

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

MARILÚ SWIECH

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA

**PONTA GROSSA
2021**

MARILÚ SWIECH

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, medicamentos e correlatos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jessica Mendes Nadal

PONTA GROSSA

2021

S976 Swiech, Marilú
Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação *in vitro*
de micropartículas poliméricas contendo timomodulina / Marilú Swiech. Ponta
Grossa, 2021.
102 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Farago.

Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Mendes Nadal.

1. Polipeptídeos. 2. Imunomodulador. 3. Micropartículas. 4. Spray-drying. 5.
Sistema de liberação modificada. I. Farago, Paulo Vítor. II. Nadal, Jessica
Mendes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e
Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 27 de maio de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 04/2021 DA MESTRANDA **MARILÚ SWIECH** REALIZADA NO DIA 27 DE MAIO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e sete dias de maio de dois mil e vinte e um, às 14h00min, por videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago e condução da Professora Doutora Jessica Mendes Nadal, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Marilú Swiech, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos, constituídos pelo Professor Doutor Paulo Vitor Farago (UEPG/PR), Professora Doutora Jessica Mendes Nadal (UEPG/PR), e demais Doutores (membros titulares): Professora Doutora Patrícia Mathias Döll-Boscardin (UEPG/PR) e Professora Doutora Yasmine Mendes Pupo (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA”**.

Encerrada a defesa, a banca considerou a dissertação APROVADA, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente Ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não .

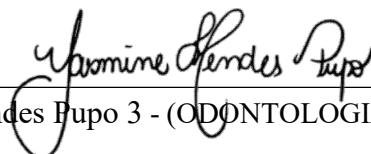
Novo título: _____



Paulo Vitor Farago 1 - (DEFAR-UEPG) – Presidente/Orientador



Patrícia Mathias Döll-Boscardin 2 - (DEFAR-UEPG) – Titular



Yasmine Mendes Pupo 3 - (ODONTOLOGIA/UFPR) – Titular

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador de tudo, por me conduzir ao encontro desta pós-graduação e me conceder forças para realizá-la.

Aos meus pais, Aloísio e Eleni, pelo amor e apoio que sempre me deram ao longo de toda a minha vida. Nunca mediram esforços para me ajudar!

Aos meus irmãos, Gerson, Marcelo, Eliton, Nilcelena, Rosa e Denise, que com uma palavra, conversa ou aconselhamento demonstravam interesse e apreço por este trabalho.

À todos os meus sobrinhos e sobrinhas, que me contagiam com suas jovialidades.

À Prof^a. Dr^a. Juliane Nadal Dias Swiech, instrumento de Deus para que eu soubesse do edital de seleção deste mestrado.

Ao meu esposo, José Carlos de Assis, que com amor, carinho, paciência e companheirismo sempre me escutou, me aconselhou, me apoiou e me ajudou, da melhor forma possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade, pela orientação e ensinamentos compartilhados.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Jessica Mendes Nadal, pela disponibilidade, correções do trabalho e incentivo.

Às professoras Dr^a. Patrícia Mathias Döll Boscardin e Dr^a. Yasmine Mendes Pupo, por aceitarem o convite de compor a banca, pelo tempo destinado à correção do trabalho e todas as contribuições realizadas.

A todos os professores que ministraram as aulas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos.

À Prof^a Dr^a Traudi Klein, pelo conhecimento compartilhado, orientações, aconselhamentos e empréstimo de equipamentos. São anjos como você que fazem a diferença nesta vida!

À química, laboratorista, colega de classe e agora Mestre, Luciane Mendes Monteiro, por todo material de laboratório emprestado ou cedido, foi fundamental para que minhas análises acontecessem. Pelas conversas, aconselhamentos e apoio. Deus lhe devolva tudo em dobro o que você fez por mim. Muito obrigada Lu!

Aos colegas de pós-graduação, que ao longo da trajetória tornaram-se amigos, Ana Beatriz, Mariana, Felipe, Patrícia, Joel e Mackelly, sempre me ajudaram de alguma forma, fosse com uma conversa ou com os experimentos.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/UNICENTRO por oportunizar o mestrado, de modo especial a coordenadora Prof^a. Dr^a. Juliana B. Olivato, pela disponibilidade de sempre.

À CAPES pela oportunidade da bolsa de mestrado.

Ao CLABMU, CLABMU-SEBISA e Recursos Hídricos, que por meio de sua equipe de técnicos possibilitaram a realização das análises.

Finalmente, agradeço à todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Timomodulina (TMD) é um extrato purificado do timo de vitelo constituído por uma mistura de polipeptídeos obtida pela hidrólise parcial ácida da glândula. Possui ação imunomoduladora, principalmente de estimulação das funções das células T, B e NK, promovendo a melhora da resposta imunológica de pacientes em diversas doenças como, câncer, AIDS e alergias, sendo considerada uma importante aliada no combate às infecções. O tratamento com o TMD geralmente requer sua administração na forma injetável e por um tempo de uso prolongado acarretando em baixa adesão do paciente ao tratamento, além de serem restritas as formas farmacêuticas disponíveis como terapêutica medicamentosa. Assim sendo, sistemas de liberação modificada podem ser desenvolvidos para criar vias de administração alternativas acompanhadas de redução no tempo de tratamento mantendo a eficácia terapêutica. Diante disto, este trabalho objetiva desenvolver e avaliar micropartículas poliméricas contendo TMD, empregando os polímeros hidroxipropilmetilcelulose e poloxâmero 188, pelo método *spray-drying*, nas concentrações de 5, 10 e 20% de fármaco, a fim de obter um sistema mucoadesivo que oportunize uma via de administração alternativa a parenteral. As micropartículas poliméricas foram caracterizadas por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. As micropartículas poliméricas contendo TMD foram obtidas com êxito pelo método escolhido e apresentaram formato esférico e/ou distorcido, de superfície lisa, rugosa ou côncava, de tamanho médio de partícula de aproximadamente 10 µm. O método analítico eleito para a determinação de TMD nas micropartículas foi seletivo e linear. As formulações apresentaram eficiência de encapsulação entre a 84,4 e 98,6%. A difração de raios-X confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se prioritariamente em dispersão molecular na matriz das micropartículas. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier asseguraram que o processo de microencapsulação não resultou em ligações químicas entre o TMD e os polímeros. A análise térmica evidenciou a proteção que o sistema polimérico conferiu ao extrato de polipeptídeos, diminuindo significativamente os eventos de degradação térmica do fármaco. A liberação *in vitro* das micropartículas das formulações contendo 10 e 20% de TMD (MT10 e MT20), em tampão PBS pH 6,8, revelou um perfil de liberação lento, gradual e progressivo com eficiências de dissolução semelhantes (7,75 e 7,79%) indicando uma liberação prolongada do fármaco. Portanto, os resultados fornecem uma base experimental para considerar as micropartículas contendo TMD preparadas por *spray-drying* como uma estratégia viável para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para a liberação modificada do imunomodulador TMD para aplicação em terapias biológicas.

Palavras-chave: Polipeptídeos. Imunomodulador. Micropartículas. HPMC. Poloxâmero 188. *Spray-drying*. Sistema de liberação modificada. Terapias biológicas. Sistema imunológico.

ABSTRACT

Thymomodulin (TMD) is a purified extract of the calf thymus consisting of a mixture of polypeptides obtained by the partial acid hydrolysis of the gland. It has an immunomodulatory action, mainly in stimulating the functions of T, B and NK cells, promoting the improvement of the immune response of patients in various diseases, cancer, AIDS and allergies, being considered an important ally in combating herbs. Treatment with TMD generally requires its administration in an injectable form and for a prolonged period of use, resulting in low patient compliance with treatment, in addition to being restricted as pharmaceutical forms available as drug therapy. Therefore, modified-release systems can be developed to create routes of administration accompanied by a reduction in treatment time while maintaining effective efficacy. In view of this, this work aims to develop and evaluate polymeric microparticles containing TMD, using the hydroxypropylmethylcellulose polymers and poloxamer 188, by spray-drying method, in the due amounts of 5, 10 and 20% of drug, in order to obtain a mucoadhesive system that provides opportunities an alternative route of administration to parenteral. The polymeric microparticles were characterized by means of morphological, spectroscopic and thermal studies. The polymeric microparticles containing TMD were successfully corrected by the chosen method and spherical and / or distorted, with a smooth, rough or concave surface, with an average particle size of approximately 10 μm . The analytical method chosen for the determination of TMD in microparticles was selective and linear. As encapsulation efficiency formulations between 84.4 and 98.6%. X-ray diffraction confirms that the encapsulation method was efficient and the drug is primarily in molecular dispersion in the microparticle matrix. Fourier transform infrared spectra ensured that the microencapsulation process did not result in links between the TMD and the polymers. A thermal analysis shows the protection that the polymeric system gave to the polypeptide extract, reducing the events of thermal degradation of the drug. The *in vitro* release of the microparticles of the two formulations with the highest drug concentration (MT10 and MT20), at pH 6.8, revealed a slow, gradual and progressive release profile with similar dissolution efficiencies (7.75 and 7.79%) indicating a prolonged release of the drug. Therefore, the results provide an experimental basis for considering microparticles containing TMD prepared by spray-drying as a viable strategy for the development of new pharmaceutical forms for a modified release of the TMD immunomodulator for application in biological therapies.

Keywords: Polypeptides. Immunomodulator. Microparticles. HPMC. Poloxamer 188. Spray-drying. Modified release system. Biological therapies. Immune system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da hematopoiese em mamíferos	24
FIGURA 2 - Exemplos de algumas interleucinas	27
FIGURA 3 - Célula dendrítica apresentando antígeno ao linfócito T imaturo dentro de um linfonodo.....	30
FIGURA 4 - Formas de micropartículas poliméricas: 1) Microcápsula (núcleo sólido); 2) microcápsula (núcleo não-sólido); 3) microcápsula (domínios micro/nano sólidos); 4) microcápsula (domínios micro/nano não-sólidos; 5) Microesfera (mistura de matriz/agente encapsulado)	44
FIGURA 5 - Estrutura química do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	45
FIGURA 6 - Estrutura química de copolímero em tribloco polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (POE-POP-POE)	47
FIGURA 7 - Representação esquemática da formação das micropartículas com aumento da sua área superficial pela atomização e secagem das gotas a partir de um material fluido	49
FIGURA 8 - Fluxograma das etapas de pesquisa	53
FIGURA 9 - Esquema da reação química entre os reagentes e as ligações peptídicas para o ensaio de proteína pelo Método de Lowry	56
FIGURA 10 - Aspecto visual macroscópico das micropartículas poliméricas obtidas por <i>spray-drying</i> MT0(A) e MT20(B)	62
FIGURA 11 - Varreduras comparativas de soluções a 10 mg.mL ⁻¹ de micropartículas ensaiadas pelo método de Lowry, MT0 (A) com pico de absorção em 299 nm e MT5 (B) em 299 e 750 nm.....	67
FIGURA 12 - Representação gráfica da curva analítica média para a determinação de TMD, obtida por espectrofotometria no UV-Vis ($\lambda = 750$ nm)	67
FIGURA 13 – Eletromicrografias revelando aspecto amorfo e irregular dos insumos puros e da MF, em aumento de 200 a 2.000 x. TMD (A), HPMC (B), poloxâmero 188 (C) e MF(D).....	70
FIGURA 14 – Eletromicrografias em aumento de 5.000 x revelando morfologias esférica e/ou côncava de superfície rugosa e/ou irregular das micropartículas poliméricas. MT0 (A), MT5 (B), MT10 (C) e MT20 (D)	71

FIGURA 15 - Distribuição de frequência do tamanho das micropartículas poliméricas das formulações MT0, MT5, MT10 e MT20 indicando a predominância das áreas em até 10 μm	73
FIGURA 16 – Difratoformas indicando estado amorfo para TMD, semicristalino para HPMC e cristalino para poloxâmero 188.....	74
FIGURA 17 - Difratoforma comparativo entre os insumos puros, MF e micropartículas poliméricas (MT)	75
FIGURA 18 - Espectro de FTIR de timomodulina, com bandas sugestivas a ligações químicas dos principais grupos funcionais de peptídeos	76
FIGURA 19 - Espectro de FTIR do HPMC com bandas características dos principais grupos funcionais	77
FIGURA 20 - Espectro de FTIR do poloxâmero 188 com bandas características dos principais grupos funcionais	77
FIGURA 21 - Espectro FTIR comparativo entre TMD, polímeros, mistura física e as micropartículas poliméricas (MT), destacando os espectros das formulações contendo TMD (MT5, MT10 e MT20) que apresentaram banda em 1654 cm^{-1} , não ocorrendo na MT0, indicando a presença do fármaco e sugerindo que não houve ligações químicas entre os componentes	78
FIGURA 22 - Curvas de TGA de TMD e polímeros (HPMC e poloxâmero 188) indicando as degradações térmicas destes componentes isolados.....	79
FIGURA 23 - Termogramas obtidos de TGA e DTG indicando cinco degradações térmicas para TMD, duas para HPMC e uma para poloxâmero 188.....	80
FIGURA 24 - Curvas de TGA apontando diminuição das degradações térmicas de TMD contida nas formulações de micropartículas poliméricas (MT5, MT10, MT20) quando comparadas a mistura física e a MT0	81
FIGURA 25 - Termogramas obtidos de TGA e DTG da mistura física (MF) e das micropartículas poliméricas (MT) demonstrando diminuição dos eventos térmicos de TMD na MT5, MT10 e MT20 quando comparados a MF e a MT0	82
FIGURA 26 - Curvas de DSC de TMD, HPMC, poloxâmero 188, MF e micropartículas poliméricas (MT0, MT5, MT10 e MT20)	83
FIGURA 27 - Perfis de liberação do TMD das micropartículas MT10 e MT20 em meio de dissolução tampão fosfato (pH: 6,8)	85

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Fatores tímicos isolados e caracterizados de tecido do timo	37
QUADRO 2 - Composição aminoacídica de TMD.....	39
QUADRO 3 – Relação de estudos clínicos com TMD como imunomodulador, entre os anos de 1980 e 2020, destacando o tempo de tratamento prolongado	42
QUADRO 4 - Exemplos de produtos farmacêuticos baseados em peptídeos carreados por sistema polimérico.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo timomodulina (MT5, MT10 e MT20) ou não (MT0)	54
TABELA 2 - Preparo das amostras a partir da solução-mãe 1 mg.mL ⁻¹ de TMD para a construção da curva de calibração.....	57
TABELA 3 - Valores de pH das soluções poliméricas contendo (MT5, MT10 e MT20) ou não (MT0) timomodulina	62
TABELA 4 - Rendimento de pó das micropartículas poliméricas contendo TMD obtidas pelo método <i>spray drying</i>	65
TABELA 5 - Concentração de TMD (%) incorporado nas micropartículas compostas por HPMC e poloxâmero 188, e eficiência de encapsulação (EE %).	68
TABELA 6 - Valores obtidos de tamanho médio para as micropartículas poliméricas contendo (MT5, MT10 e MT20) ou não TMD (MT0).....	72
TABELA 7 - Dados do perfil de liberação e eficiência de dissolução das MT10 e MT20	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ags	Antígenos
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AIDS	<i>Acquired Immuno deficiency Syndrome</i>
Asp	Aspartato (Ácido aspártico)
Arg	Arginina
Ala	Alanina
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
Cys	Cisteína
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DP	desvio padrão
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DCB	Denominação Comum Brasileira
EE	Eficiência de encapsulação
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
FTS	Fator Sérico Tímico
FTS-Zn	Fator Sérico Tímico - Zinco
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
Gly	Glicina
Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HIV	<i>Human immuno deficiency virus</i>
HLA	<i>Complex human leucocyte antigen</i>
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IRRs	infecções respiratórias recorrentes
IATR	infecção aguda do trato respiratório
Ig	Imunoglobulina
IL	<i>Interleukin</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Lys	Lisina
Leu	Leucina
LT	Linfócitos T
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

Met	Metionina
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão por Efeito de Campo
MHC	<i>Major histocompatibility</i>
MHC-I	<i>Major histocompatibility</i> de classe I
MHC-II	<i>Major histocompatibility</i> de classe II
MT	Micropartículas preparadas com HPMC e poloxâmero 188 contendo ou não timomodulina
MF	Mistura física
NKs	Células <i>natural killer</i>
NPs	Nanopartículas
pH	Potencial hidrogeniônico
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
PHBHHx	Poli (hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) contendo TP5
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RRPs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
Ser	Serina
SEM-FEG	<i>Scanning Electron Microscope with emission of electrons by a Field Emission Gun</i>
TMD	Timomodulina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
TF5	Timosina fração-5
Thr	Treonina
Tp	Timopoiatina
TP-1	Timoestimulina
TP5	Timopentina
Ta	Protimosina α
TFX	<i>Thymic X Factor</i>
TCR	Receptor de célula T
Treg	Célula T reguladora
Th1	<i>T helper 1 cell</i>
Th2	<i>T helper 2 cell</i>

Th17	<i>T helper 17 cell</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TG	<i>Thermogravimetric analysis</i>
TSLP	Linfopoiatina estromal tímica
UV-Vis	Ultravioleta e no visível
Val	Valina
XRD	<i>X Ray Diffraction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	FISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO	21
3.1.1	Imunidade Inata	28
3.1.2	Imunidade Adaptativa	33
3.1.3	Imunopatologias	35
3.2	IMUNOTERAPIAS	35
3.2.1	Imunomoduladores	36
3.2.1.1	Extratos tímicos	37
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DE TIMOMODULINA	38
3.4	MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	43
3.4.1	Polímeros	45
3.4.1.1	Hidroxipropilmetilcelulose	45
3.4.1.2	Polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno.....	47
3.4.2	Métodos de Obtenção de Micropartículas	48
3.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO TIMOMODULINA.....	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	EQUIPAMENTOS	51
4.2	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES	52
4.2.1	Fármaco	52
4.2.2	Polímeros	52
4.2.3	Demais Reagentes	52
4.2.4	Filtros	53
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	53

4.4	OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA	54
4.4.1	Determinação do Rendimento do Pó.....	55
4.4.2	Mistura Física	55
4.5	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE TIMOMODULINA INCORPORADA NAS FORMULAÇÕES PELO MÉTODO DE LOWRY	55
4.5.1	Equipamentos e Condições Espectrofotométricas	55
4.5.2	Método Analítico Colorimétrico.....	56
4.5.3	Quantificação de TMD nas Formulações.....	57
4.5.3.1	Avaliação da eficiência de encapsulação	58
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA.....	58
4.6.1	Análises Morfológicas e de Superfície.....	58
4.6.1.1	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (<i>Scanning Electron Microscope with emission of electrons by a Field Emission Gun – SEM-FEG</i>).....	58
4.6.1.2	Determinação do tamanho médio.....	59
4.6.1.3	Análise por difração de raios-X (<i>X Ray Diffraction – XRD</i>)	59
4.6.2	Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR</i>)	59
4.6.3	Análise Térmica.....	59
4.6.3.1	Calorimetria exploratória diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry – DSC</i>).....	59
4.6.3.2	Análise termogravimétrica (<i>Thermogravimetric analysis – TG</i>)	60
4.7	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA	62
5.1.1	Determinação do Rendimento do Pó.....	65
5.2	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE TIMOMODULINA INCORPORADA NAS FORMULAÇÕES PELO MÉTODO DE LOWRY	66
5.2.1	Curva de Calibração.....	67
5.2.2	Eficiência de Encapsulação.....	68

5.3	ANÁLISES MORFOLÓGICAS E DE SUPERFÍCIE	69
5.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão por Efeito de Campo (MEV-FEG)	69
5.3.2	Determinação do Tamanho Médio.....	72
5.4	ANÁLISE ESTRUTURAL.....	73
5.4.1	Análise por Difração de Raios-X (<i>X Ray Diffraction</i> – XRD).....	73
5.4.2	Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> – FTIR).....	75
5.5	ANÁLISE TÉRMICA	79
5.5.1	Análise Termogravimétrica (<i>Thermogravimetric analysis</i> – TGA).....	79
5.5.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i> – DSC).....	83
5.6	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	85
6	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras doenças podem estar relacionadas com o sistema imunológico ineficiente, entre elas podem-se citar as infecções respiratórias e os cânceres. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021), entre as dez principais causas de mortes no mundo para o ano de 2019 estão, em 4º lugar as infecções respiratórias do trato inferior, que permaneceram as doenças transmissíveis mais letais com 2,6 milhões de mortes, e, em 6º lugar os cânceres de pulmão, traqueia e brônquios com 1,8 milhões de mortes. Estas causas são apenas alguns exemplos de doenças que tal desenvolvimento possui uma estreita relação com o sistema imunológico deficiente (PARVEEN et al., 2013; ZHANG; CHEN, 2018).

Com a finalidade de regular o sistema imunológico, as terapias biológicas podem ser formas relevantes de tratamentos em saúde, as quais se utilizam de substâncias naturais a fim de aumentar a defesa do organismo frente a diversas patologias. Neste contexto, os imunomoduladores são um dos seguimentos de terapias biológicas, cujas substâncias ativas podem ser de origem natural ou sintética, e são classificados em estimulantes ou supressores do sistema imunológico dependendo da ação no organismo, também conhecidos como modificadores de respostas biológicas (SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016).

Os imunoestimulantes ativam diferentes elementos do sistema imunológico e por isso são considerados imunomoduladores não-específicos. Têm ação, principalmente, imunopreventiva pela estimulação da fagocitose e do sistema complemento. Em indivíduos saudáveis são agentes profiláticos e imunopotencializadores, e em indivíduos doentes são agentes imunoterápicos. Em ambos os casos proporcionam melhora na resposta imune (HADDEN, 1993; KUMAR et al., 2012; PARVEEN et al., 2013; SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016).

Muitos imunoestimulantes são constituídos de peptídeos, os quais são polímeros de aminoácidos conectados por ligações amídicas, referidas como ligações peptídicas, formando polipeptídeos e proteínas. A liberação de fármacos peptídicos pela via oral permanece mais fácil, atrativa e conveniente quando comparada às outras vias de administração, de modo que é considerada pelo paciente, forma de administração prática e adequada, aumentando sua adesão ao tratamento. No entanto, a maioria dos peptídeos administrados por via oral apresenta uma baixa e variada biodisponibilidade; baixa permeabilidade;

degradação enzimática, curto tempo de meia-vida, rápido *clearance* pós-absortivo e instabilidade física, como agregação e adsorção (BATISTA et al., 2019; HAGGAG; FAHEEM, 2015; LEWIS; RICHARD, 2015; MURALIDHAR et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

Por estas razões, os peptídeos são administrados na maioria das vezes pela via parenteral, a qual pode solucionar os problemas acima elencados, porém, pode levar a obstáculos quando a alta frequência das aplicações injetáveis torna esta forma farmacêutica desprezível pelo paciente aversivo à agulha. Sendo assim, avanços significativos na liberação de peptídeos por meio de vias de administração alternativas foram feitos nas últimas décadas e serão utilizados de forma mais ampla para melhorar a adesão do paciente, aumentar a eficácia ou reduzir a toxicidade (LEWIS; RICHARD, 2015).

Desta forma, timomodulina, que é um imunomodulador extraído do timo de vitelo, composto de uma mistura de polipeptídeos apresenta tais restrições, como baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral (KOUTTAB; PRADA; CAZZOLA, 1989) e duração do tratamento prolongada. Apesar disso, o timomodulina possui importantes propriedades biológicas, age no sistema imunológico e modula a proliferação e diferenciação de células tronco na medula óssea, conferindo melhora da resposta imunológica em doenças como câncer, AIDS e alergias. Por isso, mesmo sendo um fármaco descoberto há muitos anos, o timomodulina é considerado como uma terapia clássica, aliado no combate às infecções que levam a alterações imunológicas (CALSINI; MOCHEGANI; FABRIS, 1985; KOUTTAB; PRADA; CAZZOLA, 1989; MACIEL; PÉREZ, 2000).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido projetados e desenvolvidos para sobrepujar estas limitações, usando vários materiais e métodos químicos e físicos (YE; VENKATRAMAN, 2019). Uma das técnicas é a microencapsulação de fármacos, cujas micropartículas são formadas por materiais poliméricos que recobrem ou envolvem o fármaco, resultando numa matriz que o protege e preserva suas propriedades físico-químicas, funcionais e biológicas (DESAI; PARK, 2005; YE; VENKATRAMAN, 2019). O *spray-drying* é um dos métodos preferíveis para obtenção de micropartículas, pois é um processo contínuo, rápido, econômico, de alta qualidade e de escala viável, no qual a passagem da emulsão é tão rápida que não compromete a formulação (BURHAN et al., 2019; RATTES; OLIVEIRA, 2007).

Deste modo, fica notório a necessidade de se aprofundar mais o conhecimento sobre os agentes imunomoduladores por meio do que está estabelecido atualmente, contribuindo para descobertas de estratégias melhoradas para utilizar estas e futuras imunoterapias (LEWIS; RICHARD, 2015; TALMADGE, 2016; YE; VENKATRAMAN, 2019). Concomitante a isto, hoje mais do que nunca, faz-se necessário reduzir efeitos colaterais de medicamentos e tempo de tratamento, com aumento da eficácia terapêutica, nos quais as terapias naturais têm demonstrado resultados promissores (SCHIRRMACHER, 2019).

Considerando a disponibilidade destas novas tecnologias, o presente estudo visa o desenvolvimento de micropartículas poliméricas a partir dos polímeros hidroxipropilmetilcelulose e poloxâmero 188 contendo timomodulina, obtidas por *spray drying*, com a finalidade de promover a liberação modificada do fármaco em sistemas mucoadesivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter, caracterizar e avaliar *in vitro* micropartículas poliméricas mucoadesivas contendo timomodulina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver micropartículas poliméricas contendo timomodulina pelo método de secagem por aspersão (*spray drying*);
- Proceder à determinação quantitativa de timomodulina incorporado nas formulações pelo método espectrofotométrico no ultravioleta e no visível (UV-Vis), previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Caracterizar sistemas poliméricos por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Avaliar a liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas, empregando o ensaio de dissolução.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

O corpo humano está constantemente exposto aos perigos de agentes tóxicos e infecciosos, que se atingirem camadas mais internas de tecidos podem causar danos, doenças graves e até mesmo a morte do indivíduo. O organismo de mamíferos dispõe de uma sofisticada e eficiente defesa, denominada sistema imune ou sistema imunológico, cuja função fisiológica é a homeostasia do mesmo e tem por finalidade última defender o organismo de toda e qualquer situação que o coloque em risco (MARSHALL et al., 2018; MORSINK et al., 2020; NICHOLSON, 2016).

Uma rede intrincada de trabalho com órgãos, tecidos, células, mediadores químicos e enzimas, é recrutada para executar as funções do sistema imunológico: identificar, destruir e memorizar invasores patogênicos; acatar e gerenciar a simbiose com o microbioma bacteriano essencial; curar feridas e reparar lesões; identificar e destruir células envelhecidas e transformadas (tumorais); rejeitar tecidos transplantados de indivíduos alogênicos e tolerar simbioses estranhos (COHEN; EFRONI, 2019; MARSHALL et al., 2018; THAPA; FARBER, 2019).

