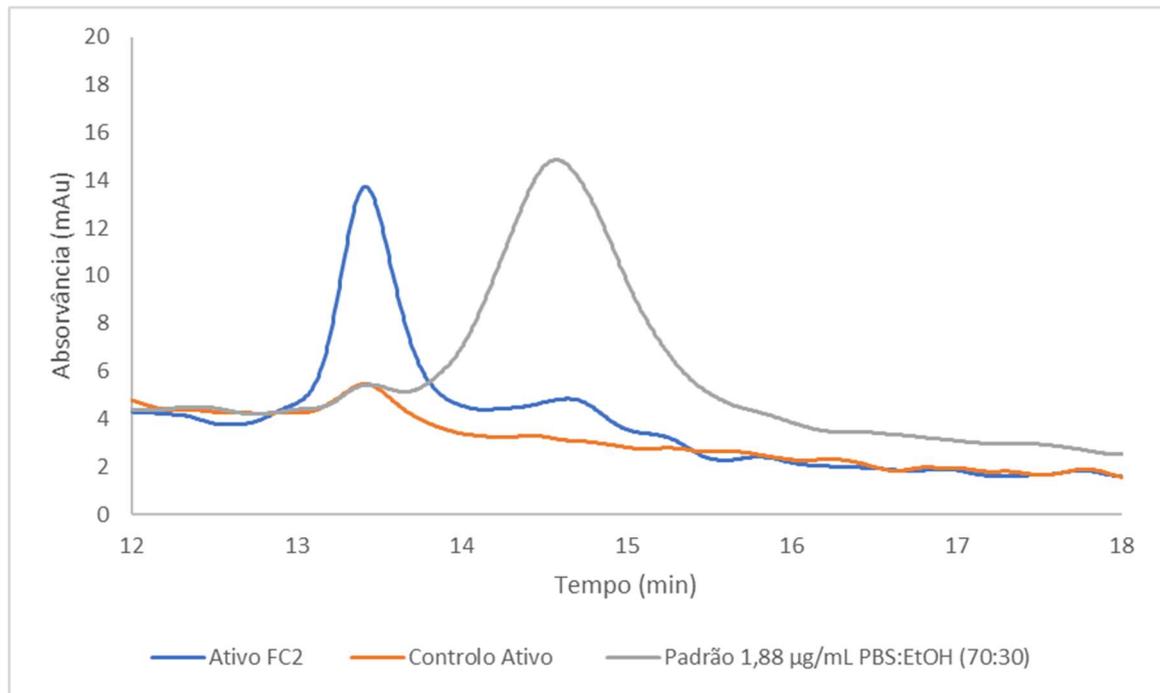


Figura 47. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

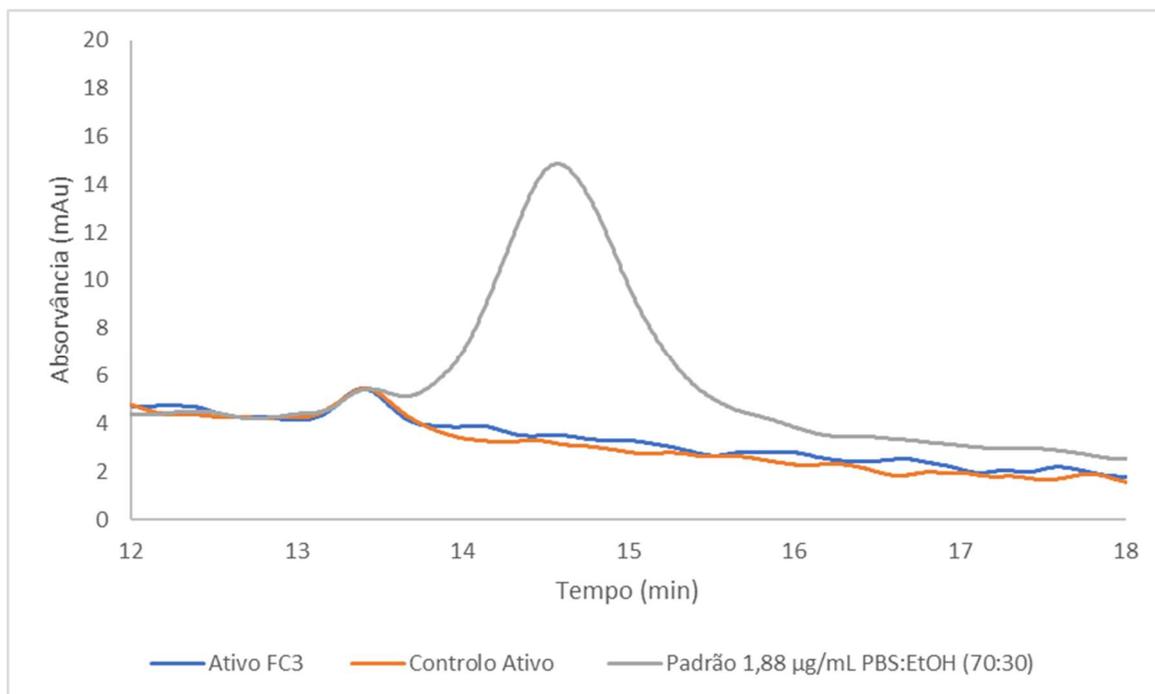


Figura 48. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (%_{v/v}) (cinzento).

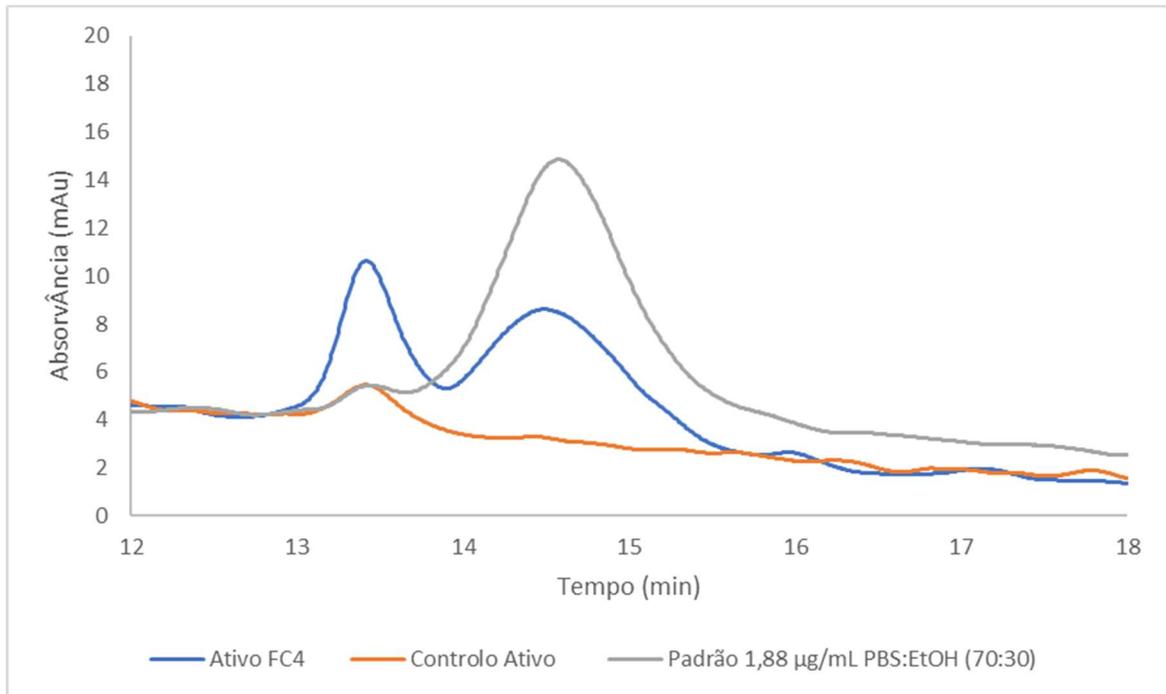


Figura 49. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC4, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3.7.2. Permeação sob condições passivas para o caso das amostras proveniente do compartimento recetor

