



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

# **Desenvolvimento, caracterização e veiculação de lipossomas contendo Indometacina e Capsaicina num gel para uso tópico**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica

**Trabalho realizado sob a orientação do:**

Professor Doutor Paulo Alexandre Lourenço Lobão

**E sob coorientação da:**

Professora Doutora Carla Manuela Soares de Matos

Fábio Miguel Fonseca Nunes

Dezembro | 2018

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE  
INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE TAL SE  
COMPROMETE

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas e símbolos .....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 - LIPOSSOMAS.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Generalidades .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Considerações físico-química dos seus componentes .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Classificação dos Lipossomas .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Preparação de lipossomas.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Encapsulação em lipossomas .....</b>	<b>9</b>
1.5.1. Métodos Físicos ou de dispersão mecânica .....	10
1.5.1.2. Extrusão .....	10
1.5.3. Purificação de lipossomas.....	11
<b>1.6. Estabilidade dos lipossomas .....</b>	<b>11</b>
1.6.1. Verificação da estabilidade .....	14
<b>1.7. Aplicações.....</b>	<b>14</b>
1.7.1. Lipossomas como transportadores de fármacos.....	15
<b>CAPÍTULO 2 - LIPOSSOMAS NO TRATAMENTO TÓPICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Estrutura da pele.....</b>	<b>18</b>
2.1.1. Epiderme.....	19
2.1.2. Derme.....	21
2.1.3. Hipoderme .....	22
<b>2.2. Processo inflamatório .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 3 - LIPOSSOMAS CONTENDO INDOMETACINA E CAPSAICINA .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Interação fármaco/lipossoma.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Indometacina.....</b>	<b>27</b>
3.2.1. Descrição .....	27
3.2.2. Caracterização físico-química <sup>79</sup> .....	27
3.2.3. Mecanismo de ação .....	27
3.2.4. Precauções no manuseamento.....	28
3.2.5. Precauções na administração .....	28
<b>3.3. Capsaicina.....</b>	<b>28</b>
3.3.1. Descrição .....	28

3.3.2. Caracterização físico-química <sup>79</sup> .....	28
3.3.3. Mecanismo de ação .....	29
3.3.4. Precauções no manuseamento .....	29
3.3.5. Precauções na administração .....	29
<b>3.4. Preparação da forma farmacêutica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5. Caracterização dos lipossomas e avaliação da percentagem de incorporação .....</b>	<b>31</b>
3.5.1. Determinação do tamanho médio de partícula .....	31
3.5.2. Determinação da quantidade de fármaco incorporado .....	32
<b>3.6. Avaliação da libertação.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7. Avaliação da estabilidade química e física.....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA DISPERSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO INDOMETACINA E CAPSAICINA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Materiais, Reagentes e Equipamentos .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Metodologia de obtenção da dispersão lipossómica .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3. Caracterização físico química dos lipossomas.....</b>	<b>36</b>
4.3.1. Determinação do pH.....	37
4.3.2. Determinação do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersão.....	38
4.3.3. Determinação da carga superficial dos lipossomas (Potencial zeta).....	39
4.3.4. Doseamento e eficácia de encapsulação da Indometacina e Capsaicina .....	39
4.3.4.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis .....	40
4.3.4.2. Espectrofotometria derivativa .....	49
<b>CAPÍTULO 5 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO A DISPERSÃO LIPOSSÓMICA DE INDOMETACINA E CAPSAICINA.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Preparação do gel de carbopol .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2. Caracterização do gel contendo a dispersão lipossómica .....</b>	<b>57</b>
5.2.1. Caracterização organolética .....	58
5.2.2. Determinação do pH da formulação .....	58
5.2.3. Viscosidade do gel .....	59
5.2.4. Análise da textura da formulação .....	60
<b>CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVA DE FUTURO .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

## **Agradecimento**

Ao concluir este trabalho agradeço a todos aqueles que fizeram com que o mesmo se tornasse possível.

Ao Professor Doutor Paulo Lobão, agradeço a simpatia, o bom acolhimento, a valiosa orientação e a disponibilidade para resolver os problemas e as dúvidas que foram surgindo no decurso da presente dissertação.

À Professora Doutora Carla Matos, manifesto a minha sincera gratidão pela infindável disponibilidade e infinito apoio que sempre demonstrou e também pela preciosa orientação na elaboração deste trabalho.

A todos os elementos e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, agradeço a simpatia e a ajuda prestada.

A todos os Professores Doutores do mestrado e membros do departamento de Tecnologia Farmacêutica, bem como do departamento de química-física, pela simpatia e disponibilidade demonstrada durante a realização deste trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais por todo o esforço, dedicação e empenho. Obrigado por acreditarem em mim.

Por fim, a todos os meus amigos e a todos os que contribuíram direta e/ou indiretamente para o sucesso deste trabalho, o meu gigantesco obrigado, pela paciência, pela confiança depositada, pela disponibilidade e pela partilha de conhecimentos, obrigado por contribuíram para o meu sucesso enquanto estudante e acima de tudo enquanto pessoa.

## Resumo

Em termos práticos, a administração de um fármaco leva a sua distribuição indiscriminada pelos diversos tecidos, órgãos ou células do organismo e, conseqüentemente, por uma ausência de especificidade para as áreas que necessitam de tratamento, resultando daí muitas vezes o aparecimento de efeitos secundários de toxicidade elevada. Posto isto, surgiu a necessidade da ciência criar sistemas que pudessem contrariar o fluxo negativo na saúde pública, surgindo assim os sistemas vetorizados, e destacando-se assim os lipossomas como vetores maioritariamente utilizados.

O conceito de lipossoma e a sua caracterização surgiu pela primeira vez em 1965 por Bangham e a sua equipa de investigadores.

Os lipossomas são microssistemas constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas espontaneamente orientadas em forma de esfera, separadas por fases aquosas e contendo maioritariamente um compartimento aquoso no seu interior. Tais estruturas, cujo diâmetro varia tipicamente entre os 50 nm e os 5 µm, formam-se espontaneamente quando alguns lípidos são dispersos em meio aquoso.

Dado a sua composição baseada em compostos naturais, relativamente não-tóxicos e maioritariamente biodegradáveis, logo após a sua descoberta surgiu a ideia de que poderiam ser usados como transportadores de moléculas farmacologicamente ativas. Posto isto, a tendência da investigação foi a de desenvolver novos sistemas suscetíveis de aumentar a eficácia terapêutica, aumentar a segurança dos fármacos administrados, bem como facilitar a sua administração, afirmando-se assim cada vez mais, a importância dos sistemas vetorizados de encapsulação de fármacos.

Neste âmbito da vectorização de fármacos, os lipossomas assumem, hoje em dia, uma posição de relevo face às vantagens decorrentes das características únicas destes sistemas, que os tornam veículos seguros e eficazes, e de que se pode salientar: a biocompatibilidade e biodegradabilidade; a grande versatilidade estrutural (devida a existência do núcleo interno aquoso e da bicamada fosfolipídica de carácter lipófilo, de que resulta a possibilidade de veicularem moléculas de diferentes características); a existência do núcleo aquoso, que minimiza a possibilidade de ocorrerem alterações conformacionais dos fármacos a eles associados que pudessem levar à diminuição ou perda de atividade; a possibilidade de manipulação das suas características físico-químicas e, conseqüentemente, do seu comportamento *in vitro* e *in vivo*; e a possibilidade de fusão com células, que facilitam a introdução de fármacos e de futuramente de material genético.

Tais características tornam os lipossomas potenciais vetores nas mais inúmeras e vastas áreas de aplicação, onde a versatilidade demonstrada é frequentemente impulsionada pela capacidade de transporte de uma elevada variedade de substâncias.

Como tal, o objetivo deste trabalho é desenvolver, caracterizar e veicular dois fármacos em lipossomas capazes de atuar em tecidos inflamados após a sua veiculação num gel. Os resultados obtidos mostraram que as vesículas formadas demonstraram boas características de veiculação no gel, bem como uma ótima eficácia de encapsulação, demonstrando que a metodologia utilizada foi eficaz.

**Palavras-chave:** Vectorização; Lipossomas; Fosfolípidos; Vesículas; Fármacos

## Abstract

In practical terms, the administration of a drug leads to an indiscriminate distribution of several tissues, organs or cells in the body. Therefore a lack of specificity in the areas requiring treatment, often leads to a greater risk of high toxicity side effects. Given this problem, science had to face the need of creating systems in order to counteract this negative effect to public health, thus resulting in vectorised systems, in which liposomes are the most used vectors.

The concept of liposome and its characterisation was first introduced in 1965 by Bangham and his team of researchers.

Liposomes are microsystems that consist of one or more lipid bilayers formed by a ball-shaped structure, separated by aqueous layers and containing, for the most part, an aqueous compartment inside. Such structures, which diameter typically can be found in the range of 50 nm and 5  $\mu$ m are formed spontaneously when some lipids are scattered in an aqueous environment.

Due to their composition based on natural compounds, relatively non-toxic and mainly biodegradable, right after their discovery it was thought that they could be used as carriers of pharmacologically active molecules. That said, research tended to develop new systems which were likely to increase the therapeutic efficiency, the safety of administered drugs and facilitate their administration, proving, once more, the importance of vectored systems of the encapsulation drugs.

In this context of drug vectorisation, liposomes have reached up to this point in time a prominent position given the advantages of the systems' unique features, which make them safer and more efficient vehicles, in particular: biocompatibility and biodegradability; large structural versatility (due to existence of internal aqueous core and phospholipid bilayer of a lipophilic nature, making it possible to carry molecules of different characteristics); the existence of an aqueous core, which minimises the chances of conformational changes taking place in drugs associated with them that could lead to a decrease or loss of activity; the fact that their physicochemical characteristics can be manipulated. The resulting consequence is its behaviour *in vitro* and *in vivo*; and the fact that they can fuse with cells, facilitating the introduction of drugs and, in the future, of genetic material.

These characteristics make the liposomes potential vectors in many and wide-ranging areas of application, where their versatility is often boosted by their ability to transport a high variety of substances.

As such, the aim of this work is to develop, characterize and transport two drugs in liposomes capable of acting on inflamed tissues after their introduction into a gel.



The obtained results showed that the formed vesicles showed good gel placement characteristics, as well as an excellent encapsulation efficiency, demonstrating that the methodology used was effective.

**Keywords:** Vectoring; Liposomes; Phospholipids; Vesicles; Drugs

## Índice de Figuras

Figura 1- Lipossoma e constituição da bicamada fosfolipídica (respetivamente) <sup>107</sup> .....	16
Figura 2 - Esquema físico-químico dos fosfolípidos <sup>108</sup> .....	17
Figura 3 - Classificação dos Lipossomas <sup>109</sup> .....	19
Figura 4- Método da hidratação do filme lipídico <sup>110</sup> .....	21
Figura 5- Processo de extrusão <sup>41</sup> .....	22
Figura 6 - Estrutura da pele <sup>111</sup> .....	34
Figura 7 - Representação da ação das diferentes COX no organismo <sup>112</sup> .....	36
Figura 8 - Localização dos diferentes tipos de moléculas nos lipossomas <sup>113</sup> .....	38
Figura 9 - Esquema do método de obtenção dos lipossomas através do processo de hidratação do filme lipídico .....	47
Figura 10 - Solução stock de Indometacina .....	46
Figura 11 - Diferentes níveis preparados para a construção da curva de calibração da Indometacina .....	56
Figura 12 - Membrana de diálise mergulhada no meio .....	66
Figura 13 - Suspensão lipossómica no interior da membrana de diálise.....	66
Figura 14 - Exemplificação do sistema de diálise completo .....	67
Figura 15 - Controlo da temperatura do meio de imersão da membrana .....	67
Figura 16 – Gel lipossómico preparado .....	69
Figura 17 – Texturómetro TA-TX2i da Stable Micro System UK .....	73
Figura 18 -Desenho gráfico da análise de firmeza e adesividade .....	74
Figura 19 -Desenho gráfico da análise de espalhabilidade .....	75

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Determinação do pH da suspensão lipossómica.....	36
Tabela 2 - Determinação do tamanho médio e do Índice de polidispersão das vesículas .....	37
Tabela 3 - Determinação do Potencial zeta das vesículas .....	50
Tabela 4- Níveis relativos à curva de calibração da Indometacina.....	54
Tabela 5 - Abs obtidas após análise dos diferentes níveis da curva de calibração da Indometacina .....	55
Tabela 6 - Níveis relativos à curva de calibração da Capsaicina.....	46