O sistema está dividido esquematicamente em imunidades inata e adaptativa (MORSINK et al., 2020). Os leucócitos, também chamados de glóbulos brancos, compõem o elenco celular do sistema, cuja presença nos tecidos se dá pela corrente sanguínea. As células-tronco hematopoiéticas pluripotenciais, que são produzidas pela medula óssea durante a vida fetal, originam os precursores leucocitários. Pequena parte destas células fica aí retida como suprimento, as demais se reproduzem e se diferenciam originando duas linhagens celulares: a mielocítica e a linfocítica. Esta produz linfócitos e aquela granulócitos e monócitos (MORSINK et al., 2020; OLSON; KANG; PASSEGUÉ, 2020).

Constituições morfológicas celulares e ou “treinamentos” capacitam os leucócitos conhecerem o que é próprio do organismo e não reagir contra ele. Tal aptidão condiciona as células de defesa a atacar qualquer estrutura que seja diferente das existentes na composição corporal, referida como corpo estranho ou não-próprio. Além disso, o sistema distingue o não-próprio inofensivo do não-próprio nocivo ao corpo, que neste caso é combatido com resposta imunológica a fim de

eliminar os agentes danosos (NICHOLSON, 2016). Exemplos destes são bactérias, fungos, parasitas, vírus e toxinas, os quais são reconhecidos pelo sistema, desde estruturas inteiras (células) até partes (moléculas), como intrusos, chamados de antígenos (Ags) (MARSHALL et al., 2018).

As complexas funções imunitárias cabem num processo comum, chamado de inflamação. O local inflamado se apresenta visivelmente ruborizado e edemaciado, e microscopicamente é caracterizado pelo acúmulo de vários tipos de células imunológicas, e pela morte e crescimento de outros tipos celulares, resultando na regeneração tecidual. Esse processo é caracterizado por respostas em cascatas que visam eliminar o patógeno. A inflamação comumente termina quando a lesão cicatriza, aonde então, a segurança do organismo foi restabelecida (COHEN; EFRONI, 2019).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do sistema imunológico. A resposta é imediata ou em poucas horas após o reconhecimento do intruso, com o rápido recrutamento de células especializadas para o local da injúria. Os processos são inespecíficos e ocorrem sempre da mesma forma, independentemente do tipo de Ag. Os componentes desta defesa estão presentes em todos os indivíduos, agindo primariamente no combate ao agressor e secundariamente comunicando a ameaça à imunidade adaptativa (MARSHALL et al., 2018; THAPA; FARBER, 2019).

Seqüencialmente, desde que seja a primeira invasão do patógeno no organismo, a imunidade adaptativa é acionada com a apresentação dos Ags patogênicos aos linfócitos, pelas células da imunidade inata. Apenas os linfócitos específicos se ligam aos Ags de correspondente especificidade, resultando em ativação destas células, que se proliferam, matam o agressor e produzem anticorpos e linfócitos de memória. É uma resposta lenta, levando dias a meses, mas altamente especializada e duradoura. Os processos são específicos e dependentes da peculiaridade do Ag, o que confere repertório de memória, produzindo resposta imunológica mais rápida e eficiente se houver um novo contato com o mesmo patógeno (HOWELL; SHEPHERD, 2018; MARSHALL et al., 2018; MORSINK et al., 2020; NICHOLSON, 2016).

As habilidades que cada uma das linhas de defesa possui constituem mecanismos complementares dentro do sistema, inferindo imunidade ao organismo (hospedeiro), que é a capacidade do corpo em resistir às doenças (MARSHALL et

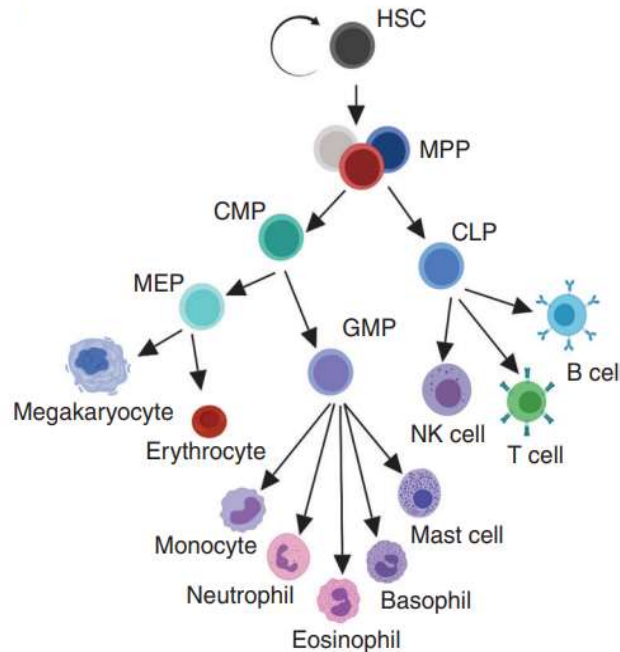
al., 2018). Por isso, é fundamental que nenhuma parte do organismo fique alheia a constante vigilância imunológica (NICHOLSON, 2016).

Todos os leucócitos provêm de um processo chamado hematopoiese, no qual são produzidas as células sanguíneas do corpo humano (FIGURA 1). Células germinativas chamadas de células-tronco pluripotentes é a fonte dessa produção, através da proliferação, auto-renovação e diferenciação celular, que se inicia na fase embrionária, onde na 4^a semana gestacional são detectadas células-tronco pluripotentes no saco vitelínico, na circulação e no fígado. A hematopoiese é realizada pelo baço em torno da 12^a semana de gestação, pelo fígado no final do 3^o trimestre, sendo o principal órgão hematopoiético neste período e deixando de ser pouco antes do nascimento, em que a medula óssea passa a protagonizar como tecido hematopoiético (KUPER et al., 2016; OLSON; KANG; PASSEGUÉ, 2020).

As células da imunidade inata e adaptativa são vistas na circulação do feto desde o início da gestação, embora com função efetora diferente das células no adulto. Na 4^a semana são observados monócitos e macrófagos, entre a 8^a e a 10^a semana células *natural killer* e granulócitos, principalmente neutrófilos, e na 12^a semana células T e B imaturas. As principais células T fetais são as células T $\gamma\delta$ até que as células T $\alpha\beta$ predominem no final do período gestacional, com células T CD4+ e CD8+ circulantes na 20^a semana. Ao final da gestação e após o nascimento as células da imunidade inata aumentam substancialmente na circulação, e os níveis adultos de células T são alcançados por volta dos 6 anos de idade (KUPER et al., 2016).

Tanto a hematopoiese quanto os processos imunológicos específicos ocorrem em locais próprios no organismo, chamados de órgãos linfóides. A medula óssea e o timo são os órgãos linfóides primários, os quais desenvolvem e selecionam linfócitos T e B. Os órgãos linfóides secundários são os linfonodos, baço, amígdalas e placas de Peyer, que ativam e diferenciam os linfócitos em células reguladoras ou efetoras, além de oportunizarem amostragem de antígenos, pois estão estrategicamente distribuídos pelo corpo. Os órgãos linfóides terciários são agregados linfóides organizados ocorrendo em quase todos os tecidos corporais em resposta a uma reação imunológica em curso, estando associada a auto-imunidade, infecção ou câncer (BUETTNER; LOCHNER, 2016; PABST, 2018).

FIGURA 1 – Esquema da hematopoiese em mamíferos



Fonte: Adaptado de OLSON, O. C.; KANG, Y. A.; PASSEGUÉ, E. Normal hematopoiesis is a balancing act of self-renewal and regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1–23, 2020.

Nota: HSC: *hematopoietic stem cells* (células-tronco hematopoiéticas); MPP: *multipotent progenitors* (progenitores multipotentes); CMP: *common myeloid progenitors* (progenitores mielóides comuns); CLP: *common lymphoid progenitors* (progenitores linfóides comuns); GMP: *granulocyte-macrophage progenitors* (progenitores de granulócitos-macrófagos); MEP: *megakaryocyte-erythroid progenitors* (progenitores megacariócitos-eritróides); *megakaryocyte* (megacariócito); *erythrocyte* (eritrócito); *monocyte* (monócito); *neutrophil* (neutrófilo); *eosinophil* (eosinófilo); *basophil* (basófilo); *mast cell* (mastócito); *NK cell* (célula *natural killer*); *T cell* (célula T); *B cell* (célula B).

Dentro da intrincada rede de trabalho está o sistema complemento, que é um conjunto de proteínas solúveis da imunidade inata produzidas pelo fígado, células endoteliais e epiteliais, monócitos, macrófagos e pelas células dendríticas, e que atuam na inflamação e em alguns processos fisiológicos. O complemento é fundamental na imunidade, pois além de eliminar patógenos instrui a resposta imune adaptativa. Ele acontece em efeito cascata, aonde as proteínas do complemento ativas como enzimas clivam umas às outras, resultando em nova enzima, que cliva outras proteínas gerando novas proteases, até que a combinação final seja capaz de opsonizar, quimiotaxiar ou lisar a membrana celular microbiana (LUBBERS et al., 2017; TROUW; PICKERING; BLOM, 2017).

A ativação da cascata do complemento ocorre por três vias, sendo a primeira a via clássica, ativada pela ligação da molécula de reconhecimento C1q à imunoglobulina (Ig) G, IgM, proteína C reativa e à pentraxina-3. A segunda, é a via

das lectinas que possui muitas moléculas de reconhecimento, como a lectina de ligação à manose, ficolinas e coletinas. E a terceira, é a via alternativa, acionada por properdina e por *tick-over*, que é uma reação quando os níveis plasmáticos de C3b estão baixos. O resultado da ativação de todas as vias é a formação de C3 convertase, C4b2a resulta das vias clássica e das lectinas, e C3bBb deriva da via alternativa (LUBBERS et al., 2017; TROUW; PICKERING; BLOM, 2017).

Outro componente do sistema imunológico é o complexo principal de histocompatibilidade, também chamado de antígenos leucocitários humanos, cujas denominações grafadas na língua inglesa são, *major histocompatibility complex* (MHC) e *human leucocyte antigen* (HLA) respectivamente. É um conjunto de genes altamente polimórficos localizados no cromossomo 6 relacionados à imunidade, que codifica proteínas de superfície celular, as quais têm a finalidade de expor peptídeos antigênicos, formando complexos peptídeo-MHCs que oportunizam o reconhecimento e a eliminação de Ags por células citotóxicas. Tal procedimento estabelece uma ponte de fundamental importância entre as imunidades inata e adaptativa, garantindo a funcionalidade de todo o sistema imunológico (BAKELA; ATHANASSAKIS, 2018; NICHOLSON, 2016; WIECZOREK et al., 2017).

As proteínas do MHC são categorizadas em classes I e II. As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e são codificadas, preponderantemente, pelos genes clássicos A, B e C, com mais de 12.000 alelos, em cadeias α , que são montadas com as β_2 -microglobulinas, cuja codificação é feita pelo cromossomo 15 no retículo endoplasmático, formando heterodímeros chamados de moléculas MHC-I. Na infecção, ou as células não exibem o MHC-I, o que desperta a atenção de células *natural killer*, ou as células expressam os complexos peptídeo-MHCs classe I, ativando células T CD8+, e que em ambos os casos levam a morte celular (BAKELA; ATHANASSAKIS, 2018; NICHOLSON, 2016).

As moléculas de classe II também são heterodímeros, mas de composição diferente da classe I. As cadeias são α e β , codificadas majoritariamente pelos genes clássicos DP, DQ e DR, com mais de 20.000 combinações alélicas, sendo expressas principalmente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como monócitos, macrófagos e células dendríticas, as quais processam os peptídeos resultantes da fagocitose de proteínas antigênicas na superfície do MHC-II, formando o complexo peptídeo-MHC classe II, que é transportado para a membrana celular e reconhecido

pelas células T CD4+, que iniciam a resposta adaptativa (BAKELA; ATHANASSAKIS, 2018).

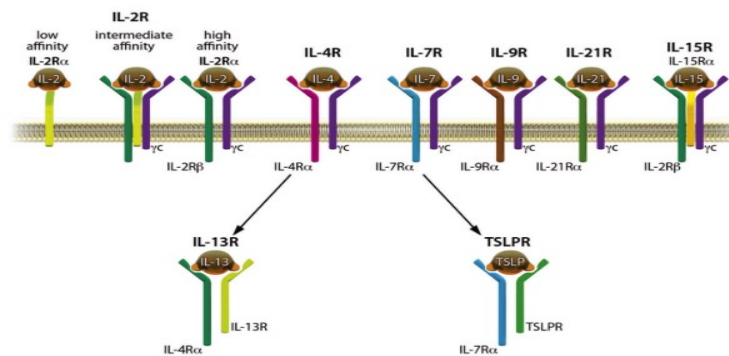
As funções imunológicas são reguladas por glicoproteínas denominadas de citocinas, cuja produção é realizada pelo parênquima tecidual, mas principalmente pelos leucócitos, e atuam estimulando ou inibindo funções das células de defesa resultando em interação entre estas e os tecidos envolvidos, criando uma efetiva comunicação que gera ou atenua a inflamação, ou induz reparos. Para tanto, as citocinas ampliam e orientam a geração de padrões adequados de imunidade (HOLDSWORTH; CAN, 2015).

As citocinas entram em contato com seu alvo via receptores específicos expressos na superfície dos leucócitos e do parênquima, funcionalizando-os para uma resposta rápida e eficaz ao dano instalado, seja infeccioso ou não. As citocinas já identificadas são: interleucinas, fatores de necrose tumoral, interferons, fatores estimuladores de colônias e alguns fatores de transformação do crescimento, cujos termos na língua inglesa, são *interleukin* (IL), *tumor necrosis factor* (TNF), *interferon* (IFN), *colony stimulating factor* (CSF) e *transforming growth factor* (TGF) (AKDIS et al., 2016; HOLDSWORTH; CAN, 2015).

As interleucinas são as citocinas mais numerosas, cerca de 60 já foram detectadas. Sua designação IL é seguida de um numeral e estão reunidas em famílias de acordo com homologia de seqüência e semelhanças da cadeia do receptor ou propriedades funcionais, alguns exemplos na FIGURA 2. Os IFNs são α , β e γ , os TNFs são α e β , os CSFs são o granulócito (G-CSF) e o granulócito-macrófago (GM-CSF), além dos TGFs β (AKDIS et al., 2016; HOLDSWORTH; CAN, 2015).

As citocinas da imunidade inata predominantes na resposta aguda são IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, CXCL8, G-CSF e GM-CSF, cuja ação local é ativar células endoteliais, mastócitos, células dendríticas e células T $\gamma\delta$, acionando molécula de adesão do endotélio, diminuindo o fluxo sanguíneo e aumentando a permeabilidade vascular. Essas alterações propiciam o acúmulo de proteínas de fase aguda, de coagulação, do complemento e Ig. Esses efeitos são reverberados resultando produção de novas citocinas, ativação de outros leucócitos e mais mudanças no cenário responsivo (AKDIS et al., 2016; HOLDSWORTH; CAN, 2015).

FIGURA 2 - Exemplos de algumas interleucinas



Fonte: Adaptado de AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, 2016.

Na imunidade adaptativa uma gama de citocinas também trabalha, a exemplo, IL-4, IL-6, IL-12, IL-23 e TGF- β , que direcionam para qual via o subconjunto de células T auxiliaadoras deve se diferenciar. A IL-12 guia células T auxiliaadoras 1 (Th1) que passa a produzir IFN- γ e TNF- α , a IL-4 sinaliza para células T auxiliaadoras 2 (Th2) que secreta mais IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, e as citocinas IL-6, IL-23 e TGF- β determinam via à células T auxiliaadoras 17 (Th17) que libera IL-17A-F, IL-21, IL-22 e IL-23 (HOLDSWORTH; CAN, 2015).

Ainda participam do sistema imune as quimiocinas, também conhecidas por citocinas quimiotáticas. Constituem uma grande família de pequenas citocinas, cerca de 50 proteínas com 8 a 12 kDa produzidas por várias células do organismo em duas condições, uma fisiológica, em que as quimiocinas homeostáticas são sintetizadas constitutivamente em níveis elevados orientando o destino das células de defesa, o que garante a vigilância dos tecidos, e sob a condição patológica, aonde leucócitos e outros tipos celulares ativados pela lesão, são induzidos a produzir as quimiocinas inflamatórias, as quais sob influência de mediadores pró-inflamatórios, fazem a quimiotaxia de monócitos, macrófagos e células T para o local da injúria (LAGOU et al., 2018; MILLER; MAYO, 2017).

Além da quimiotaxia, principalmente de leucócitos, as quimiocinas agem na hematopoiese, na angiogênese e na degranulação leucocitária, e para que estas ações ocorram, as quimiocinas se ligam a sete tipos de receptores acoplados à proteína G transmembrana expressos por várias células, provocando alterações na estrutura das proteínas G, resultando em acionamento das vias de sinalização

intracelular relacionadas à ativação e movimentação celular (CHEN et al., 2018; MILLER; MAYO, 2017).

As quimiocinas são classificadas de acordo com a seqüência primária de aminoácidos e pela disposição de resíduos de cisteína dentro da proteína, os quais preservam o monômero por meio de ligações dissulfeto. Isso resulta em variações das duas cisteínas mais próximas do N-terminal, agrupadas em quatro subfamílias: CC, CXC, CX3C e XC, aonde a letra C representa o resíduo cisteína. Na quimiocina, CC significa que as duas cisteínas estão justapostas, CXC significa que um resíduo de aminoácido, indicado pela letra X, separa as duas cisteínas, assim como na CX3C as cisteínas estão separadas por três resíduos de aminoácidos. A XC é a exceção, caracterizada por não ter a primeira e a terceira cisteínas no monômero (HUGHES; NIBBS, 2018; MILLER; MAYO, 2017).

Por suas funções e por estarem implicadas em todas as respostas imunológicas, as quimiocinas exercem relevantes papéis na inflamação, na infecção, no reparo tecidual, na vigilância imunitária e fundamentalmente na homeostase. Entretanto, também participam nocivamente de inflamações e até de patologias como câncer, HIV/AIDS e aterosclerose, sendo alvo para o desenvolvimento de terapias (HUGHES; NIBBS, 2018; MILLER; MAYO, 2017).

3.1.1 Imunidade Inata

A resposta imune inata conta com mecanismos de defesa que estão codificados nos genes humanos (MORSINK et al., 2020). Esta imunidade é composta por três níveis de barreira. O primeiro é a barreira física, constituída por pele e mucosas, os quais impedem a penetração de patógenos por meio de epitélio sobreposto, pH ácido, mucosa epitelial ciliar justaposta com pêlos nasais e muco, ou pela flora intestinal (HOWELL; SHEPHERD, 2018; MARSHALL et al., 2018; NICHOLSON, 2016).

O segundo nível é a barreira bioquímica, caracterizada por condições corporais tais como: baixo pH estomacal, febre, e as enzimas presentes na saliva, suor e lágrima (HOWELL; SHEPHERD, 2018; NICHOLSON, 2016).

E se mesmo assim os patógenos alcançarem o organismo, um terceiro nível de barreira ocorre, é a inflamação, cujo entrelaçado processo é caracterizado predominantemente pela resposta imune inata. Mediadores pró-inflamatórios,

citocinas, proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda e os leucócitos como, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células linfóides inatas e células *natural killer* são os principais protagonistas da resposta primária (MARSHALL et al., 2018; NICHOLSON, 2016; THAPA; FARBER, 2019).

A inflamação inicia com o tecido lesado, o qual libera várias substâncias quimiotáticas induzindo o local a mudanças como, a dilatação dos vasos sanguíneos, diminuição do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e extravasamento de líquido para os espaços intersticiais, propiciando rápida comunicação do evento e passagem facilitada às células de defesa, das quais os fagócitos migram em maior abundância (COHEN; EFRONI, 2019; HOLDSWORTH; CAN, 2015; HOWELL; SHEPHERD, 2018).

Chegando ao tecido lesado reações de reconhecimento ocorrem entre os receptores da superfície dos fagócitos e os Ags, iniciando a fagocitose, cuja finalidade é impedir a entrada, replicação e sobrevivência do patógeno nos tecidos do hospedeiro, de modo a isolar a área lesada e retardar sua disseminação. As células fagocíticas são os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, porém as duas primeiras têm ação preponderante (CHOWDHURY et al., 2020; HOWELL; SHEPHERD, 2018; MARSHALL et al., 2018; MORSINK et al., 2020; NICHOLSON, 2016; THAPA; FARBER, 2019).

Os receptores que os fagócitos expressam recebem o nome de Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs), por identificarem Padrões Moleculares Associados à Patógenos ou *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs), presentes em microrganismos, mas que não ocorrem em mamíferos. Dentre os vários RRP's destaca-se a família dos Receptores *Toll-like* (TLR) por sua saliente atuação. Após a interação PRRs/PAMPs ocorre a endocitose, onde os agentes patogênicos são englobados pelo citoplasma dos fagócitos, que os internalizam em vesículas chamadas fagossomos, os quais se fundem aos lisossomos, cujos conteúdos são substâncias capazes de digerir e eliminar o microrganismo (HOWELL; SHEPHERD, 2018; MARSHALL et al., 2018; NICHOLSON, 2016; THAPA; FARBER, 2019).

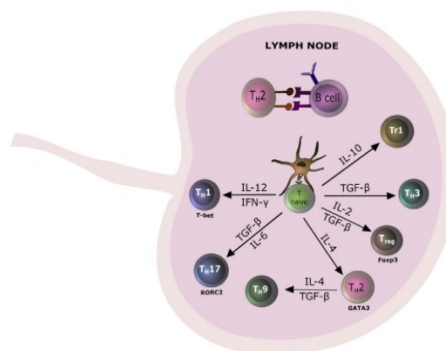
O prosseguimento da resposta inata é caracterizado pela singularidade que cada glóbulo branco possui ao manipular o agente infeccioso ou em participar da inflamação, e tais ações celulares se inter-relacionam de modo a cumprir a

incumbência da defesa primária (COHEN; EFRONI, 2019). Desta forma, a seguir os leucócitos são descritos, iniciando-se pelos fagócitos.

Dendritic cells (DCs) ou células dendríticas, apesar de não fagocitarem quantitativamente são consideradas as APCs mais poderosas do sistema, por orquestrarem linfócitos T (LT) e eventos imunológicos que direcionam para a resposta necessária, ativação ou inibição, fazendo a ponte entre as imunidades inata e adaptativa. Há duas classes de DCs, distribuídas em subconjuntos em todos os tecidos e órgãos linfóides, a convencional, com três potentes APCs ($CD8a^+$, $CD103^+$ e $CD11b^+$) e a plasmocitóide, que produz grandes quantidades de interferon tipo I em resposta à infecção viral (WAISMAN et al., 2017).

As DCs são as primeiras a chegar ao local infectado e após fagocitarem os Ags maturam-se e migram pelos vasos linfáticos até os órgãos linfóides secundários, processando-os com o MHC-II, e os apresentando aos LTs imaturos (FIGURA 3), dos quais somente os específicos são ativados. Regulam a diferenciação, a maturação e a função de LT de modo contato-dependente e por secreção de $TGF\beta$, $IL-1\beta$, $IL-10$, $IL-27$, e $IL-23$, ácido retinóico e indoleamina 2,3-desoxigenase, ativam indiretamente linfócitos B e inibem a resposta imune em conjunto com os linfócitos T reguladores (WAISMAN et al., 2017; YATIM; LAKKIS, 2015).

FIGURA 3 - Célula dendrítica apresentando antígeno ao linfócito T imaturo dentro de um linfonodo



Fonte: AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and $TNF-\alpha$: Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, 2016.

Monócitos. Discretas como APCs, os monócitos ocorrem em dois subconjuntos em humanos como $CD14^+$ e $CD14_{low} CD16^+$. Os monócitos do primeiro subconjunto são chamados de monócitos inflamatórios, por assim agirem, enquanto os do segundo subconjunto são os monócitos de patrulhamento, por vigiarem a

integridade do endotélio. No sangue, os monócitos inflamatórios têm meia-vida em aproximadamente 20 horas, podendo se diferenciar em monócitos de patrulhamento, que circulam por dias, ou alcançar os tecidos e se diferenciar em macrófagos ou em células dendríticas (HOEKSEMA; DE WINTHER, 2016; MURRAY, 2018; WAISMAN et al., 2017).

Macrófagos. Já os macrófagos são as principais células efetoras que intervêm na imunidade inata, pois fagocitam micróbios, debris teciduais, células envelhecidas, apresentam Ags aos linfócitos T e coordenam o desenvolvimento, a homeostase e a regeneração do novo tecido. Os macrófagos têm vida longa, entre meses e anos, residindo em tecidos e parênquima de órgãos, dos quais a maioria é de origem embrionária e uma parte de monócitos sanguíneos, que num influxo aos neutrófilos chegam rapidamente ao local danificado (GORDON; PLÜDDEMANN, 2017; MARSHALL et al., 2018; OISHI; MANABE, 2018).

Uma vez ativados por TLR ou IFN- γ , os macrófagos realizam as atividades microbicida, tumoricida e depurativa, e morrem, mas muitos fagocitam e processam os Ags em fragmentos (peptídeos), os quais são ligados ao MHC-II formando um complexo que é expresso na membrana celular. Como milhares de linfócitos T estão circulando pelo corpo todo geralmente o LT específico encontra o complexo peptídeo-MHC e se liga ao peptídeo através de seu receptor de célula T (TCR), ativando os LT específicos, que iniciam suas ações na resposta adaptativa. Os macrófagos também liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , que induzem outras células efetoras até a lesão (GORDON; PLÜDDEMANN, 2017; MURRAY, 2018; NICHOLSON, 2016; OISHI; MANABE, 2018).

Neutrófilos. Os neutrófilos são as células imunes mais numerosas do sangue periférico, possuindo curta meia-vida, entre 7 e 12 horas, são produzidas diariamente, no entanto, quando há lesão conseguem viver por até três dias. Atraídas por quimiotáxicos migram dos vasos sanguíneos em direção a lesão, sendo uma das primeiras a chegar ao local. Atualmente, sabe-se que são bem mais que assassinas suicidas, além de secretar citocinas que recrutam monócitos e macrófagos, realizam três funções principais: fagocitar Ags, entregar grânulos citoplasmáticos e criar armadilhas para os intrusos (SELDERS et al., 2017).

A fagocitose realizada eficazmente pelos neutrófilos libera enzimas líticas e espécies reativas de oxigênio durante a digestão, que são tóxicos a vários patógenos. A degranulação extracelular, dependendo da classe, age como pró ou

anti-inflamatória, matando os microrganismos e fornecendo substâncias para reprogramação da matriz, angiogênese e regeneração. As armadilhas extracelulares neutrofílicas, são feitas a partir de grânulos e material nuclear, evitando a disseminação da infecção. A remoção dos neutrófilos ocorre por apoptose, fagocitose via macrófagos ou por migração reversa aos vasos sanguíneos (SELDERS et al., 2017).

Células natural killer. As células *natural killer* (NK) são linfócitos que atuam na imunidade inata através da secreção de fatores solúveis, da regulação das respostas de APCs e de células T e da citotoxicidade contra células não saudáveis, como por exemplo, as infectadas por vírus ou as tumorais. As NKs são programadas para vigiar se o MHC-I está expresso em todas as células nucleadas, como células doentes não o expressam, ocorre ativação destas células citotóxicas (BI; TIAN, 2017; KUMAR, 2018; NICHOLSON, 2016).

Uma vez ativadas, as NKs entram em contato com o alvo liberando grânulos intracelulares que permitem o acesso de suas perforinas e granzimas, proteínas que formam poros e precipitam a morte celular contendo o patógeno. Ainda, as NKs podem ser ativadas através de seus inúmeros receptores, os quais reconhecem ligantes, como as imunoglobulinas, na superfície de células modificadas e partem para o ataque. Após matar o alvo a NK se dirige para outra célula infectada ou modificada (BI; TIAN, 2017; KUMAR, 2018; NICHOLSON, 2016).