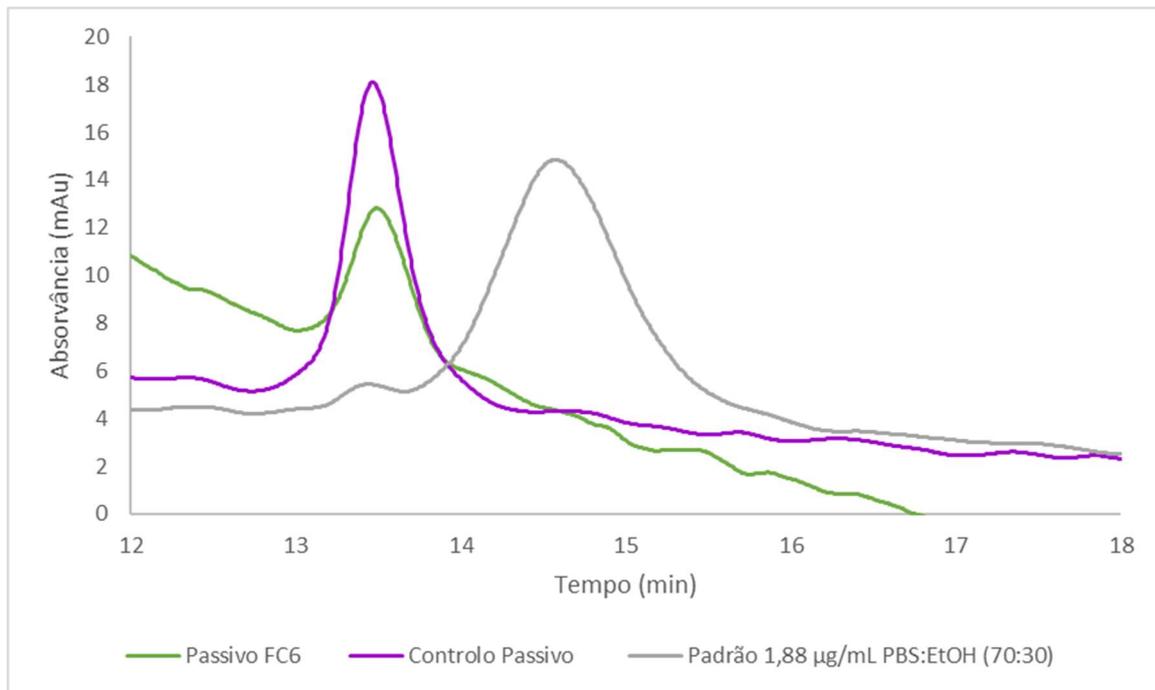


Figura 50. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC9. Nesta Figura encontra-se também PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

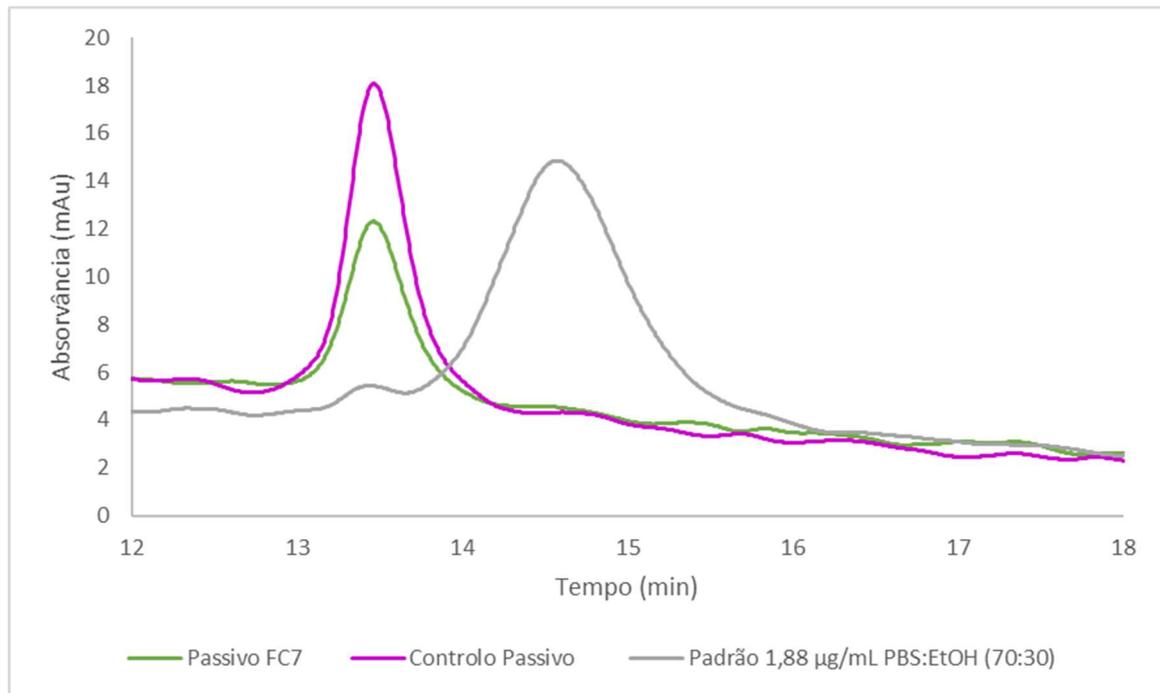


Figura 51. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

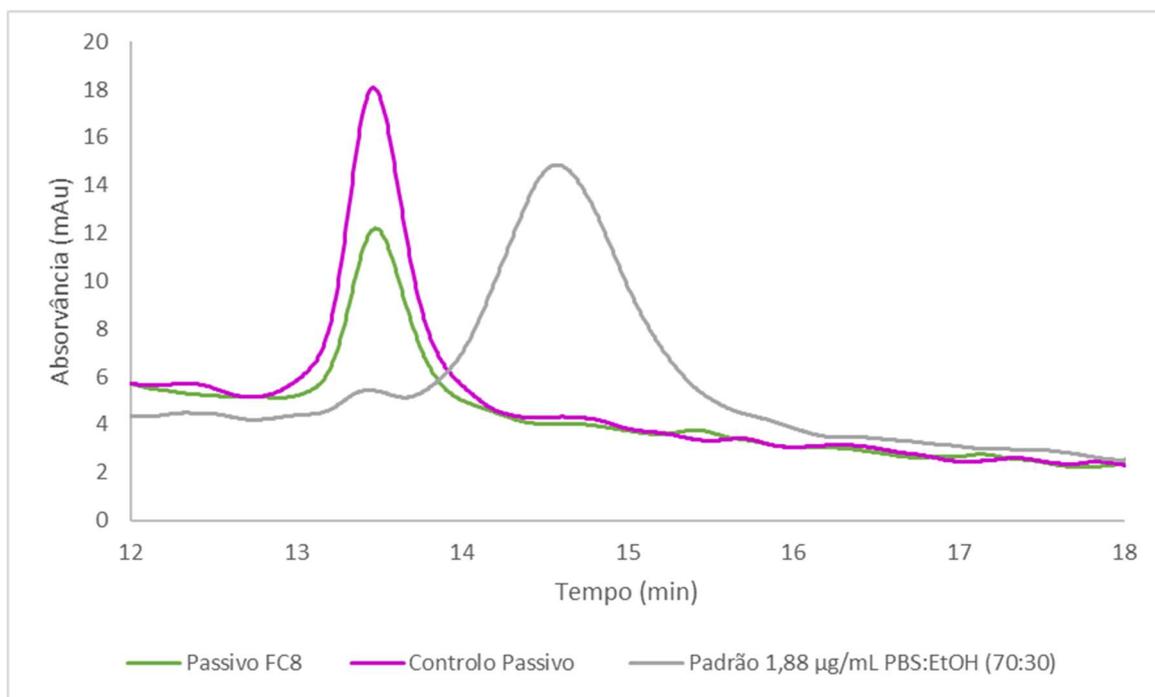


Figura 52. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3.7.3. Permeação sob condições ativas com um laser com fluência de 69 mJ/cm² para o caso das amostras de pele