Tabela 7 - Abs obtidas após análise dos diferentes níveis da curva de calibração da Capsaicina.....	47
Tabela 8 – Eficácia de encapsulação da Indometacina.....	52
Tabela 9 - Eficácia de encapsulação da Capsaicina .....	52
Tabela 10 – Resultados relativos ao pH do gel.....	70

## **Índice de Gráficos**

Gráfico 1 - Curva de calibração da Indometacina .....	45
Gráfico 2 - Desenho de Residuais da Indometacina .....	45
Gráfico 3 - Curva de calibração da Capsaicina .....	48
Gráfico 4 - Desenho de residuais da Capsaicina .....	48
Gráfico 5 - Espectros de Abs da Indometacina e Capsaicina derivados.....	50
Gráfico 6 – Espectros de Abs da Indometacina e Capsaicina .....	50
Gráfico 7 - Valores comparativos de Abs derivada da Indometacina e Capsaicina .....	51
Gráfico 8 - Espectros de libertação in vitro da Indometacina e Capsaicina .....	53
Gráfico 9 - Comparação entre a libertação in vitro entre o branco e a Indometacina ..	67
Gráfico 10 - Resultados da análise da viscosidade .....	71
Gráfico 11 – Resultados da firmeza do gel .....	74
Gráfico 12 - Resultados da adesividade do gel .....	74
Gráfico 13 – Resultados da Espalhabilidade do gel .....	74

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

**AINEs** - Anti-inflamatórios não esteroides

**CL** – Cardiolipina

**EE** - Eficiência de encapsulação

**GUVs** - Giant Unimellar Vesicles

**LTs** - Leucotrienos

**LUVs** - Large Unimellar Vesicles

**MLVs** - Multimellar Vesicles

**MVVs** - Multivesicular Vesicles

**MTX** – Metotrexato

**PA** - Ácido fosfatídico

**PC** – Fosfatidilcolina

**PCS** - Espectroscopia de correlação fotônica

**PE** - Fosfatidiletanolamina

**PI** - Fosfatidilinositol

**PG** – Fosfatidilglicerol

**PGs** - Prostaglandinas

**PS** – Fosfatidilserina

**SFM** - Sistema Fagocítico Mononuclear

**SUVs** - Small Unimellar Vesicles

**TPA** - Texture Profile Analysis

**Tt** - Temperatura de transição de fase

**TXs** - Tromboxanos

**UV/Vis** - Radiação ultravioleta/visível

## INTRODUÇÃO GERAL

Qualquer processo farmacocinético depende essencialmente das características físico-químicas do fármaco. A biodisponibilidade, a falta de afinidade para com o receptor (farmacodinâmica), a complexidade do percurso *in vivo* e a eliminação ou inativação prematura da molécula ativa, representam problemas reais no que concerne à eficácia dos fármacos após administração.<sup>1</sup>

Em termos práticos, a administração de um fármaco leva à sua distribuição indiscriminada pelos diversos tecidos, órgãos ou células do organismo e, conseqüentemente, por uma ausência de especificidade para áreas que necessitam de tratamento, resultando maioritariamente um aparecimento de efeitos secundários de elevada toxicidade<sup>1,2</sup>

Posto isto, a tendência da investigação em tecnologia farmacêutica é a de desenvolver novos sistemas (como sistemas vectorizados) capazes impulsionar a eficácia terapêutica, com redução do número de doses administradas, bem como pela quantidade de fármaco por dose, visando permanentemente a segurança e respectiva melhoria da especificidade do fármaco para um local de ação.<sup>2,3</sup>

Estes sistemas vectorizados (vulgarmente designados em linguagem anglo-saxónica por “drug targeting”) tem por finalidade tornar a distribuição no organismo independente das propriedades físico-químicas inerentes à molécula ativa a veicular, incorporando-a num agente apropriado (vetor), escolhido em função de um determinado objetivo terapêutico.<sup>4,5</sup>

São várias as potencialidades da vectorização de fármacos, salientando a proteção da molécula ativa desde o local de administração até ao local de ação, propriedade que é inerente a cada vetor, melhoria na transposição de algumas barreiras fisiológicas, bem como uma melhoria da especificidade dos fármacos aumentando a sua afinidade para com o recetor, de forma a aumentar a concentração do fármaco num determinado órgão, tecido ou célula-alvo. Esta melhoria da especificidade vai originar espontaneamente uma diminuição da toxicidade, evitando a acumulação desnecessária de fármaco em tecidos particularmente sensíveis bem como possíveis efeitos secundários indesejáveis.<sup>3,4</sup>

Contudo, para que se possa usufruir de tais potencialidades, o vetor terá de apresentar características propícias ao fim pretendido e a aspetos gerais como:<sup>3,4</sup>

- Biocompatibilidade e biodegradação, independentemente da via de administração utilizada, não devendo induzir a formação de metabolitos tóxicos;

- Tamanho conveniente, de modo a permitir a incorporação de uma quantidade de fármaco suscetível de exercer o efeito terapêutico desejado alcançando determinados objetivos em termos de distribuição *in vivo*;
- Estrutura resistente de forma a proporcionar a proteção necessária da molécula ativa desde o local de administração até ao local de ação;
- Poder de fixação da molécula ativa até alcançar o local de ação, de modo a evitar a sua libertação prematura, mas permitindo também a reversão do complexo vetor-fármaco para que a molécula ativa possa interagir farmacologicamente com o alvo;
- Afinidade para com os órgãos, tecidos ou células-alvo;

Após numerosos estudos realizados, a tecnologia farmacêutica gerou vetores de fármacos cada vez mais complexos, sendo atualmente propostos em função do objetivo terapêutico, podendo ser divididos em três grupos principais: vetores de 1ª geração, vetores de 2ª geração e vetores de 3ª geração. <sup>6,7</sup>

Os vetores de 1ª geração contemplam estruturas simples, de tamanho relativamente elevado (entre 100 e 800 µm), concebidas com a finalidade de libertar a molécula ativa veiculada num determinado órgão.

Neste grupo incluem-se alguns vetores como:

- Microcápsulas: que são sistemas formados por um reservatório, delimitado por uma parede polimérica, onde se encontra dissolvida molécula ativa
- Microsféricas: que são sistemas formados por uma matriz polimérica onde se encontra dispersa a molécula ativa.

Os vetores de 1ª geração são frequentemente utilizados na veiculação de algumas substâncias anti-tumorais, e caracterizam-se pela necessidade de administração especial e o mais próximo possível do órgão alvo. <sup>8</sup>

Os vetores de 2ª geração, são os vetores mais frequentemente utilizados e estudados. Não necessitam de nenhum modo de administração particular e apresentam uma grande versatilidade.

De tamanho coloidal, geralmente inferior a 1 µm, estes vetores podem ser administrados por numerosas vias, entre as quais se salienta a via intravenosa, caso o local fisiológico visado seja um tecido. <sup>9</sup>

Dentro deste grupo distinguem-se dois tipos de vectorização: a vectorização passiva e a vectorização ativa:

Na vectorização passiva, a distribuição da molécula ativa depende apenas das características físico-químicas do vetor escolhido, ocorrendo preferencialmente para

nos órgãos ricos em células do sistema retículo endotelial (como por exemplo, as células de Kupffer do fígado e os macrófagos do baço, pulmões e medula). Contrariamente, na vetorização ativa a distribuição da molécula ativa depende de fatores externos ao vetor, como por exemplo a temperatura de um determinado tecido lesado. <sup>10,11</sup>

Os vetores de 3ª geração são suportes vesiculares, particulares ou moleculares acoplados a elementos capazes de reconhecer especificamente o “alvo” biológico visado, celular ou intracelular. <sup>11,12</sup>

Atualmente, os elementos de reconhecimento celular mais utilizados são os anticorpos monoclonais. Consistindo em complexos proteicos, estes elementos de reconhecimento surgem em resposta a determinados agentes estranhos ao organismo (vulgarmente denominados de antigénios). <sup>12</sup>

Este estudo baseia-se na conceção, análise e desenvolvimento de um gel lipossómico constituídos por Indometacina e Capsaicina que apresente características favoráveis aos mais variados níveis de aceitabilidade.



# CAPÍTULO 1 - LIPOSSOMAS

## 1.1. Generalidades

Os lipossomas são vesículas esféricas, com diâmetros compreendidos entre os nanômetros e os micrómetros, constituídos basicamente por fosfolípidos naturais ou sintéticos e, por vezes, por outros componentes da membrana celular, como o colesterol.

A estrutura dos lipossomas caracteriza-se pela existência de uma bicamada lipídica, capaz de formar estruturas mono ou pluricompartimentais, concêntricas, que alternam com fases aquosas. <sup>3,17</sup>

Contudo, toda esta definição visa o ano de 1965, quando Alec Bangham, com sua observação pioneira de que fosfolípidos em soluções aquosas poderiam formar estruturas fechadas em bicamadas, permitiu que a pesquisa sobre os lipossomas percorresse um longo caminho, convertendo-os de simples objetos de pesquisa biofísica em ambiciosos veículos terapêuticos. <sup>3</sup>

Neste mesmo período, Paul Ehrlich propunha pela primeira vez um sistema vetorizado, que ficara conhecido como “Bala Mágica de Ehrlich”. Este modelo compreendia que o fármaco deveria ser vetorizado, direcionando-o mais especificamente ao tecido alvo. <sup>14</sup> Inicialmente, os resultados das primeiras pesquisas foram desmotivantes, retratando uma elevada instabilidade físico-química e biológica bem como baixa eficiência na encapsulação de fármacos.

Mas, após anos de estudo, a utilidade dos lipossomas foi melhorada visando o aumento da estabilidade e a compreensão das características físico-químicas e interação com fluidos biológicos, ocupando atualmente um lugar de excelência no que concerne à veiculação de fármacos. <sup>14,15</sup>

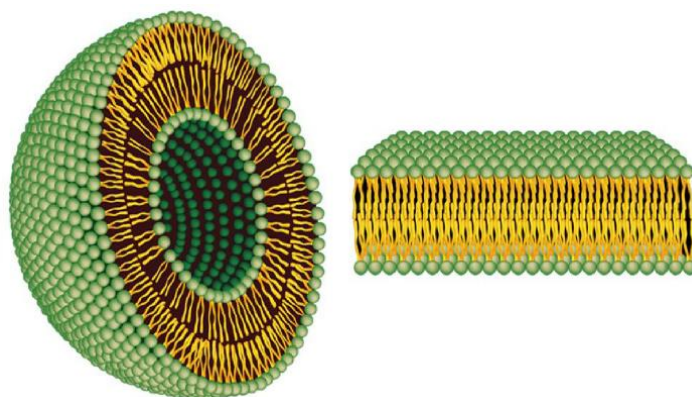


Figura 1- Lipossoma e constituição da bicamada fosfolipídica (respetivamente) <sup>107</sup>

## 1.2. Considerações físico-química dos seus componentes

Os fosfolípidos são moléculas anfipáticas, derivadas do glicerol ou da esfingosina <sup>15</sup> e de acordo com o número de álcoois, podem ser divididos em fosfoglicéridos e esfingomiélinas. <sup>17</sup>

Os fosfoglicéridos representam os principais fosfolípidos em células eucariotas e referem-se aos fosfolípidos que derivam do glicerol. São formados por duas partes em que uma é hidrófoba e a outra hidrófila, sendo que a hidrófoba é maioritariamente constituída por duas cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos saturados ou insaturados que esterificam igual numero de grupos hidroxilo do glicerol, apresentando mais normalmente acilos com um número de carbonos entre os 16 e os 18. Contrariamente a parte hidrófila esterifica no terceiro carbono do glicerol e é constituída por uma molécula de ácido fosfórico. Contém pelo menos um grupo hidroxilo e conforme os respetivos radicais, podem ser eletricamente neutros ou