Eosinófilos. Já os eosinófilos são um tipo de leucócito sobressalente em respostas específicas do hospedeiro, a exemplo infecção por helmintos, vírus, bactérias e doenças alérgicas. Admite-se que os eosinófilos colaborem com uma série de substâncias benéficas, as quais favorecem o desenvolvimento, remodelação e reparo de tecidos, de modo especial locais de barreira como os epitélios (BOCHNER, 2018; WELLER; SPENCER, 2017).

Depois que deixam a medula óssea, os eosinófilos circulam pelo sangue e buscam residência tecidual, principalmente no trato gastrointestinal, apresentando um tempo de vida de 24 horas na corrente circulatória, de alguns dias nos tecidos e de semanas em inflamação contínua. Suas funções efetoras decorrem dos efeitos citotóxicos de quatro proteínas catiônicas contidas em seus grânulos citoplasmáticos, a saber: proteína básica principal 1, proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina derivada de eosinófilos, e peroxidase de eosinófilos (RAVIN; LOY, 2015; WELLER; SPENCER, 2017).

Respondendo ao recrutamento feito por moléculas de adesão e quimiocinas, os eosinófilos chegam aos sítios infectados e atacam secretando os conteúdos granulares por exocitose, citólise ou degranulação fragmentada, sendo o último um mecanismo exclusivo de eosinófilos. Estes conteúdos são proteínas nocivas a patógenos, podendo ser também aos tecidos do hospedeiro. Ainda, outro meio dos eosinófilos abordarem antígenos é ligando seu receptor a IgA ou IgE, que estão ligadas por toda a superfície dos Ags. Ademais, as proteínas citotóxicas estimulam muitos outros efeitos na resposta imune, entre eles a degranulação de mastócitos e basófilos (RAVIN; LOY, 2015; WELLER; SPENCER, 2017).

Basófilos. Assim como os eosinófilos, basófilos e mastócitos também são granulócitos, mas estes últimos por apresentarem morfologia e funções semelhantes normalmente são estudados em conjunto. Células raras, menos de 1% dos leucócitos periféricos, os basófilos são originados na medula óssea e no baço, formando-se duas populações: basófilos desencadeados pela ação de IL-3 e basófilos desencadeados pela ação da linfopoiétina estromal tímica (TSLP). Basófilos produzidos no baço são decorrentes apenas de TSLP (NAKASHIMA; OTSUKA; KABASHIMA, 2018; OETJEN; NOTI; KIM, 2016).

A principal fonte de IL-3 são células T ativadas, já de TSLP são os epitélios. Basófilos desencadeados por IL-3 são muito responsivos a receptores FcεRI de IgE complexada a Ags, e basófilos desencadeados por TSLP são ativados por IL-3, IL-18 e IL-33. Após sua ativação, os basófilos iniciam a inflamação com a degranulação e liberação de IL-4, IL-13, histaminas, leucotrienos e fator de ativação de plaquetas, recrutando para o local lesado neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (NAKASHIMA; OTSUKA; KABASHIMA, 2018; OETJEN; NOTI; KIM, 2016; SCHWARTZ; EBERLE; VOEHRINGER, 2016).

3.1.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa, já chamada de imunidade adquirida, é responsável pela maior parte da resposta imune justamente por promover defesa extremamente poderosa e específica. É formada pelos linfócitos e compreende, dependendo dos componentes relacionados, em imunidade humoral, caracterizada pelas imunoglobulinas (anticorpos) produzidas pelos linfócitos B (células B), e em imunidade celular, protagonizada pelos linfócitos T (células T) ativados. Responde

tardamente, porém de maneira altamente direcionada, já que este processo de defesa envolve seletividade por parte dos linfócitos no reconhecimento do antígeno, baseada na exposição anterior, o que confere memória e expansão de células clonais, e, uma subsequente exposição recruta mais rapidamente este complexo processo (HOWELL; SHEPHERD, 2018; PARVEEN et al., 2013).

A especificidade das células T é uma consequência da diversidade de receptores de ligação a antígenos, que se encontra em sua membrana, conhecidos como TCR, sendo que cada célula T expressa um único tipo de receptor e tem a capacidade de proliferar e se diferenciar rapidamente ao receber os sinais apropriados. Todo este processo se dá a partir do momento em que as APCs apresentam os antígenos as células T, já descritos aqui. Deste modo, os TCRs são dispositivos, por assim dizer, altamente reativos, programados para reconhecer tudo aquilo que seja diferente do organismo humano (HOLDSWORTH; CAN, 2015; MARSHALL et al., 2018).

As células T se diferenciam principalmente em células CD8⁺ (células T citotóxicas) e/ou células CD4⁺ (células T auxiliares). As primeiras são ativadas por peptídeo antigênico ligado a moléculas MHC-I, e estão envolvidas principalmente na destruição de células infectadas por agentes patológicos como, vírus e células tumorais. Após a resolução da infecção, as CD8⁺ efetoras morrem e são eliminadas pelos fagócitos, entretanto, algumas ficam retidas como células de memória as quais podem se diferenciar rapidamente em células efetoras após encontros subsequentes com o mesmo antígeno (MARSHALL et al., 2018; NICHOLSON, 2016).

Já as CD4⁺, ativadas por antígeno ligado às moléculas de MHC-II, são caracterizadas pelas células Th, cuja atividade é mediar a resposta imune, auxiliando no direcionamento de outras células e regulando o tipo de ação das mesmas, desempenhando importante papel no estabelecimento e maximização da resposta imunológica. A Th1, Th2 e Th17 são as células que respondem com maior frequência, aonde Th1 produz IFN- γ , que ativa macrófagos e aumenta a imunidade antiviral e a patógenos intracelulares, e citocinas que estimulam a diferenciação das células B para a produção de anticorpos opsonizantes, os quais aumentam a eficiência dos fagócitos (HOWELL; SHEPHERD, 2018; MARSHALL et al., 2018).

Th2 libera citocinas (IL-4, 5 e 13) envolvidas no desenvolvimento de células B produtoras de IgE, no desenvolvimento e recrutamento de mastócitos e eosinófilos, e aumentam a produção de certas formas de IgG que auxiliam no

combate à infecção bacteriana. As células Th17 produzem IL-17 e estão associados a respostas inflamatórias contínuas, particularmente em infecções e doenças crônicas. A maioria das células Th também morre após a resolução da infecção e algumas permanecem como células de memória Th (HOLDSWORTH; CAN, 2015; MARSHALL et al., 2018).

As CD4+ têm um subconjunto de células, as células T reguladoras (Treg), cuja atividade é ajustar as ações celulares imunológicas em respostas normais ou aberrantes aos autoantígenos e no desenvolvimento de doenças autoimunes, “além de desempenhar importante papel no desenvolvimento da tolerância imunológica a certos antígenos estranhos, como os encontrados nos alimentos” (MARSHALL et al., 2018).

3.1.3 Imunopatologias

O estado imunológico saudável é fortemente determinado durante os primeiros estágios da vida. Entretanto, como todo sistema é passível de falhas o sistema imune pode apresentar vulnerabilidade ocasionando respostas inadequadas. Acredita-se que muitas doenças relacionadas ao sistema imunológico, incluindo atopia e certas doenças autoimunes, tenham sua origem em alterações adversas no equilíbrio imunológico durante a gravidez ou nos primeiros três anos de vida da criança. Se um único elemento deste sistema trabalhar de maneira insuficiente ou exacerbada pode ocasionar doença ao organismo, em que muitos casos são crônicos (KUPER et al., 2016; MARSHALL et al., 2018; NICHOLSON, 2016).

3.2 IMUNOTERAPIAS

Desde o século XIX, esforços em aproveitar o sistema imune para controlar doenças já eram realizados pelo pioneiro no assunto, Dr. William B. Coley, mas que ao longo da história acabaram dando lugar a tratamentos mais agressivos, como quimioterapia e radioterapia, já que respostas mais consistentes não eram obtidas. Contudo, as pesquisas na imunoterapia continuaram seu trajeto no decorrer dos anos (SHARMA et al., 2017).

Recentemente, a ativação do sistema imunológico de pacientes utilizando terapias biológicas tem recebido especial atenção, visto que são terapias mais fisiológicas, e assim melhores toleradas. As imunoterapias são uma das terapias biológicas e proporcionam vantagens em aumentar a eficácia do tratamento acompanhada de menores efeitos colaterais (SCHIRRMACHER, 2019). Intervenção imunológica é uma estratégia terapêutica para neoplasias, doenças infecciosas, inflamatórias e auto-imunes (TALMADGE, 2016).

3.2.1 Imunomoduladores

Os imunomoduladores fazem parte do repertório das imunoterapias. São substâncias naturais ou sintéticas, cuja ação é regular o sistema imunológico, induzindo mecanismos de defesa inata e adaptativa (SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016). Clinicamente, podem ser classificados como imunoadjuvantes, imunossupressores e imunoestimulantes. Os imunoadjuvantes são substâncias combinadas com antígenos tendo a capacidade de melhorar a eficácia das vacinas, por isso são considerados imunomoduladores específicos, com ação seletiva entre imunidade celular e humoral (PARVEEN et al., 2013; SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016).

Os imunossupressores são um grupo de fármacos estruturalmente e funcionalmente heterogêneos e agem impedindo a ação do sistema de defesa, aplicados em pacientes com órgãos transplantados ou doenças autoimunes. Esquemas terapêuticos com práticas de imunossupressores concomitantes são por vezes necessários para alcançar melhores resultados no tratamento (KUMAR et al., 2012; PARVEEN et al., 2013).

Ao contrário, os imunoestimulantes ativam diferentes elementos do sistema imunológico e por isso são considerados imunomoduladores não-específicos. Têm ação imunopreventiva pela estimulação da fagocitose e do sistema complemento. Imunoestimulantes em indivíduos saudáveis são agentes profiláticos e imunopotenciadores, e em indivíduos doentes são agentes imunoterápicos. Em ambos os casos proporcionam resposta imune melhorada (KUMAR et al., 2012; PARVEEN et al., 2013; SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016).

Os imunoestimulantes são classificados de acordo com o modo de ação e a origem (natural ou sintética) como: produtos bacterianos, carboidratos complexos,

vacinas, drogas imunoreagentes, fatores nutricionais, extratos animais, citocinas e extratos vegetais. Imunoestimulantes oriundos de síntese comum, a exemplo os extratos de plantas ou de animais, têm potencial aplicação, pois não são caros, são de fácil obtenção e demonstram ação contra um amplo espectro de patógenos (SHAHBAZI; BOLHASSANI, 2016).

3.2.1.1 Extratos tímicos

Dentre os imunomoduladores podemos citar os extratos derivados de glândula do timo, cuja diferenciação ocorre pelo processo de obtenção. As etapas do processo são purificação, fracionamento e filtragem, resultando em misturas de peptídeos. As preparações não são definidas pelos seus componentes, mas pela padronização correspondente ao procedimento de extração. Podem-se considerar dois grupos de fármacos derivados do timo: o primeiro são os extratos purificados de glândulas de timo de animais, contendo misturas de peptídeos, e o segundo grupo são peptídeos únicos, sintetizados (WOLF et al., 2011).

Alguns peptídeos tímicos que já foram isolados estão relacionados no

QUADRO 1, com a sua correspondente denominação, abreviatura, conteúdo e ou peso molecular, o tipo de extrato e a origem animal do extrato (BIRR, 2013).

QUADRO 1 - Fatores tímicos isolados e caracterizados de tecido do timo

Nome	Abr.	Conteúdo/tamanho	Extrato	Origem do Timo
Timosina	-	Mistura de polipeptídeos	Bruto	Rato
Fator X tímico	TFX	Mistura de polipeptídeos, 2000 – 18000 Da	Bruto	Bezerro
Timosina fração-5	TF5	10 polipeptídeos principais e 30 menores	Purificado	Bezerro
Timoestimulina	TP-1	Mistura de polipeptídeos, 1000 – 12000 Da	Purificado	Bezerro
Timomodulina	-	Mistura de polipeptídeos	Purificado	Bezerro
Protimosina α	Ta	113 aminoácidos	Purificado	Rato
Timopoiatina	TP	Polipeptídeo, 5562 Da	Purificado	
Timulina, Fator TímicoSérico	FTS-Zn	Nonapeptídeo, 847 Da	Purificado	Porco

Fonte: BIRR, C. the Gmp-Based Drug Substance Sctl Development Aiming At Prevention of Opportunistic Infections After X-Ray- and Chemotherapy of Cancer. a Synthetic Combinatorial Tetrapeptide Library Substitution for Calf Thymus Extract. **Biotechnologia Acta**, v. 6, n. 4, p. 162–171, 2013.

Nota: Abr.: abreviatura.

Os fármacos peptídicos imunoterápicos são selecionados pelas seguintes vantagens: diversidade química e biológica; eficácia (quando comparados aos fármacos convencionais de pequenas moléculas); especificidade terapêutica; maior atividade farmacológica e menor toxicidade (LEWIS; RICHARD, 2015; YE; VENKATRAMAN, 2019).

Contudo, por sua natureza biomacromolecular, apresentam peculiares desafios na sua liberação por via oral, como, susceptibilidade a valores extremos de pH do trato gastrointestinal e a degradação enzimática, e pobre absorção pela mucosa epitelial, com curto tempo de meia-vida e baixa biodisponibilidade. Sistemas de liberação que superem este quesito ainda estão em andamento, e por todas estas razões proteínas e peptídeos são frequentemente administrados pela via parenteral (ALCALÁ-ALCALÁ et al., 2013; LEWIS; RICHARD, 2015; SOUERY et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DE TIMOMODULINA

O timomodulina (TMD) é um extrato purificado do timo de vitelo obtido pela hidrólise parcial ácida da glândula, constituído por mistura de polipeptídeos com pesos moleculares entre 1 e 10.000 Da (CAZZOLA; MAZZANTI; KOUTTAB, 1987; KOUTTAB; PRADA; CAZZOLA, 1989; MACIEL; PÉREZ, 2000; MURALIDHAR et al., 2017).

O processo de obtenção de TMD foi patenteado em 1972 pela Ellem Indústria Farmacêutica S.p.A. (Milão, Itália) sob o número 3657417, e compreende tratar o timo de bezerro em extrator a pH 4,4-4,8 por 48-72 horas, filtrar, tratar o filtrado em banho termo-regulado a pH 9,0-9,5 por 60 minutos, filtrar novamente, reduzir o segundo filtrado a pH 6,0-7,0 com ácido clorídrico, ultrafiltrar a solução e liofilizar, obtendo-se o pó seco de timomodulina (BRUNETTI; PINI, 1972; CAZZOLA; MAZZANTI; KOUTTAB, 1987).

O extrato é grafado na língua inglesa como *thymomodulin* e tem registro no Serviço de Resumos Químicos, *Chemical Abstracts Service* (CAS), uma divisão da Sociedade Química Americana, sob o número 90803-92-2, com Denominação Comum Brasileira (DCB) 08605 (BRASIL, 2019). Até o momento não possui monografia em farmacopeias, e por ser um polipeptídeo não possui fórmula e estrutura químicas definidas. Entretanto, Cazzola; Mazzanti e Kouttab (1987)

relataram em uma revisão que a composição aminoacídica de TMD foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase-reversa, revelando dezoito resíduos de aminoácidos (QUADRO 2).

QUADRO 2 - Composição aminoacídica de TMD

Asp	8.2	Arg	8.6	Ile	2.6
Glu	14.9	Ala	10.4	Leu	5.4
Ser	5.8	Tyr	2.0	Lys	7.2
His	1.6	Met	1.2	Trp	0.1
Gly	13.3	Val	4.1	Cys	0.6
Thr	4.1	Phe	2.5	Pro	7.3

Fonte: CAZZOLA, P.; MAZZANTI, P.; KOUTTAB, N. M. Update and future perspectives of a thymic biological response modifier (thymomodulin). **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 9, n. 2, p. 195–216, 1987.

A farmacocinética de TMD foi estudada em ratos *Wistar*, cuja rápida absorção pela medula óssea, rim e fígado ocorreu logo após a injeção intraperitoneal de TMD marcada, com maior radioatividade no núcleo celular. Noutro estudo, TMD foi administrado por vias intraperitoneal, 1 mg, e oral, 5 mg, e sua atividade em induzir a expressão de antígenos de superfície em linfócitos T murinos apresentou picos entre 1 e 2 horas (CAZZOLA; MAZZANTI; KOUTTAB, 1987). Uma pesquisa encontrou pico máximo de atividade parecida com o fator tímico sérico (FTS-*like*), medida em plasma de ratos, entre 4 e 6 horas após receberem 5 mg de TMD por via oral (CALVINI; MOCCHEGIANI; FABRIS, 1985).

Diversos ensaios clínicos demonstraram resultados benéficos com TMD administrada profilática ou concomitantemente aos tratamentos convencionais, cujos resultados observados foram melhora dos sintomas clínicos em infecções, alergias, doenças malignas, e da funcionalização imunológica durante a selinidade (KOUTTAB; PRADA; CAZZOLA, 1989; MACIEL; PÉREZ, 2000; WILSON, 1999).

Suas propriedades biológicas são modular a proliferação e diferenciação de células tronco na medula óssea e estimular as funções de células T, B e NK. Induz pré-células T expressar características de células T maduras, restabelece a

proporção CD4/CD8, estimula a produção de interleucina-2, estimula a maturação das células B, a síntese de imunoglobulina (Ig) A e IgG, e a expressão de anticorpos, incrementa a secreção de citocinas pelos mononucleares, e modula o fenótipo e a maturação funcional de timócitos humanos. Todos estes atributos fazem de TMD um agente sinérgico em tratamentos infecciosos (KOUTTAB; PRADA; CAZZOLA, 1989; MACIEL; PÉREZ, 2000; WILSON, 1999).

Diante de sobressalente atividade biológica, a ação imunomoduladora de TMD em humanos foi revisada, e para isso quatro bases de dados foram utilizadas, fazendo-se a busca com os descritores *thymomodulin* e *thymic hormone* entre os anos de 1980 e 2020. Science Direct selecionou 63 artigos para a pesquisa básica e 28 para a avançada, MEDLINE/PubMed 56 e 10, Web of Science 44 e 1, e LILACS 5 e nenhum. A maioria dos estudos se repetiu nas bases e 13 artigos configuraram estudos clínicos com TMD, cujas sínteses são descritas a seguir.

Entre os anos 80 e 90 foi encontrada a maior parte dos estudos clínicos com TMD: idosos com mais de 70 anos que não tinham níveis detectáveis de FTS receberam TMD via oral em dose única e a análise de seus soros demonstrou que o TMD induziu o aparecimento de atividade semelhante ao FTS (CALSIANI; MOCHEGANI; FABRIS, 1985); crianças que receberam o extrato tiveram um aumento em células CD3 e CD4, funções neutrofílicas e IgA salivar, com redução das infecções respiratórias recorrentes (IRRs) (FIOCCHI et al., 1986).

Pacientes com rinite alérgica perene, asma brônquica e dermatite atópica tiveram redução nos níveis de IgE, na contagem de eosinófilos e na frequência de crises agudas, com melhorados sintomas clínicos após tratamento com TMD (FIOCCHI et al., 1987); resultados equivalentes para pacientes com rinite alérgica perene, com aumento de títulos séricos de IgG (MARZARI et al., 1987). Pacientes no início da infecção pelo HIV receberam TMD e tiveram um aumento de CD4 com o restabelecimento das razões CD4/CD8, e curso clínico da doença melhorado (VALESINI et al., 1986, 1987).

Um estudo com crianças com alergia alimentar manifestando dermatite atópica realizado por Cavagni et al. (1989) constatou que no grupo tratado com TMD houve um decréscimo nos níveis de IgE total e específica, e as lesões cutâneas tiveram um melhor curso, ou seja, não mudaram, comparado às lesões do grupo placebo, que só pioravam com o decorrer do tempo.

Em Bortolotti (1988) crianças com hepatite B crônica tratadas com TMD tiveram marcadores sanguíneos positivos para a infecção soro-convertidos em anticorpos específicos e maior taxa de recuperação. Na pesquisa de Ederly et al. (1988) pacientes com câncer de mama ou ginecológico que receberam TMD previamente à radioterapia tiveram taxas de leucopenia significativamente menores daquelas que não receberam; de forma semelhante também ocorreu em Kim et al. (1993).

Em Mirić et al. (1996, 1997) homens e mulheres com miocardite ou cardiomiopatia dilatada foram divididos em três grupos e acompanhados por dois anos. O primeiro grupo recebeu tratamento convencional e TMD, o segundo, tratamento convencional e interferon- α , e o terceiro, apenas o tratamento convencional. Houve melhora ventricular significativa nos dois primeiros grupos, cujo eletrocardiograma normalizou em 88% dos indivíduos.

A investigação do efeito de TMD na imunidade de indivíduos idosos (64 a 98 anos), realizada por Braga et al. (1994), encontrou um efeito restaurador na fagocitose de polimorfonucleares e na liberação de radicais oxidativos, com índices significativamente aumentados.

Foram encontradas cinco revisões sistemáticas entre os anos de 1980 e 2020 narrando investigações do efeito imunomodulador de TMD em humanos. Wilson (1999) ao revisar os últimos 20 anos de estudos clínicos com extratos tímicos relatou Fiocchi (1986, 1987), Valesini (1987), Bortolotti (1988), Kouttab (1989), Bagnato (1989) e Mirić (1996), sendo a maioria deles já elencados aqui.

Na meta-análise de Gludd e Gludd (2009), sobre hepatite viral, foi apontado que alguns imunomoduladores, entre eles o TMD do estudo de Galli et al. (1985), não demonstraram benefício a pacientes com hepatite B aguda.

Já a revisão de Schaad; Esposito e Razi (2015) reportou um estudo com TMD como estratégia alternativa para a prevenção de infecção aguda do trato respiratório (IATR), o qual pertence a revisão de Del-Rio-Navarro et al. (2012), que avaliou a segurança e a eficácia de imunoestimulantes administrados a crianças para prevenir IATRs versus placebo. Examinando esta revisão, cinco estudos com TMD foram incluídos, a seguir referidos.

Fiocchi et al. (1986), já mencionado; em Clerici et al. (1988) crianças com IATRs tratadas com TMD apresentaram recorrência 50% menor comparado ao grupo placebo; ao contrário, em Fukuda et al. (1999) o TMD não foi substancial; em

Karam-Bechara et al. (1995) crianças com bronquite recorrente tratadas com TMD tiveram recidivas significativamente diminuídas comparadas as que não receberam TMD; e de forma semelhante ocorreu em crianças no estudo de Longo et al. (1988).

A revisão de Singh; Pai, (2015) investigou os recentes avanços em agentes antioxidantes e imunomoduladores voltados para o tratamento de HIV/AIDS, e também comparou as patentes das composições medicamentosas que contivessem estes agentes, relatando duas patentes contendo TMD, WO2009082818A1 e EP2257567A1.

Winter et al. (2018) registraram a pesquisa de Miric et al. (1996) em sua revisão sobre tratamentos imunomodulatórios de miocardite linfocítica realizados entre os anos de 1950 e 2016, destacando a significância da melhora da ejeção ventricular de pacientes com miocardite tratados com TMD. O mesmo estudo de Miric et al. (1996) é relatado na revisão sistemática sobre a eficácia de imunossupressores na miocardite nos últimos 30 anos de Cheng et al. (2020).

O tratamento com timomodulina normalmente exige um tempo de uso prolongado. O QUADRO 3 relaciona a posologia e a duração do tratamento com TMD utilizados pelos pacientes dos estudos clínicos acima descritos.

QUADRO 3 – Relação de estudos clínicos com TMD como imunomodulador, entre os anos de 1980 e 2020, destacando o tempo de tratamento prolongado

(continua)

	Autor (es) do estudo	Quadro clínico	Participantes	Posologia TMD	Duração Tratamento
1	Calsini; Mocchegiani e Fabris (1985)	Níveis indetectáveis de FTS plasmático	Homens e mulheres idosos (70 anos)	80, 160, 320, 640 ou 800 mg	Dose única
2	Fiocchi et al.(1986)	IRR	Crianças e adolescentes (4-14 anos)	3 mg/kg/dia	3 meses
3	Valesini et al. (1986, 1987)	Início de HIV	Homens e mulheres	60 mg/dia	Mais de 50 dias
4	Marzari et al. (1987)	Rinite alérgica perene	Homens e mulheres	120 mg/dia	4 meses
5	Clerici et al. (1988)	IRR com 6 episódios no último ano	Crianças (4-6 anos)	60 mg 2 vezes/dia	3 meses
6	Edery et al. (1988)	Neutropenia decorrente de radioterapia (câncer mama ou ginecológico)	Mulheres	20 mg/dia IM	7 dias antes e durante a radioterapia
7	Longo et al. (1988)	IATR recorrente com mais de 1 episódio de febre por mês	Crianças (3- 9 anos)	30 mg 2 vezes/dia	4 meses
8	Cavagni et al. (1989)	Alergia alimentar manifestada em lesão cutânea	Crianças	120 mg/dia	90 dias

QUADRO 3 - Relação de estudos clínicos com TMD como imunomodulador, entre os anos de 1980 e 2020, destacando o tempo de tratamento prolongado

(conclusão)

	Autor (es) do estudo	Quadro clínico	Participantes	Posologia TMD	Duração Tratamento
9	Kim et al. (1993)	Neutropenia decorrente de quimioterapia (câncer ginecológico)	Mulheres	15 mL/dia	15 dias antes da quimioterapia
10	Mirić et al. (1996, 1997)	Doença do músculo cardíaco dilatado	Homens e mulheres	10 mg SC	3 vezes/semana
11	Braga et al. (1994)	Senilidade	Homens e mulheres	160 mg/dia	6 semanas
12	Karam-Bechara et al. (1995)	Bronquite com 6 episódios de recorrência e com 3 cursos de antibióticos	Crianças (3-12 anos)	3 mg/kg/dia	3 meses
13	Fukuda et al. (1999)	Otite aguda recorrente e amigdalite de repetição	Crianças (8 meses-7 anos)	2 mg/kg 2 vezes/dia	3 meses

Fonte: A autora

No Brasil há dois registros de medicamentos contendo TMD, Oromunil (100430612) e Leucogen (105730062), porém aquele está inativo desde 2001. O Leucogen[®] contém apenas TMD como princípio ativo e está comercializado nas formas farmacêuticas xarope e *pellets* (cápsulas), manufacturados pela Aché Laboratórios Farmacêuticos. As bulas destas apresentações informam que o xarope contém 20 mg do peptídeo por 5 mL de solução e que a cápsula contém 20 mg do peptídeo em 80 mg de extrato em pó (BRASIL, 2019).

Ainda, o xarope é indicado em pediatria como, imunoestimulante, imunomodulador e coadjuvante no tratamento de infecções das vias aéreas respiratórias, sarampo, varicela, caxumba e coqueluche, asma brônquica e alergia alimentar, e a cápsula é indicada em clínica médica como, coadjuvante no tratamento das doenças infecciosas bacterianas ou virais agudas ou recorrentes, hepatite infecciosa, asma brônquica ou herpes zoster (BRASIL, 2019).