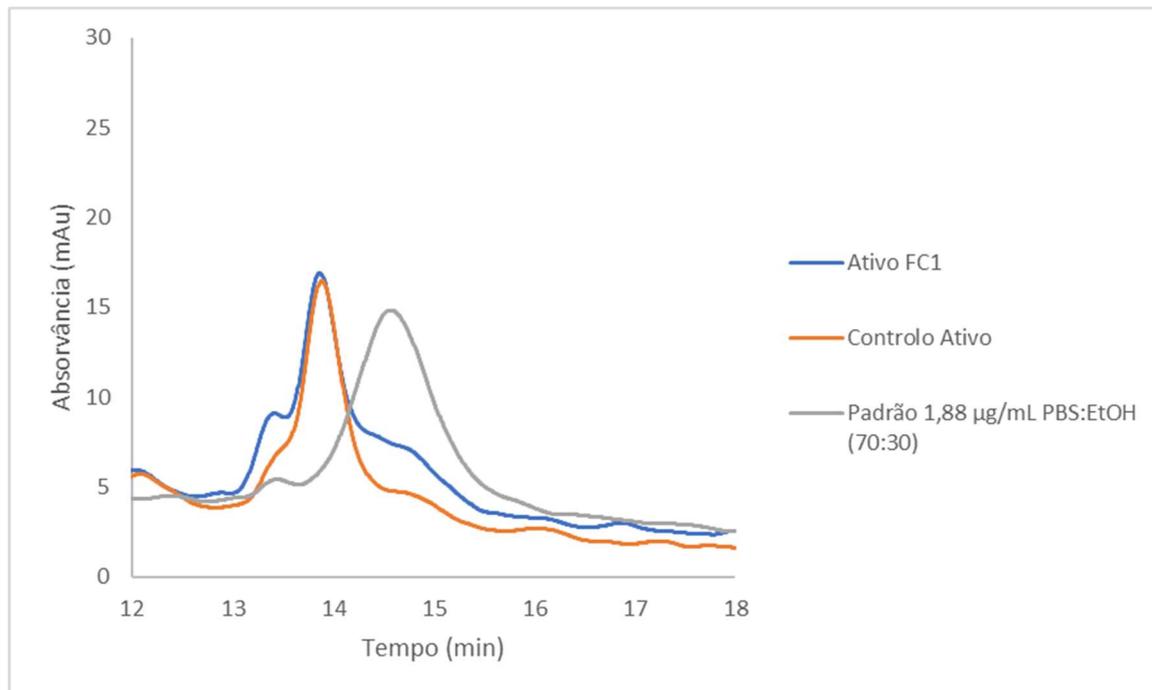


Figura 53. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

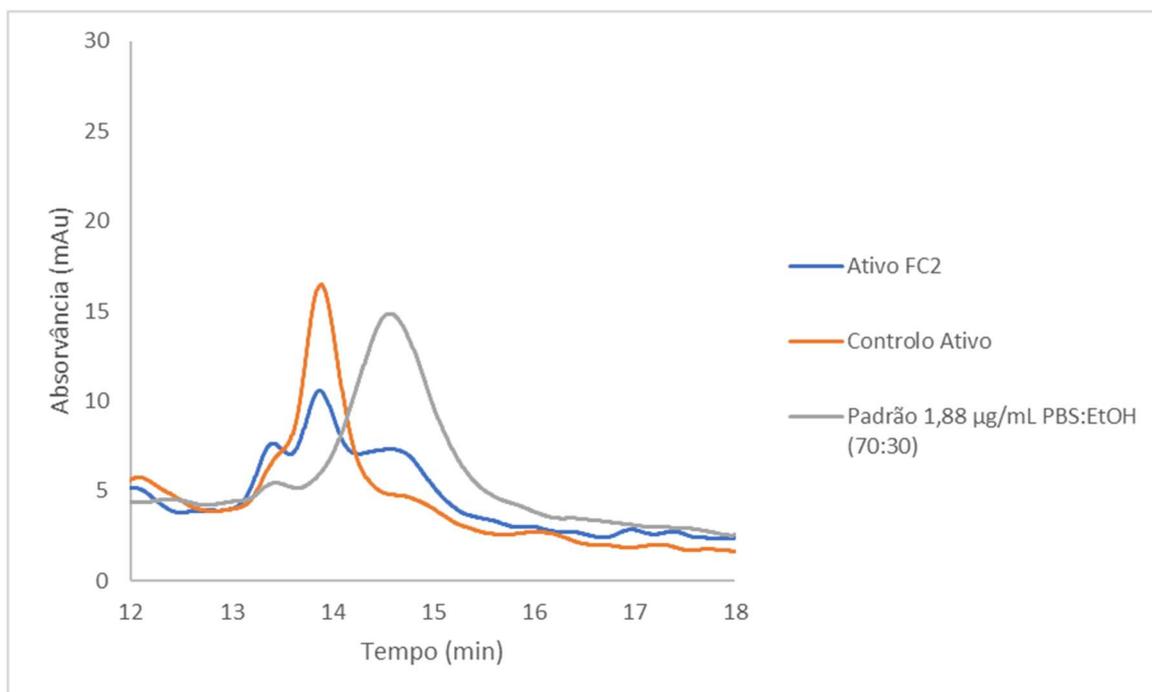


Figura 54. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

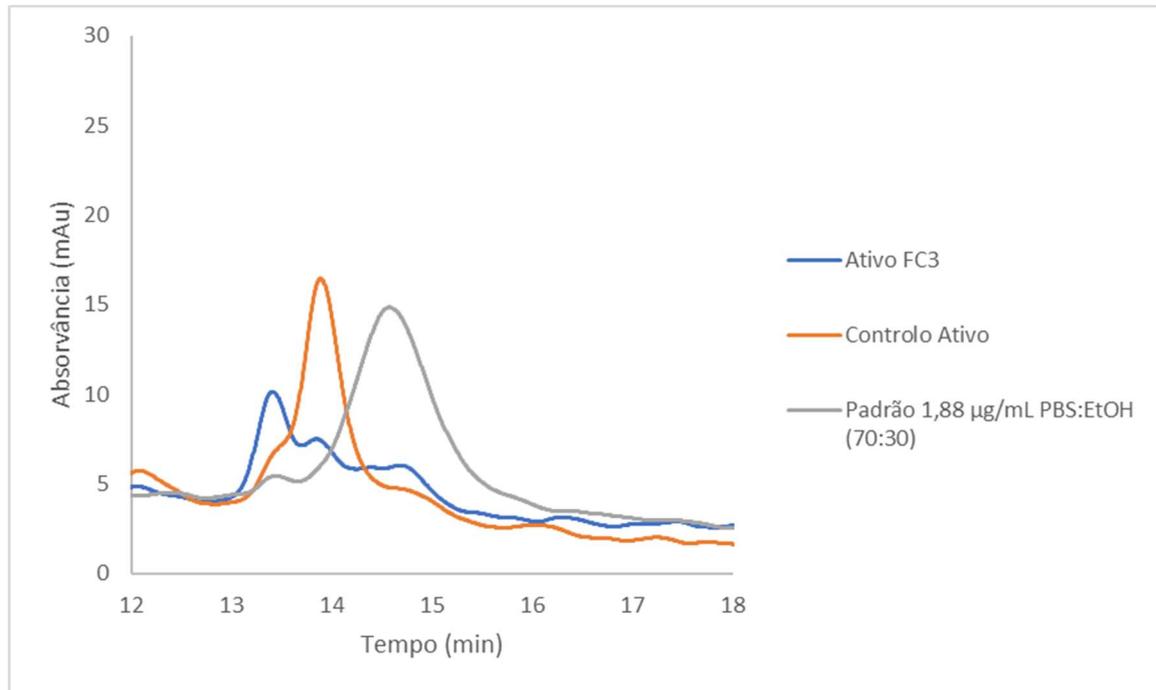


Figura 55. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

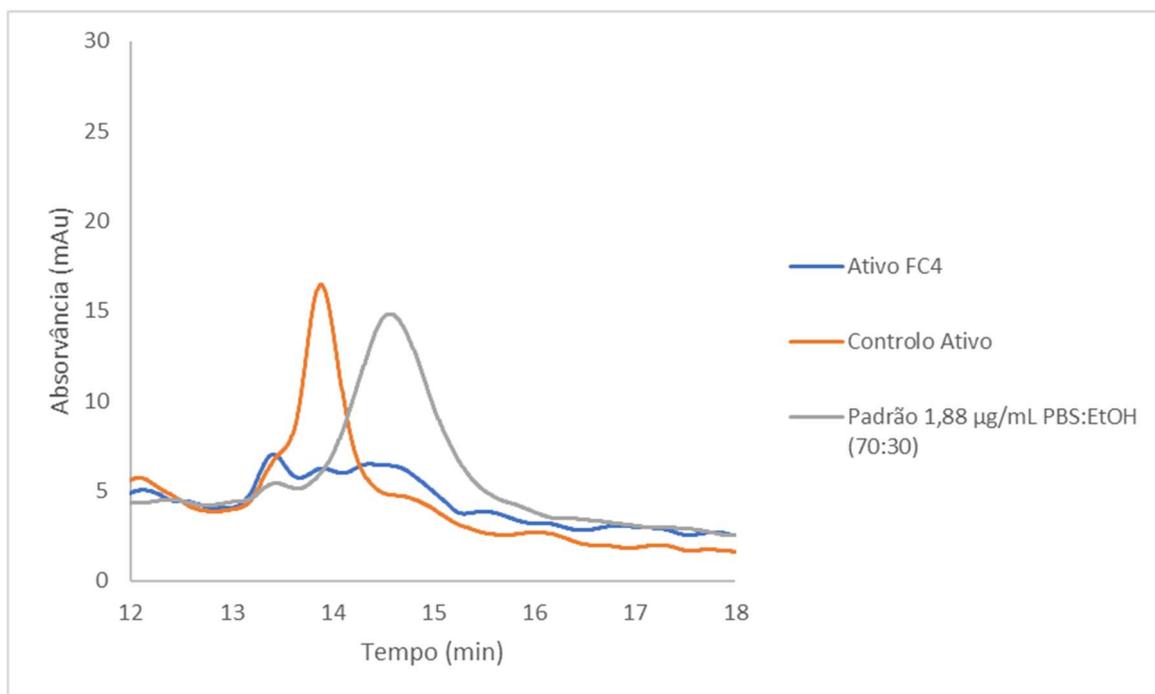


Figura 56. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC4, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3.7.4. Permeação sob condições passivas para o caso das amostras de pele