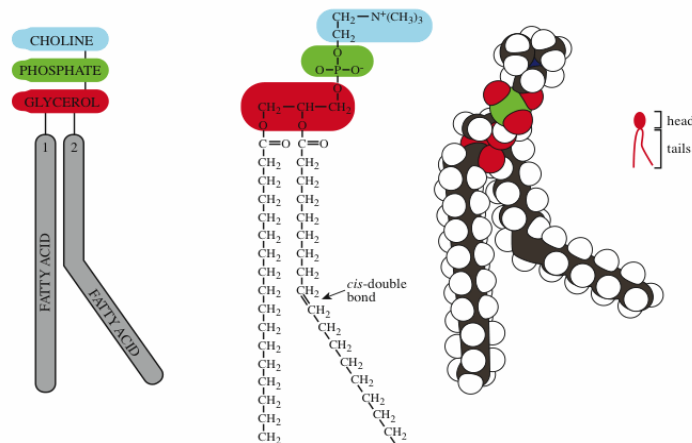


Figura 2 - Esquema físico-químico dos fosfolípidos <sup>108</sup>

apresentarem carga positiva <sup>15,17,36</sup>

As estruturas químicas dos fosfoglicéridos alteram a sua classificação devido:

- À estrutura da sua porção polar/hidrofílica;
- Ao comprimento e a saturação das suas cadeias apolares;

Se as alterações ocorrerem ao nível da sua parte polar/hidrofílica, originam fosfoglicéridos diferentes como:

- Fosfatidilcolina ( PC )
- Fosfatidiletanolamina ( PE )
- Fosfatidilserina ( PS )
- Ácido fosfatídico ( PA )
- Fosfatidilinositol ( PI )

- Fosfatidilglicerol ( PG )
- Cardiolipina ( CL )

Se ocorrerem ao nível do comprimento das suas porções apolares:

- Dipalmitoílfosfatidilcolina;
- Diestearoílfosfatidilcolina;

As esfingomielinas são também consideradas fosfolípidos, uma vez que contêm igualmente fósforo na sua composição, sendo contudo, os únicos fosfolípidos das membranas biológicas que não derivam do glicerol. Em substituição ao glicerol, as esfingomielinas apresentam uma molécula de esfingosina, a qual, quimicamente, é um álcool aminado contendo uma cadeia hidrocarbonatada longa e insaturada. <sup>3,14</sup>

Nas esfingomielinas, o grupo amina da esfingosina encontra-se ligado a um ácido gordo, através de uma ligação amina, e o grupo hidroxilo primário está esterificado, apresentando conformação semelhante à da fosfatidilcolina. <sup>15,16</sup>

Os fosfolípidos não apresentam obrigatoriamente uma origem sintética, podendo ter igualmente uma origem natural. Extraídos de materiais biológicos, como por exemplo da soja ou da gema do ovo, estes produtos apresentam características heterogéneas no que respeita a cadeias hidrocarbonatadas dos ácidos gordos esterificantes, exibindo naturalmente um grau variável de insaturação. <sup>16,17,36</sup>

Contrariamente, quando obtidos por síntese química, estes produtos apresentam uma composição bem definida, particularmente no que concerne aos grupos acilo, podendo ser obtidos com cadeias hidrocarbonadas saturadas ou insaturadas e com maior ou menor número de átomos de carbono. <sup>17,36</sup>

Para além dos fosfolípidos, é relevante realçar que os lipossomas podem incluir outras moléculas lipídicas na sua constituição, como é o caso do colesterol, onde a quantidade incluída na bicamada fosfolipídica é variável, podendo até atingir cerca de 50% da composição química total. Mas quando presentes, as moléculas de colesterol orientam o seu grupo hidroxilo para a fase aquosa, enquanto a parte tricíclica se intercala nas cadeias acíclicas dos fosfolípidos. Fornecendo aos lipossomas um aumento da sua estabilidade, um aumento da flexibilidade da membrana, e uma maior estanquicidade no que concerne à saída dos fármacos hidrossolúveis neles veiculados. <sup>16,17,36</sup>

### 1.3. Classificação dos Lipossomas

A diversidade de estruturas com que se apresentam os lipossomas deu lugar a uma classificação, cujo critério é fundamentalmente baseado no número de bicamadas existentes bem como na dimensão das vesículas formadas. Fig. 1

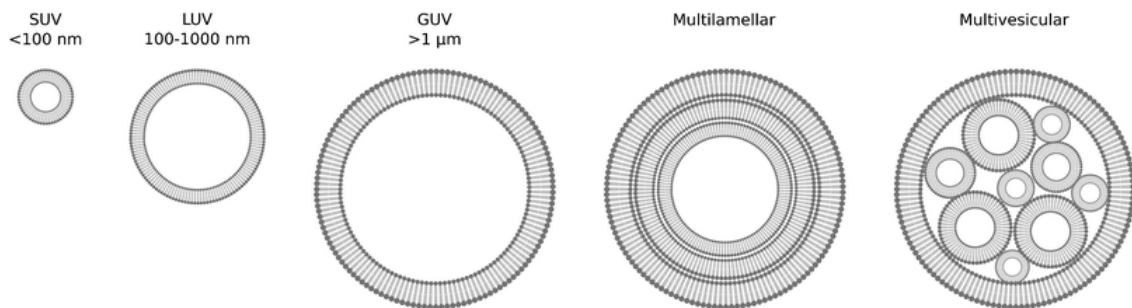


Figura 3 - Classificação dos Lipossomas <sup>109</sup>

Tal como referido, a diferença entre classificações visa a dimensão e o número de camadas existentes, sendo: <sup>19</sup>

- SUV (“Small Unilamellar Vesicles”) – Lipossomas pequenos, formados por apenas uma bicamada fosfolipídica, cujo a dimensão não ultrapasse os 100 nm.
- LUV (“Large Unilamellar Vesicles”) – Lipossomas grandes, formados por apenas uma bicada fosfolipídica, com dimensões compreendidas entre os 100-1000 nm.
- GUV (“Giant Unilamellar Vesicles”) - Lipossomas de dimensões elevadas (normalmente acima de 1 μm) mas igualmente formados por apenas uma bicada fosfolipídica.
- MLV (“Multilamellar Vesicles”) – Lipossomas normalmente de grandes dimensões, formados por várias bicamadas fosfolipídicas bem organizadas e alternadas com camadas aquosas.
- MVV (“Multivesicular Vesicles”) - Lipossomas normalmente de grandes dimensões, formados por várias vesículas dispersas no interior de uma vesícula de maior dimensão.

#### 1.4. Preparação de lipossomas

Contrariamente à preparação de outros sistemas, a preparação de lipossomas envolve uma menor complexidade no seu processo bem como uma menor complexidade na incorporação de bioativos quer hidro quer lipossolúveis, devido ao facto de constituírem organizações moleculares espontâneas quando dispersos em meios aquosos.

Tal organização molecular (em bicamada) está inteiramente relacionada com a necessidade que o sistema lipídico demonstra em arranjar uma organização compatível de baixar a energia livre do sistema. Perante tais circunstâncias, os fosfolípidos orientam-se inibindo a exposição das suas porções apolares com o meio aquoso envolvente e maximizando a exposição das suas porções polares a esse mesmo meio. <sup>19,36,41,44</sup>

Diversos parâmetros influenciam o processo de formação dos lipossomas, como a relação lípido/água, a temperatura, a agitação do sistema, a composição lipídica, o pH, a força iónica e a osmolaridade da fase aquosa. <sup>3,15,16</sup> Mas devido à ampla utilização de lipossomas, surgiu a necessidade de desenvolver métodos preparativos simples, rápidos, eficientes e industrialmente acessíveis. Contudo, é importante ressaltar que o tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação, e posto isto, visto a composição química, número de bicamadas lipídicas, distribuição de tamanhos e o volume encapsulado influenciarem, consideravelmente, qualquer aplicação dos lipossomas, o seu método de preparação deverá ser sempre escolhido criteriosamente. <sup>3,17</sup>

O processo clássico de preparação de lipossomas, iniciado por Alec Bangham em 1965, denomina-se método de hidratação do filme lipídico e atualmente compreende 3 passos básicos <sup>17,19</sup>

1. Secagem dos lípidios dissolvidos num solvente orgânico;
2. Hidratação do filme lipídico;
3. Agitação da dispersão resultante;
4. Purificação;

Neste método, uma fina e homogénea camada lipídica é depositada nas paredes de um balão de vidro, onde por evaporação, sob corrente de gás inerte, de uma solução do lípido num solvente ou mistura de solventes orgânicos, os quais sejam, simultaneamente, eficientes na dissolução da concentração de lípido pretendida e suficientemente voláteis, como por exemplo, clorofórmio ou clorofórmio-metanol, a camada lipídica sofre o processo de secagem. O filme lipídico preparado é

posteriormente hidratado com uma solução aquosa, e a agitação da mistura conduz à formação espontânea de uma população de vesículas lipossômicas heterogêneas no que respeita ao tamanho e número de bicamadas lipídicas. Os lipossomas assim preparados são denominados de MLV. A Figura 2 apresenta os principais passos deste método. <sup>19,36</sup>



Figura 4- Método da hidratação do filme lipídico <sup>110</sup>

Este processo de preparação pode sofrer algumas variações, nomeadamente quanto ao solvente orgânico utilizado, à forma de secagem do lípido e aos parâmetros de agitação, como o tempo, a intensidade, o modo e a temperatura de agitação. <sup>41-44</sup>

Contudo, este método conduz sempre à formação de vesículas multilamelares muito heterogêneas no que respeita ao tamanho, forma e número de bicamadas lipídicas, e quando se pretende obter vesículas homogêneas e de tamanho bem definido bem como encapsular a molécula ativa desejada, torna-se necessário submeter os MLVs a processos adicionais. <sup>15</sup>

### 1.5. Encapsulação em lipossomas

Ao longo do tempo, e devido às inúmeras tentativas de encapsulação de fármacos, foi cientificamente provado que o carácter hidrofílico, hidrofóbico e anfifílico de certas substâncias representara alguns dos fatores condicionantes do grau de encapsulação em lipossomas, e que perante tal facto, a seleção do método teria de ser criteriosamente feita, dividindo todos os métodos por dois grupos distintos <sup>19,41,44</sup>

- Encapsulação passiva
- Encapsulação ativa.

A encapsulação passiva é um processo simples e representa o método mais utilizado de encapsulação de ativos em lipossomas. Ocorrendo basicamente na sequência do processo de formação espontânea dos lipossomas, a encapsulação

passiva compreende dois métodos de realização: métodos físicos ou de dispersão mecânica e os métodos químicos ou de dispersão no solvente. <sup>3,14,19</sup>

No caso da encapsulação ativa, a veiculação do ativo ocorre após a formação dos lipossomas, tendo sido este método, especialmente concebido para substâncias com carácter anfifílico que se apresentem como susceptíveis de atravessar a bicamada fosfolipídica dos lipossomas, pré-formados. <sup>3,14,16</sup>

### 1.5.1. Métodos Físicos ou de dispersão mecânica

São vários os processos capazes de encapsular ativos passivamente bem como conduzir à obtenção de lipossomas unilamelares no mesmo processo, contudo, os processos mais frequentemente usados como métodos de dispersão mecânica são, nomeadamente, a sonicação e a extrusão, embora existam outros como a “french pressure cell”, microfluidização/homogeneização, desidratação/re-hidratação, congelação-descongelação. <sup>3,14,41,44</sup>

#### 1.5.1.1. Extrusão

A extrusão baseia-se na passagem forçada dos MLVs através de filtros com um diâmetro de poro bem definido, sob uma elevada pressão de um gás inerte, a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do ou dos lípidos constituintes da suspensão. A repetição deste processo de extrusão tende a diminuir o número de bicamadas lipídicas e após aproximadamente 10 extrusões, os lipossomas apresentam-se predominantemente homogéneos e unilamelares. O seu diâmetro final vai depender do tamanho do poro utilizado e das características do próprio lípido.