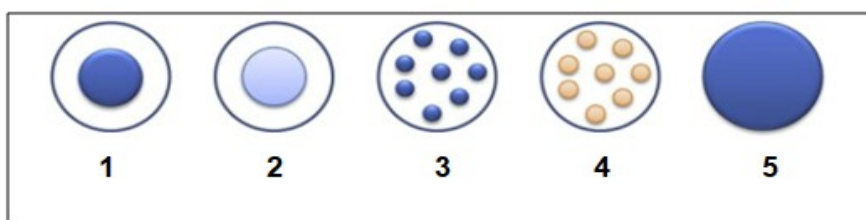
3.4 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

Sistemas de liberação modificada de fármacos são fontes inovadoras de produtos farmacêuticos comparados aos convencionais pelas vantagens em aumentar a solubilidade dos compostos ativos em meio aquoso e a estabilidade em meio fisiológico; melhorar a biodisponibilidade; reduzir os efeitos colaterais; promover a vetorização; controlar a taxa de liberação; e reduzir a posologia, o que

contribui com a adesão do paciente a terapia. Desta forma, a pesquisa na área de desenvolvimento farmacêutico vem apresentando grande progresso em entrega modificada de fármacos para várias classes medicamentosas, incluindo os peptídeos (BERNAL RODRIGUEZ et al., 2019).

Os sistemas de liberação modificada ocorrem por meio de duas técnicas, nanopartículas ou micropartículas (BATISTA et al., 2019). As micropartículas são constituídas de matrizes poliméricas biocompatíveis e biodegradáveis, de forma esférica e tamanho entre 1 e 1000 μm , onde ou o fármaco está misturado homogeneamente aos demais componentes, chamada de microesfera, ou se situa em um núcleo delimitado por outro material, chamada de microcápsula (FIGURA 4) (AHADIAN et al., 2020; BURHAN et al., 2019; DESAI; PARK, 2005; LENGYEL et al., 2019; MITHU et al., 2017).

FIGURA 4 - Formas de micropartículas poliméricas: 1) Microcápsula (núcleo sólido); 2) microcápsula (núcleo não-sólido); 3) microcápsula (domínios micro/nano sólidos); 4) microcápsula (domínios micro/nano não-sólidos); 5) Microesfera (mistura de matriz/agente encapsulado)



Fonte: CAMPOS, E. et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 8, p. 2005–2021, 2013.

As micropartículas devem alcançar os seguintes critérios para serem consideradas eficientes: alta eficiência de encapsulação, preservar a atividade do fármaco durante a encapsulação e armazenamento, serem de fácil administração no local alvo e apresentar taxa de liberação controlada para atingir um efeito terapêutico enquanto minimiza os efeitos colaterais (CAMPOS et al., 2013).

Os sistemas matriciais são um dos sistemas mais utilizados, pois se caracterizam por transportar o fármaco uniformemente disperso em nível molecular ou particulado na matriz, cujos mecanismos de liberação da substância ativa como difusão, dissolução, erosão e intumescimento, podem mudar de acordo com a formulação desenvolvida (BERNAL RODRIGUEZ et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

3.4.1 Polímeros

“Polímeros são a combinação de monômeros com propriedades de produção flexível, leve e de baixo custo” (SHAMEEM et al., 2020).

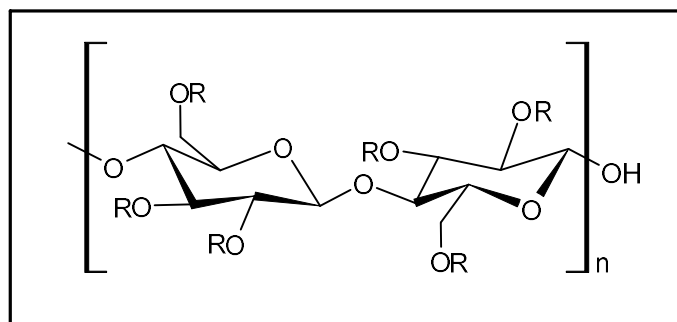
Os polímeros estão entre os excipientes farmacêuticos mais utilizados para compor as diversas formulações de liberação modificada devido à sua capacidade em fornecer liberação controlada de agentes terapêuticos em doses contínuas por um período prolongado (AGRAWAL et al., 2020; BERNAL RODRIGUEZ et al., 2019; FATOUROS, 2016; KARAVASILI; MAŠKOVÁ et al., 2020; LAYEK; MANDAL, 2020; RAROKAR et al., 2016; WU et al., 2011).

Neste aspecto, polímeros de fontes naturais e sintéticas têm sido utilizados em várias formulações de liberação controlada, na qual a seleção do polímero, ou da mistura de polímeros, adequado depende da via de administração e de como o fármaco deve ser liberado (LAYEK; MANDAL, 2020).

3.4.1.1 Hidroxipropilmetilcelulose

Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), também chamado de hipromelose, é um polímero natural, cuja molécula (FIGURA 5) de natureza não-iônica, é baseada em uma cadeia linear de polissacarídeo de celulose parcialmente *o*-metilado e *o*-(2-hidroxipropilado), obtido semi-sinteticamente pelo tratamento da celulose natural com hidróxido de sódio (MAŠKOVÁ et al., 2020).

FIGURA 5 - Estrutura química do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)



Fonte: LAYEK, B.; MANDAL, S. Natural polysaccharides for controlled delivery of oral therapeutics: a recent update. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. August 2019, p. 115617, 2020.

Nota: R: grupos radicais (R: H, CH₃ ou CH₂CH(OH)CH₃); n: quantidade de monômeros na cadeia.

Polímeros naturais, principalmente os polissacarídeos, estão sendo utilizados cada vez mais em sistemas de liberação modificada, por sua excelente biocompatibilidade, segurança, biodegradabilidade, abundância natural, baixo custo e facilidade de modificações químicas (KRESE et al., 2016; LAYEK; MANDAL, 2020).

Essa alquilação direcionada de grupos hidroxila da celulose torna o polímero hidrofílico, e dependendo do grau da substituição e da proporção entre os grupos metoxil e hidroxipropil resultam em vários tipos de HPMC com diferentes pesos moleculares, viscosidade e tamanho de partícula. Um sistema matricial que se intumescce e forma um gel em camadas é promovido pelo HPMC, no qual a taxa de liberação do fármaco na superfície do sistema é controlada. A solução de HPMC possui estabilidade em ampla faixa de pH (entre 3,0 e 11,0), a molécula não pode ser clivada por enzimas e se aplicam tanto para fármacos hidrossolúveis quanto para lipossolúveis. Tais capacidades diferenciadas explicam o amplo emprego do polímero em sistemas de liberação controlada para várias vias de administração (KRESE et al., 2016; MAŠKOVÁ et al., 2020).

Dentre as várias marcas de HPMC comercializadas está o Methocel[®] E4M Premium CR, produzido pela Companhia Química *Dow* (*Dow Chemical Company*, MI, USA), cujo grau de substituições é representado pela letra E que corresponde ao código farmacopeico 2910, aonde os dois primeiros dígitos se referem ao grupo metoxil e os dois últimos ao grupo hidroxipropil. O número 4 e a letra M indicam a viscosidade de 4.000 cP da solução a 2%, a 20°C (MAŠKOVÁ et al., 2020).

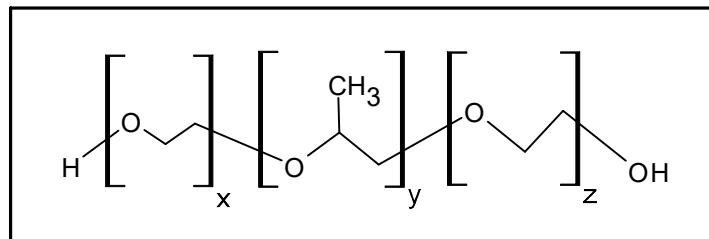
A hidratação da cadeia de HPMC é dependente da temperatura, com ponto de gelificação entre 50 e 90°C, dependendo do tipo e concentração do polímero, e influencia significativamente a formação e a estrutura do gel resultante. Soluções aquosas do polímero exibem comportamento reversível induzido por inversão térmica, ou seja, transições de soluções para gel (sol-gel), em temperaturas altas, são observadas pela turvação da solução. Isto decorre das interações hidrofóbicas entre as metoxilas do HPMC durante a desidratação (KRESE et al., 2016; MAŠKOVÁ et al., 2020).

Esta propriedade proporciona notável mucoadesividade, que é muito utilizada em gelificação *in situ*, e para tanto uma redução na substituição do grupo hidroxipropil permite o decréscimo do ponto de gelificação do HPMC próximo a temperatura do corpo humano (MAŠKOVÁ et al., 2020).

3.4.1.2 Polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno

Poli(óxido de etileno) (POE) e poli(óxido de propileno) (POP) são polímeros sintéticos que compõem o copolímero em tribloco POE-POP-POE, cuja estrutura química (FIGURA 6) possui uma cadeia hidrofóbica central e duas cadeias hidrofílicas laterais, de caráter não iônico solúvel em água, comercializado como Pluronic[®] ou poloxâmeros. Sua maior importância farmacêutica é na produção de sistema de gelificação *in situ* para a liberação de diversos tipos de medicamentos, que podem ser administrados por via tópica, oftálmica ou parenteral (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018; KAIZU; ALEXANDRIDIS, 2015; PASCHEN et al., 2021; RAROKAR; SAOJI; KHEDEKAR, 2018; ZARRINTAJ et al., 2020).

FIGURA 6 - Estrutura química de copolímero em tribloco polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (POE-POP-POE)



Fonte: ZARRINTAJ, P. et al. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 110, p. 37–67, 2020.

Nota: x, y e z são as quantidades de monômeros na cadeia.

Pela constituição monomérica, o copolímero de bloco apresenta caráter anfifílico em solução aquosa, demonstrando propriedades ativas de superfície (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018). O grupo hidrofóbico pode aumentar a transição sol-gel e, desta forma, minimizar a concentração do copolímero necessário para a formulação (RAROKAR; SAOJI; KHEDEKAR, 2018).

Por suas excelentes propriedades estabilizadoras de proteínas e bons perfis de segurança os poloxâmeros 188 são um dos surfactantes mais usados em formulações biofarmacêuticas. Aliar este copolímero ao ingrediente farmacêutico ativo, como uma proteína, proporciona a estabilização da mesma por meio da prevenção de agregação e tensões interfaciais que podem ocorrer durante muitos estágios de produção, armazenamento, envio e aplicação (GRAPENTIN et al., 2020; PASCHEN et al., 2021).

3.4.2 Métodos de Obtenção de Micropartículas

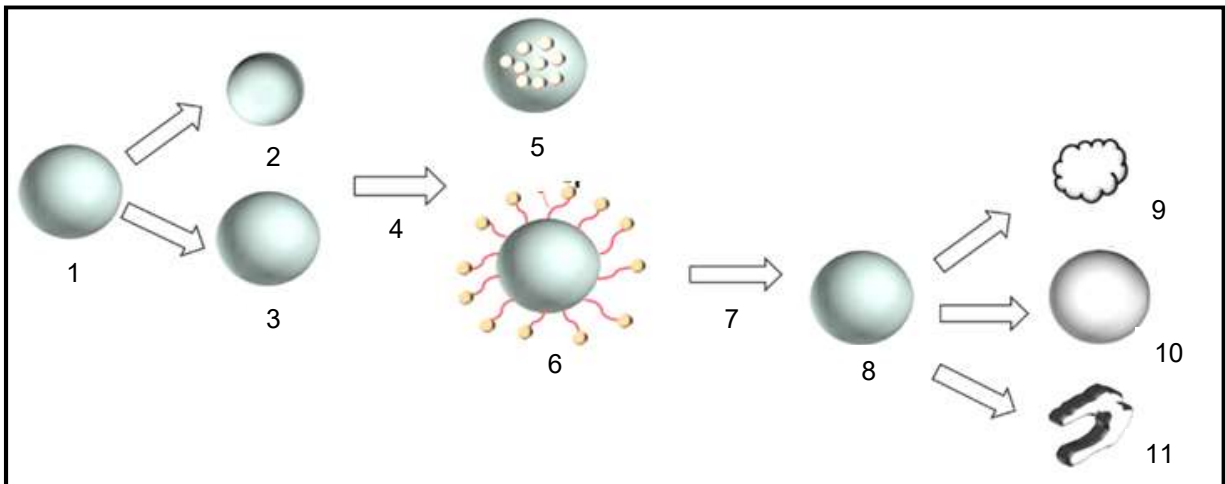
Há vários métodos para obtenção de micropartículas, e as duas técnicas de dispersão de sólidos são consideradas com melhores resultados para aumentar solubilidade em água e perfil de liberação. A primeira é denominada método de fusão, e ocorre por meio de extrusão, e a segunda é referida como método de evaporação de solventes (ASHOUR et al., 2016).

O método *spray drying*, também chamado de secagem por pulverização, corresponde à segunda técnica e consiste da transformação de um material fluido em partículas secas, por meio de um pulverizador de secagem a quente. É um processo originalmente da indústria alimentícia, mas que foi perfeitamente adaptável à produção industrial de medicamentos. É um método de primeira escolha porque é um processo contínuo, rápido, de etapa única e de escala viável (ASHOUR et al., 2016; BURHAN et al., 2019b; DESAI; PARK, 2005; MITHU et al., 2017; RATTES; OLIVEIRA, 2007).

O princípio de funcionamento do aparelho *spray dryer* ocorre a partir da alimentação líquida que é atomizada em um bico. A redução no tamanho das gotas leva a um grande aumento na área de superfície (FIGURA 7), as quais, agora pulverizadas, ao passarem pela câmara de secagem têm o solvente removido rapidamente pelo fluxo contínuo de um gás de secagem quente. Assim, formam-se partículas secas que são separadas do fluxo de gás e coletadas em um recipiente coletor (ARPAGAUS et al., 2018; WANG et al., 2021).

As micropartículas, especialmente as com polímero biodegradável, são promissoras carreadoras para a liberação de peptídeos em longo prazo, pois protegem estas biomoléculas de células ou enzimas do organismo humano, facilitam a administração, são eliminadas rapidamente *in vivo* e têm o processo de fabricação estabelecido (YE; VENKATRAMAN, 2019).

FIGURA 7 - Representação esquemática da formação das micropartículas com aumento da sua área superficial pela atomização e secagem das gotas a partir de um material fluido



Fonte: Adaptado de WANG, B. et al. A critical review of spray-dried amorphous pharmaceuticals : Synthesis , analysis and application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 594, n. October 2020, p. 120–165, 2021.

Nota: 1: gota a partir de material fluido; 2 e 3: variados tamanhos de gotas atomizadas; 4: secagem por pulverização; 5: precipitação de massa (fármaco no interior da micropartícula); 6: precipitação de massa (fármaco hidrofóbico na superfície da micropartícula); 7: formação de concha; 8: micropartícula deformada, podendo originar três tipos de deformação; 9: deformação em ondulação; 10: deformação em halo; 11: deformação em copo.

A maioria dos produtos farmacêuticos comercializados que carregam peptídeos particulados, como micropartículas, são injetáveis, por apresentarem maior estabilidade (SOUDRY-KOCHAVI et al., 2015). Mas a baixa adesão do paciente a terapia devido ao desconforto das picadas de agulha, cuja frequência e tempo de tratamento podem ser prolongados, torna as vias, oral, bucal, nasal, pulmonar, transdérmica, vaginal e retal, alternativas a parenteral, evidenciando-as como interessantes alvos para o desenvolvimento de novas tecnologias em sistemas de liberação modificada de fármaco, apesar dos desafios que elas apresentam (CHOONARA et al., 2014; MURALIDHAR et al., 2017; SOUDRY-KOCHAVI et al., 2015).

3.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO TIMOMODULINA

Nos últimos anos inúmeras pesquisas se voltam para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de peptídeos, pois são uma possibilidade promissora em contornar as susceptibilidades que estas moléculas orgânicas apresentam, por meio de nanopartículas ou de micropartículas poliméricas, que são verdadeiras portadoras de fármacos (BATISTA et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Neste aspecto, foi realizado levantamento de literatura relacionada ao timomodulina em quatro bases de dados, *Science Direct*, *Web of Science*, *Scopus* e *LILACS*, com os descritores *thymomodulin*, *thymic hormone*, *drug delivery system*, *modified release system*, *microparticles*, *spray drying* e *spray dryer*, para o período dos últimos vinte anos. Entretanto, as bases de dados não selecionaram nenhum estudo com TMD nesta área, somente estudos de liberação modificada com outros hormônios tímicos.

Considerando a ausência de artigos sobre sistemas de liberação modificada contendo TMD que demonstrem a possibilidade em reduzir a dose, a frequência e a duração do tratamento, vislumbrando novas vias de administração e a melhora na biodisponibilidade do fármaco, o presente estudo visa desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar a liberação *in vitro* de um sistema polimérico contendo TMD para o tratamento imunomodulador que possa ser utilizado como ponto de partida para o desenvolvimento de diferentes formas farmacêuticas mucoadesivas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Agitador magnético múltiplo (SP LABOR, modelo SP-10015/S, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica (UNI BLOC, modelo ATX224, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (PERKIN ELMER, modelo STA 6000, Waltham, MA, Estados Unidos da América);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21 com acessório de refletância difusa, DRS-8000, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC, modelo GENESYS 10S UV-VIS, Waltham, MA, Estados Unidos da América).
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 IonCoater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG) (TESCAN, modelo MIRA 3, Brno, República Checa);
- pHmetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- *Spray Dryer* (LABMAQ, modelo MSD 0.5, São Paulo, Brasil);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (PERKIN ELMER, modelo STA 6000, Waltham, MA, Estados Unidos da América);
- Sistema de ultra purificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos da América);

4.2 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

4.2.1 Fármaco

- Timomodulina – Pureza: 11,42% (expressa em teor de nitrogênio, cuja especificação é de 7 a 15%), lote: 1902001202, Galena, São Paulo, Brasil.

4.2.2 Polímeros

- Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (METHOCEL™ E4M Premium, \overline{Mw} 86.000 g.mol⁻¹) - SIGMA-ALDRICH, São Paulo, Brasil;
- Polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (Poloxâmero 188, \overline{Mw} 8.400 g.mol⁻¹) - SIGMA-ALDRICH, São Paulo, Brasil;

4.2.3 Demais Reagentes

- Brometo de Potássio grau espectroscópico (KBr) - SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Estados Unidos da América;
- Carbonato de sódio anidro PA (Na₂CO₃) - Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, Brasil;
- Citrato de Sódio dihidratado PA (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) - SYNTH, São Paulo, Brasil;
- Fosfato de Sódio anidro monobásico PA (NaH₂PO₄) - REATEC, Colombo, Brasil;
- Fosfato de Sódio bibásico heptahidratado U.S.P. (Na₂HPO₄.7H₂O) - SYNTH, São Paulo, Brasil;
- Hidróxido de Sódio PA (NaOH) - VETEC QUÍMICA FINA, Duque de Caxias, Brasil;
- Sulfato de cobre pentahidratado PA (CuSO₄.5H₂O) - SYNTH, São Paulo, Brasil;

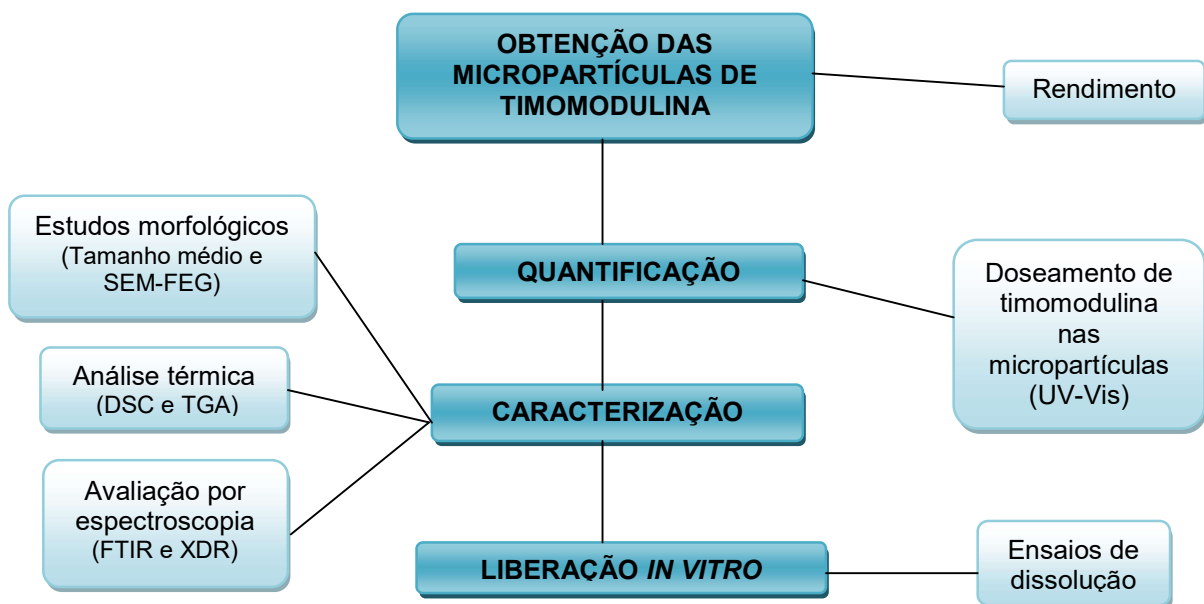
4.2.4 Filtros

- Chromafil® O-45/15 MS, filtro hidrofílico, 0,45 µm de abertura dos poros, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha;
- Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,22 µm de abertura dos poros, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos do presente trabalho tiveram seu início com a síntese das micropartículas poliméricas. A seguir, o timomodulina incorporado nas partículas foi quantificado por meio de espectrofotometria no visível (UV-Vis), sob método compendial validado, aonde a eficiência de encapsulação de TMD foi avaliada. Sequencialmente, as formulações foram caracterizadas por métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. O mecanismo de liberação *in vitro* do TMD das micropartículas poliméricas foi estudado a partir do ensaio de dissolução. As etapas das análises estão esquematizadas no fluxograma da FIGURA 8.

FIGURA 8 - Fluxograma das etapas de pesquisa



Fonte: A autora

4.4 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA

A obtenção das micropartículas poliméricas contendo TMD foi conduzida pelo método de secagem por aspersão, também chamado de secagem por pulverização ou *spray drying* (BURHAN et al., 2019; CHO et al., 2015; MU et al., 2005; RATTES; OLIVEIRA, 2007; WANG et al., 2021).

A partir do fármaco e dos polímeros foram desenvolvidas as formulações de micropartículas denominadas MT (micropartículas preparadas com HPMC e poloxâmero 188 contendo ou não TMD). As concentrações teóricas de timomodulina utilizadas foram 5 (MT5), 10 (MT10) e 20% (MT20), indicadas na TABELA 1.

TABELA 1 - Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo timomodulina (MT5, MT10 e MT20) ou não (MT0)

Formulação	Composição			
	TMD (g)	HPMC (g)	Poloxâmero 188 (g)	Solução aquosa (mL)
MT0	-	2,40	0,60	300
MT5	0,15	2,28	0,57	300
MT10	0,30	2,16	0,54	300
MT20	0,60	1,92	0,48	300

Fonte: A autora

Cada formulação foi preparada da seguinte forma: os polímeros foram solvatados em água por agitação magnética (800 rev.min⁻¹), aonde o HPMC foi adicionado aos poucos em 200 mL de água a 80°C e agitado por 2 horas, e o poloxâmero 188 dissolvido em 90 mL de água a 8°C e adicionado aos poucos na solução de HPMC arrefecida, sob agitação magnética. Uma solução final de polímeros de pH 6,0 foi obtida de acordo com a literatura (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018) e a mesma mantida entre 2 e 8°C *overnight* para completa hidratação.

Na manhã subsequente, o TMD foi dissolvido em 10 mL de água e adicionado aos poucos à solução de polímeros sob agitação magnética (800 rev.min⁻¹) por 1 h. Transcorrido esse período, as formulações foram conduzidas à secagem por aspersão, utilizando o *Spray Dryer* LABMAQ, modelo MSD 0.5,

operando nas seguintes condições: diâmetro do atomizador: 0,82 mm, pressão de atomização: 3 kgf.cm⁻², fluxo do ar de secagem: 50 L.min⁻¹, fluxo de alimentação da formulação em secagem: 0,33.h⁻¹, temperatura de entrada: 135 ± 5°C e temperatura de saída: 60 ± 5°C. Para fins comparativos, foi preparada uma formulação de micropartículas poliméricas sem a adição do fármaco (MT0) como controle negativo, e todas as formulações foram preparadas em triplicata e protegidas da luz.

4.4.1 Determinação do Rendimento do Pó

O rendimento da produção das micropartículas poliméricas contendo o TMD pelo método *spray drying* foi calculado pela equação 1 (BURHAN et al., 2019):

$$\text{Rendimento do pó} = \frac{\text{massa de pó no final do processo}}{\text{massa de pó inicial em solução}} \times 100 \quad (1)$$

4.4.2 Mistura Física

A mistura física (MF) entre os polímeros utilizados e o fármaco foi preparada para uma caracterização comparativa na proporção, em massa, de 1:1:1 (TMD:HPMC:Poloxâmero 188).

4.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE TIMOMODULINA INCORPORADA NAS FORMULAÇÕES PELO MÉTODO DE LOWRY

4.5.1 Equipamentos e Condições Espectrofotométricas

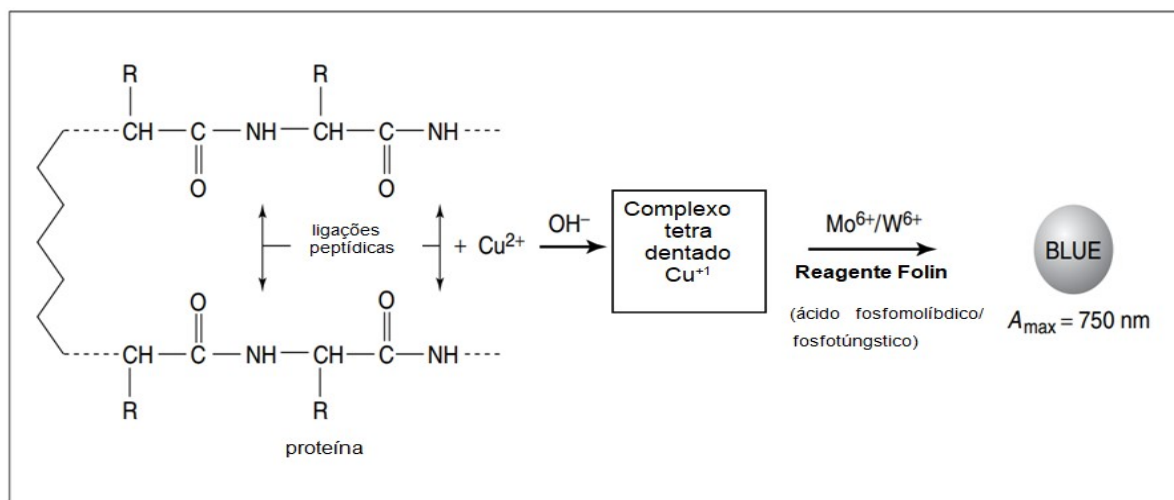
As análises colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e no visível, modelo GENESYS 10S UV-Vis (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, Estados Unidos da América), que opera com cubeta de quartzo entre 190 nm e 1100 nm, com detector de fotodiodos *Dual Silicon*, temperatura de aproximadamente 25°C. O comprimento de onda utilizado foi 750 nm, indicado pelo método colorimétrico eleito.