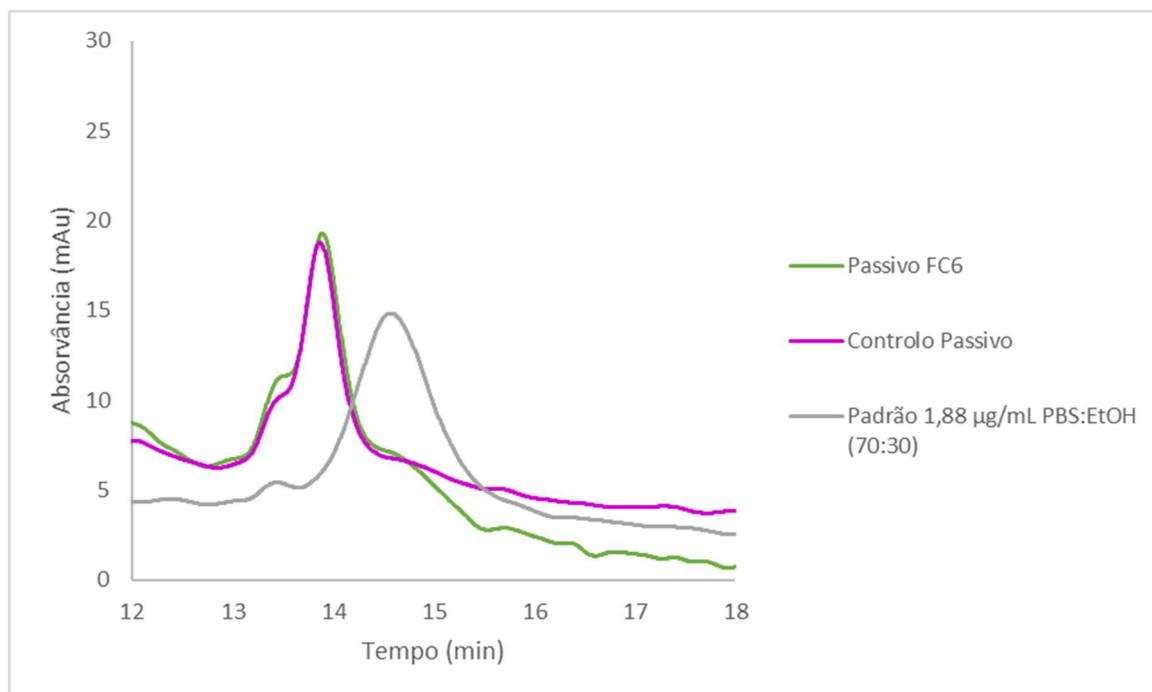


Figura 57. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

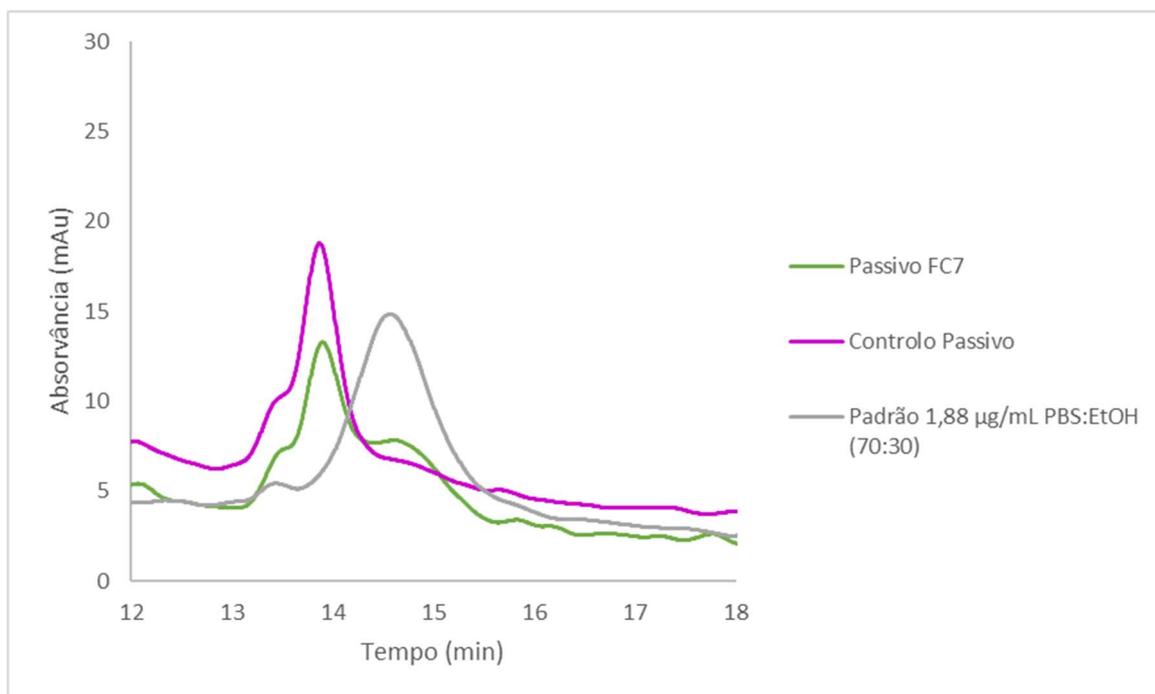


Figura 58. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

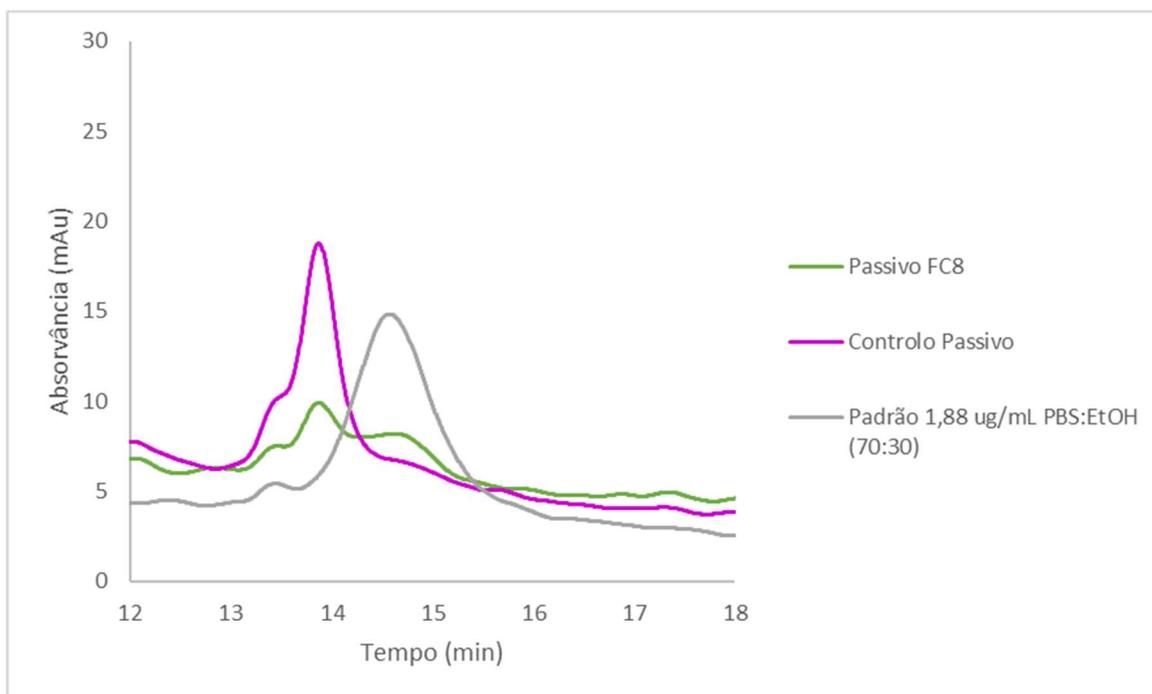


Figura 59. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3.7.5. Permeação sob condições ativas com um laser com fluência de 48 mJ/cm² para o caso das amostras proveniente do compartimento recetor