<sup>14,15,19,41,44</sup>

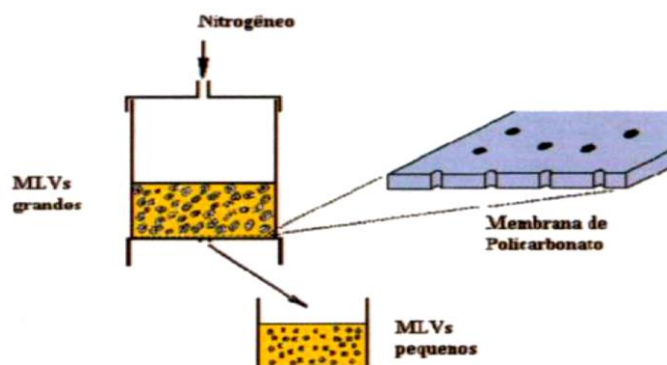


Figura 5- Processo de extrusão <sup>41</sup>

### 1.5.3. Purificação de lipossomas

Na maior parte dos casos a encapsulação de fármacos em lipossomas não apresenta uma eficácia total, verificando-se ativos não encapsulados na dispersão. Posta tal problemática, é essencial a remoção do material não encapsulado, uma vez que, ao ativo livre pode estar associado um elevado potencial tóxico, ou o mesmo pode interferir com a estabilidade do lipossoma. Contudo, por vezes, na dispersão final verificam-se também vesículas lipossômicas vazias, principalmente quando o processo de preparação é a extrusão.<sup>36</sup>

Posta tal problemática, e caso se pretenda a utilização de apenas uma das populações, torna-se necessário purificar a dispersão final, correspondendo à separação do material não encapsulado e/ou à separação de uma dada população de lipossomas de uma outra existente no mesmo meio. Como exemplo de técnicas de purificação de lipossomas podem referir-se a cromatografia de exclusão molecular e a ultracentrifugação, cuja utilização depende de fatores como o volume de amostra a tratar<sup>14,17,36,41,44</sup>.

O princípio de separação por cromatografia de exclusão molecular baseia-se nos diferentes tamanhos moleculares dos constituintes a separar, sendo os de menores dimensões retardados relativamente aos de maiores dimensões no seu deslocamento ao longo de uma coluna de gel, o qual se for escolhido de forma adequada permite uma separação eficiente.<sup>17,36</sup>

Na ultracentrifugação a amostra é sujeita a forças centrífugas que determinam, em função da sua intensidade, a sedimentação dos constituintes de maior densidade, permanecendo os restantes no líquido sobrenadante. Assim a ultracentrifugação, além de separar os componentes de uma mistura, tem também a vantagem de concentrar a amostra desejada.<sup>21,22,44</sup>

## 1.6. Estabilidade dos lipossomas

As formulações lipossômicas constituem sistemas suscetíveis de sofrer diversos tipos de alterações de natureza física e química. Contudo, se preparados e armazenados sob condições bem específicas, a ocorrência destas alterações pode ser minimizada.<sup>14,15</sup>

Fisicamente, e dependendo da sua constituição, bem como do meio envolvente, os lipossomas podem sofrer agregação, fusão, deposição, rutura membranar e, no caso de encapsularem ativos, perda do seu conteúdo. Do ponto de



vista químico, a instabilidade dos lipossomas passa pela possível ocorrência de reações de hidrólise bem como de oxidação nos fosfolípidos provocadas por vários fatores. <sup>16,17,36</sup>

A agregação e sedimentação é essencialmente provocada pelas forças de Van der Waals sendo claramente mais pronunciadas nas vesículas com maiores dimensões, constituindo um fenómeno natural e inevitável. No entanto, a inclusão de uma quantidade reduzida de fosfolípidos carregados negativamente na constituição lipídica representa um método simples para reduzir este processo. <sup>17</sup>

A velocidade a que um composto se difunde através da membrana lipossómica depende do seu peso molecular, carga e hidrofília. Assim, a difusão será retardada quando o peso molecular do composto encapsulado for elevado, ou quando este se encontrar carregado eletricamente e/ou sendo altamente hidrossolúvel. <sup>15,17,36</sup>

A composição da bicamada também representa um fator determinante no que determina a eficiência da retenção, verificando-se que a permeabilidade que apresenta, diminui com o aumento da saturação das cadeias acilo dos fosfolípidos, o que se explica pelo facto destes fatores provocarem um aumento da temperatura de transição de fase (Tt). <sup>3,14,15,36</sup>

Como referido anteriormente, o colesterol influencia a fluidez da membrana lipossómica, assim sendo, para uma dada composição fosfolipídica, que origine bicamada fluidas à temperatura ambiente, a inclusão deste esteroide conduz a uma regulação da rigidez e, em consequência, à diminuição da permeabilidade das vesículas. <sup>36</sup>

Normalmente, os lipossomas não contêm grupos redutíveis e, deste modo, apresentam uma grande estabilidade relativamente à redução, sendo, geralmente, a parte polar dos fosfolípidos muito mais estável que as cadeias hidrocarbonadas. Já os possíveis processos de oxidação dos fosfolípidos podem ser prevenidos ou minimizados pela utilização de lípidos de elevada pureza, pela utilização de alguns agentes anti-oxidantes, e pela correta conservação das dispersões finais resultantes, sob pressões de oxigénio reduzidamente controladas. <sup>17,36</sup>

O nível de oxidação dos lipossomas pode ser consideravelmente diminuído se se tiver em conta as seguintes precauções. <sup>3,14,15,17,24</sup>

- a) os lipossomas devem ser preparados a partir de fosfolípidos não armazenados durante longos períodos de tempo;
- b) evitar procedimentos que envolvam temperaturas elevadas;
- c) conduzir os processos de manufactura na ausência de oxigénio;
- d) desoxigenar as soluções aquosas com um gás inerte;

- e) armazenar as suspensões de lipossomas numa atmosfera inerte e no escuro;
- f) incluir antioxidantes (por exemplo, vitamina E) como componentes das membranas lipídicas.

Pode ainda haver necessidade de acrescentar à formulação um agente quelante de metais (como o ferro), para prevenir a iniciação da reação em cadeia.

Numa fase inicial, a hidrólise não afeta a estrutura dos lipossomas, mas altera significativamente outras propriedades, especialmente a permeabilidade da membrana. Por sua vez, os possíveis processos de hidrólise minimizam-se conservando as as formulações a baixas temperaturas, assegurando um pH próximo da neutralidade. <sup>22</sup>

Selecionando cuidadosamente o valor de temperatura, de pH e diminuindo o tempo de processamento, faz com que a hidrólise ocorra numa extensão não significativa. No entanto, esta lenta progressão pode condicionar a longo prazo a estabilidade das suspensões dos lipossomas, e, deste modo, recomenda-se que as amostras que necessitem de ser armazenadas por longos períodos de tempo sejam liofilizadas ou pelo menos congeladas <sup>3-14</sup>. Um método que evita totalmente as reações de hidrólise consiste no uso de lípidos que contêm ligações éter em vez de éster, como os que são encontrados nas membranas de bactérias halófilicas. A hidrólise *in vivo* como resultado da ação enzimática pode ser prevenida, por exemplo, pelo uso da esfingomiéline. <sup>16</sup>

No entanto, a liofilização representa atualmente o método de conservação com maior percentagem de sucesso. Devido à sublimação da água e à posterior redução até 3% do peso total em água, a liofilização tornou-se um processo que mais estabilidade traz às preparações lipossómicas minimizando significativamente processos como oxidações e hidrólises. <sup>16,17,23,24</sup>

Contudo, a liofilização pode conferir uma inatividade às preparações por destruição das membranas devido às baixas temperaturas inerentes ao processo, devendo por vezes, ser necessário a adição de agentes crioprotetores como a sacarose, a lactose ou trealose, que atuam na membrana impedindo o congelamento total e tornando a membrana ligeiramente fluida mesmo que em estado vítreo. <sup>16-17-23-24</sup>

Biologicamente, é necessário ter em consideração que as formulações lipossómicas são geralmente emulsões, cuja fase contínua corresponde à fase aquosa, facilmente sujeita a contaminação microbiológica. Os lipossomas não podem ser sujeitos a certos processos inibitórios como esterilização por exposição a altas temperaturas e também e a diversos tipos de radiação, assim como a agentes

químicos esterilizantes, e, deste modo, o único método possível para esterilizar após preparação é a filtração.<sup>24,26,27,28</sup>

Contudo este procedimento é apenas aplicável a lipossomas de tamanho reduzido, que possa permitir mais facilmente a passagem através de uma membrana com poros de dimensões reduzidas. Assim, este processo não pode ser aplicado a lipossomas de maiores dimensões, sendo, então, aconselhado a preparação dos mesmo segundo condições assépticas.<sup>21,23,24</sup>

Adicionalmente, a solução orgânica inicial lipídica deve passar através de uma membrana filtrante de celulose regenerada, promovendo a remoção de esporos e microorganismos.<sup>22,23,25</sup>

### 1.6.1. Verificação da estabilidade

A verificação da estabilidade física das formulações lipossômicas pode efetuar-se através da avaliação do diâmetro médio das vesículas ao longo do tempo. A avaliação da degradação por fenómenos de oxidação pode ser efetuada pela determinação dos seus produtos finais, nomeadamente peróxidos, aldeídos e ligações duplas ou triplas conjugadas, os quais podem ser facilmente detetados por espectrofotometria de ultravioleta/vísivel (UVA/vis) ou mesmo pelo seu odor.<sup>16,17,22,23</sup>

## 1.7. Aplicações

Dada a sua composição, os lipossomas são considerados altamente biocompatíveis, apresentando-se similares a certas membranas biológicas, biodegradáveis, apirogénicos e praticamente desprovidos de toxicidade. Como já referido, as suas características farmacocinéticas juntamente com a capacidade de poderem transportar uma grande diversidade de substâncias quer na fase aquosa quer na fase lipídica, contribuíram decisivamente para que os lipossomas se considerassem vetores altamente especializados como sistemas transportadores de agentes bioativos.<sup>15,16</sup>

Da grande diversidade de sistemas lipossômicos para uso clínico, apenas serão referidos neste trabalho os destinados a preparações para administração cutânea.

### 1.7.1. Lipossomas como transportadores de fármacos

A capacidade dos lipossomas para proteger e conduzir fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis, assim como a sua biocompatibilidade com as membranas celulares, constituem algumas das principais razões para a sua aplicação como sistemas transportadores de fármacos em farmacologia e medicina. Assim, os lipossomas podem ser utilizados nas mais diversas terapias (como por exemplo, terapia contra doenças cancerígenas, contra infeções, contra inflamações, na intoxicação através de agentes quelantes capazes de remover os metais acumulados nos tecidos), bem como em meios auxiliares de diagnóstico (como na visualização de metástases através da incorporação de materiais de contraste e de isótopos radioactivos) <sup>15,16,17,36</sup>

A administração de um fármaco veiculado influencia os seus parâmetros relativos à farmacocinética, farmacodinâmica e biodistribuição, os quais, por sua vez, afetam o seu índice terapêutico <sup>15-16</sup>. Uma das principais vantagens da utilização de lipossomas como transportadores é a facilidade de incorporação de um fármaco, independentemente da sua carga ou massa molecular, podendo mesmo acomodar substâncias com características de polaridade muito diferentes no mesmo sistema. <sup>16,17</sup>

Como formulação farmacêutica, as principais vantagens consistem no aumento da solubilização de fármacos quer hidro quer lipossolúveis, bem como a proteção conferida por estes sistemas à hidrólise dos fármacos, provocada, por exemplo, pela ação de enzimas degenerativas ou até de condições de pH adversas. <sup>15,16,17</sup>

Contudo, já existem estudos bem caracterizados em termos físico-químicos, de estrutura, de estabilidade, toxicidade (sendo preparados a partir de substâncias naturais são relativamente não tóxicos e biodegradáveis), imunogenicidade e formas de administração *in vivo* (intravenosa, intramuscular, subcutânea, dérmica, ocular, pulmonar, nasal ou oral), dispendo-se de um vasto leque de possibilidades na escolha do sistema mais adequado para cada fim. Contudo, embora os resultados obtidos *in vitro* sejam encorajadores, a aplicação de lipossomas *in vivo* está limitada pela sua retenção ao nível do sistema fagocítico mononuclear (SFM) <sup>3,14,15,16</sup>

Na corrente sanguínea, os lipossomas (considerados corpos estranhos ao organismo) são rapidamente capturados pelos macrófagos e aprisionados no fígado, baço, nódulos linfáticos, pulmões e medula óssea, os quais têm como função a destruição de antigénios que entram no organismo. Deste modo, o tempo de vida dos lipossomas na corrente sanguínea pode ser reduzido drasticamente. <sup>14</sup>

Contudo, a utilização de lipossomas como sistemas transportadores de fármacos, continua a ter grandes vantagens relativamente a outras famílias de

transportadores, mas parte destes problemas levaram ao desenvolvimento de sistemas modificados, atribuindo novas capacidades aos lipossomas, direcionando-os mais especificamente para o alvo e evitando a sua captura e posterior degradação pelo SFM. <sup>14,16</sup> Estas características são essencialmente atribuídas pela inserção de determinadas moléculas na sua camada exterior, como anticorpos específicos para determinadas células, revestimento com imunoglobinas agregadas por aquecimento, ligação covalente de anticorpos, incorporação de esfingomiéline e colesterol ou por incorporação de lípidos imunogénicos, glicoproteínas e glicolípidos naturais ou sintéticos <sup>14,21,22</sup>. Quando assim modificados, os lipossomas foram genericamente designados de lipossomas “stealth” e podem apresentar um tempo de vida na corrente sanguínea 100 vezes superior <sup>14,16</sup>.