4.5.2 Método Analítico Colorimétrico

O TMD incorporado nas micropartículas poliméricas foi determinado pelo método de Lowry com pequenas modificações, cuja adaptação foi validada por Santos (2012). O método de Lowry (LOWRY et al., 1951) é um método compendial, cuja descrição consta no método 2, da seção determinação de proteínas totais, da farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019), e também em protocolos como o de Krohn (2002), se tratando de um consolidado ensaio de quantificação por meio da espectrofotometria de absorção no visível.

O método de Lowry é um dos ensaios mais utilizados para a determinação de proteína total sendo extensivo a peptídeos (CHUTIPONGTANATE et al., 2012; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998), aonde o princípio se baseia numa solução contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença do catalisador cobre (II) produzindo um composto (complexo tetra dentado Cu^{+1}) com absorção máxima em 750 nm (FIGURA 9). A principal vantagem deste método é sua alta sensibilidade, sendo o de escolha para amostras com baixas concentrações de proteínas, dentro da faixa de 1 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ (KROHN, 2002; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

FIGURA 9 - Esquema da reação química entre os reagentes e as ligações peptídicas para o ensaio de proteína pelo Método de Lowry



Fonte: Adaptado de KROHN, R. I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. A.3H.1-A.3H.28, 2002.

As soluções que o método exige são quatro: reagente A, constituído pela solução de Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1 N; reagente B, solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a

0,5% e citrato de sódio 1%; reagente C, preparado imediatamente antes do uso, composto pela mistura de 50 mL do reagente A + 1 mL do reagente B; reagente D, reagente de Folin Ciocalteu diluído com água purificada na proporção 1:1 (KROHN, 2002).

O ensaio original utiliza 5 mL do reagente C e 0,5 mL do reagente D para cada 1 mL de amostra, entretanto, este trabalho utilizou 2 mL e 0,2 mL respectivamente, para cada 1 mL de amostra, alteração validada por Santos (2012), otimizando tempo e reagentes.

4.5.3 Quantificação de TMD nas Formulações

Para quantificar o TMD nas formulações, uma curva de calibração foi construída a partir de curvas analíticas em triplicata com sete pontos de concentrações diferentes (200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A TABELA 2 resume as diluições preparadas da solução-mãe 1 mg.mL^{-1} de TMD para a construção da curva. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados, a análise de regressão linear ocorreu pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por Análise de Variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

TABELA 2 - Preparo das amostras a partir da solução-mãe 1 mg.mL^{-1} de TMD para a construção da curva de calibração

Amostra*	TMD ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota SM (μL)	Volume de Água (μL)	Reagente C (mL)	Reagente D (mL)
Branco	0	0	1000	2	0,2
1	200	200	800	2	0,2
2	300	300	700	2	0,2
3	400	400	600	2	0,2
4	500	500	500	2	0,2
5	600	600	400	2	0,2
6	700	700	300	2	0,2
7	800	800	200	2	0,2

Fonte: A autora

Nota: *Média (n=3); TMD: timomodulina; SM: solução-mãe.

O método de interpolação na curva de calibração foi empregado para mensurar o TMD em MT5, MT10 e MT20 com a concentração teórica do fármaco de

5 mg. As amostras foram solubilizadas em água purificada, ensaiadas, duplamente filtradas, com chromafil® O-45/15 MS, filtro hidrofílico, 0,45 µm de abertura dos poros e chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,22 µm de abertura dos poros, e lidas por espectrofotômetro. A MT0 foi utilizada como branco e a concentração real de TMD contida em cada amostra foi calculada por meio da equação da reta.

4.5.3.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulação

Com os resultados obtidos na quantificação de TMD, a eficiência de encapsulação (EE%) para MT5, MT10 e MT20 foi calculada a partir da razão entre a concentração do fármaco obtida no final do processo *spray-drying* (carga real do fármaco) e a concentração do fármaco em solução no início do processo (carga teórica de fármaco), segundo a equação 2 (MITHU et al., 2017). O desvio padrão foi calculado.

$$EE \% = \left(\frac{\text{Carga real de fármaco}}{\text{Carga teórica de fármaco}} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA

4.6.1 Análises Morfológicas e de Superfície

4.6.1.1 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (*Scanning Electron Microscope with emission of electrons by a Field Emission Gun – SEM-FEG*)

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG-TESCAN, modelo MIRA 3, Brno, República Checa). As amostras foram depositadas sobre o *stub* polido e recobertas com ouro usando o equipamento de recobrimento (QUORUM Technologies Ltda, modelo SC7620, East Sussex, BN8 6BN, Reino Unido), durante 1 minuto e 10 mA. Durante a análise foram empregadas voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV e registradas por meio da utilização de software específico.

4.6.1.2 Determinação do tamanho médio

O tamanho médio de partícula foi determinado por análise estatística das micropartículas nas eletromicrografias obtidas pela SEM-FEG da MT5, MT10 e MT20 utilizando o *software ImageJ*, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde Mental (*National Institute of Mental Health*, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América) (RASBAND, 2010). Os dados obtidos pelo *ImageJ* foram plotados pelo *software Origin*[®].

4.6.1.3 Análise por difração de raios-X (*X Ray Diffraction* – XRD)

O timomodulina puro, os polímeros puros, a mistura física e as micropartículas poliméricas contendo TMD foram examinadas em difratômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão), scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 3° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.6.2 Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR)

As micropartículas poliméricas contendo TMD, o TMD e os polímeros puros, e a mistura física foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige 21 (SHIMADZU, Quioto, Japão), na faixa de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e $32 \text{ scan} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.6.3 Análise Térmica

4.6.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC)

As amostras foram colocadas em célula calorimétrica de alumina. O instrumento utilizado foi o STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados

Unidos da América) calibrado usando índio (In; P.F.= 156,6°C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão. As amostras foram aquecidas a uma taxa $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, de 20 a 600°C , sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

4.6.3.2 Análise termogravimétrica (*Thermogravimetric analysis* – TG)

A análise termogravimétrica foi realizada em equipamento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos da América), utilizando célula calorimétrica de alumina, onde as amostras foram aquecidas a uma taxa constante de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, de 20 a 600°C , sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

4.7 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados para as micropartículas MT10 e MT20, com quantidade correspondente a 50 mg de fármaco, por meio de teste de dissolução, método 2 da Farmacopeia Brasileira (2019), em dissolutor em cubas utilizando o aparato pá (NOVA ÉTICA, modelo 299-6ATTs, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil).

O meio de dissolução utilizado foi tampão fosfato pH 6,8 a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sob agitação magnética contínua de 50 rpm, no volume de 200 mL. Alíquotas de 2 mL do meio de liberação foram retiradas com a reposição do meio em igual volume pelo período de 3 h, nos intervalos de tempo de 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos. As amostras foram ensaiadas pelo método de Lowry adaptado (SANTOS, 2012) e a quantidade de TMD liberada determinada por meio da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro na região do visível (UV-Vis), em 750 nm.

As absorbâncias encontradas foram aplicadas na equação da reta, derivada da curva de calibração previamente construída ($200 \text{ a } 800 \mu\text{g.mL}^{-1}$), obtendo-se as concentrações de TMD para cada intervalo de tempo. As análises foram realizadas em triplicata, mantendo-se as condições *sink*.

Os gráficos representando os perfis de liberação foram obtidos plotando-se a porcentagem corrigida de TMD liberada em função do tempo. A eficiência de dissolução (ED) foi calculada por meio da equação 3 (SARABU et al., 2020).

$$ED = \frac{\left(\int_0^t y \times dt\right)}{y_{100} \times t} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

ED é a eficiência de dissolução;

$\int_0^t y \times dt$ é a área sob a curva de dissolução em função do tempo;

$y_{100} \times t$ é a área total do retângulo definido por 100% de dissolução e pelo tempo limite do ensaio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIMOMODULINA

As soluções aquosas poliméricas contendo ou não o TMD apresentaram, logo após o seu preparo, valores de pH entre 6,7 e 7,0 (TABELA 3), estando compatível com a faixa de pH do fármaco.

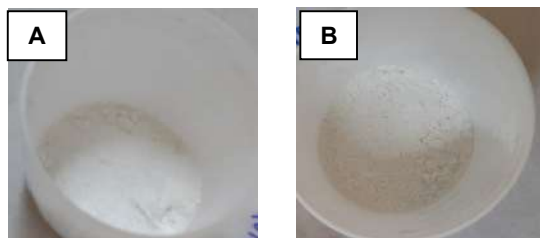
TABELA 3 - Valores de pH das soluções poliméricas contendo (MT5, MT10 e MT20) ou não (MT0) timomodulina

Formulação	MT0	MT5	MT10	MT20
pH	7,0	7,0	6,8	6,7

Fonte: A autora

As micropartículas de hidroxipropilmetilcelulose e poloxâmero 188 (MT) contendo timomodulina 5, 10 e 20%, MT5, MT10 e MT20 respectivamente, e as micropartículas controle negativo, MT0, foram obtidas com êxito pelo método *spray-drying*. Após o processo de secagem por aspersão, as micropartículas das quatro formulações se apresentaram com aspecto pó seco esbranquiçado como mostra a FIGURA 10.

FIGURA 10 - Aspecto visual macroscópico das micropartículas poliméricas obtidas por *spray-drying* MT0(A) e MT20(B)



Fonte: A autora

A secagem por pulverização é um método útil e amplamente aplicado para preparar partículas de proteína e peptídeo em pó, onde micropartículas e nanopartículas podem ser formadas com maior controle sobre o tamanho da partícula, morfologia e densidade do pó (CHO et al., 2015). Apesar de uma etapa

ocorrer em alta temperatura, o solvente rapidamente evaporado resulta em partículas resfriadas, o que torna o método, em condições ideais, preferível ao se micronizar macromoléculas biológicas sensíveis ao calor, impedindo a sua degradação (HAGGAG; FAHEEM, 2015; STÅHL et al., 2002).

Atualmente, dentre os vários estudos que desenvolveram sistemas de liberação modificada de peptídeos em matriz polimérica, o de Salvioni et al. (2016) utilizou o HPMC, além de outros polímeros, em tecnologia de liberação de três camadas obtendo sucesso na administração oral de insulina colônica em ratos diabéticos. D'Souza et al. (2015) também utilizaram HPMC e outros polímeros para obter micropartículas contendo insulina, por meio do *spray-drying*, as quais gastroprotegeram o fármaco, ocorrendo eficaz atividade hipoglicêmica em ratos, quase comparável à insulina administrada por injeção subcutânea.

Ainda, nanopartículas (NPs) contendo exenatida foram microencapsuladas em HPMC e Eudragit L usando o *spray-drying* para a administração oral em ratos, e apesar da pouca melhora na biodisponibilidade, pela incapacidade das NPs em reter a exenatida, a investigação sobre microencapsular as NPs para promover a passagem destas através dos enterócitos foi evidenciada, demonstrando não ser apenas um revestimento protetor adicional (SOUDRY-KOCHAVI et al., 2015).

Além destes exemplos de estudos, muitos produtos farmacêuticos também desenvolvidos a partir de micropartículas poliméricas contendo peptídeos já foram registrados. Alguns deles estão no mercado desde os anos 90, sendo que a maioria das formulações são suspensões injetáveis, de micropartículas ou implantes de polímero, de liberação lenta. O QUADRO 4 elenca alguns destes produtos, os quais utilizam o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) como polímero (LEWIS; RICHARD, 2015).

QUADRO 4 - Exemplos de produtos farmacêuticos baseados em peptídeos carregados por sistema polimérico

(continua)

	NOME COMERCIAL	SUBSTÂNCIA ATIVA	INDICAÇÃO
1	Copaxone®	Acetato de glatirâmero	Imunomodulador para esclerose múltipla
2	Lupron® Depot	Leuprolida	Hormônio para câncer de próstata
3	Velcade®	Bortezomibe	Antineoplásico utilizado no mieloma múltiplo
4	Sandostatin® LAR	Octreotida	Tratamento da acromegalia
5	Zoladex®	Goserelina	Tratamento de câncer de próstata
6	Byetta®	Exenatida	Tratamento do diabetes tipo 2

QUADRO 4 - Exemplos de produtos farmacêuticos baseados em peptídeos carregados por sistema polimérico

(conclusão)

	NOME COMERCIAL	SUBSTÂNCIA ATIVA	INDICAÇÃO
7	Decapeptyl®	Triptorrelina	Tratamento de câncer de próstata
8	Somatuline®	Lanreotide	Tratamento da acromegalia;
9	Supprelin®	Histrelina	Tratamento da puberdade precoce
10	Miacalcin®	Calcitonina	Tratamento da osteoporose
11	Fortical®	Calcitonina	Tratamento da osteoporose
12	Suprefact®	Buserelina	Tratamento da endometriose
13	Synarel®	Nafarelina	Tratamento da endometriose

Fonte: Adaptado de LEWIS, A. L.; RICHARD, J. Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 2, p. 149–163, 2015.

Entretanto, como descrito na seção sistemas de liberação modificada contendo TMD, não há literatura científica investigando a vantagem ou não de tais sistemas para este peptídeo imunomodulador, mas resultados expressivos de pesquisas inovadoras com outros hormônios tímicos sinalizam a possibilidade em desenvolver novas tecnologias com este fármaco. A seguir, alguns estudos desenvolvidos em tais sistemas com hormônios tímicos em que foram observados aumento da biodisponibilidade e melhora clínica dos animais.

Ti et al. (2015) demonstraram que timosina $\beta 4$, um fator angiogênico, encapsulada em estruturas de esponja (*scaffold*) de colágeno-quitosana, produzidas pelo método de *freeze-drying* (liofilização), aplicadas topicamente, melhorou a cicatrização de feridas cutâneas diabéticas de ratos, com reepitelização mais rápida, melhor reorganização dérmica e maior vascularização da ferida.

Ainda, Jin et al. (2011) revestiram NPs de poli(butil cianoacrilato) contendo timopentina (TP5) com quitosana ou conjugado de quitosana-glutationa, usando polimerização em emulsão otimizada para a administração oral em ratos com disfunção imunológica, ocorrendo aumento nas contagens de CD3+, CD4+ e CD8+, sugerindo que o sistema melhora a biodisponibilidade oral de peptídeos hidrofílicos.

Peng et al. (2018) desenvolveram filmes sanduíche implantáveis de poli(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) contendo TP5 (PHBHHx), cuja liberação *in vitro* revelou quase nenhuma liberação de explosão, o tempo de liberação *in vivo* foi prolongado para 42 dias e a farmacodinâmica demonstrou que os filmes aumentaram significativamente as taxas de sobrevivência em um modelo imunossupressor de rato e valores CD4/CD8 restabelecidos, apontando que os filmes de PHBHHx sanduíche mostram excelente potencial como sistema de liberação sustentada para peptídeo hidrofílico.

Neste sentido, as concentrações de TMD utilizadas nas formulações do presente estudo foram selecionadas a fim de se obter e caracterizar micropartículas poliméricas desenvolvidas a partir dos polímeros HPMC e poloxâmero 188 com o propósito de investigar a promoção da liberação modificada deste sistema mucoadesivo, o que acarretaria em uma melhora na biodisponibilidade, e possível redução das doses e tempo de tratamento deste imunomodulador, além de propiciar vias de administração alternativas a via parenteral, como por exemplo, a via nasal.

5.1.1 Determinação do Rendimento do Pó

O rendimento dos pós, obtidos para as três formulações de micropartículas poliméricas contendo TMD (MT5, MT10 e MT20) por meio do método *spray drying*, foi aumentando de acordo com o aumento da concentração do fármaco, entretanto os valores médios foram baixos, como mostra a TABELA 4:

TABELA 4 - Rendimento de pó das micropartículas poliméricas contendo TMD obtidas pelo método *spray drying*

Formulação	Rendimento* (%)
MT5	14,03±1,42
MT10	18,12±3,21
MT20	21,12±0,85

Fonte: A autora

Nota: *Média (n= 3) ±desvio padrão.

De fato a literatura relata baixos rendimentos para partículas desta natureza, ou seja, para micropartículas poliméricas provenientes do método *spray drying* resultantes de investigação em escala experimental (BURHAN et al., 2019).

“A produtividade é a razão entre a taxa de fluxo de alimentação e a taxa de secagem”, os quais dependem diretamente da temperatura de entrada de secagem, em que uma temperatura de entrada mais elevada aumenta a taxa de secagem, o que aumenta a produtividade do pó e a porcentagem de rendimento. Contudo, o aumento da taxa de secagem também influencia fortemente o conteúdo de umidade final e a densidade aparente. A temperatura do ciclone, onde as partículas de pó são separadas do ar úmido e depositadas no fundo do ciclone, é reconhecida como

temperatura do ar de saída, sendo o parâmetro mais importante método *spray drying*, que é um indicativo da velocidade de secagem (SHISHIR; CHEN, 2017).

A partir disto, fica evidente que o baixo rendimento das MTs sofreu o impacto dos parâmetros do processo, principalmente da temperatura, além da deposição de pó no ciclone e demais partes do aparelho, contribuindo com a perda no processo. Entretanto, a transposição do método de pulverização a seco para a escala industrial resulta, normalmente, em rendimentos apropriados (SHISHIR; CHEN, 2017; WANG et al., 2021).

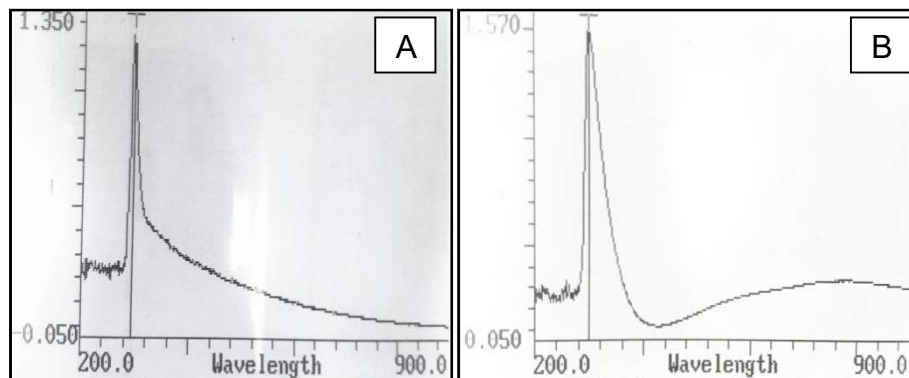
5.2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE TIMOMODULINA INCORPORADA NAS FORMULAÇÕES PELO MÉTODO DE LOWRY

Para quantificar o TMD foi aplicado o método de Lowry adaptado e validado por Santos (2012), que apesar de relatar algumas substâncias interferentes, como polissacarídeos, na determinação e quantificação de proteínas e peptídeos, é um método seletivo devido a sua alta sensibilidade (CHUTIPONGTANATE et al., 2012; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). Como o HPMC, um dos polímeros que compôs a formulação MT, é um polissacarídeo, foram realizadas varreduras comparativas entre a MT0, contendo apenas os polímeros, e a MT5, contendo fármaco e polímeros, de modo a investigar a possibilidade de interferência destes.

A MT5 foi eleita para comparação com MT0 por ser a formulação contendo o TMD que apresenta maior concentração de polímeros (95%) e, por conseguinte a formulação com a concentração de polímeros mais próxima da MT0 (100%). Desse modo, as duas soluções foram preparadas a 10 mg.mL^{-1} de micropartículas, submetidas ao método e lidas por espectrofotômetro entre 200 e 900 nm.

A FIGURA 11 ilustra a comparação entre os espectros obtidos para as duas soluções, aonde A é a varredura da solução MT0, a qual apresentou espectro com pico de absorção apenas em 299 nm, e B é a varredura da solução MT5, que demonstrou um espectro com absorção máxima em dois comprimentos de onda, 299 nm e 750 nm, confirmando que os reagentes do método formaram o complexo tetra dentado Cu^{+1} apenas com o TMD presente somente na formulação MT5, cuja absorção ocorreu em 750 nm.

FIGURA 11 - Varreduras comparativas de soluções a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de micropartículas ensaiadas pelo método de Lowry, MT0 (A) com pico de absorção em 299 nm e MT5 (B) em 299 e 750 nm

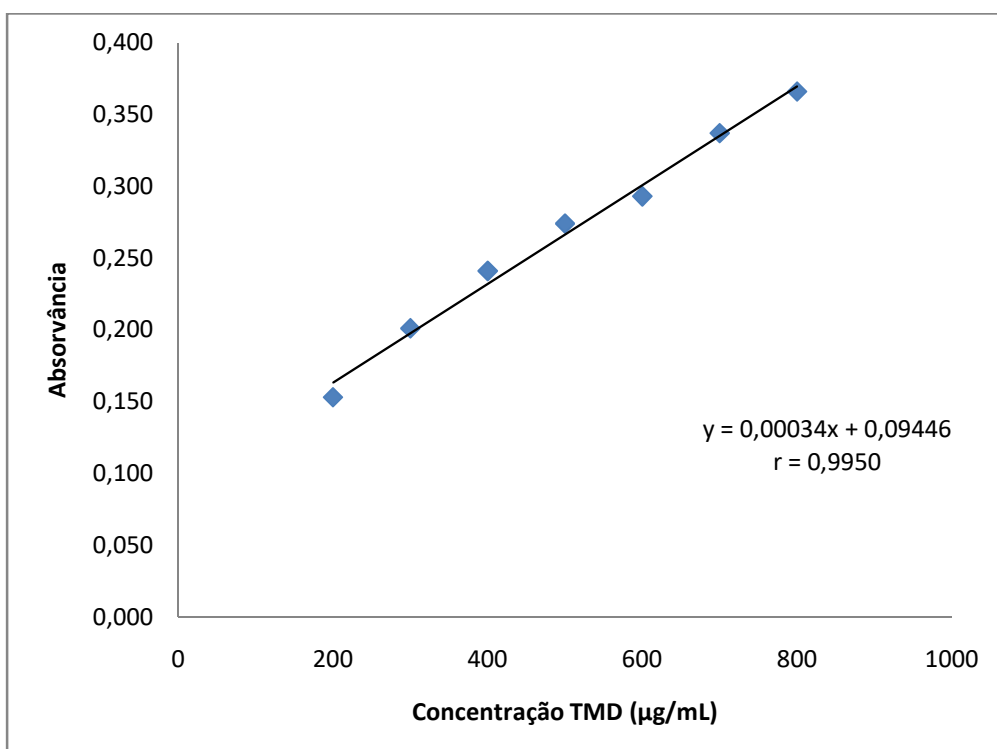


Fonte: A autora

5.2.1 Curva de Calibração

A curva de calibração ilustrada na FIGURA 12 demonstra a linearidade do método, que é a "capacidade do mesmo em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra", dentro de uma faixa de trabalho definida (BRASIL, 2017).

FIGURA 12 - Representação gráfica da curva analítica média para a determinação de TMD, obtida por espectrofotometria no UV-Vis ($\lambda = 750 \text{ nm}$)



Fonte: A autora

Por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação (r), sendo r indicador da qualidade da regressão linear obtida, devendo ser maior ou igual a 0,990, e quanto mais próximo de 1 representa menor dispersão entre os pontos e maior segurança dos resultados (BRASIL, 2017).

A linearidade foi obtida com a curva analítica média no intervalo de 200 a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtendo-se a equação da reta $y = 0,00034x + 0,09446$, onde y é a absorvância e x é a concentração da solução padrão em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados revelaram um coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 e coeficiente angular diferente de zero ($p < 0,05$).

A RDC N° 166/17 orienta que o valor do coeficiente angular deve ser significativamente maior que zero, pois ele representa a proporcionalidade entre a variável independente (respostas analíticas) e a variável dependente. Aqui, o coeficiente foi 0,00034, contudo, também são observados na literatura baixos valores deste coeficiente para polipeptídeos devido a variabilidade dos tamanhos das moléculas e dos grupos cromóforos (aminoácidos aromáticos) neles contidos, e apesar de significativo intervalo entre as concentrações da faixa dinâmica o aumento proporcional das absorvâncias foi discreto (CHUTIPONGTANATE et al., 2012).

5.2.2 Eficiência de Encapsulação

Após as quantificações de TMD nas micropartículas poliméricas MT5, MT10 e MT20, a eficiência de encapsulação (EE) foi calculada por meio da equação 2, cujos valores obtidos estão resumidos na TABELA 5.

TABELA 5 - Concentração de TMD (%) incorporado nas micropartículas compostas por HPMC e poloxâmero 188, e eficiência de encapsulação (EE %)

Formulação	Concentração teórica de TMD (%)	EE* (%)
MT5	5	98,6 \pm 2,36
MT10	10	94,5 \pm 2,71
MT20	20	84,4 \pm 0,61

Fonte: A autora

Nota: *Média (n= 3) \pm desvio padrão.

Todas as formulações preparadas pelo método *spray drying* apresentaram valores entre 84,4 e 98,6%, com baixos valores de desvio padrão, em conformidade com a faixa permitida pela RDC Nº 166/2017 (BRASIL, 2017). Isso se deve ao método empregado no preparo das MT ser adequado a macromoléculas sensíveis a temperatura como fármacos peptídicos, preservando-as da degradação e otimizando a encapsulação nas micropartículas.

A eficiência de encapsulação encontrada em outros hormônios tímicos fornece alusão a EE obtida para o fármaco em investigação, o timomodulina. Microesferas entéricas carregadas com timosina para administração oral, preparadas por técnica de evaporação de solvente de emulsão óleo em óleo, alcançaram EE progressiva para timosina, entre 44 e 84,8%, conforme a concentração de polímero foi aumentada de 1,5 para 6% (YANG et al., 2005). No presente trabalho o mesmo ocorreu com o TMD, a formulação de menor concentração de fármaco (MT5) demonstrou maior EE, e à medida que a concentração de TMD aumentou a EE diminuiu.