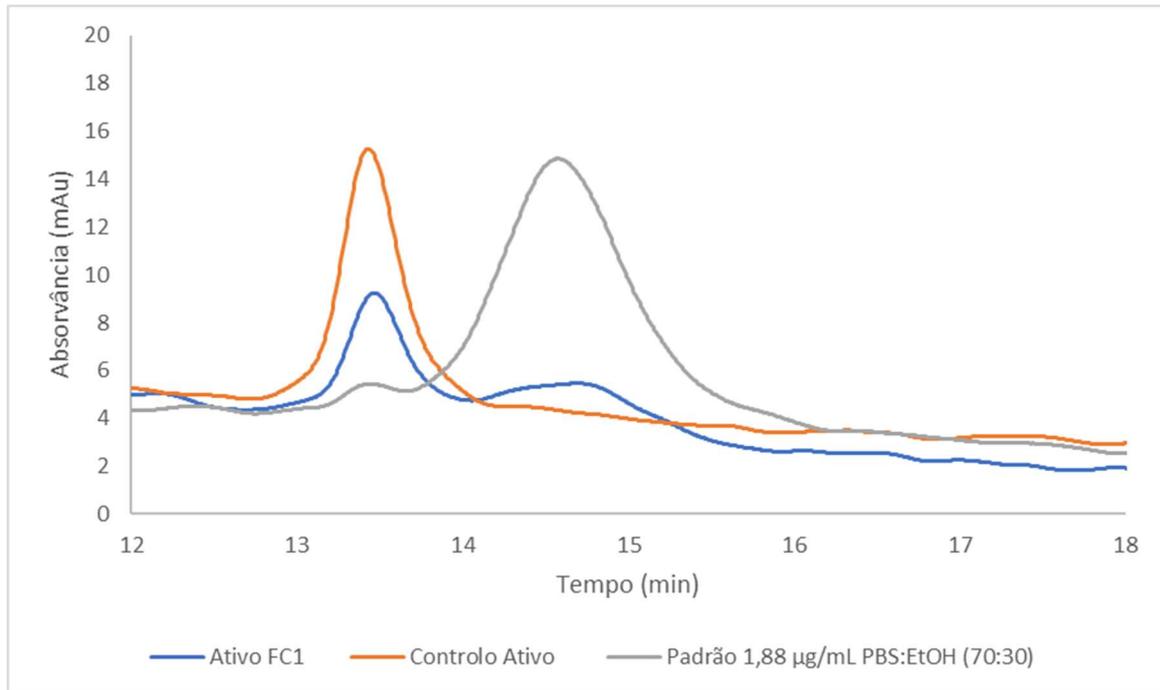


Figura 60. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

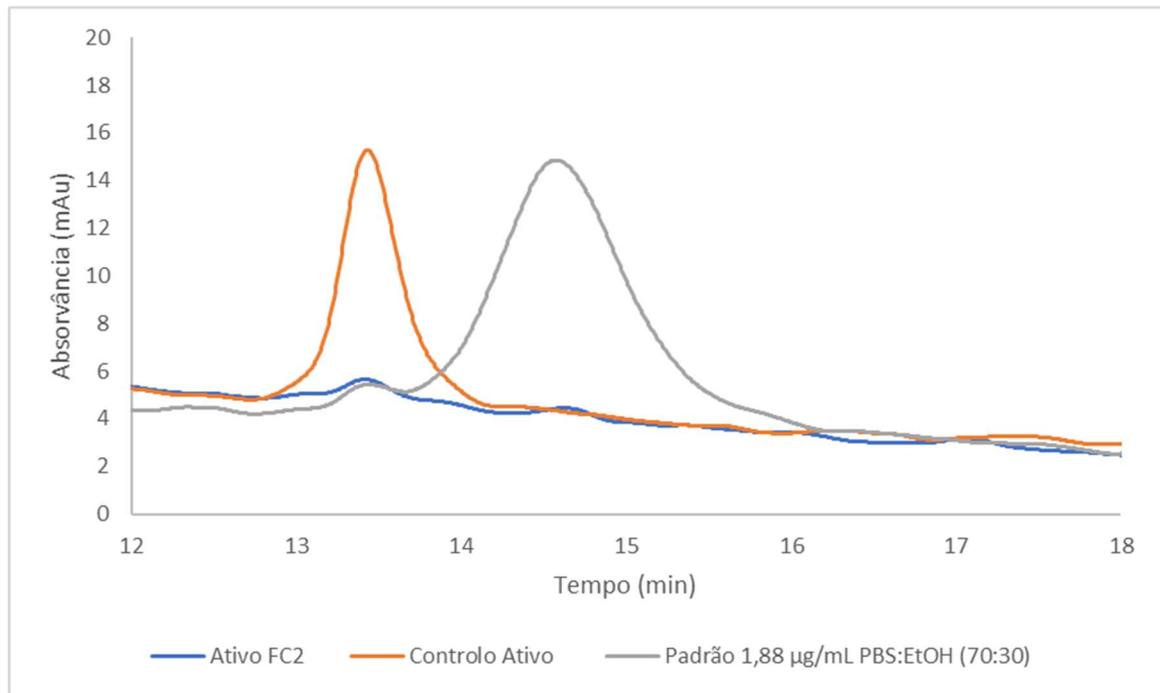


Figura 61. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

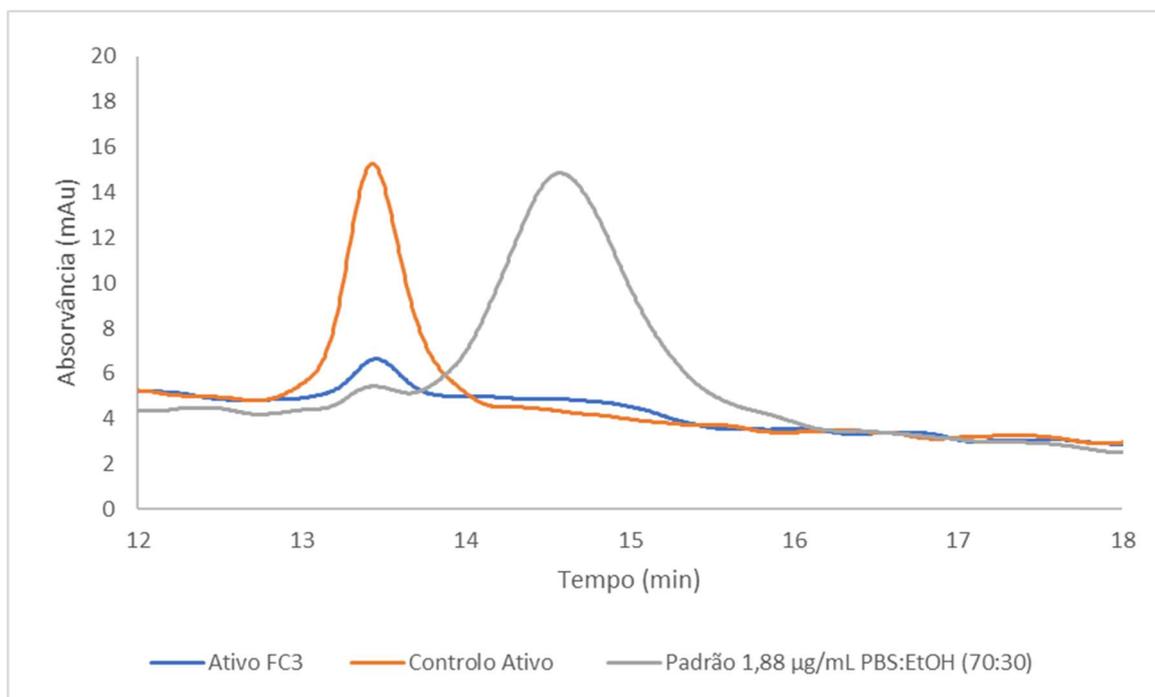


Figura 62. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

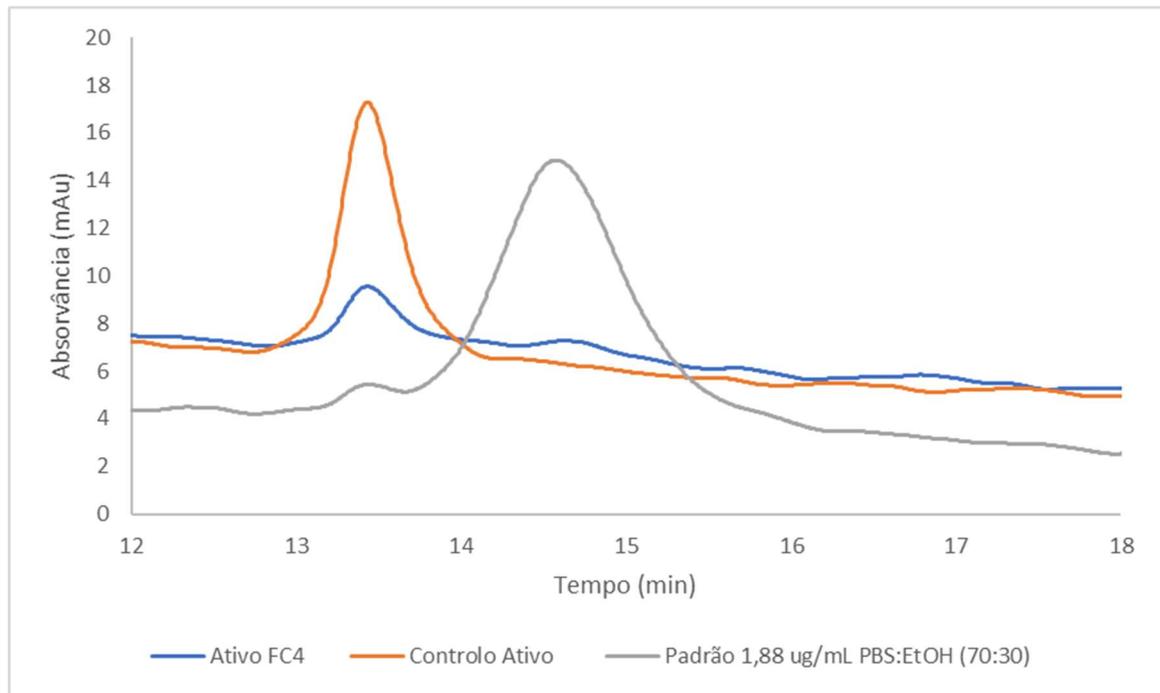


Figura 63. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC4, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 $\mu\text{g/mL}$ em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3.7.6. Permeação sob condições passivas para o caso das amostras proveniente do compartimento recetor