A eficácia do transporte de um determinado fármaco pelos lipossomas depende não só da eficiência com que o lipossoma o veicula até ao local alvo, mas também da forma como a célula interatua com o lipossoma e recebe o seu conteúdo. Um lipossoma pode interatuar com uma célula de quatro maneiras, nomeadamente <sup>14,16,17,36</sup>

1. Endocitose: Este é o principal mecanismo de interação dos lipossomas com as células que possuem capacidade endocítica. Neste mecanismo os lipossomas passam a endossomas pela invaginação da membrana plasmática os quais posteriormente se fundem com os lisossomas, sendo sujeitos a digestão celular a um valor de pH inferior a 5. Durante a digestão dos lipossomas, é libertado o seu conteúdo aquoso, o qual pode permanecer no interior dos lisossomas até que ocorra a exocitose.
2. Fusão: Este mecanismo consiste na mistura completa dos lípidos constituintes da membrana dos lipossomas com os da célula resultando na libertação do seu conteúdo para o citoplasma.
3. Adsorção: Este mecanismo pode ser resultado de forças físicas atrativas ou da ligação de moléculas da membrana dos lipossomas a recetores específicos. Sendo facilitada com a presença de moléculas vetorizadoras na superfície do lipossoma ou quando a carga deste é contrária à da célula.
4. Transferência de lípidos: Este mecanismo compreende a transferência dos componentes lipídicos, como fosfolípidos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e colesterol, entre duas bicamadas fosfolípídicas em contacto, sem necessidade de rutura do lipossoma ou prejuízo da integridade membranar.

Como referido anteriormente, a possibilidade de usar estes sistemas transportadores como vetores de fármacos ("drug targeting") é a maior vantagem dos lipossomas, pois promove o transporte do fármaco para os locais de ação específicos, ao nível de um determinado órgão, tecido ou célula.<sup>3,14</sup>

A utilização de vetores pode ser efetuada de diferentes formas.<sup>21,36</sup>

a) vetorização natural: este tipo de vetorização tira partido dos mecanismos naturais e fisiológicos de defesa do organismo contra antigénios na corrente sanguínea. Sucintamente, a rápida captura dos lipossomas pelo SFM, e deposição em órgãos como fígado e baço, pode permitir o tratamento de infeções e carcinomas nesses locais.

b) vetorização física: Este tipo de vetorização depende do local alvo do lipossoma, o qual por vezes, pode induzir alterações na libertação do conteúdo vetorizado. A vetorização física envolve o uso de lipossomas sensíveis a parâmetros como a temperatura, pH ou luz. A sensibilidade das vesículas à temperatura pode ser controlada usando lípidos com diferentes temperaturas de transição de fase, de modo que quando atingem locais de temperatura mais elevada, como nos processos inflamatórios, libertam o seu conteúdo. No caso de libertação por alteração no parâmetro de pH, temos locais onde se verifique infeção, inflamação e tumores, que consistem em locais que possuem um valor de pH mais baixo comparativamente ao tecido saudável. Perante estes parâmetros, os lipossomas libertam então, o seu conteúdo. Lipossomas sensíveis a alterações de pH podem ser constituídos, por exemplo, por fosfatidiletanolamina, os quais se tornam instáveis quando o valor de pH baixa.

c) vetorização compartimental: consiste na administração dos lipossomas nos locais onde o efeito terapêutico é requerido.

d) vetorização mediada por ligando: envolve a modificação da superfície dos lipossomas pela introdução de moléculas, como glicolípidos, glicoproteínas, lipopolissacarídeos ou anticorpos, que se irão ligar a recetores específicos na célula-alvo.

Ao nível da administração destes sistemas, as principais vias são a intravenosa, intra-peritoneal e sub-cutânea, mas (como anteriormente referenciado) a grande e principal desvantagem da utilização destas vias consiste no tempo de vida dos lipossomas na corrente sanguínea devido à captura imediata pelo SFM.<sup>24,25</sup>

Uma via oral, sendo por vezes classificada como preferencial, consiste numa via alternativa às vias acima referenciadas. Contudo a administração de lipossomas por esta via é por vezes dificultada pelas condições agressivas inerentes ao trato

gastrintestinal, nomeadamente: a presença de enzimas degradativas ao longo do trato, o facto da impossibilidade que o trato gastrointestinal apresenta à absorção de agregados de maiores dimensões e o baixo valor de pH estomacal que representa o primeiro grande obstáculo para as preparações que optam por esta via. Como solução, a utilização de MLVs pode constituir uma alternativa aos problemas encontrados por esta via, pois após tais adversidades, as múltiplas bicamadas que constituem a morfologia dos MLVs, vão se degradando gradualmente, libertando o ativo aos poucos. Como alternativa, outras vias utilizadas para administração de formulações contendo lipossomas são por exemplo: a via tópica (que será a via abordada e estudada no decorrer deste trabalho) e a via pulmonar. Ambas as vias são utilizadas (principalmente) para a veiculação de fármacos de ação local.<sup>24,25,40</sup>

Do exposto se depreende que, seja qual for o fármaco sujeito a encapsulação ou a via de administração, um requisito fundamental para o desenvolvimento de uma formulação com lipossomas é uma elevada taxa de encapsulação do fármaco a ser veiculado, quer o fármaco se associe com a membrana lipídica, quer seja aprisionado no compartimento aquoso interno, pois uma taxa elevada de encapsulação diminui o custo das formulações e os riscos de toxicidade associada aos lipossomas<sup>24,25,32,40</sup>

## **CAPÍTULO 2 - LIPOSSOMAS NO TRATAMENTO TÓPICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS**

### **2.1. Estrutura da pele**

Tendo uma área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, uma espessura de aproximadamente 3 mm, e representando 10% do nosso peso total, a pele é avaliada como o maior órgão inerente ao corpo humano.<sup>50</sup>

Durante muito tempo (aproximadamente até ao final do Séc. XIX), a pele era considerada uma barreira impermeável a quase todas as substâncias, exceto aos gases, sendo apenas no Séc. XX que se generalizou a ideia de que nem todas as camadas da pele apresentavam igual grau de permeabilidade, chegando-se à conclusão de que a epiderme é muito menos permeável que a derme.

No presente, é perfeitamente aceitável a ideia de que é o estrato córneo a principal barreira à absorção de substâncias pela pele.<sup>50,51,52</sup>

Das várias funções inerentes à pele, salientamos:

- Função de barreira (contra agressões externas ambientais como temperatura, radiações, agentes químicos, microrganismos e alérgenos);
- Regulação da perda de humidade e de alguns nutrientes e a conservação da homeostase corporal (regulando a temperatura corporal e a pressão sanguínea).

Contudo, e para além de todas estas características, a pele constitui (como referido anteriormente) uma via de administração alternativa, porém promissora, de compostos terapêuticos para efeitos quer tópicos, quer sistémicos.<sup>52,53</sup>

Estruturalmente, as camadas tecidulares da pele são três, nomeadamente:

- Epiderme;
- Derme;
- Hipoderme.

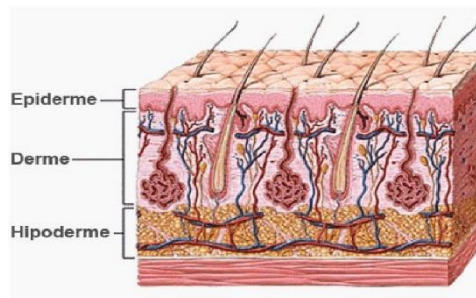


Figura 6 - Estrutura da pele<sup>111</sup>

### 2.1.1. Epiderme

A epiderme é estruturalmente considerada como a camada mais externa da pele, sendo constituída por vários(as) estratos/camadas<sup>51-52-53</sup>

- Estrato córneo
- Estrato lúcido
- Estrato granuloso
- Estrato espinhoso
- Estrato germinativo ou camada basal

O estrato mais interno é o estrato germinativo ou camada basal. Este estrato é constituído por uma percentagem de aproximadamente 80% de água e por células



caracterizadas por apresentarem capacidade proliferativa de outros componentes da epiderme.

Acima deste estrato encontra-se o estrato espinhoso, em que as células são morfológicamente achatadas, seguido do estrato granuloso, essencialmente constituído por lípidos e proteínas, e do estrato lúcido (formado por uma camada de células ricas em grânulos proteicos, normalmente presente na pele em zonas sem folículos pilosos, como a palma das mãos e planta dos pés). <sup>51,52,53</sup>

Seguidamente, apresenta-se o estrato mais superficial da epiderme (o estrato córneo). Este estrato é constituído por várias camadas de células achatadas, desidratadas, queratinizadas e compactas denominadas de corneócitos (células fisiologicamente inativas, sendo continuamente renovadas por células provenientes das camadas inferiores) e por lípidos presentes nos espaços vazios, nesta camada, os corneócitos mais exteriores apresentam-se muitas vezes menos compactados e com grandes espaços entre fiadas de células quase em descamação. <sup>51,52,53</sup>

Dependendo da posição das camadas formadas pelos corneócitos, distingue-se o nível de compactação dos mesmo sendo: a camada interior uma camada mais compacta constituída por corneócitos ligados com desmossomas e uma cama exterior mais laxa que através da quebra dos desmossomas ligantes desencadeia o processo de descamação. <sup>53,54</sup>

Este estrato afasta-se muito do nível fisiológico do estrato basal pelo conteúdo em água ser de apenas 20%. Contudo consiste num estrato marcadamente higroscópico, podendo intumescer até 5 vezes o seu peso por absorção de água. <sup>51</sup>

Para além de todos estes estratos, a epiderme é constituída por vários tipos de células que exercem funções importantes e distintas, como:

- Queratinócitos
- Melanócitos
- Células de Langerhans
- Células de Merkel

Os queratinócitos constituem a maioria da população celular epidérmica (80-90%). Diferenciam-se em permanência a partir das camadas mais profundas até à superfície, a fim de renovarem as células da camada córnea (corneócitos), que se acabam por destacar. A duração normal deste ciclo de renovação celular é cerca de 26 a 28 dias podendo chegar à produção de cerca de 1250 células por dia e por cm<sup>3</sup>. <sup>51</sup>

Os queratinócitos caracterizam-se também pela produção de uma proteína denominada de queratina, responsável pela rigidez das camadas mais exteriores da

pele, conferindo um aumento da resistência da mesma às agressões físicas externas.  
52

Entre os queratinócitos encontram-se os melanócitos, células cuja função é a produção de melanina e pigmentação da pele.<sup>53</sup>

As células de Langerhans estão presentes nos estratos intermediários da epiderme, e constituem células viáveis, sem desmossomas e com uma estrutura citoplasmática muito típica (em forma de “estrela” devido às suas extensões do citoplasma que lhes confere um aspeto dendrítico). Estas células têm a sua principal origem na medula óssea e derivam das células sanguíneas circulantes (monócitos), que posteriormente migram para a epiderme diferenciando-se.<sup>51,52,53</sup>

Admite-se que as células de Langerhans intervenham em mecanismos imunitários, sendo consideradas verdadeiros macrófagos derivado da sua capacidade de captar alergenos de contacto da pele e os apresentarem aos linfócitos T, sendo fulcrais na sensibilização por contacto ao meio externo.<sup>52</sup>

Entre as células epidérmicas basais encontram-se o “último grupo” de células pertencentes à epiderme (as células de Merkel).<sup>54</sup>

As células de Merkel ligam-se às células epidérmicas basais através de desmossomas e estão em conexão directa com a fibra nervosa terminal, sem interposição da lâmina dermo-epidérmica. Estas células são provavelmente recetores mecânicos sensoriais que respondem a estímulos como a pressão e o tato.<sup>56</sup>

### 2.1.2. Derme

Presente entre a epiderme e o tecido subcutâneo, é ricamente constituída por fibras colagénias e elásticas, sendo capaz de promover a sustentação da epiderme, tendo ainda uma rica participação nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo.<sup>51-52-54</sup>

A derme divide-se em duas camadas distintas:

- derme papilar
- derme reticular

A derme papilar é considerada por vários autores a camada menos espessa da derme. Rica em tecido conjuntivo e fibroblastos, esta camada da derme é também constituída por colagénio tipo III e vasos sanguíneos de menor espessura e calibre.  
51,52

A derme reticular caracteriza-se por feixes dérmicos constituídos por colagénio tipo I, permeados por colagénio tipo III e vasos sanguíneos de maior calibre.<sup>52,54</sup>

Na matriz extracelular, o componente mais abundante é o colagénio, acabando por promover a resistência da pele. Na pele adulta a percentagem de colagénio pode alcançar os 90% do tipo I e 10% tipo III. <sup>54</sup>

Estudos apontam uma redução da síntese e da quantidade total de colagénio de cerca de 1% por ano a partir da vida adulta e por área de superfície da pele.