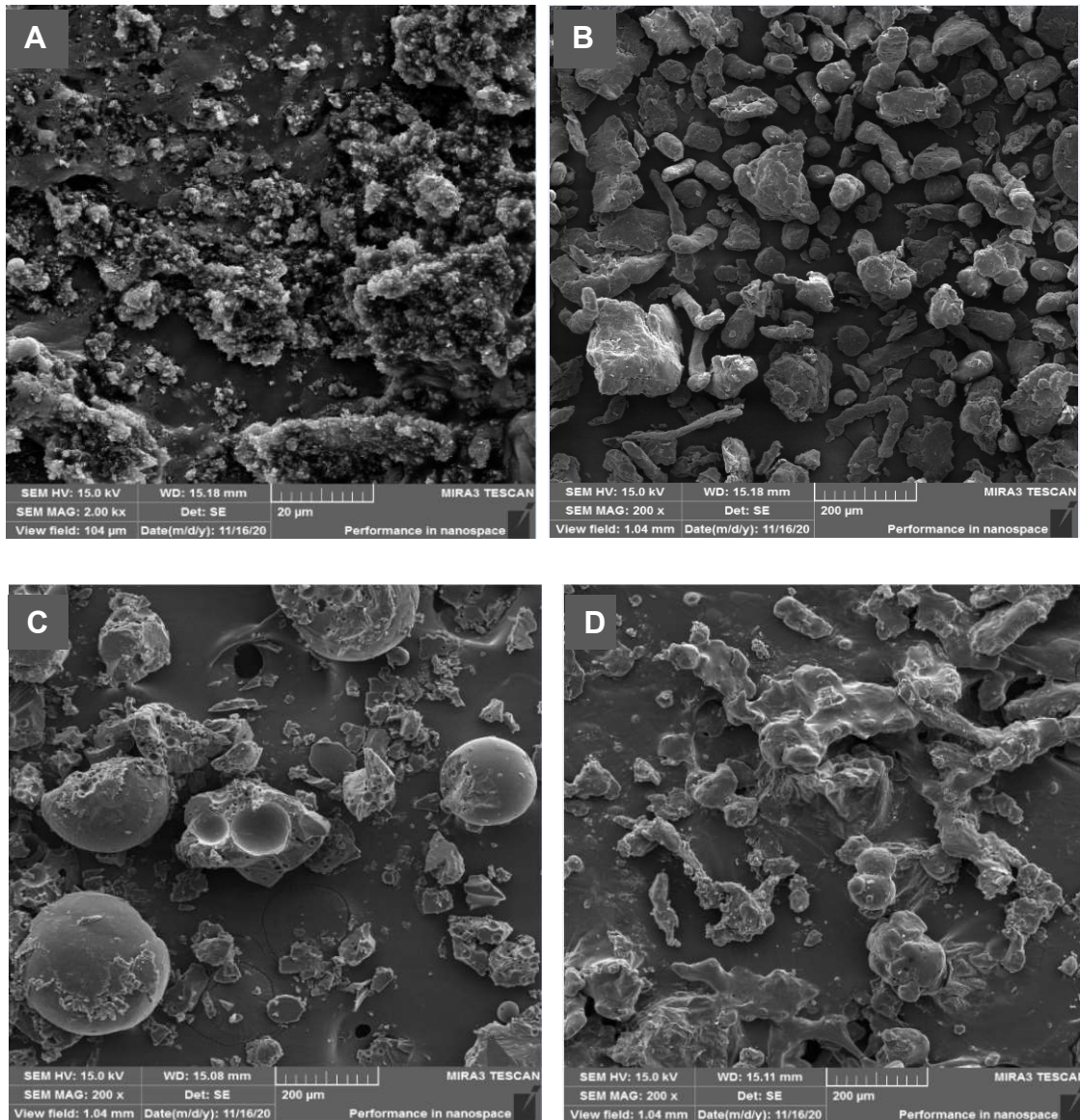
Isso decorre do fato de que quanto maior a concentração e massa molar do polímero maior é a viscosidade da solução, a qual submetida ao *spray dryer* impede a força mecânica de quebrar as gotas em gotículas, resultando em partículas de maior tamanho, o que confere maior capacidade da matriz em aprisionar o fármaco e alongamento da distância de difusão do fármaco (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MAŠKOVÁ et al., 2020; RANGA RAO; PADMALATHA DEVI, 1988; YANG et al., 2005; WANG et al., 2021).

5.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E DE SUPERFÍCIE

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão por Efeito de Campo (MEV-FEG)

As eletromicrografias obtidas por MEV-FEG, com aumento de 2.000 vezes para o fármaco puro e de 200 vezes para os polímeros e para a mistura física (TMD:HPMC:Poloxâmero 188), estão indicadas na FIGURA 13. O TMD puro se apresentou com aspecto amorfo, o HPMC e o poloxâmero 188 puros com aglomerados amorfos de superfície irregular, assim como a mistura física (MF).

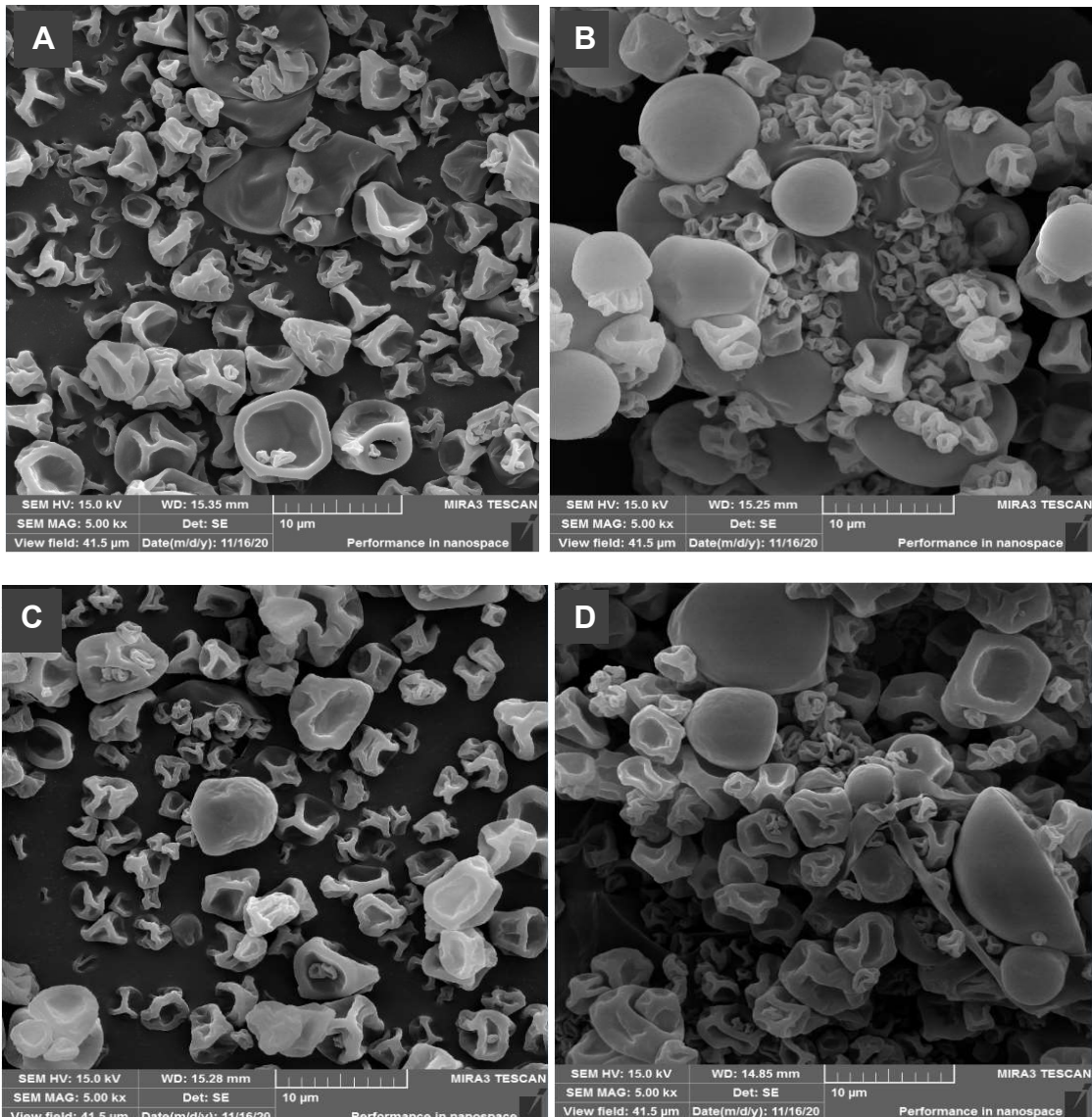
FIGURA 13 – Eletromicrografias revelando aspecto amorfo e irregular dos insumos puros e da MF, em aumento de 200 a 2.000 x. TMD (A), HPMC (B), poloxâmero 188 (C) e MF(D)



Fonte: Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU)– UEPG, 2020.

Já as eletromicrografias das micropartículas contendo ou não timomodulina (MT) foram obtidas com aumento de 5.000 vezes, indicadas na FIGURA 14, a qual revelou aglomerados de micropartículas com formato distorcido, achatado e com rugosidades e concavidades na superfície, presentes em todas as formulações (MT0, MT5, MT10 e MT20), exceto as MT5 e MT20 que também formaram micropartículas esféricas. Apesar da variação da concentração do fármaco nas MT as estruturas se apresentaram morfológicamente similares, não sendo observada a presença de substâncias amorfas na superfície das micropartículas.

FIGURA 14 – Eletromicrografias em aumento de 5.000 x revelando morfologias esférica e/ou côncava de superfície rugosa e/ou irregular das micropartículas poliméricas. MT0 (A), MT5 (B), MT10 (C) e MT20 (D)



Fonte: Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) – UEPG, 2020.

As micropartículas formadas por meio do método *spray drying* geralmente são esféricas de diversos tamanhos (SOSNIK; SEREMETA, 2015). Entretanto, também podem formar micropartículas côncavas como as encontradas nas morfologias das MT, fenômeno decorrente da extração do solvente do meio da gotícula produzindo uma pressão interna que colaba a partícula, ou do impacto das partículas úmidas na parede da câmara de secagem (WANG et al., 2021).

5.3.2 Determinação do Tamanho Médio

As micropartículas de todas as formulações apresentaram tamanhos variados, com um discreto aumento no valor das médias da MT5, MT10 e MT20 à proporção que a concentração de fármaco aumentou como informa a TABELA 6. As baixas dimensões se encontram dentro da faixa da microescala (1-1000 μm) demonstrando o sucesso na obtenção de micropartículas poliméricas contendo timomodulina (AHADIAN et al., 2020; LENGYEL et al., 2019).

TABELA 6 - Valores obtidos de tamanho médio para as micropartículas poliméricas contendo (MT5, MT10 e MT20) ou não TMD (MT0)

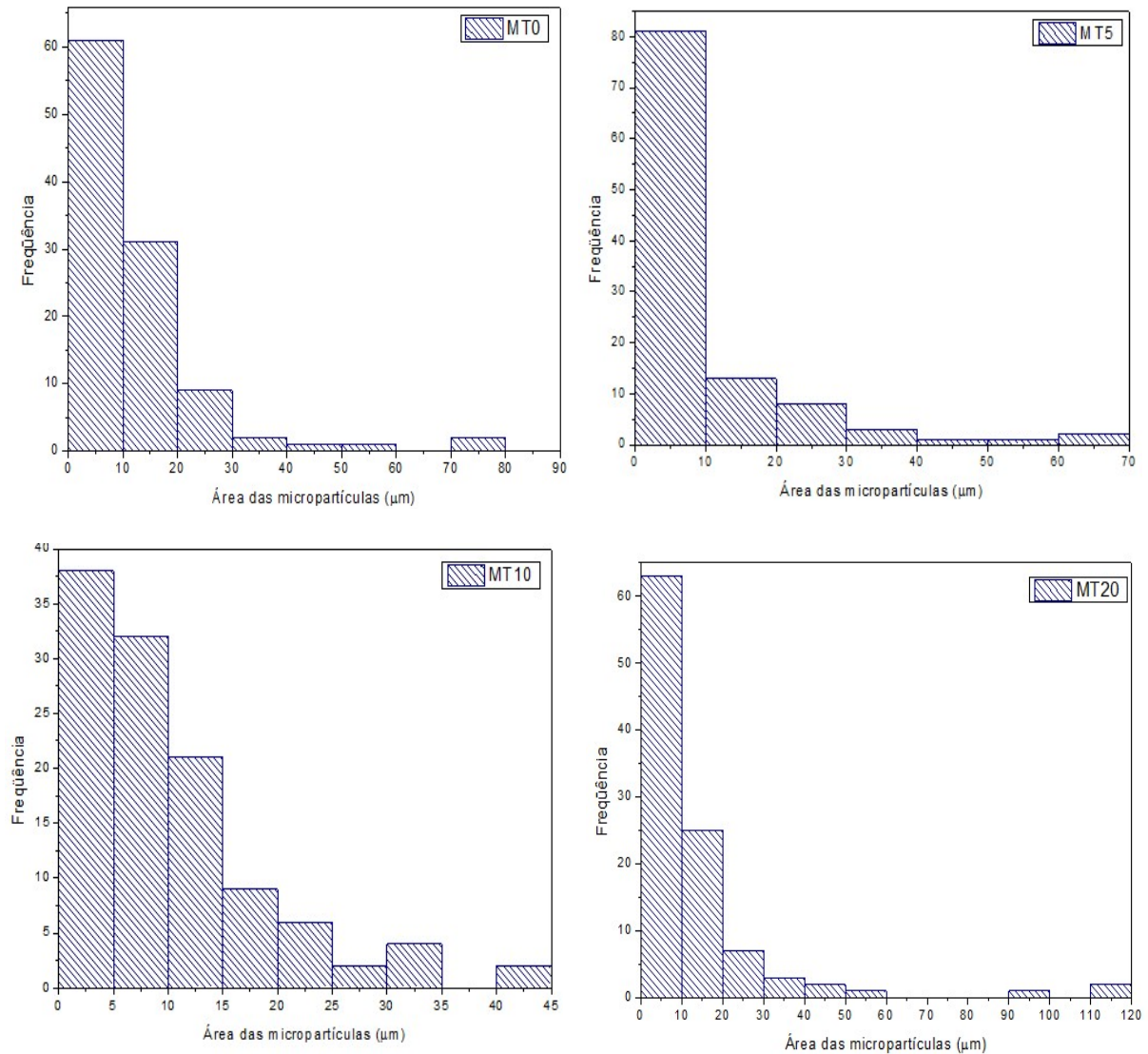
Formulação	Tamanho médio (μm)	
	Média*	DP**
MT0	11,857	$\pm 11,225$
MT5	8,290	$\pm 10,895$
MT10	10,060	$\pm 8,249$
MT20	12,572	$\pm 16,963$

Fonte: A autora

Nota: *Teste estatístico: histograma (fórmula de Sturges); **DP: Desvio padrão.

O alto valor para o desvio padrão confirma a diversidade de tamanhos entorno da média observada tanto nas eletromicrografias quanto nos histogramas (FIGURA 15), aonde a distribuição de frequência do tamanho médio das micropartículas tanto da MT0 (formulação sem fármaco) quanto das MT5, MT10 e MT20 (contendo fármaco) se concentrou em partículas com até 10 μm de tamanho.

FIGURA 15 - Distribuição de frequência do tamanho das micropartículas poliméricas das formulações MT0, MT5, MT10 e MT20 indicando a predominância das áreas em até 10 μm



Fonte: A autora

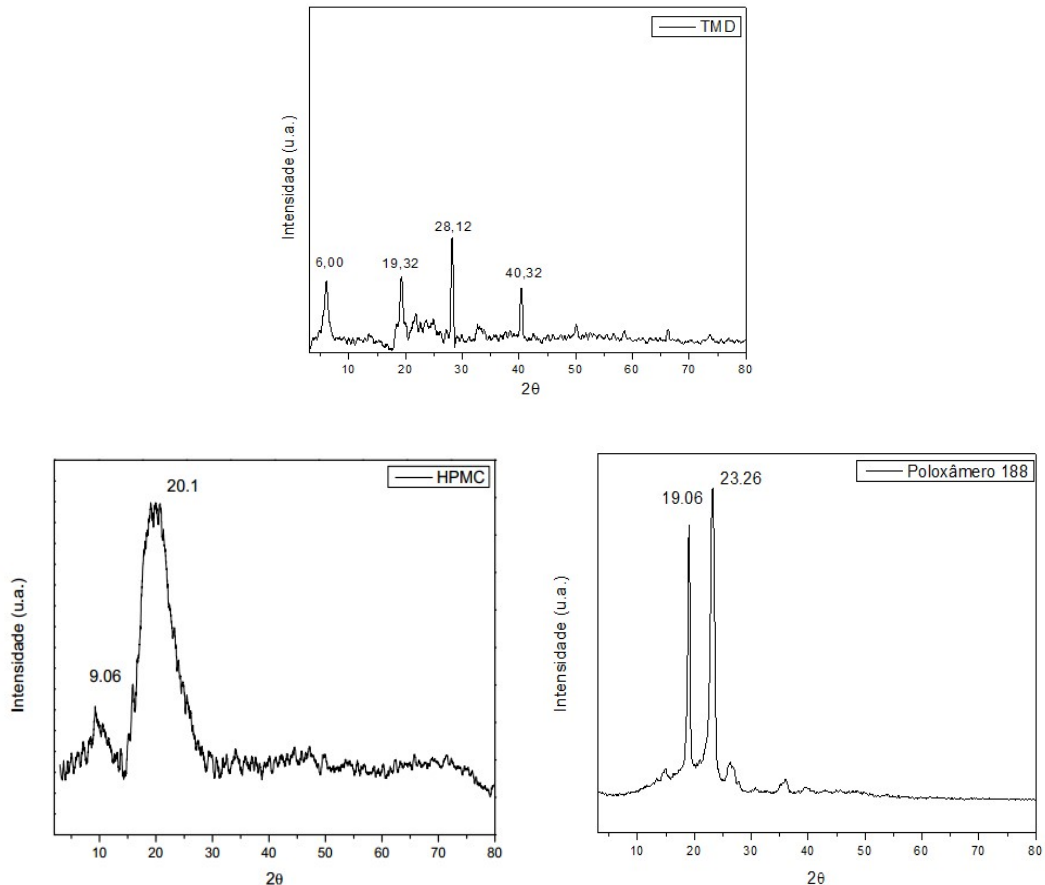
5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL

5.4.1 Análise por Difração de Raios-X (*X Ray Diffraction – XRD*)

Substâncias no estado sólido possuem características cristalinas e/ou amorfas e a análise por difração de raios-X identifica estas características, cujo padrão é único para cada composto cristalino (YANG et al., 2020). A FIGURA 16 ilustra os difratogramas do fármaco e dos excipientes puros, aonde foi possível observar quatro ínfimos picos em $2\theta = 5,98^\circ$, $19,26^\circ$, $28,22^\circ$ e $40,34^\circ$ para o timomodulina, dois picos em $2\theta = 9,06^\circ$ e $20,1^\circ$ típicos de HPMC comprovando sua

natureza semicristalina, em acordo com a literatura (YANG et al., 2020; ZHANG et al., 2018), e dois picos bem definidos e de grande intensidade em $2\theta = 19,06^\circ$ e $23,26^\circ$ para o poloxâmero 188 apontando seu estado cristalino (ZHAI et al., 2017).

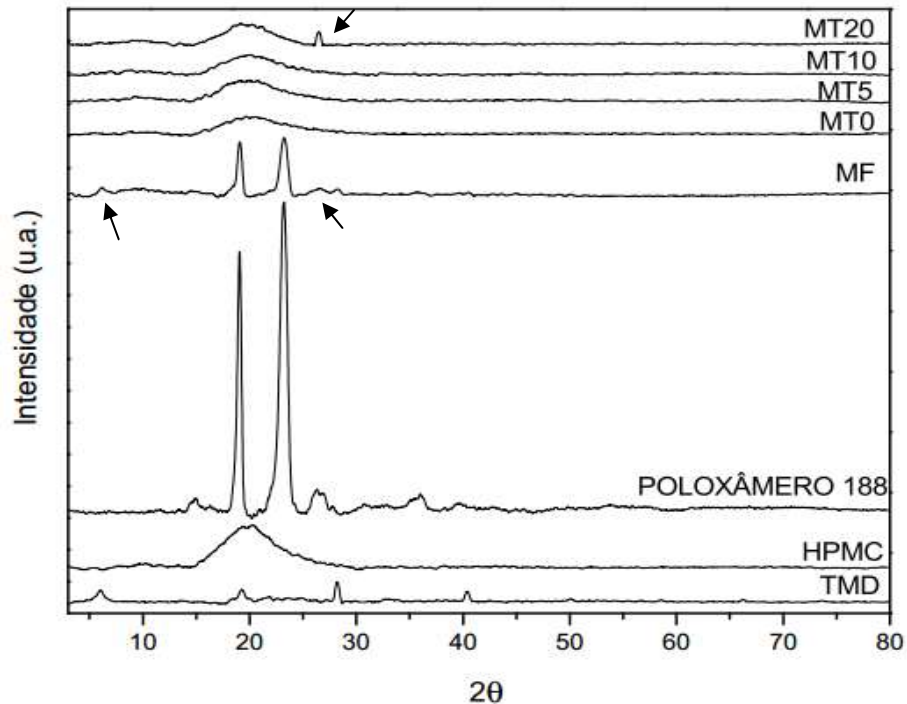
FIGURA 16 – Difratoogramas indicando estado amorfo para TMD, semicristalino para HPMC e cristalino para poloxâmero 188



Fonte: A autora

Já a FIGURA 17 apresenta, além dos difratogramas dos componentes puros, os difratogramas da mistura física (TMD:HPMC:Poloxâmero 188) e das micropartículas poliméricas (MT0, MT5, MT10 e MT20), possibilitando a comparação entre eles. A MF demonstrou picos coincidentes com os do fármaco, indicados pelas duas setas abaixo do difratograma, e com os dos polímeros, observando-se que a mistura não alterou a cristalinidade dos compostos.

FIGURA 17 - Difratograma comparativo entre os insumos puros, MF e micropartículas poliméricas (MT)



Fonte: A autora

Com relação às MTs, visualizou-se em todas as formulações, contendo ou não o TMD, o desaparecimento dos picos de cristalinidade do fármaco e suavização dos picos dos excipientes, indicando que ocorreu completa amorfização de TMD e amorfização dos polímeros durante o processo de encapsulação. Adicionalmente, a MT20 demonstrou um pico, indicado pela seta, que aparentemente seria do fármaco, entretanto ao localizar em $2\theta = 26,04^\circ$ observa-se que corresponde ao poloxâmere 188.

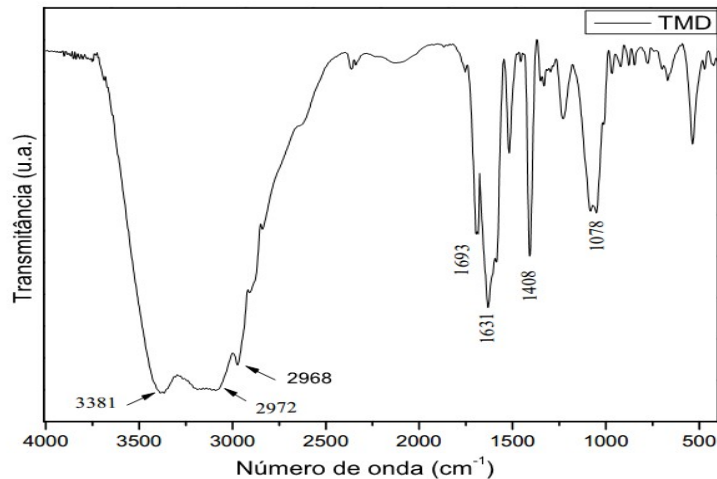
A amorfização da formulação é considerada benéfica, pois favorece a difusão das moléculas dos fármacos através da parede da matriz polimérica resultando em uma liberação controlada dos fármacos encapsulados (YANG et al., 2020).

5.4.2 Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR)

A FIGURA 18 ilustra o espectro de FTIR de TMD, o qual mostrou uma de vibração de estiramento N – H com sobreposição da banda de vibração de estiramento do grupo OH em ligação de hidrogênio intermolecular (3381 cm^{-1}), vibração de estiramento de carbono hibridizado sp^3 (2972 e 2968 cm^{-1}), vibração de

estiramento C = O de amidas N-substituídas (1693 cm^{-1}), vibrações de estiramento $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}_2$ de aromático e vibrações típicas de estiramento C = O de amida I (1631 cm^{-1}), que é devido à vibração de alongamento da cadeia peptídica. Vibração de deformação angular assimétrica C – H (1408 cm^{-1}) e vibração de estiramento C – N (1078 cm^{-1}). Os dados encontrados para o TMD são compatíveis com os encontrados para peptídeos na literatura (BIMLESH MANN; RAMESH POTHURAJU; KUMAR BAJAJ, 2021; LAN et al., 2020; RADETA et al., 2007; WANG et al., 2015).

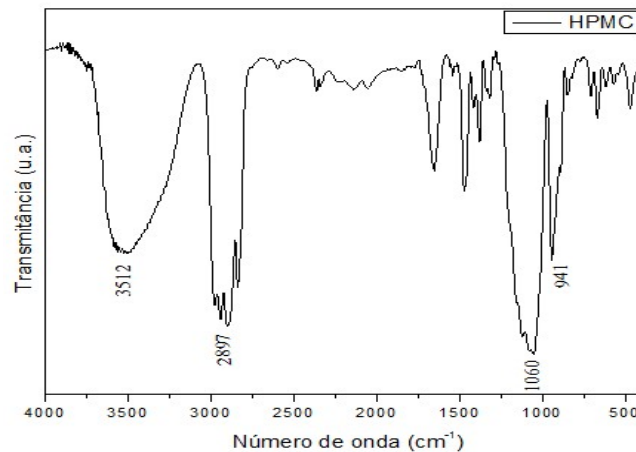
FIGURA 18 - Espectro de FTIR de timomodulina, com bandas sugestivas a ligações químicas dos principais grupos funcionais de peptídeos



Fonte: A autora

A FIGURA 19 mostra o espectro do HPMC com bandas características em 3512 cm^{-1} (vibração de estiramento OH), 2897 cm^{-1} (vibração de estiramento C - H), 1375 cm^{-1} (vibração de flexão CH_3 assimétrica), 1060 cm^{-1} (vibração de alongamento assimétrico C - O) e 941 cm^{-1} (vibração de alongamento simétrico C – O) (AL-ANI et al., 2019; DING; ZHANG; LI, 2015; NAMVIRIYACHOTE et al., 2020).

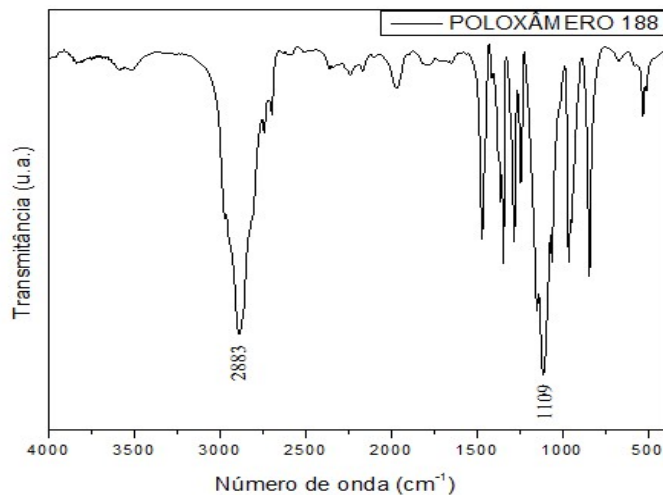
FIGURA 19 - Espectro de FTIR do HPMC com bandas características dos principais grupos funcionais



Fonte: A autora

A FIGURA 20 se refere às principais bandas do espectro do poloxâmero 188 com vibração de estiramento C – H (2883 cm⁻¹) e vibração de alongamento assimétrico C – O (1109 cm⁻¹) (MANCA et al., 2020; PARDHI; JAIN, 2021; YAN et al., 2010).