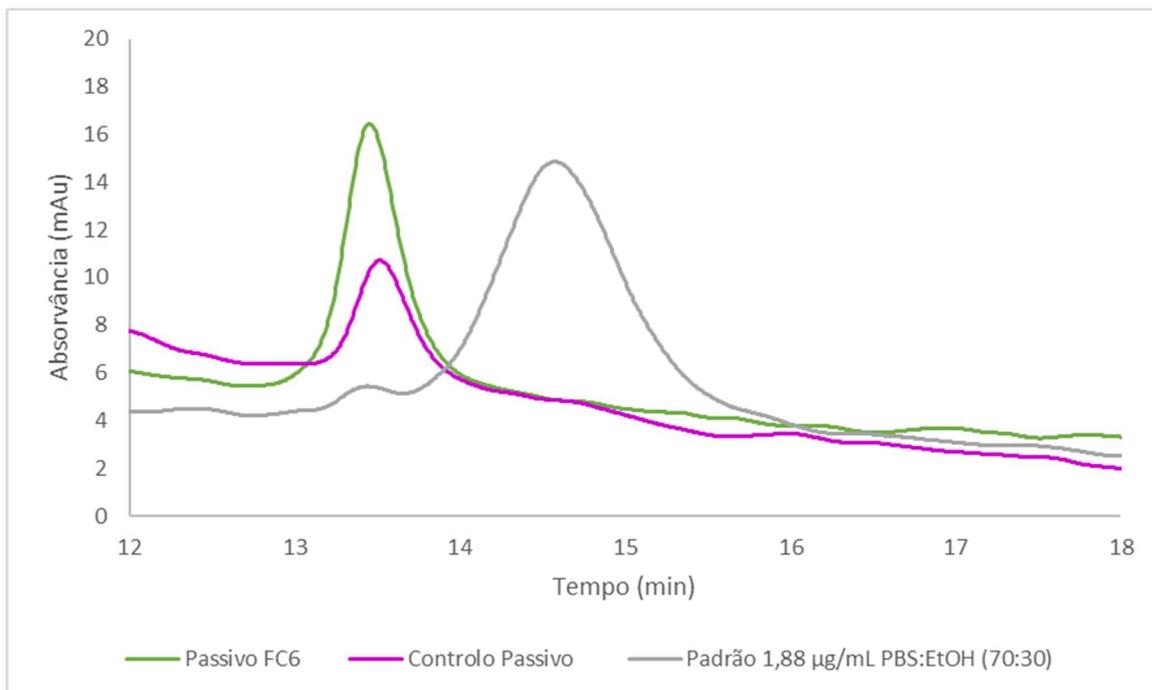


Figura 64. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

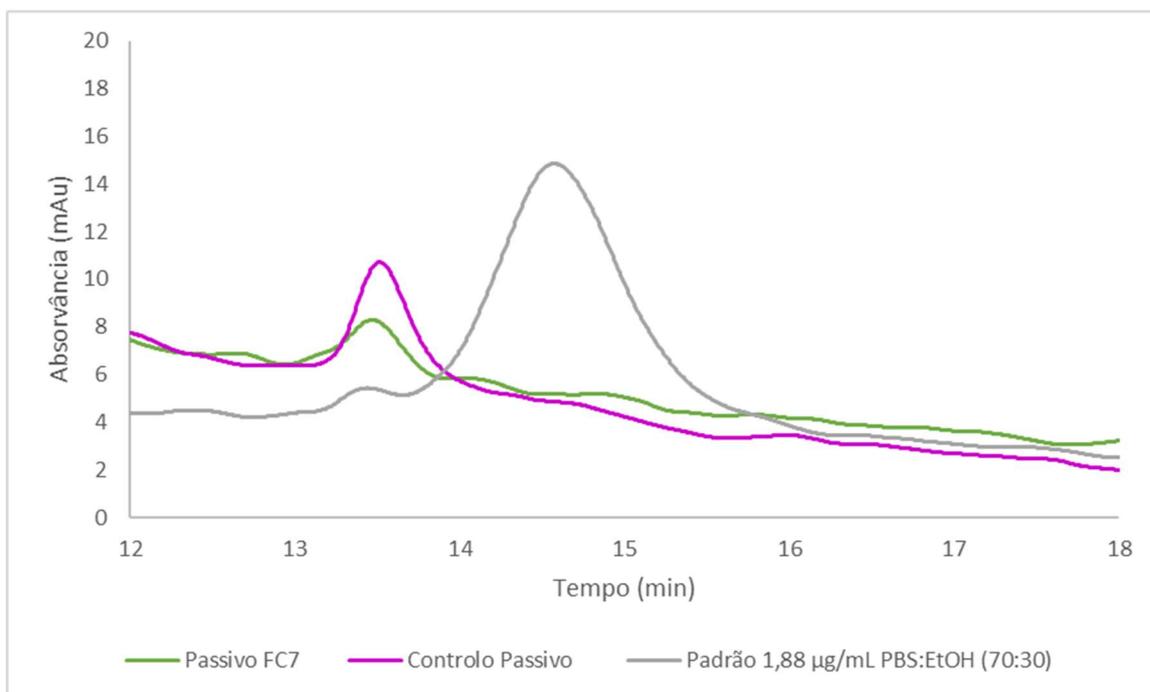


Figura 65. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

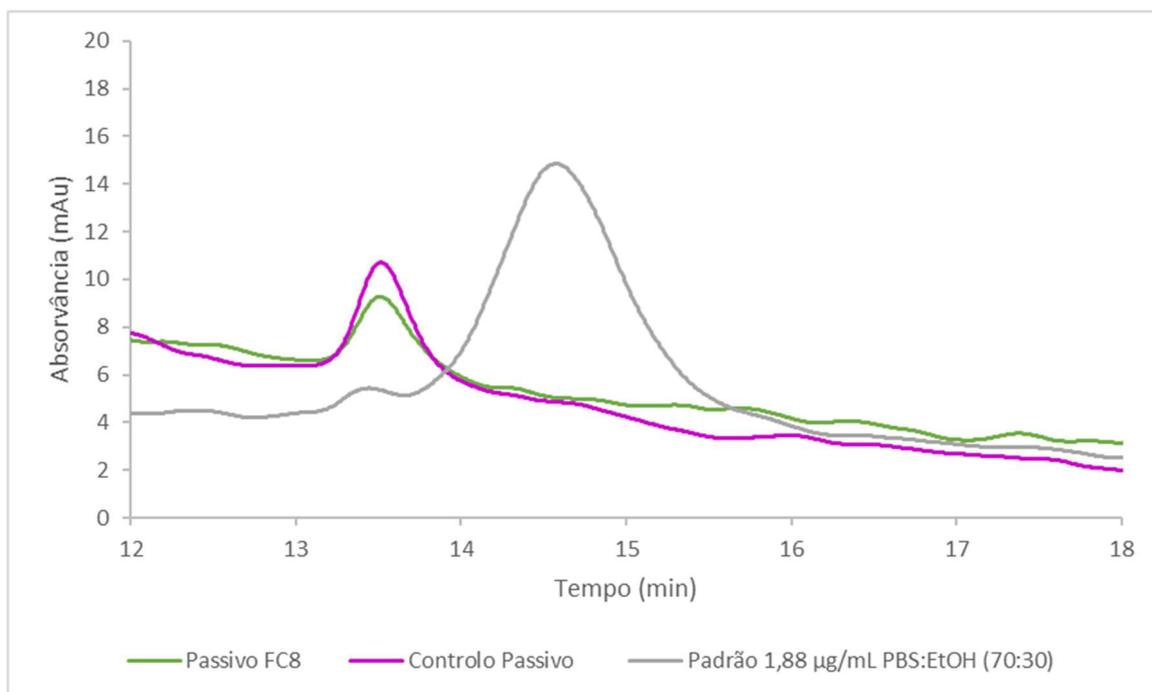


Figura 66. Cromatograma obtido para a amostra retirada às 0,5 h do compartimento recetor da FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (vermelho) que foi retirado às 0,5 h do compartimento recetor da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3.7.7. Permeação sob condições ativas com um laser com fluência de 48 mJ/cm² para o caso das amostras de pele

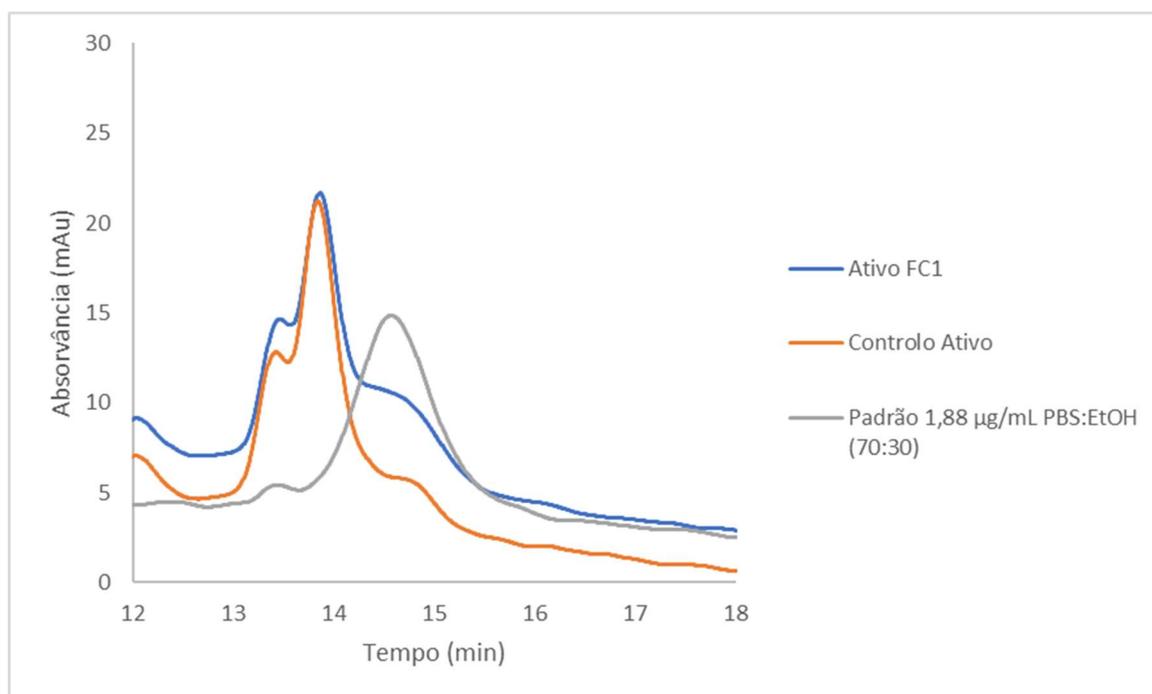


Figura 67. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC1, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