A neoformação e deposição desta fibra tem um papel bastante importante no que diz respeito a respostas de cicatrização, uma vez que a modulação da migração e proliferação celular garante a eficácia deste processo. <sup>52,53,54</sup>

A elastina é outra proteína pertencente à derme caracterizando-se macroscopicamente por rugas, sendo que ao longo do tempo (envelhecimento humano) torna-se amorfa aumentando a sua quantidade e formando aglomerados.

Contudo esta proteína representa o principal componente proteico que compõe as fibras elásticas da pele, que a nível estrutural se encontram entrelaçadas com as fibras de colagénio. <sup>52,53</sup>

Tais conhecimentos, tornam-se importantes para a prevenção e manutenção do envelhecimento cutâneo, através de vários fatores, nomeadamente ambientais, nutricionais e mecânicos. <sup>52,53</sup>

### 2.1.3. Hipoderme

A Hipoderme representa a camada mais profunda da pele, cria um isolamento térmico, protege contra o choque físico e permite o armazenamento de energia que é utilizada quando necessária. A este nível são notórias as células específicas, como é o caso de células gordas, fibroblastos e macrófagos. <sup>52,53</sup>

## 2.2. Processo inflamatório

Por ser a primeira barreira física de proteção do organismo contra agentes externos, a pele está sujeita a constantes agressões e a sua capacidade de reparação tecidual é de grande importância para a sobrevivência do ser humano. <sup>55</sup>

Após uma agressão física, química ou biológica, ocorre uma perturbação do equilíbrio entre as células dos tecidos, e por essa razão observa-se uma resposta tecidual à lesão que é caracterizada por um conjunto complexo de reações como <sup>55</sup>:

- Inflamação;
- Quimiotaxia;
- Proliferação celular;

- Diferenciação;
- Remodelação.

A inflamação é um mecanismo complexo, essencialmente de defesa e indispensável à sobrevivência dos seres vivos. É desencadeada por vários tipos de agentes agressores, essencialmente por agentes físicos (como traumatismos e radiações), biológicos (microorganismos patogénicos) e patológicos (reações imunológicas).<sup>56</sup>

Este mecanismo inflamatório caracteriza-se por sintomas como o rubor, calor, edema, dor e incapacidade funcional, podendo evoluir em fases distintas como:<sup>56</sup>

- a) Aguda: a qual corresponde à resposta inicial para a lesão celular, conduz à produção de prostaglandinas e é dominada por vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar;
- b) Subaguda: caracterizada por infiltração de leucócitos e macrófagos e conduz à fagocitose ou neutralização dos organismos estranhos;
- c) Crónica: com degenerescência e fibrose dos tecidos<sup>56</sup>.

Como mecanismo de defesa fisiológico, a reação inflamatória tem como objetivo a reparação do dano tecidual e a eliminação do agente agressor. Contudo, este equilíbrio lesão-reparação pode ser perturbado pelo excesso de permanência do agente agressor ou do seu deficiente combate, assumindo, conseqüentemente, a reação inflamatória uma forma crónica e destrutiva, sendo a artrite reumatóide um exemplo clínico desse fenómeno<sup>56</sup>.

Dos mediadores intervenientes na reação inflamatória salientam-se, pela sua importância, as prostaglandinas (PGs). As prostaglandinas são compostos químicos de natureza lipídica que existem praticamente em todos os tecidos animais e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, por exemplo, a vasodilatação ou a vasoconstrição, o aumento ou a diminuição da tensão arterial, a proteção da mucosa gástrica (aumento da secreção de muco e manutenção da camada superficial hidrofóbica de proteção), inibição da secreção ácida gástrica, aumento do fluxo sanguíneo renal, contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, ovulação, metabolismo ósseo, resposta imunológica, fenómenos inflamatórios, hiperalgesia, regulação da atividade quimiotática celular, coagulação sanguínea, entre outras<sup>56,57,58</sup>.

As PGs são normalmente englobadas em três séries (1, 2, 3), dependendo do número de duplas ligações na cadeia lateral. Diferentes ácidos sintetizam PGs diferentes, sendo que os ácidos diomo- $\gamma$ -linolénico araquidónico e timnodónico formam, respectivamente, as séries PG<sub>1</sub> PG<sub>2</sub> e PG<sub>3</sub>.

Além da insaturação das cadeias laterais, as PGs são também agrupadas de acordo com as funções químicas ligadas ao anel presente na sua estrutura. Os diferentes grupos das PGs são simbolizados por letras de A a I (por exemplo, PGA, PGF e PGG) .<sup>56</sup>

Para além das PGs, existem ainda outros mediadores envolvidos no processo inflamatório, como os tromboxanos (TXs) e os leucotrienos (LTs). As prostaglandinas e os tromboxanos, formados pela enzima ciclooxigenase, são coletivamente designados de prostanóides. Não são armazenados nas células, são sintetizados como resultado de uma perturbação na membrana celular, atuam localmente e são rapidamente metabolizados, pelo que são apenas detetáveis por curtos períodos de tempo<sup>56</sup>. A síntese das prostaglandinas inicia-se, portanto, com a atividade da ciclooxigenase.

*Via da ciclooxigenase:* A via da ciclooxigenase depende da atuação de um complexo enzimático, globalmente designado por ciclooxigenase, que conduz à biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos. Este complexo enzimático apresenta dois locais ativos com atividades distintas<sup>65</sup>, nomeadamente um com atividade de endoperóxido redutase e o outro com atividade de peroxidase. As prostaglandinas possuem ação vasodilatadora, ao contrário do tromboxano, sendo que este acaba por realizar a contração das paredes dos vasos ativando a agregação das plaquetas.

Em 1989, Needleman e seus colaboradores descreveram uma forma indutível da COX, demonstrando deste modo que a sua indução ocorre por estímulos inflamatórios e por citocinas, passando assim a admitir devido às características distintas da sua expressão, a existência das isoformas COX-1 e COX-2.<sup>66</sup>

A COX-1 é expressa constitutivamente, estando presente em todas as células, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, apresentando funções fisiológicas, conduzindo à produção de prostaglandinas anti-trombogénicas, citoprotectoras da mucosa gástrica e envolvidas na manutenção da função plaquetária e renal.

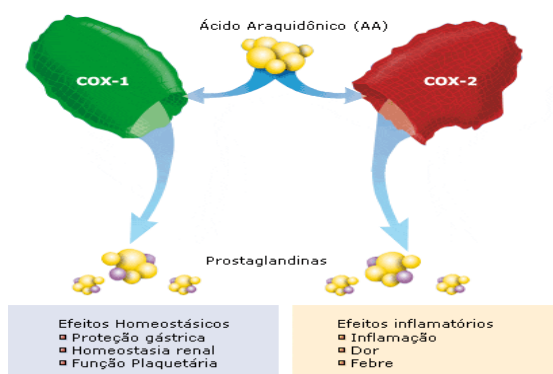


Figura 7 - Representação da ação das diferentes COX no organismo<sup>112</sup>

A COX-2, por sua vez, é uma enzima indutível, geralmente não detectável nos tecidos saudáveis, mas o seu nível aumenta dramaticamente em tecidos inflamados.

Pode ser induzida na presença de citocinas, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa por células envolvidas no processo inflamatório, no entanto, desde a descoberta original da COX-2 em células estimuladas pelas citocinas, verificou-se que esta enzima também é expressa em tecidos não inflamados, incluindo o rim, cérebro, tumores do cólon, ossos e cartilagem <sup>67-68</sup>.

Contudo, ambas (COX-1 e COX-2) são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica das membranas do retículo endoplasmático e numa menor extensão na membrana nuclear <sup>69</sup>. Apresentam diferenças ao nível da localização, da expressão e da regulação dos genes mas a estrutura da proteína e a função enzimática, nomeadamente, a afinidade e capacidade de conversão do ácido araquidónico em PGs.

Uma terceira variante catalítica da COX (COX-3) foi demonstrada em estudos *in vitro* com linhagens de macrófagos. A COX-3, é possivelmente uma variante da COX-1, pois é produzida pelo mesmo gene, encontrando-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula e coração. A possível expressão desta variante não origina prostaglandinas pró-inflamatórias, mas sim um membro da família das ciclopentanonas, com actividade anti-inflamatória. Se a hipótese de uma terceira ciclooxigenase com actividade anti-inflamatória estiver correcta, a sua expressão pode resultar em períodos típicos de remissão do processo inflamatório, como são os casos de artrite reumatóide <sup>66</sup>. Apesar de ser formada pelo mesmo gene que induz a inserção de aminoácidos na estrutura que corresponderia à da COX-1 <sup>70</sup>, sendo ainda inibida por fármacos como o paracetamol que apresenta atividade analgésica e antipirética e uma pequena capacidade inibitória das COX-1 e COX-2, pode-se assim explicar o mecanismo de ação do paracetamol <sup>66,70,71</sup>.

O estudo dos leucotrienos e a sua relação com os processos biológicos é, hoje em dia, ainda motivo de estudo, já que uma maior compreensão dos mecanismos de ação das PGs e TXs, permite um melhor aperfeiçoamento do conhecimento sobre os agentes terapêuticos anti-inflamatórios.

Como as lesões cutâneas nos seres humanos são muito frequentes e oriundas de diferentes causas, as pesquisas por tratamentos alternativos têm sido uma mais-valia, visando a promoção da correta renovação dos estratos e zonas lesadas. <sup>56</sup>

## CAPÍTULO 3 - LIPOSSOMAS CONTENDO INDOMETACINA E CAPSAICINA

### 3.1. Interação fármaco/lipossoma

A ação dos fármacos divide-se geralmente em duas fases, nomeadamente, a fase farmacocinética e a fase farmacodinâmica.<sup>82,83</sup>

Na fase farmacocinética, os processos compreendidos são a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, enquanto que na fase farmacodinâmica os processos biológicos envolvidos são os de interação dos fármacos com os seus alvos de ação. Assim sendo, durante o percurso de uma substância ativa, desde o seu local de absorção até aos locais onde a sua ação será exercida, é inevitável a passagem por várias barreiras lipídicas formadas pelas mais diversas membranas celulares.<sup>83-84</sup>

Posto isto, torna-se evidente a importância da extensão da ligação do fármaco à membrana lipídica, bem como a sua localização e orientação adequada. Desta interação pode ainda resultar alterações das propriedades físico-químicas da própria membrana que, por si só, pode contribuir de uma forma direta para um diferente mecanismo de ação do sistema.

Esta interação depende sobretudo de duas propriedades:<sup>83,84,85</sup>

1. propriedades das próprias membranas (determinadas pela respetiva composição dos lípidos envolventes)
2. propriedades físico-químicas e estrutura química dos próprios fármacos.