FIGURA 20 - Espectro de FTIR do poloxâmero 188 com bandas características dos principais grupos funcionais

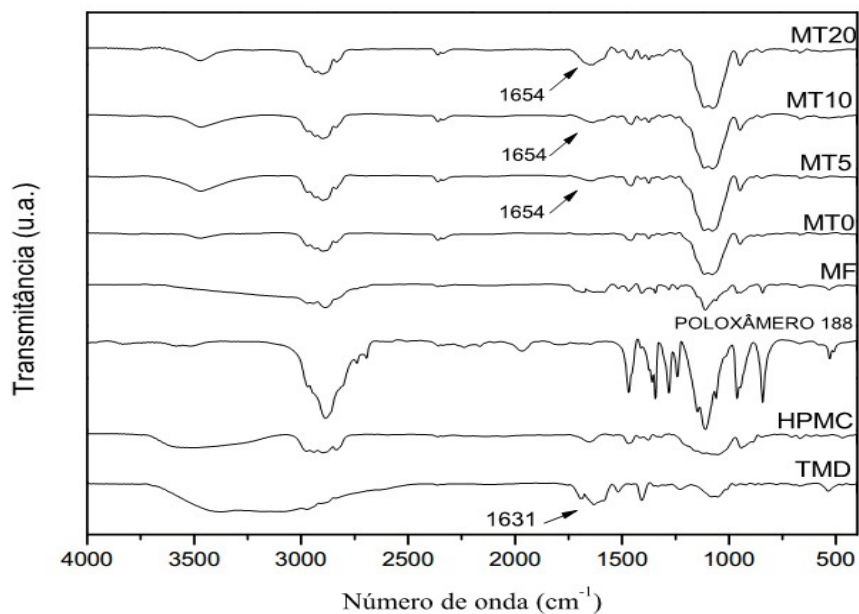


Fonte: A autora

Os espectros comparativos de FTIR para TMD, polímeros (HPMC e poloxâmero 188), mistura física (as bandas correspondem à soma das bandas individuais dos polímeros e do fármaco) e para as formulações de micropartículas (MT0, MT5, MT10 e MT20) estão demonstrados na FIGURA 21.

É possível observar que os espectros da mistura física e das MT indicam que não houve alteração dos grupos funcionais dos componentes das formulações, cujas bandas se mantiveram, mas com menor intensidade em razão da microencapsulação. Ainda, nota-se a banda de vibração de estiramento C = O da amida I (1654 cm^{-1}) presente em MT5, MT10 e MT20, indicado nos espectros, de intensidade progressiva em função do aumento da concentração de TMD, em região muito semelhante ao do fármaco puro (1631 cm^{-1}), não sendo observada na formulação MT0, sem o fármaco.

FIGURA 21 - Espectro FTIR comparativo entre TMD, polímeros, mistura física e as micropartículas poliméricas (MT), destacando os espectros das formulações contendo TMD (MT5, MT10 e MT20) que apresentaram banda em 1654 cm^{-1} , não ocorrendo na MT0, indicando a presença do fármaco e sugerindo que não houve ligações químicas entre os componentes



Fonte: A autora

O processo de formulação microparticulado provavelmente é a razão de tal deslocamento de absorção e do aumento da intensidade da banda, sendo nesta situação a presença de fármaco na superfície da partícula registrada pelo interferograma. Portanto, os resultados sugerem que não houve ligação química entre os componentes, pois não ocorreram deslocamentos significativos nas principais bandas quando comparadas com aquelas nos espectros das substâncias isoladas, tão pouco aparecimento de novas bandas (ABRIATA et al., 2019; ZANETTI et al., 2019).

A espectroscopia no infravermelho por transformada em Fourier é uma análise que identifica estruturas químicas de substâncias orgânicas através da detecção de suas ligações e grupos funcionais, e a partir disto permite revelar se houve interações moleculares entre os fármacos e os excipientes nas micropartículas. Assim sendo, é uma importante análise que caracteriza os grupos funcionais presentes nos compostos da formulação, além de confirmar a integridade do fármaco após o processo da microencapsulação (ABRIATA et al., 2019; ZANETTI et al., 2019).

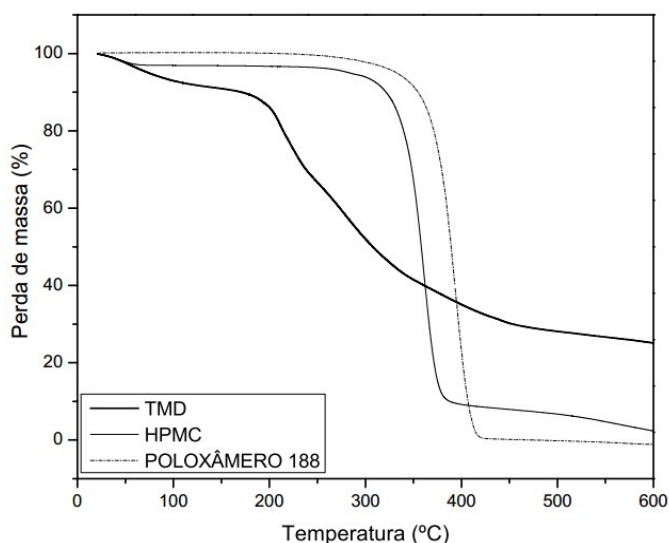
Os espectros de FTIR de proteínas e peptídeos podem ser distinguidos de outros compostos pela presença de duas bandas típicas, amida I e/ou amida II, decorrentes das ligações peptídicas através das quais os aminoácidos são ligados para formar uma cadeia polipeptídica (BIMLESH MANN; RAMESH POTHURAJU; KUMAR BAJAJ, 2021).

5.5 ANÁLISE TÉRMICA

5.5.1 Análise Termogravimétrica (*Thermogravimetric analysis* – TGA)

A FIGURA 22 demonstra os termogramas comparativos obtidos por TGA para o TMD e para os polímeros (HPMC e poloxâmero 188).

FIGURA 22 - Curvas de TGA de TMD e polímeros (HPMC e poloxâmero 188) indicando as degradações térmicas destes componentes isolados

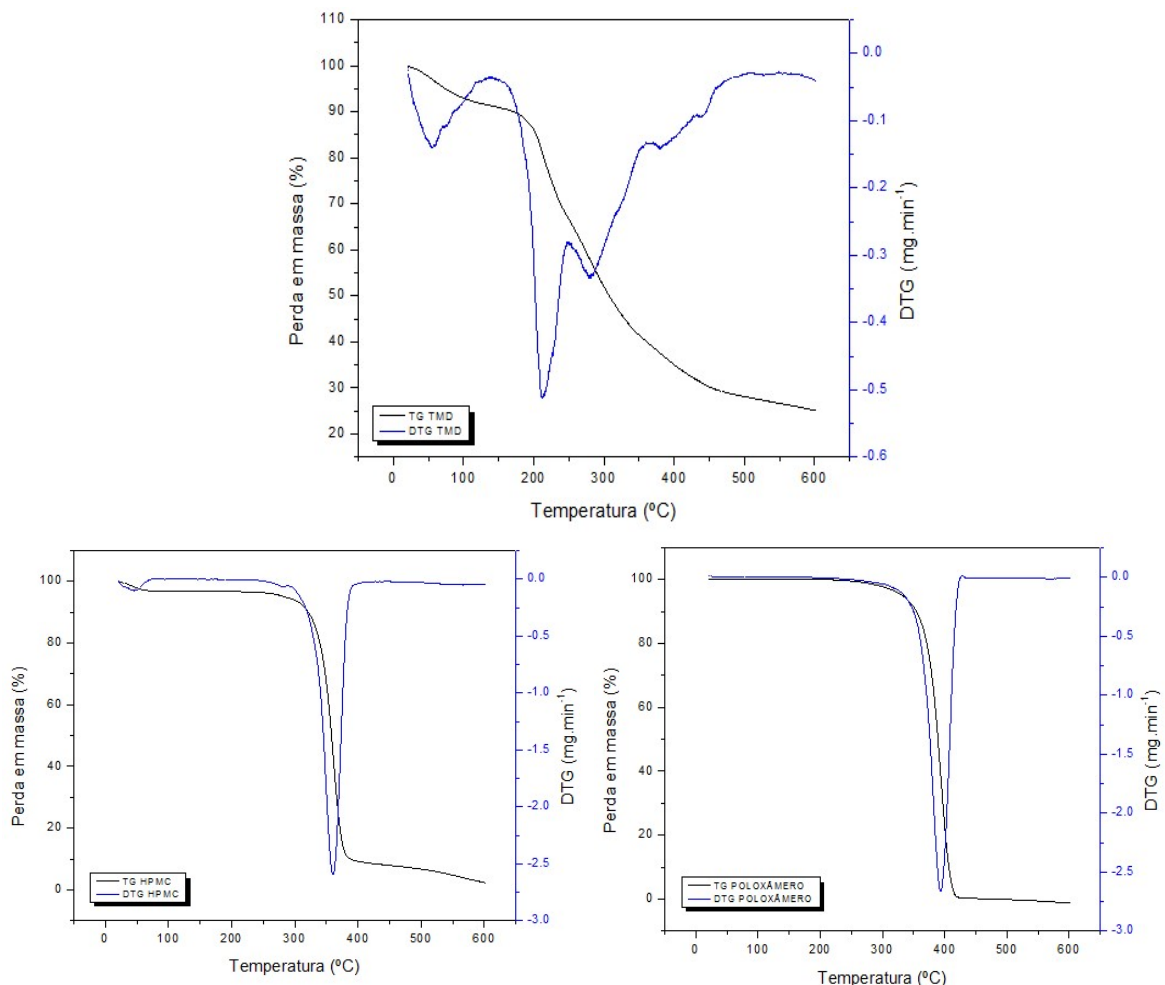


Fonte: A autora

Os eventos nestas curvas são melhores visualizados nos termogramas de TGA e de sua derivada primeira de TG (DTG) na FIGURA 23, aonde o TMD revelou cinco decaimentos entre 21 e 486 °C, indicando instabilidade térmica para esta faixa de temperatura, sendo que o primeiro evento observado entre 21 e 135 °C se deve, provavelmente, a uma perda de umidade encontrada na amostra. O segundo evento foi entre 135 e 250 °C, com percentual visualmente significativo de perda de massa, sugestivo ao seu ponto de fusão em aproximadamente 200 °C. E as demais degradações entre 250 e 486 °C.

Ainda na FIGURA 23, a curva do HPMC demonstrou dois eventos de degradação entre 24 e 401 °C, no qual o primeiro é água de cristalização e o segundo é a fusão. E o poloxâmero 188 apresentou único evento entre 280 e 424 °C, correspondente à fusão.

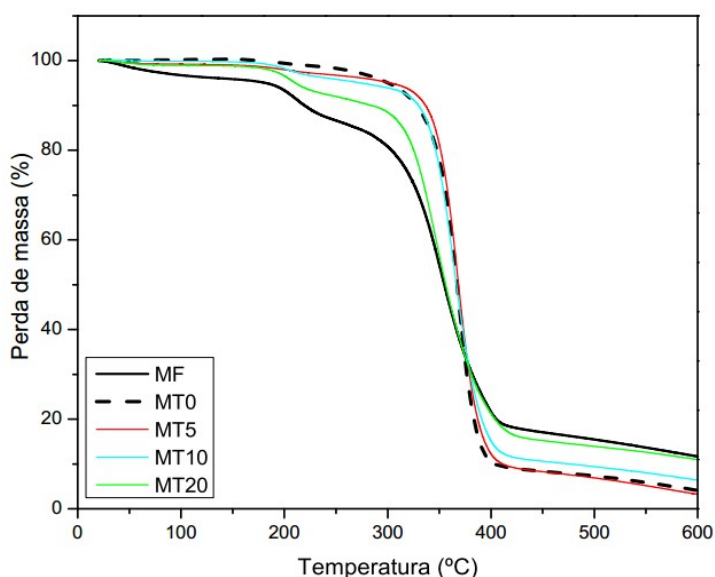
FIGURA 23 - Termogramas obtidos de TGA e DTG indicando cinco degradações térmicas para TMD, duas para HPMC e uma para poloxâmero 188



Fonte: A autora

As curvas comparativas entre a mistura física e as MTs estão ilustradas na FIGURA 24, as quais demonstraram que todas as formulações contendo o fármaco tiveram ausência de alguns eventos térmicos ou diminuição de perda de massa para a faixa de instabilidade do fármaco puro, o que é visível quando comparado com a curva da MF.

FIGURA 24 - Curvas de TGA apontando diminuição das degradações térmicas de TMD contida nas formulações de micropartículas poliméricas (MT5, MT10, MT20) quando comparadas a mistura física e a MT0

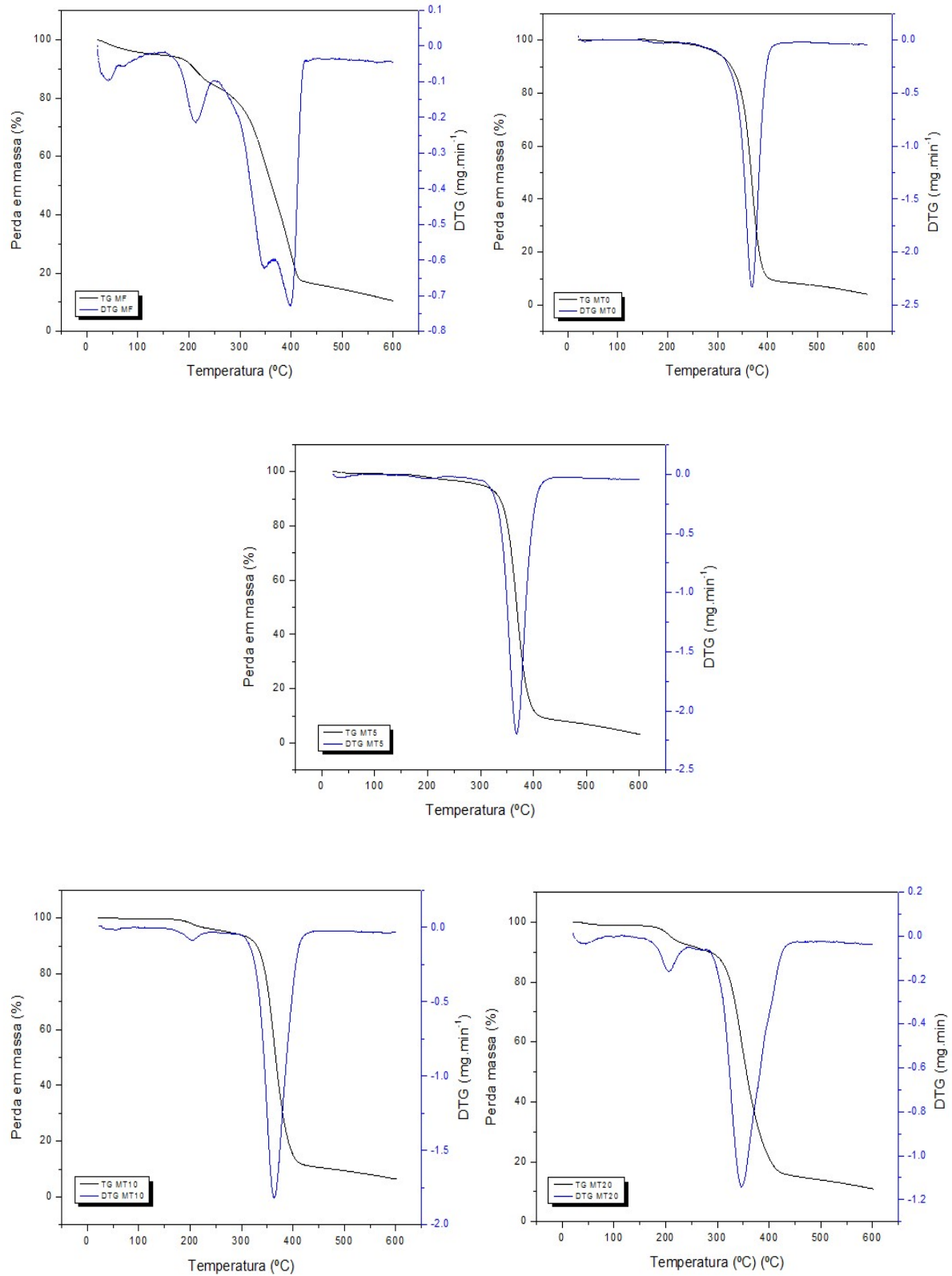


Fonte: A autora

A TGA e DTG da MF e das formulações contendo ou não o TMD (FIGURA 25) detalham tais eventos. O primeiro termograma se refere à MF, o qual apresentou três decaimentos: o primeiro entre 20 – 114 °C, atribuído a umidade do fármaco, o segundo entre 148 – 253 °C referente à degradação de TMD, porém observa-se uma diminuição da perda de massa, e o terceiro entre 253 – 430 °C, relacionado à fusão dos dois polímeros. A curva para MT0 revelou apenas um evento com início em aproximadamente 153 °C e término em 433 °C, associado aos excipientes.

Ainda, as formulações apresentaram curvas visualmente parecidas com a MT0, entretanto, MT5 demonstrou um decaimento correspondente à faixa do segundo evento de TMD puro, mas com discreta perda de massa. E de forma semelhante à curva de MT5, MT10 e MT20 apresentaram maior e progressiva degradação de TMD em função da concentração do fármaco, além de um evento no início da curva associado à umidade, porém de menor percentual de perda.

FIGURA 25 - Termogramas obtidos de TGA e DTG da mistura física (MF) e das micropartículas poliméricas (MT) demonstrando diminuição dos eventos térmicos de TMD na MT5, MT10 e MT20 quando comparados a MF e a MT0



Fonte: A autora

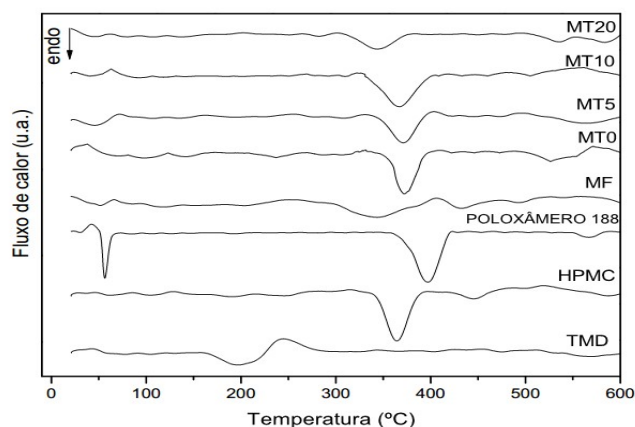
Assim, foi possível observar a partir da análise termogravimétrica dos componentes isolados e associados na matriz polimérica que houve melhora da estabilidade térmica de TMD após a sua microencapsulação por meio do método *spray drying*, pois ocorreu diminuição de eventos de degradação térmica e de quantidade perdida de massa de fármaco.

A análise termogravimétrica fornece medidas das alterações ou perdas de massa da amostra em função de programação de temperatura ou de tempo pela qual a amostra é submetida. Deste modo, é possível obter informações sobre dessolvatação e decomposição da substância investigada, o que possibilita caracterizá-la revelando a sua estabilidade térmica, ou seja, a faixa de temperatura em que ela adquire composição química fixa, definida e constante, além de apontar possíveis alterações dos componentes em pré-formulações (COSTA et al., 2020; DE OLIVEIRA; YOSHIDA; DE LIMA GOMES, 2011; JHA; SHAH; AMIN, 2020).

5.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry – DSC*)

Os termogramas avaliados por DSC de TMD, do HPMC, do poloxâmero 188, da MF e das MT estão ilustrados na FIGURA 26. Para o TMD foi observado uma curva com temperatura inicial de 163,61 °C, um pico endotérmico pouco definido e de baixa intensidade em 197,32 °C, uma rampa de evento exotérmico em 226 °C com pico de baixa intensidade em 242,94 °C, que provavelmente deve-se ao evento de degradação mais proeminente do fármaco.

FIGURA 26 - Curvas de DSC de TMD, HPMC, poloxâmero 188, MF e micropartículas poliméricas (MT0, MT5, MT10 e MT20)



Fonte: A autora

O HPMC apresentou um pico de fusão em aproximadamente 362 °C, sendo que a literatura que relata variados pontos de fusão para esta substância em função do grau de metoxilação da molécula (MAŠKOVÁ et al., 2020; YANG et al., 2020). O poloxâmero 188 mostrou dois eventos endotérmicos, a 55,22 e a 395,64 °C, em acordo com a literatura (PARDHI; JAIN, 2021; YINGNGAM et al., 2019).

A MF retratou os eventos endotérmicos do fármaco e dos polímeros isolados, indicados pelas setas, entretanto de intensidade bem diminuída. E finalmente, as curvas obtidas por DSC para as MT se apresentaram de forma semelhante, sem sinal de evento característico de TMD e com apenas um pico endotérmico relacionado à fusão dos polímeros, o que indica a total amorfização do peptídeo pelo processo de microencapsulação.

Os picos poucos definidos na curva de TMD e a temperatura de fusão encontrada para o HPMC podem estar relacionados com o grau de pureza das substâncias, sendo que quanto mais puro o composto, melhor definido é o pico do evento e correspondente temperatura (COSTA et al., 2020).

A TG e a DSC são análises que se complementam, e por isso a interpretação dos resultados devem ser concomitantes, de forma a permitir conclusões mais precisas (COSTA et al., 2020; JHA; SHAH; AMIN, 2020). Ainda não há relatos de análises térmicas com o extrato tímico em questão, o qual revelou ser um peptídeo com um alto ponto de fusão, em torno de 200 °C, mas com muitos eventos de degradação, comprovando a instabilidade física. Ademais, à medida que a concentração de TMD foi aumentando nas MT, a perda de massa da mesma também aumentou fato concernente à eficiência de encapsulação, aonde o maior índice foi obtido com a MT5.

Calorimetria exploratória diferencial se baseia na quantificação da perda ou ganho de calor que resultam em mudanças físicas ou químicas na amostra, em função da temperatura (COSTA et al., 2020).

Desta forma, a análise térmica é um conjunto de técnicas analíticas, constituído pelas termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial, capazes de avaliar uma propriedade física de um composto por intermédio de um programa de temperatura. Estas duas análises são como que impressões digitais dos compostos, pois cada material apresenta eventos térmicos característicos com comportamentos distintos em função da composição química, por isso são análises complementares

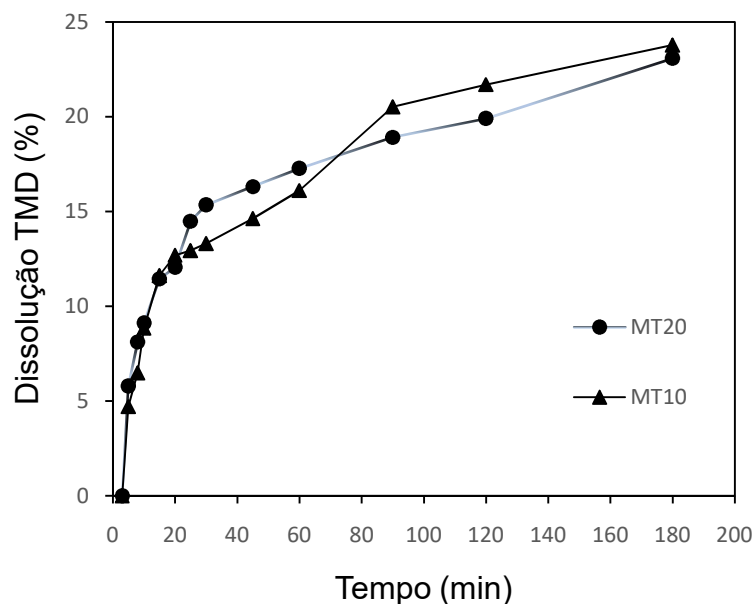
entre si, de maneira que a interpretação dos termogramas ocorre concomitantemente (COSTA et al., 2020).

5.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os perfis de liberação *in vitro* obtidos para as micropartículas poliméricas MT10 e MT20, para uma concentração teórica de 5 mg de fármaco, estão apresentados na FIGURA 27. As duas formulações foram eleitas para este ensaio considerando-se os maiores rendimentos do pó com as maiores concentrações de fármaco e menores concentrações de MT contidas no pó. Apesar da maior eficiência de encapsulação (EE) ter ocorrido com a MT5, os outros três requisitos ficaram opostos quando comparados com a MT10 e MT20.

Além disso, a EE da MT10 (94,5%) ficou muito próxima da EE da MT5 (98,6%), de modo que aquela foi representativa para ambas as formulações com a vantagem de necessitar apenas a metade da quantidade de pó da MT5 para a mesma concentração teórica de fármaco, o que é importante para o desenvolvimento de formulações, desde que se respeitem os critérios de produção da forma farmacêutica (ALDERBORN, 2016).

FIGURA 27 - Perfis de liberação do TMD das micropartículas MT10 e MT20 em meio de dissolução tampão fosfato (pH: 6,8)



Fonte: A autora

A formulação MT10 demonstrou a liberação de 20% do fármaco em 90 minutos e a formulação MT20 liberou 20% do fármaco no tempo de 120 minutos. No período avaliado (total de 180 minutos) observou-se a liberação máxima de 23% de timomodulina do sistema polimérico, o que pode provavelmente estar relacionado com o meio de dissolução utilizado (tampão fosfato pH 6,8).

A maior parte dos processos que acontecem em um sistema de liberação modificada pode ser resumida em três classes, a difusão, a liberação por processo de ativação e a desagregação/erosão polimérica, sendo que esta última controla a liberação do fármaco a partir de matriz formada por polímeros hidrossolúveis. (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Para fármacos solúveis, a sua liberação pelo sistema ocorre por meio de quatro etapas sequenciais da desagregação/erosão polimérica: difusão do meio para o interior da matriz, hidratação e intumescimento da matriz, dissolução do fármaco e difusão do fármaco através dos canais intersticiais da matriz para o meio externo (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Desta forma, a difusão do fármaco é fortemente influenciada pela viscosidade que a matriz fornece, pois quanto maior a viscosidade (rigidez do gel formado) maior é o controle da liberação do fármaco pelo sistema. Neste aspecto, o HPMC tem papel central na liberação de TMD pelo sistema matricial polimérico aqui desenvolvido, pela propriedade em se gelificar na presença de água formando uma estrutura em camadas, o que promove o controle da dissolução e da liberação do fármaco de dentro da matriz (KRESE et al., 2016; LAMOUDI; CHAUMEIL; DAOUD, 2016; MAŠKOVÁ et al., 2020).

Ainda, pela diversidade de apresentações de HPMC's vários fatores tais como, peso molecular, grau de polimerização, grau de substituição metoxil e hidroxipropoxil, e grau de viscosidade também interferem diretamente na formação do gel. O excipiente utilizado neste estudo, o Methocel E4M, pertence à classe dos HPMC's de alta viscosidade, porém dentre eles é o de menor grau, sendo indicado para aplicação local em mucosas, principalmente para conter biomacromoléculas. (KRESE et al., 2016; MAŠKOVÁ et al., 2020).

Além destes fatores, estudos relatam a influência de outros solutos presentes no meio de dissolução, como eletrólitos, açúcares dietéticos, lauril sulfato de sódio e etanol. Uma maior concentração destas substâncias, dentro da faixa mais baixa de sua concentração, acarreta em uma liberação progressivamente mais lenta

do fármaco pela matriz, já em altas concentrações a maior afinidade delas com a água ocasionam baixa hidratação do HPMC levando a sua precipitação, comprometendo a barreira de difusão das camadas de gel, resultando em maior liberação de fármaco (KRESE et al., 2016).

Assim, ambas as formulações, MT10 e MT20, apresentaram perfis de liberação semelhantes, aonde houve uma rápida liberação inicial (*burst effect*) (MAŠKOVÁ et al., 2020), com uma taxa de liberação em torno de 9%, seguido de uma liberação lenta e progressiva, mas permanecendo com baixos percentuais de dissolução. Por isso, apesar das micropartículas terem apresentado alta eficiência de encapsulação, fica sugestivo que o meio de dissolução utilizado na concentração de 100 mM, a fim de obter pH 6,8, pode ter influenciado a hidratação do HPMC e por consequência interferido na dissolução de TMD, resultando em baixas taxas de fármaco liberado pela matriz polimérica.