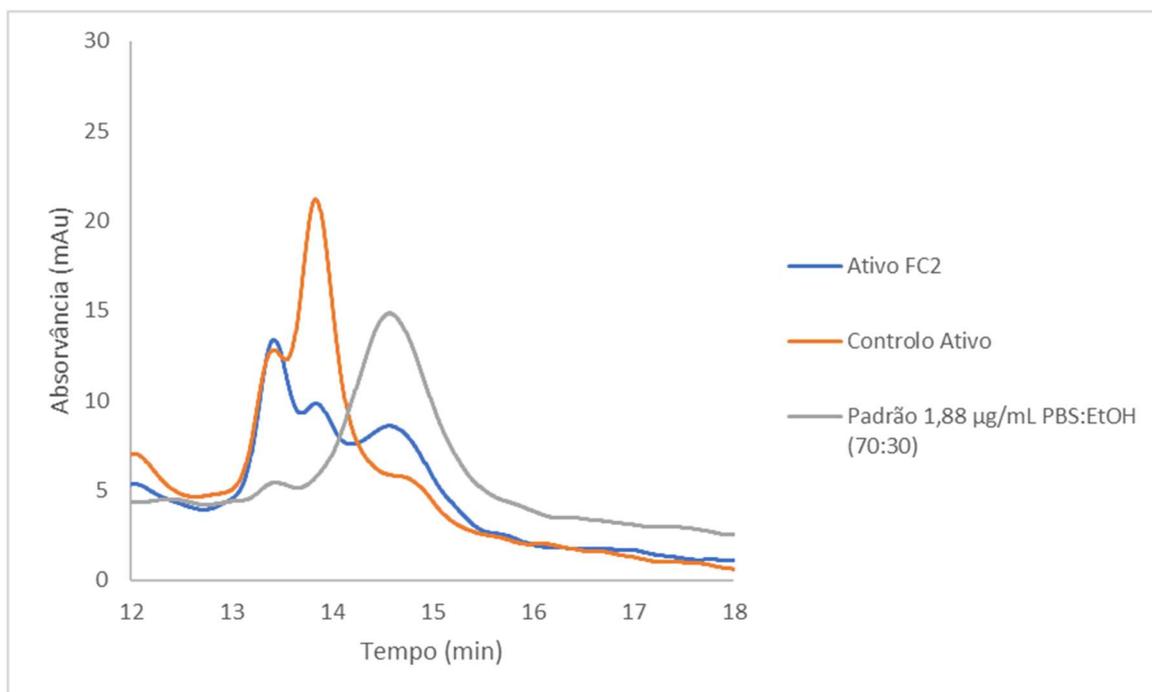


Figura 68. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC2, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

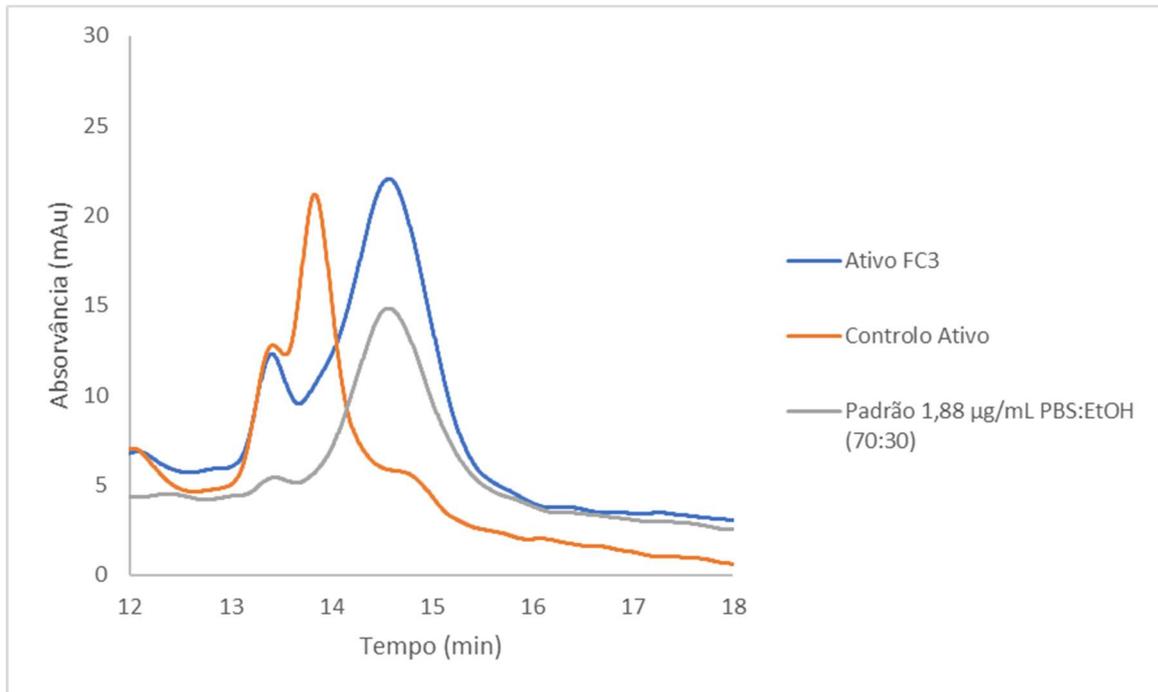


Figura 69. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC3, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

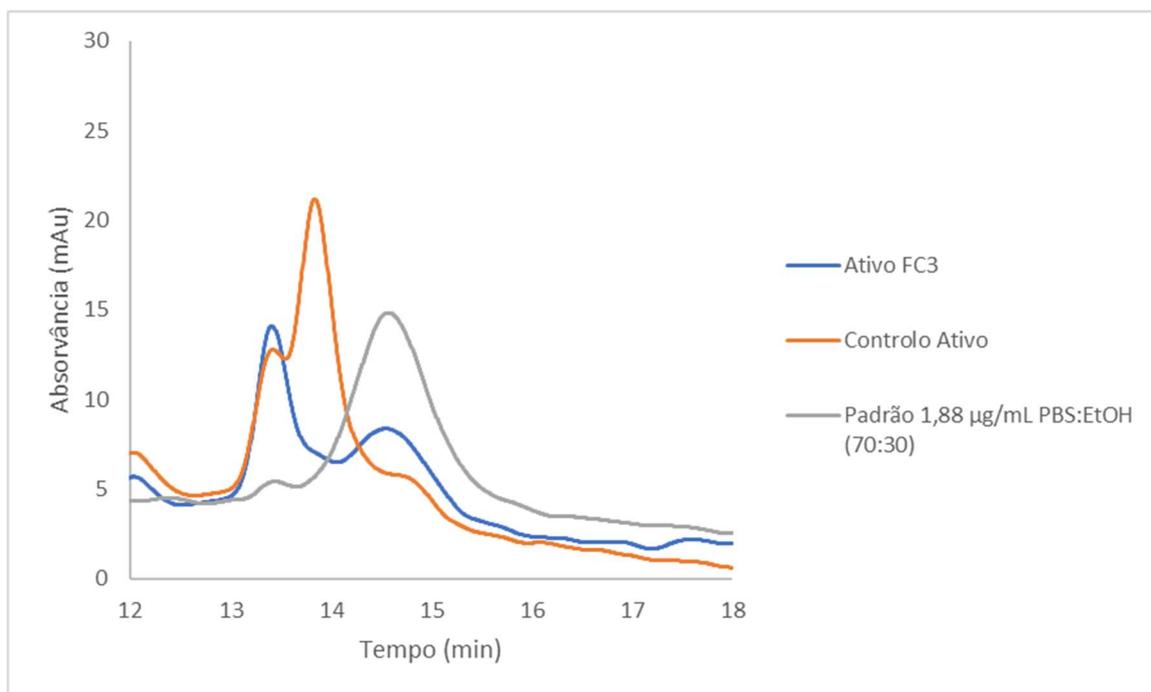


Figura 70. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC4, na qual foi colocada a formulação de CyA (azul), e do respetivo controlo (laranja) que foi retirado da FC5. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