Os fármacos hidrossolúveis localizam-se predominantemente no interior ou exterior aquoso das membranas, podendo também estabelecer ligações electrostáticas ou iónicas com a zona interfacial, enquanto que os fármacos lipossolúveis localizam-se predominantemente no interior das membranas, podendo estabelecer ligações hidrofóbicas ou de Van der Waals.<sup>82,83,85</sup>

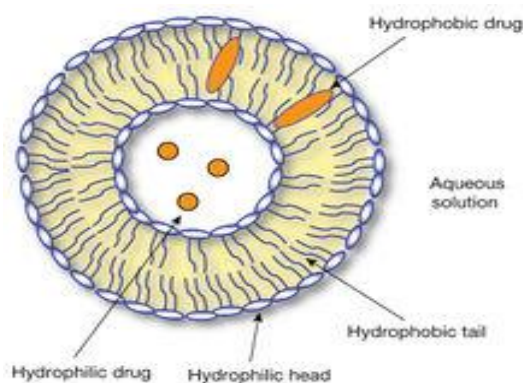


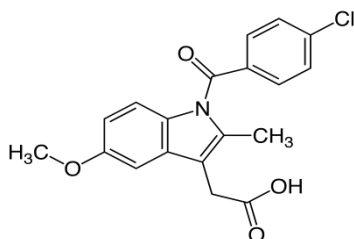
Figura 8 - Localização dos diferentes tipos de moléculas nos lipossomas<sup>113</sup>

## 3.2. Indometacina

### 3.2.1. Descrição

A indometacina é um antiinflamatório não esteróide derivado do ácido indolacético.<sup>79</sup>

### 3.2.2. Caracterização físico-química <sup>79</sup>



**Molécula:**

**Fórmula:** C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 357,8 g.mol<sup>-1</sup>

**pKa:** 4,5

**Nº CAS:** 53-86-1

**Aspeto:** Pó cristalino branco ou amarelo

**Solubilidade:** Praticamente insolúvel em água e moderadamente solúvel em álcool.

**Estabilidade:** Instável em solução alcalina

**Precauções físico-químicas:** Proteger da luz

### 3.2.3. Mecanismo de ação

Já conhecida a participação das prostaglandinas na dor, febre e inflamação, a indometacina atua inibindo a atividade da enzima ciclooxigenase para diminuir a formação de precursores de prostaglandinas e tromboxanos. Mas embora muitos dos seus efeitos terapêuticos e adversos sejam provocados inibição desta síntese, outras ações contribuem de forma significativa para os efeitos terapêuticos do medicamento.

<sup>79,80</sup>



### 3.2.4. Precauções no manuseamento

As preparações que contenham Indometacina devem ser manuseadas cuidadosamente. É aconselhado usar luvas e evitar a inalação de pó, descontaminando a área utilizada após manipulação. <sup>80</sup>

### 3.2.5. Precauções na administração

Na administração, as preparações contendo Indometacina abrangem as precauções gerais de segurança dos restantes AINEs. <sup>80</sup>

A segurança dos AINE quando administrados por via tópica tem demonstrado muito raramente reações cutâneas graves. Aparentemente o risco de ocorrência de reações deste tipo é maior no início do tratamento. Contudo é aconselhável a interrupção do tratamento aos primeiros sinais de lesões ou outras manifestações de hipersensibilidade. <sup>80</sup>

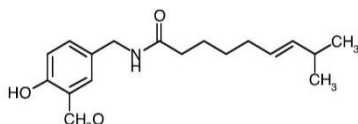
## 3.3. Capsaicina

### 3.3.1. Descrição

A capsaicina é o princípio ativo dos frutos maduros secos de *Capsicum* spp, sendo usualmente usado como um analgésico tópico em condições dolorosas tais como neuralgia pós-herpética após a cura das lesões, neuropatia diabética, osteoartrite, e artrite reumatóide. <sup>79</sup>

### 3.3.2. Caracterização físico-química <sup>79</sup>

**Molécula:**



**Fórmula:** C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 305.4 g mol<sup>-1</sup>

**Nº CAS:** 404-86-4

**Aspeto:** Pó branco ou ligeiramente amarelado

**Solubilidade:** Praticamente insolúvel em água (20 °C), moderadamente solúvel em etanol, éter e clorofórmio.

**Estabilidade:** Facilmente oxidável (evitar contacto entre a molécula e agentes oxidantes fortes)

**Precauções físico-químicas:** Proteger da luz e selar e armazenar hermeticamente os recipientes de acondicionamento do pó.

### 3.3.3. Mecanismo de ação

A sensação de queimadura e dor é o resultado da interação química da capsaicina com os neurónios sensoriais.<sup>79,81</sup>

A capsaicina, como um membro da família vanilóides, liga-se a um recetor específico destes compostos (VR1), que também pode ser estimulado pelo calor e/ou desgaste físico. Esta ligação permite a passagem de catiões da membrana celular para a célula, que tem como resultado o estímulo do cérebro por parte dos neurónios sensoriais a promover a sensação de queimadura.<sup>79,81</sup>

Contudo, a ação da capsaicina e compostos relacionados pode tornar-se complexa, estando ainda em fase de investigação. Mas uma vez que o efeito da capsaicina não depende de uma vasodilatação na pele, ela é vulgarmente considerada como um contra-irritante tradicional.<sup>79,81</sup>

### 3.3.4. Precauções no manuseamento

As preparações que contenham Capsaicina devem ser manuseadas cuidadosamente. Deve ser evitada a inalação do pó, bem como o contacto com qualquer zona da pele e dos olhos.<sup>81</sup>

### 3.3.5. Precauções na administração

Após a aplicação tópica, as mãos devem ser imediatamente lavadas, a menos que sejam as áreas de tratamento, e nesse caso, devem ser lavadas cerca de 30 minutos após a aplicação. É desaconselhado o duche ou a lavagem das zonas lesadas imediatamente após a aplicação, bem como o uso de temperaturas de água elevadas, visto poder exacerbar a sensação de queimadura por parte do doente.<sup>81</sup>

Se for necessário o uso de ligaduras para cobrir as áreas lesadas em tratamento, é desaconselhável que se exerça muita força e tensão no local.<sup>81</sup>

### 3.4. Preparação da forma farmacêutica

Recentemente, num estudo feito na Faculdade de Farmácia de Moga (Índia), os investigadores tentaram desenvolver um gel contendo lipossomas que incorporavam metotrexato (MTX) para a terapêutica sintomática da psoríase grave, uma vez que tanto a via oral como a parentérica (que representam as duas principais vias de administração deste fármaco na atualidade) apresentam uma elevada toxicidade sistémica associada.

A via tópica reduz este problema de toxicidade sistémica, assumindo um lugar importante no que concerne a novas vias alternativas de administração de fármacos, mesmo estando associada a limitações de permeabilidade, limitando a passagem de certas moléculas.

O trabalho desenvolvido por estes investigadores tem como objetivo o desenvolvimento de um sistema de gel vesicular para a administração tópica de MTX combinado com mentol para aumentar a capacidade de permeação cutânea das vesículas, bem como para minimizar a sua disponibilidade e toxicidade sistémica associada, postulando-se que os lipossomas serão mais eficazes na libertação do fármaco para a pele, retendo o fármaco no tecido com o mínimo de absorção sistémica.

Inicialmente, os investigadores começaram pela preparação dos dois constituintes separadamente, ou seja, os lipossomas e a base de gel.

Na preparação dos lipossomas, optaram pela técnica clássica de hidratação do filme lipídico, onde a fosfatilcolina da soja e do ovo, o colesterol e o MTX, foram dissolvidos numa mistura de metanol e clorofórmio nas proporções de 2:1 no interior de um balão.

Após a hidratação do filme, a suspensão resultante foi colocada 1 hora a estabilizar num local fresco e seco, onde após este repouso, os fármacos livres resultantes da preparação da suspensão bem como a quantidade de fármaco incorporado foram avaliados pela técnica de centrifugação.

Após a preparação dos lipossomas, iniciou-se a preparação do gel que iria servir de base para a incorporação destes lipossomas. Este foi preparado utilizando Carbopol 934 em várias concentrações utilizando a técnica de preparação por hidratação do carbopol com neutralização do pH com uma base forte como a trietanolamina.

Posteriormente à preparação do gel, os lipossomas anteriormente preparados foram dispersos em glicerol que foi adicionado e misturado ao gel. Concluiu-se que o

gel que apresentara melhores condições de textura para a veiculação das partículas lipossômicas foi o gel a 2,5% de Carbopol 934.

Para estudos de estabilidade como, características organolépticas, textura e pH, o gel foi mantido em ambiente seco, sem o contacto direto com a luz e avaliado durante um mês, tendo sido submetido a ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliação da eficácia de permeação por um mesmo período.

Após a finalização dos respetivos ensaios de estabilidade, bem como de eficácia de permeação, foi notório concluir através dos resultados obtidos que o gel que demonstrou melhor estabilidade com o tempo e maior grau de permeação cutânea, foi o gel que continha mentol na sua composição, pois este excipiente conseguiu desordenar a barreira lipídica presente entre os corneócitos e criar poros de passagem dos lipossomas pela barreira cutânea.

Este estudo permitiu-me concluir que para a elaboração de um gel eficaz que contenha lipossomas de Indometacina e Capsaicina, para o tratamento tópico de inflamações, será necessário ter em conta não só a forma e o método de encapsulação dos respetivos fármacos em lipossomas, mas também a textura e os excipientes utilizados na base da forma farmacêutica que será o gel, pois todos esses fatores se evidenciam como extremamente importantes para o sucesso da eficácia da terapêutica em causa.

### **3.5. Caracterização dos lipossomas e avaliação da percentagem de incorporação**

Apos a purificação dos lipossomas, segue-se a sua caracterização, e de entre os vários parâmetros de caracterização destaca-se:

- A determinação do tamanho dos lipossomas;
- A determinação da quantidade de fármaco incorporado.

#### **3.5.1. Determinação do tamanho médio de partícula**

Este parâmetro tornar-se exequível recorrendo à técnica de espectroscopia de correlação fotónica (PCS) <sup>91,93,94,95</sup>

Esta técnica baseia-se na difração da luz laser difratada pelas partículas em suspensão animadas de movimentos brownianos.

Através de uma fonte de radiação laser que incide sobre a dispersão de partículas a analisar, o fotodetector detecta a intensidade da luz difratada pelas partículas e um correlacionador digital analisa essa intensidade. <sup>100,101</sup>

A flutuação da intensidade da luz difratada é função do tamanho das partículas, sendo que quanto mais pequenas as partículas, mais rapidamente se movimentam e maior é a velocidade de flutuação da luz difratada. <sup>94,95</sup>

A utilização desta técnica demonstra vantagens como uma preparação simples da amostra e marcada por medições rápidas e pelo simples facto de constituir uma técnica não invasiva nem destrutiva.

### 3.5.2. Determinação da quantidade de fármaco incorporado

A eficiência de encapsulação (EE) é traduzida pelo quociente entre a razão molar do composto a encapsular e do lípido na preparação final e a razão molar desse composto e do lípido na fase inicial de hidratação expresso em percentagem:

$$EE (\%) = \frac{\textit{Composto encapsulado}}{\textit{Composto total}} \times 100$$

### 3.6. Avaliação da libertação

A técnica mais frequentemente utilizada para a avaliação da libertação dos fármacos pelos lipossomas é a técnica da diálise, em que a solução contendo lipossomas é armazenada no interior de um saco de diálise, que por sua vez se encontra imerso numa determinada solução, sendo avaliada a quantidade de fármaco que consegue atravessar esta membrana e que chega à solução exterior. <sup>102-104-105</sup>

### 3.7. Avaliação da estabilidade química e física.

Ao longo do tempo, os lipossomas podem sofrer diversos tipos de alterações, que podem ser divididas em físicas, químicas e biológicas. Fisicamente, os lipossomas podem sofrer agregação, fusão e rutura membranar, dependendo da constituição lipídica, bem como do meio envolvente. <sup>95,96,97,98</sup>

A verificação deste tipo de fator pode efetuar-se através da avaliação do diâmetro médio das vesículas ao longo do tempo. <sup>95,96,97,98</sup>

Outros fatores como a degradação também podem ser incorporados neste tópico, podendo ser avaliada pela capacidade de formação de certos produtos finais, nomeadamente peróxidos, aldeídos e ligações duplas ou triplas conjugadas, os quais podem ser facilmente detetados por espectrofotometria de ultravioleta visível ou mesmo pelo seu odor. <sup>2,99,100,102,104</sup>

Este processo de degradação química é, assim, fortemente afetado pelo valor de pH do meio e também pela temperatura, podendo ser controlado por ajuste dos valores de pH do meio que se apresentem próximos da neutralidade <sup>2</sup>, pelo que este processo de degradação pode ser minimizado conservando as suspensões dos lipossomas a baixas temperaturas (4°C) e a um valor de pH igual a 7,4. <sup>2</sup>

## **CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA DISPERSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO INDOMETACINA E CAPSAICINA**

Neste capítulo descrevem-se as condições experimentais globais utilizadas, bem como a instrumentação, os reagentes e a preparação das soluções. As condições experimentais específicas de cada técnica serão descritas nos capítulos a elas respeitantes. É apresentada também a nomenclatura geral usada na descrição das constantes de partição e, por fim, são descritos, de maneira sucinta, os programas computacionais que permitiram todos os cálculos e a interpretação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos.