Como mencionado anteriormente, não há estudos de sistemas com liberação modificada contendo o TMD, no entanto a investigação de SOUDRY-KOCHAVI et al. (2015), já descrita na seção 5.1, encontrou resultados semelhantes para a avaliação da liberação *in vitro* de nanopartículas contendo exenatida, microencapsuladas em HPMC e Eudragit L pelo método *spray-drying* para a administração oral.

Nesta avaliação, a liberação máxima do fármaco foi de 15% num período total de 240 minutos. Os autores sugerem que a liberação de exenatida foi baixa em função da sua desnaturação durante a pulverização das micropartículas ou pela reticulação entre as moléculas de BSA ou com o glutaraldeído, utilizados para obter as nanopartículas, aonde resultaram numa baixa eficiência de encapsulação (40%) (SOUDRY-KOCHAVI et al., 2015).

Finalmente, considerando a equação 3, a eficiência de dissolução avaliada no tempo final de 180 minutos foi de 7,75% e 7,79% para as micropartículas MT10 e MT20, respectivamente. A TABELA 7 resume os dados do perfil de liberação e da eficiência de dissolução para cada formulação.

TABELA 7 - Dados do perfil de liberação e eficiência de dissolução das MT10 e MT20

MEIO DE DISSOLUÇÃO		pH 6,8 (5 a 180 minutos)	
AMOSTRA	% _{MÁX.}	TEMPO _{MÁX.}	ED(%)
MT10	23,07	180 minutos	7,75
MT20	23,77	180 minutos	7,79

Fonte: A autora

Nota: %_{MÁX.}: porcentagem máxima liberada no período avaliado; TEMPO_{MÁX.}: tempo em que houve liberação máxima do fármaco no período avaliado; ED: eficiência de dissolução.

Ficou demonstrado que as formulações MT10 e MT20, apesar da diferença nas concentrações do fármaco, apresentaram desempenhos semelhantes, com baixas taxas de liberação do fármaco, exceto os tempos de liberação da taxa de 20% de TMD em que a MT10 antecedeu (90 minutos) a MT20 (120 minutos), fato ocorrido ao contrário no estudo de YANG et al. (2005), no qual a timosina liberada com maior percentual foi das micropartículas constituídas de menor concentração polimérica. Contudo, elevadas taxas de eficiência de dissolução são relatadas pela literatura para as formas farmacêuticas de liberação imediata (FORTUNATO et al., 2007), de modo que uma redução do valor da eficiência de dissolução do TMD, promovida pelos materiais poliméricos utilizados, se torna interessante estratégia para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo prolongada.

A liberação *in vitro* é um teste imprescindível, pois investiga a *performance* de uma determinada forma farmacêutica, por meio de método compendial ou de monografia da substância a ser avaliada, com a finalidade de assegurar a eficiência e segurança de novos sistemas de liberação de fármacos (JUG et al., 2018).

Deste modo, o ensaio informa acerca da dissolução e do perfil de liberação do fármaco pelo sistema, os quais são requisitos fundamentais para: desenvolver formulações farmacêuticas, parametrizar o controle de qualidade, direcionar o estudo de liberação *in vivo* e comprovar etapas do processo regulamentar do produto. Esta avaliação é de tal importância que em algumas formulações o estudo se torna crucial para a investigação da atividade farmacológica (BRASIL, 2019; JUG et al., 2018; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

6 CONCLUSÃO

As micropartículas poliméricas contendo timomodulina (TMD) formuladas a partir de hidroxipropilmetilcelulose e poloxâmero 188 (MT5, MT10 e MT20), foram obtidas com sucesso pelo método *spray-drying*.

Os sistemas apresentaram micropartículas com formato variado, esférico e/ou distorcido, de superfície lisa, rugosa ou côncava, com dimensões dentro da faixa da microescala.

O XRD confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se predominantemente em dispersão molecular na matriz polimérica.

As análises espectroscópicas por FTIR confirmaram que não houve reação química que mudasse a estrutura química do fármaco ou dos polímeros, indicando que ambos não interagem significativamente.

A análise térmica por TG/DTG e DSC também indicaram que não houve interação entre o fármaco e os excipientes e que a microencapsulação melhorou a estabilidade térmica do fármaco.

O método colorimétrico foi seletivo e linear para a determinação e quantificação do fármaco nas formulações, as quais apresentaram alta eficiência de encapsulação.

O ensaio de liberação *in vitro* revelou um perfil de dissolução lento, gradual e progressivo do fármaco das micropartículas MT10 e MT20 com baixas taxas de liberação do fármaco e de eficiência de dissolução. Contudo, essa redução evidenciou que o sistema polimérico é uma importante estratégia para a liberação modificada de fármaco do tipo prolongada.

Desta forma, todos os objetivos do presente trabalho foram alcançados: o desenvolvimento e obtenção de um sistema de liberação modificada de micropartículas poliméricas contendo o timomodulina, a sua caracterização físico-química e a avaliação da liberação *in vitro* das micropartículas.

Ainda sim, estudos complementares como, avaliar a liberação *in vitro* em meios de dissolução com pH ácido, comparar com a liberação *in vitro* do fármaco em sistema de liberação imediata, avaliar a liberação *in vivo*, investigar a gelificação *in situ*, e verificar o efeito citotóxico *in vitro*, são necessários para definir o potencial deste sistema para o desenvolvimento de diferentes formas farmacêuticas mucoadesivas que promovam biodisponibilidade melhorada.

REFERÊNCIAS

- ABRIATA, J. P. et al. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, n. October 2018, p. 347–355, 2019.
- AGRAWAL, M. et al. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 327, n. June, p. 235–265, 2020.
- AHADIAN, S. et al. Micro and nanoscale technologies in oral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 157, p. 37–62, 2020.
- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, 2016.
- AL-ANI, E. et al. The effect of the source and the concentration of polymers on the release of chlorhexidine from mucoadhesive buccal tablets. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 6, p. 756–766, 2019.
- ALCALÁ-ALCALÁ, S. et al. A biodegradable polymeric system for peptide-protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2141–2151, 2013.
- ALDERBORN, G. **Delineamento de Formas Farmaceuticas**. Aulton. 4 ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2016.
- ARPAGAUS, C. et al. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2, p. 194–214, 2018.
- ASHOUR, E. A. et al. Hot melt extrusion as an approach to improve solubility, permeability and oral absorption of a psychoactive natural product, piperine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 989–998, 2016.
- BAKELA, K.; ATHANASSAKIS, I. Soluble major histocompatibility complex molecules in immune regulation: highlighting class II antigens. **Immunology**, v. 153, n. 3, p. 315–324, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5795187/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35795187/). Acesso em: 8 nov. 2020.
- BATISTA, P. et al. Development and characterization of chitosan microparticles-in-films for buccal delivery of bioactive peptides. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2019.
- BERNAL RODRIGUEZ, C. A. et al. Development of an oral control release system from *Physalis peruviana* L. fruits extract based on the co-spray-drying method. **Powder Technology**, v. 354, p. 676–688, 2019.

BI, J.; TIAN, Z. NK cell exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. jun, 28 jun. 2017.

BIMLESH MANN, A. S.; RAMESH POTHURAJU, R.; KUMAR BAJAJ, R. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: an alternative approach for chemical iron fortification. **Food Research International**, v. 141, n. June 2020, p. 110133, 2021.

BIRR, C. the Gmp-Based Drug Substance Sctl Development Aiming At Prevention of Opportunistic Infections After X-Ray- and Chemotherapy of Cancer. a Synthetic Combinatorial Tetrapeptide Library Substitution for Calf Thymus Extract. **Biotechnologia Acta**, v. 6, n. 4, p. 162–171, 2013.

BOCHNER, B. S. The eosinophil: For better or worse, in sickness and in health. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, American College of Allergy, Asthma and Immunology, 1 ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez82.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC6087501/>. Acesso em: 1 nov. 2020.

BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of poloxamers for drug delivery. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

BORTOLOTTI, F, et al. Effect of an orally administered thymic derivative, Thymodulin, in chronic type B hepatitis in children. **Current Therapeutic Research**, v. 43, n. 67, 1988.

BRAGA, P. C. et al. Restoration of polymorphonuclear leukocyte function in elderly subjects by thymomodulin. **Journal of Chemotherapy**, v. 6, n. 5, p. 354–359, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [**Consultas/ Medicamentos**]. Brasília, 2019. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=8964>. Acesso em: 08 jul. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [**Bulário Eletrônico**]. Brasília, 2019. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23993222016&pIdAnexo=3960430. Acesso em: 08 jul. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [**DCB – Denominações Comuns Brasileiras**]. Brasília, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/denominacaocomum-brasileira>. Acesso em: 11 jul. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017]. Aprova o “**Critérios para a validação de métodos analíticos**”. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 10 ago. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8008json-file-1>. Acesso em: 2 nov. 2020.

BRUNETTI, B.; PINI, E. Thymus extract having a therapeutic action. Depositante: United States Patent Office. US3657417A. Depósito: 26 maio 1969, Concessão: 18 abr. 1972. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US3657417A/en>. Acesso em: 16 nov. 2020.

BUETTNER, M.; LOCHNER, M. Development and function of secondary and tertiary lymphoid organs in the small intestine and the colon. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 342, p. 1-11. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5011757/?report=abstract>. Acesso em: 2 nov. 2020.

BURHAN, A. M. et al. Optimisation of the microencapsulation of lavender oil by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 36, n. 3, p. 250–266, 2019.

CALSINI, P.; MOCHEGANI, E.; FABRIS, N. The pharmacodynamics of thymomodulin in elderly humans. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 11, n. 9, p. 671–4, 1985.

CAMPOS, E. et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 8, p. 2005–2021, 2013.

CAVAGNI, G. et al. "Food allergy in children: an attempt to improve the effects of the elimination diet with an immunomodulating agent (thymomodulin). A double-blind clinical trial." **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 11, n. 1, p. 131–142, 1989.

CAZZOLA, P.; MAZZANTI, P.; KOUTTAB, N. M. Update and future perspectives of a thymic biological response modifier (thymomodulin). **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 9, n. 2, p. 195–216, 1987.

CHEN, K. et al. Chemokines in homeostasis and diseases Cellular and Molecular Immunology. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, p. 324-334, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6052829/?report=abstract>. Acesso em: 17 nov. 2020.

CHENG, C. et al. Efficacy of immunosuppressive therapy in myocarditis: A 30-year systematic review and meta analysis. **Autoimmunity Reviews**, n. August, p. 102710, 2020.

CHO, W. et al. Design of salmon calcitonin particles for nasal delivery using spray-drying and novel supercritical fluid-assisted spray-drying processes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 1, p. 288–296, 2015.

CHOONARA, B. F. et al. A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1269–1282, 2014.

CHOWDHURY, M. A. et al. Immune response in COVID-19: A review. **Journal of Infection and Public Health**, 2020. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez82.periodicos.capes.gov.br/32718895/>. Acesso em: 10 out. 2020.

CHUTIPONGTANATE, S. et al. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. **Talanta**, v. 98, p. 123–129, 2012.

COHEN, I. R.; EFRONI, S. The immune system computes the state of the body: Crowd wisdom, machine learning, and immune cell reference repertoires help manage inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 154, n. 3, p. 383-393.

COSTA, B. DE A. et al. Viability of Oral Administration in Pre-Formulation Composed of Ganciclovir With NaCl By Tga/Dtga and Dsc. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 100508–100517, 2020.

D'SOUZA, B. et al. Development of β -cyclodextrin-based sustained release microparticles for oral insulin delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 8, p. 1288–1293, 2015.

DE OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; DE LIMA GOMES, E. C. Análise termica aplicada a farmacos e formulacoes farmaceuticas na industria farmaceutica. **Quimica Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.

DEL-RIO-NAVARRO, B. E. et al. Immunostimulants for preventing respiratory tract infection in children. **Evidence-Based Child Health**, v. 7, n. 2, p. 629–717, 2012.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, 2005.

DING, C.; ZHANG, M.; LI, G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 194–201, 2015.

EDERY, A. et al. Thymomodulin exerts a preventive effect against radioinduced leukopenia in cancer patients. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 100, 1988.

FIOCCHI, A. et al. A double-blind clinical trial for the evaluation of the therapeutical effectiveness of a calf thymus derivative (Thymomodulin) in children with recurrent respiratory infections. **Thymus**, v. 8, n. 6, p. 331–339, 1986.

FIOCCHI, A. et al. A double blind clinical trial on the effectiveness of a thymic derivative (thymodulin) in the treatment of children with atopic dermatitis. **International Journal immunotherapy**, v. 3, p. 279, 1987.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: Heterogeneity and functions. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2017.

GRAPENTIN, C. et al. Protein-Polydimethylsiloxane Particles in Liquid Vial Monoclonal Antibody Formulations Containing Poloxamer 188. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 8, p. 2393–2404, 2020.

HADDEN, J. W. Immunomodulation. Immunostimulantes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 5, p. 169–174, 1993.

HAGGAG, Y. A.; FAHEEM, A. M. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. jun, 2015.

HOEKSEMA, M. A.; DE WINTHER, M. P. J. Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. **Antioxidants and Redox Signalig**, v. 25, n. 14, p. 758-774, 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5098128/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31098128/). Acesso em: 31 out. 2020.

HOLDSWORTH, S. R.; CAN, P. Y. Cytokines: Names and numbers you should care about Clinical **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2243-2254, 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4670773/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26147773/). Acesso em: 2 nov. 2020.

HOWELL, M.; SHEPHERD, M. The immune system. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 19, n. 10, p. 575–578, 2018.

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **FEBS Journal**, v. 285, n. 16, p. 2944-2971, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6120486/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30048666/). Acesso em: 10 out. 2020.

JHA, D. K.; SHAH, D. S.; AMIN, P. D. Thermodynamic aspects of the preparation of amorphous solid dispersions of Naringenin with enhanced dissolution rate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 583, n. jan, p. 119-363, 2020.

JIN, X. et al. Chitosan-glutathione conjugate-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Promising carriers for oral thymopentin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 51–57, 2011.

JUG, M. et al. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 350–366, 2018.

KAIZU, K.; ALEXANDRIDIS, P. Micellization of polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymers in aqueous polyol solutions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 210, p. 20–28, 2015.

KARAVASILI, C.; FATOUROS, D. G. Smart materials: In situ gel-forming systems for nasal delivery. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 157–166, 2016.

KIM, B. G. et al. Clinical Efficacy of Thymomodulin on Neutropenia Induced by Chemotherapy in the Patients with Gynecologic Cancer. **Journal of Korean Cancer Association**, v. 25, n. 6, p. 956–965, 1993.

KOUTTAB, N. M.; PRADA, M.; CAZZOLA, P. THYMOMODULIN: BIOLOGICAL PROPERTIES AND CLINICAL APPLICATIONS. **Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy**, v. 6, n. 1, p. 5–9, 1989.

KRESE, A. et al. Influence of ionic strength and HPMC viscosity grade on drug release and swelling behavior of HPMC matrix tablets. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 26, p. 4–11, 2016.

KROHN, R. I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. A.3H.1-A.3H.28, 2002.

KUMAR, D. et al. A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 3, p. 165–184, 2012.

KUMAR, S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. **Immunology**, v. 154, n. 3, p. 383-393, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29512837/>. Acesso em: 1 nov. 2020.

KUPER, C. F. et al. Development of immune organs and functioning in humans and test animals: Implications for immune intervention studies. **Reproductive Toxicology**, v. 64, p. 180–190, 2016.

LAGOU, V. et al. Genetic Architecture of Adaptive Immune System Identifies Key Immune Regulators. **Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 798- 810.e6, 16 out. 2018.

LAMOUDI, L.; CHAUMEIL, J. C.; DAOUD, K. Swelling, erosion and drug release characteristics of Sodium Diclofenac from heterogeneous matrix tablets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 93–100, 2016.

LAN, T. et al. Complexation between soy peptides and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Formation mechanism and morphological characterization. **Lwt**, v. 134, n. jul, p. 109990, 2020.

LAYEK, B.; MANDAL, S. Natural polysaccharides for controlled delivery of oral therapeutics: a recent update. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. aug, p. 115617, 2020.

LENGYEL, M. et al. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. **Scientia Pharmaceutica**, 2019.

LEWIS, A. L.; RICHARD, J. Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. **Therapeutic Delivery Delivery**, v. 6, n. 2, p. 149–163, 2015.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LOWRY, O. H. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265- 275+, 1951.

LUBBERS, R. et al. Production of complement components by cells of the immune system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 183-194, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5383442/?report=abstract](#). Acesso em: 7 nov. 2020.

MACIEL, B. M.; PÉREZ, G. L. Una antigua aliada: la timomodulina. **Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas**, v. 9, n. 2, p. 65–68, 2000.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. out. 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 4 maio 2021.

MANCA, M. L. et al. Impact of nanosizing on dermal delivery and antioxidant activity of quercetin nanocrystals. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. oct, p. 101482, 2020.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, 2018.

MARZARI, R. et al. Perennial allergic rhinitis. Prophylaxis of acute episodes using thymomodulin. **Minerva Medica**, v. 78, n. 22, p. 1675–81, 1987.

MAŠKOVÁ, E. et al. Hypromellose – A traditional pharmaceutical excipient with modern applications in oral and oromucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 324, p. 695-727, 2020.

MENDES, J. B. E. et al. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: Physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. c, p. 1–13, 2012.

MILLER, M. C.; MAYO, K. H. Chemokines from a structural perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez82.periodicos.capes.gov.br/28974038/>. Acesso em: 16 nov. 2020.

MIRIĆ, M. et al. Long-term follow up of patients with dilated heart muscle disease treated with human leucocytic interferon alpha or thymic hormones: Initial results. **Heart**, v. 75, n. 6, p. 596–601, 1996.

MIRIĆ, M. et al. Biopsy-proven Dilated Heart Muscle Disease Treated with Immunomodulators. In: **Immunoregulation in Health and Disease**, [s.l.: s.n.]. p. 331–338.

MITHU, S. H. et al. Evaluation of the surface chemistry and drug-polymer interaction of semi-crystalline micro-particles for the development of controlled release formulations. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 559–567, 2017.

MORSINK, M. A. J. et al. Immune Organs and Immune Cells on a Chip: An Overview of Biomedical Applications. **Micromachines**, v. 11, n. 9, 12 set. 2020.

MU, L. et al. Novel powder formulations for controlled delivery of poorly soluble anticancer drug: Application and investigation of TPGS and PEG in spray-dried particulate system. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 3, p. 565–575, 2005.

MURALIDHAR, P. et al. An over view: Protein and peptide based drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 42, n. jan, p. 169–178, 2017.

MURRAY, P. J. Immune regulation by monocytes. **Seminars in Immunology**, v. 35, p. 12–18, 2018.

NADAL, J. M. et al. A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: Development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, p. 7–11, 2015.

NAKASHIMA, C.; OTSUKA, A.; KABASHIMA, K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 1, p. 3–8, 2018.

NAMVIRIYACHOTE, N. et al. Polyurethane-biomacromolecule combined foam dressing containing asiaticoside: fabrication, characterization and clinical efficacy for traumatic dermal wound treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 510–520, 2020.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 275–301, 2016.

OETJEN, L. K.; NOTI, M.; KIM, B. S. New insights into basophil heterogeneity. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 5, p. 549-561, 2016. Disponível em: <https://www-ncbi-nlm-nih.ez82.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC5010479/>. Acesso em: 2 nov. 2020.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International Immunology**, v. 30, n. 11, p. 511–528, 2018.

OLSON, O. C.; KANG, Y. A.; PASSEGUÉ, E. Normal hematopoiesis is a balancing act of self-renewal and regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1–23, 2020.

PABST, R. The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: The critical role for T lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 7, p. 1096-1100, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.201747392>. Acesso em: 7 nov. 2020.

PARDHI, V. P.; JAIN, K. Impact of binary/ternary solid dispersion utilizing poloxamer 188 and TPGS to improve pharmaceutical attributes of bedaquiline fumarate. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, n. Jan, p. 102349, 2021.

PARVEEN, P. et al. An Overview of Immunology -Systemic Review. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 1, n. 8, p. 628–644, 2013.

PASCHEN, C. A. et al. Simultaneous quantification of polysorbate 20 and poloxamer 188 in biopharmaceutical formulations using evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, 2021.

PENG, K. et al. Implantable sandwich PHBHHx film for burst-free controlled delivery of thymopentin peptide. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 3, p. 432–439, 2018.

RADETA, M. et al. Isolation of thymus gland fractions and the determination of their biological activity. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 3, p. 225–234, 2007.

RANGA RAO, K. V.; PADMALATHA DEVI, K. Swelling controlled-release systems: recent developments and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 48, n. 1–3, p. 1–13, 1988.

RAROKAR, N. R. et al. Nanostructured Cubosomes in a Thermoresponsive Depot System: An Alternative Approach for the Controlled Delivery of Docetaxel. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 2, p. 436–445, 2016.

RAROKAR, N. R.; SAOJI, S. D.; KHEDEKAR, P. B. Investigation of effectiveness of some extensively used polymers on thermoreversible properties of Pluronic® tri-block copolymers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 220–230, 2018.

RASBAND, W. **ImageJ**. Bethesda, Maryland National Institutes of Mental Health , 2010. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, n. 1, p. 7–14, 2007.

RAVIN, K. A.; LOY, M. The eosinophil in infection. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology Humana**, v. 50, p. 214-227, 2015. Disponível em: <https://link-springer-com.ez82.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12016-015-8525-4>. Acesso em: 1 nov. 2020.

SALVIONI, L. et al. Oral delivery of insulin via polyethylene imine-based nanoparticles for colonic release allows glycemic control in diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 110, p. 122–130, 2016.

SANTOS, F. R. DOS. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88341>. Acesso em: 10 ago. 2020.

SARABU, S. et al. Hypromellose acetate succinate based amorphous solid dispersions via hot melt extrusion: Effect of drug physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, 2020.

SCHAAD, U. B.; ESPOSITO, S.; RAZI, C. H. Diagnosis and management of recurrent respiratory tract infections in children: A practical guide. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2015.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 407–419, 2019.

SCHWARTZ, C.; EBERLE, J. U.; VOEHRINGER, D. Basophils in inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 778, p. 90–95, 2016.

SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regenerative Biomaterials**, v. 4, n. 1, p. 55–68, 2017.

SHAHBAZI, S.; BOLHASSANI, A. Immunostimulants: Types and Functions. **Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 45–51, 2016.

SHAMEEM, M. M. et al. Materials Today : Proceedings A brief review on polymer nanocomposites and its applications. **Materials Today: Proceedings**, 2020.

SHARMA, P. et al. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 707–723, 2017.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.

SINGH, G.; PAI, R. S. Dawn of antioxidants and immune modulators to stop HIV-progression and boost the immune system in HIV/AIDS patients: An updated comprehensive and critical review. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 600–605, 2015.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40–54, 2015.

SOUDRY-KOCHAVI, L. et al. Improved oral absorption of exenatide using an original nanoencapsulation and microencapsulation approach. **Journal of Controlled Release**, v. 217, p. 202–210, 2015.

SOUERY, W. N. et al. Controlling and quantifying the stability of amino acid-based cargo within polymeric delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 300, n. Dec 2018, p. 102–113, 2019.

STÅHL, K. et al. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1–2, p. 227–237, 2002.

TALMADGE, J. E. Natural product derived immune-regulatory agents. **International Immunopharmacology**, v. 37, p. 5–15, 2016.

THAPA, P.; FARBER, D. L. The Role of the Thymus in the Immune Response. **Thoracic surgery clinics**, v. 29, n. 2, p. 123–131, 2019.

TI, D. et al. Controlled release of thymosin beta 4 using a collagen-chitosan sponge scaffold augments cutaneous wound healing and increases angiogenesis in diabetic rats with hindlimb ischemia. **Tissue Engineering - Part A**, v. 21, n. 3–4, p. 541–549, 2015.

TROUW, L. A.; PICKERING, M. C.; BLOM, A. M. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 9, p. 538–547, 2017.

VALESINI, G. et al. Clinical improvement and partial correction of the T cell defects of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and lymphadenopathy syndrome (LAS) by a calf thymus acid lysate. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 531–532, 1986.

VALESINI, G. et al. of HIV Thymus and Infection: Acid Lysate Defects Improves Clinical Stages Symptoms in the Early Second. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 23, n. 12, p. 1915–1919, 1987.

WAISMAN, A. et al. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 2, p. 153–163, 2017.

WANG, B. et al. A critical review of spray-dried amorphous pharmaceuticals: Synthesis, analysis and application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 594, n. October 2020, p. 120–165, 2021.

WANG, M. et al. Synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared spectromicroscopy for characterization of the protein/peptide distribution in single microspheres. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 3, p. 270–276, 2015.

WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature Reviews Immunology**, Nature Publishing Group, , 1 dez. 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5783317/?report=abstract](https://www.nature.com/articles/PM5783317?report=abstract). Acesso em: 1 nov. 2020.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **[The top 10 causes of death]**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 10 fev. 2021.

WIECZOREK, M. et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 292, 2017. Disponível em: /pmc/articles/PMC5355494/?report=abstract. Acesso em: 8 nov. 2020.

WILSON, J. L. THYMUS EXTRACTS : An International Literature Review of Clinical Studies. **Foundation for Immunology and Nutrition, Development, Education and Research**, v. 1, p. 1–47, 1999.

WINTER, M. P. et al. Immunomodulatory treatment for lymphocytic myocarditis—a systematic review and meta-analysis. **Heart Failure Reviews**, v. 23, n. 4, p. 573–581, 2018.

WOLF, E. et al. Thymic peptides for treatment of cancer patients (Review). **Cochrane Library**, n. 2, 2011.

WU, H. et al. Design and evaluation of baicalin-containing in situ pH-triggered gelling system for sustained ophthalmic drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 410, n. 1–2, p. 31–40, 2011.

YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.

YANG, J. F. et al. Thymosin-loaded enteric microspheres for oral administration: Preparation and in vitro release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1–2, p. 41–47, 2005.

YANG, N. et al. Moisture sorption and desorption properties of gelatin, HPMC and pullulan hard capsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 659–666, 2020.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 7, p. 1274–1281, 1 jul. 2015.

YE, C.; VENKATRAMAN, S. The long-term delivery of proteins and peptides using micro/nanoparticles: Overview and perspectives. **Therapeutic Delivery**, v. 10, n. 5, p. 269–272, 2019.

YINGNGAM, B. et al. Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, n. May, p. 101138, 2019.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS VIA ESPECTROFOMETRIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS EXISTENTES. **QUÍMICA NOVA**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZANETTI, M. et al. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. December 2018, p. 198–207, 2019.

ZARRINTAJ, P. et al. Ploxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 110, p. 37–67, 2020.

ZHAI, X. et al. Preparation and characterisation of solid dispersions of tanshinone IIA, cryptotanshinone and total tanshinones. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 85–97, 2017.

ZHANG, H.; CHEN, J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 10, p. 1773–1781, 2018.

ZHANG, L. et al. Microstructures and properties of photophobic films composed of hydroxypropyl methylcellulose and different salts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 945–951, 2018.

ZHANG, Y. et al. Investigation into Efficiency of a Novel Glycol Chitosan-Bestatin Conjugate to Protect Thymopoietin Oligopeptides from Enzymatic Degradation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 2, p. 828–837, 2016.

ZHANG, Y. et al. Just how prevalent are peptide therapeutic products? A critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 587, n. May, p. 119491, 2020.