3. Permeação sob condições passivas para o caso das amostras de pele

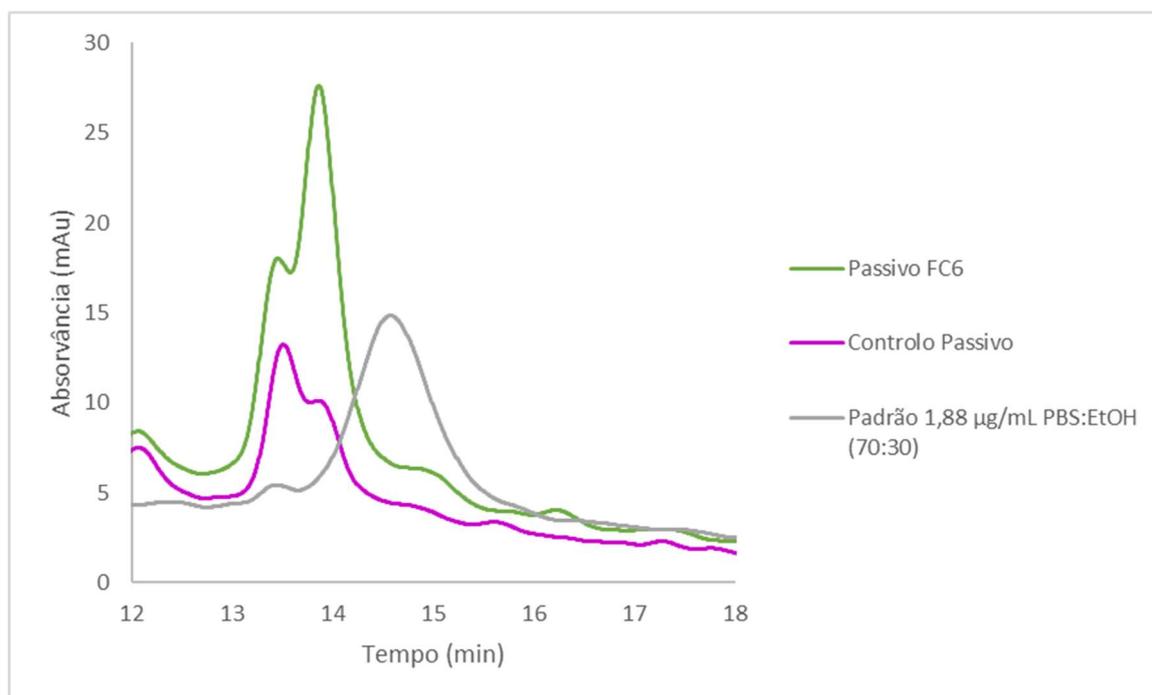


Figura 71. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC6, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

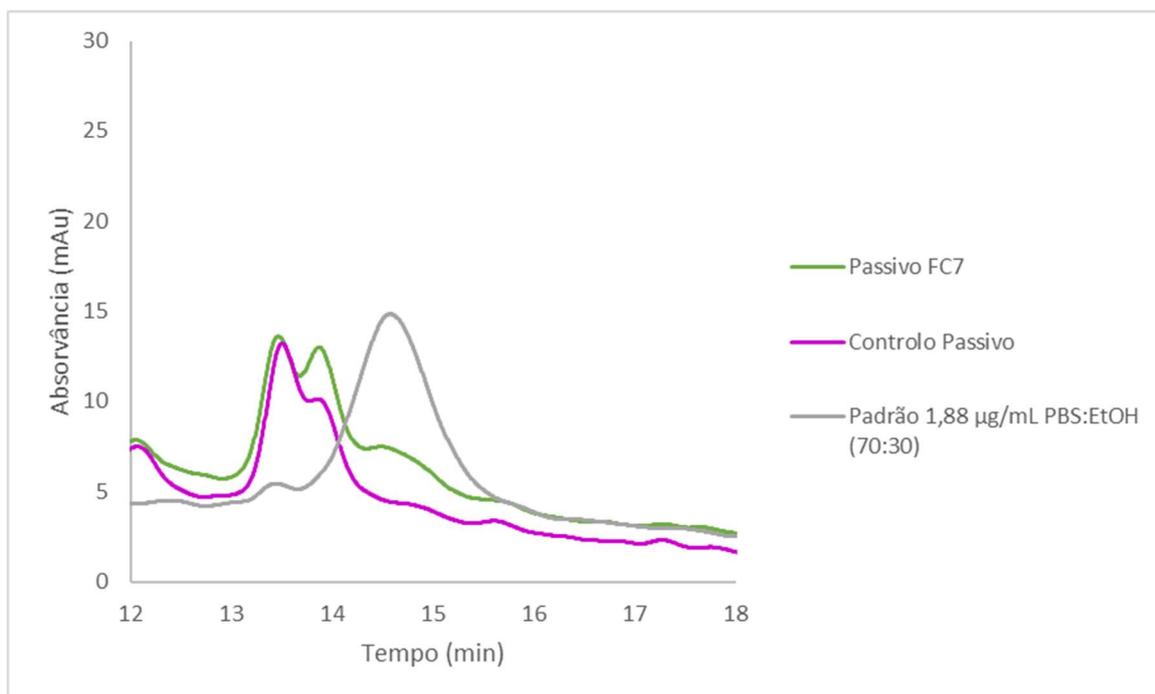


Figura 72. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC7, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

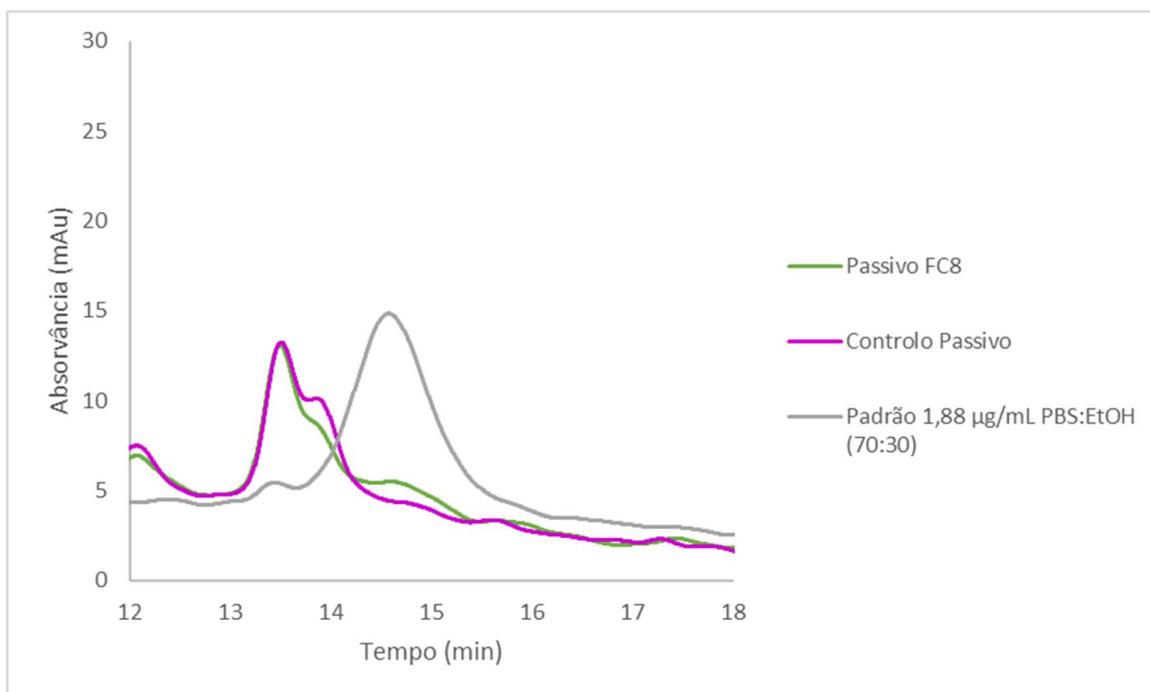


Figura 73. Cromatograma obtido para a amostra de pele retirada da FC8, na qual foi colocada a formulação de CyA (verde), e do respetivo controlo (roxo) que foi retirado da FC9. Nesta Figura encontra-se também representado o cromatograma para uma solução padrão de CyA de concentração 1,88 µg/mL em PBS/EtOH (70/30) (% v/v) (cinzento).

4. Teste de Grubbs

A presença de possíveis outliers foi avaliada com o teste de Grubbs com um intervalo de confiança de 95%. Na Tabela 1 encontram-se apresentados os valores críticos do Teste de Grubbs.

Tabela 1. Valores críticos do teste de Grubbs para um número n de amostras a um nível de significância de 5%.

n	G (0.05)	n	G (0.05)	n	G (0.05)
3	1,154	15	2,548	80	3,306
4	1,481	16	2,586	90	3,348
5	1,715	17	2,62	100	3,384
6	1,887	18	2,652	120	3,445
7	2,02	19	2,681	140	3,495
8	2,127	20	2,708	160	3,537
9	2,215	25	2,822	180	3,574
10	2,29	30	2,909	200	3,606
11	2,355	40	3,036	300	3,724
12	2,412	50	3,128	400	3,803
13	2,462	60	3,2	500	3,863
14	2,507	70	3,258	600	3,911