### **4.1. Materiais, Reagentes e Equipamentos**

#### **Materiais (Reagentes):**

- Capsaicina (Sigma-Aldrich)
- Indometacina (Sigma-Aldrich)
- Etanol absoluto (Fisher-Scientific)
- EPC (Fosfatidilcolina do ovo) (Sigma-Aldrich)
- Clorofórmio (VWR-Chemicals)
- Água Purificada (VWR-Chemicals)

## **Equipamentos:**

- Balança Kern PBF 2000-2 com uma precisão de 0.01g (Alemanha);
- Banho de ultrassons - Bandelin electronic D-1000 Berlin 45 RK100H (Alemanha);
- Câmara de fluxo laminar - Heraeus Hera Safe HS 12 (Alemanha);
- Centrifuga - ThermoFisher Scientific Heraeus Multiuge X1R (Alemanha); Extrusor
- Espectrofotometro UV-VIS - JASCO V-650 (Japão);
- Dispersão dinâmica da luz (DLS) - Zetasizer Nano-ZS Malvern Instruments (Reino Unido);
- Placa de agitação com aquecimento - Heidolph MR Hei-Tec (Alemanha); Stuart Scientific SM26 (Reino Unido);
- Potenciometro - Crison® Basic 20 (Espanha);
- Viscosímetro rotativo Brookfield, modelo *DV-E Viscosimeter*
- Texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido)

### **4.2. Metodologia de obtenção da dispersão lipossômica**

A preparação dos lipossomas foi feita através do método de hidratação do filme lipídico, seguido de extrusão.

Na preparação utilizou-se uma fase orgânica constituída por Fosfatidilcolina do ovo na concentração de 18mg/mL, Indometacina na concentração de 2mg/mL e Capsaicina na concentração de 1mg/mL, dissolvidas em solvente orgânico (clorofórmio), num balão de fundo redondo.

De seguida procedeu-se à evaporação do solvente orgânico em corrente contínua de azoto levando assim à formação de um filme lipídico nas paredes do balão. O filme foi hidratado por uma fase aquosa, composta por 5 mL de água ultrapurificada sob agitação em agitador de vórtice.

Após a hidratação do filme lipídico obteve-se uma solução de aspeto leitoso, formada por vesículas multilamelares e fragmentos de bicamada, a qual foi submetida a 10 ciclos de extrusão em membrana de policarbonato com uma porosidade de 200 nm (os primeiros 5 ciclos) e de 100 nm (os últimos 5 ciclos) originando uma solução semitransparente constituída por vesículas unilamelares pequenas.

A figura 9, apresenta o esquema da produção de lipossomas através do método hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.

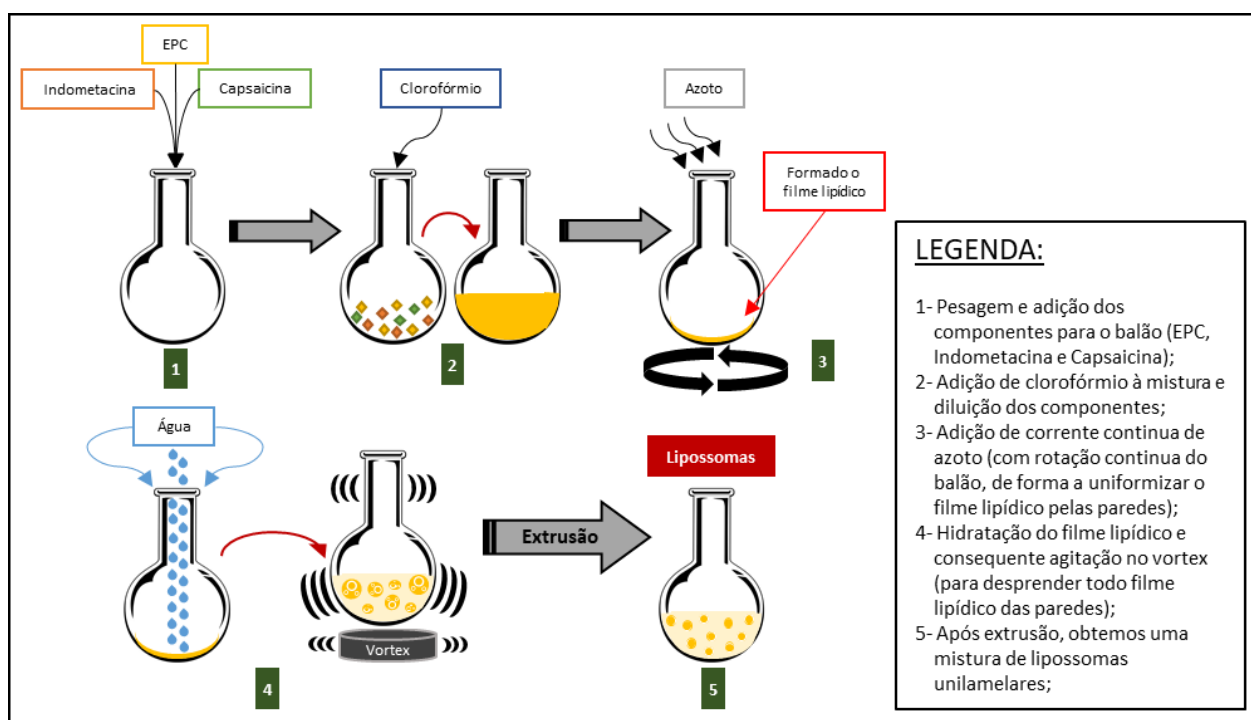


Figura 9 - Esquema do método de obtenção dos lipossomas através do processo de hidratação do filme lipídico

### 4.3. Caracterização físico-química dos lipossomas

A caracterização englobou a determinação do pH da dispersão lipossômica, a determinação do diâmetro médio, do índice de polidispersão, da concentração e da carga superficial das vesículas. Esta caracterização inicial foi repetida semanalmente ao longo de 4 semanas de armazenamento à temperatura ambiente, dentro de frascos de vidro âmbar e ao abrigo da luz.

Como legenda descrevo que o T0 representa as determinações após a preparação da suspensão lipossômica, o T1 representa as determinações após 1 semana da preparação, o T2 representa 2 semanas após a preparação, o T3 representa a 3 semana e o T4 representa os valores obtidos após 4 semanas da preparação.

É importante realçar novamente que os valores expressos representam uma média e um desvio padrão de n=6.



#### 4.3.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada à temperatura ambiente com um leitor de pH digital e com eletrodo de vidro, previamente calibrado com tampões de pH 4,0, 7,0 e 10,0. O pH das preparações foi medido logo após a sua obtenção e de 7 em 7 dias.

O controlo de pH das amostras em estudo é importante uma vez que pode ser indicador de alterações na estabilidade dos lipossomas. O valor de pH foi medido durante 4 semanas após a preparação e a tabela seguinte apresenta os valores de pH dos dispersões em estudo:

	pH (ua)
<b>T0</b>	7,5 ± 0,2
<b>T1</b>	7,2 ± 0,3
<b>T2</b>	7,4 ± 0,2
<b>T3</b>	7,3 ± 0,1
<b>T4</b>	7,1 ± 0,3

*Tabela 1 - Determinação do pH da suspensão lipossómica*

Os valores de pH foram similares entre si no decorrer das 4 semanas, indicando assim que estas partículas possivelmente não sofreram alterações nas suas estruturas.

#### 4.3.2. Determinação do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersão

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das vesículas (índice de polidispersão) foram determinados por espectroscopia de correlação fotónica, à temperatura ambiente e a um ângulo de 90°, utilizando um contador de partículas.

A análise é realizada em meio líquido e mede o volume hidrodinâmico das partículas atribuindo-lhe teoricamente um formato esférico.

A dispersão lipossómica foi diluída em água para se obter uma contagem adequada de partículas. Este índice avalia a distribuição da população de partículas em torno de um tamanho médio de partícula.

## Espectroscopia de correlação fotónica (DLS)

Esta técnica de caracterização possibilita o cálculo de 2 parâmetros, o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (Pdi) de forma a obter dados sobre o tamanho médio dos lipossomas em estudo e sobre a sua distribuição de tamanho, respetivamente. <sup>114,115</sup>

A distribuição de tamanho pode apresentar-se, como sendo unimodal (apresenta uma população), multimodal (apresenta várias populações), monodispersa ou polidispersa, contendo uma distribuição de tamanhos estreita, ou larga, respetivamente.

Uma vez usado uma escala compreendida entre 0 e 1, considera-se um “bom” índice de polidispersão aquele que apresenta um valor inferior a “0,1” representando uma população de partículas com elevada homogeneidade. Pelo contrário, um índice de polidispersão elevado sugere uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo a existência de várias populações. <sup>114,116</sup>

Esta caracterização foi realizada com 6 leituras independentes (n=6) de amostras diferentes.

Analisou-se então uma amostra diluída (1mL da suspensão lipossómica para 14 mL de água milliQ), tendo sido obtidos valores de Pdi inferiores a 0,1 (como apresentado na tabela seguinte):

	<b>TAMANHO (nm)</b>	<b>ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (ua)</b>
<b>T0</b>	84,3 ± 2,9	0,086 ± 0,027
<b>T1</b>	88,8 ± 2,1	0,112 ± 0,021
<b>T2</b>	85,1 ± 2,7	0,083 ± 0,017
<b>T3</b>	88,7 ± 1,2	0,125 ± 0,018
<b>T4</b>	86,8 ± 2,8	0,135 ± 0,021

*Tabela 2 - Determinação do tamanho médio e do Índice de polidispersão das vesículas*

Observando os resultados é notório concluir que os tamanhos apresentados pelas diferentes leituras são muito próximos entre si, verificando-se igualmente que todas as amostras apresentam um valor de Pdi baixo ( $\leq 0,1$ ), indicando uma distribuição de tamanho de partículas homogénea observando-se também que as partículas se distribuem num curto intervalo de tamanhos e com uma distribuição homogénea, aproximando-se de uma distribuição unimodal e monodispersa.

### 4.3.3. Determinação da carga superficial dos lipossomas (Potencial zeta)

A carga superficial das vesículas pode ser avaliada com base nas medidas do potencial zeta que consiste no potencial elétrico (teórico) entre o ambiente aquoso e uma região difusa de carga predominante oposta à superfície da célula. Este potencial pode ser calculado medindo-se a mobilidade eletroforética celular num determinado campo elétrico. <sup>118,120</sup>

Este potencial é definido como a distância da superfície da partícula a um ponto no fluido da suspensão, onde iões de carga elétrica oposta permanecem fortemente ligados à partícula quando esta se move num determinado campo elétrico.

Sucintamente, o potencial zeta é uma medida indireta da estabilidade física das partículas podendo influenciar a cinética de libertação e o destino biológico dos lipossomas, porque quando as partículas possuem carga positiva tendem a ser atraídas por cargas negativas de superfícies e componentes biológicas, e vice-versa. <sup>116,118</sup>

A magnitude deste potencial dá-nos a indicação da estabilidade física de um sistema coloidal pois se todas as partículas de uma suspensão apresentarem um potencial zeta elevado (negativo ou positivo), estas vão-se repelir umas às outras não havendo assim tendência em criar agregados. Segundo a literatura, partículas com um potencial zeta superior a 30 mV (valor absoluto) são consideradas fisicamente estáveis, por outro lado se o potencial zeta rondar os 20 mV (negativo ou positivo), geralmente a suspensão coloidal apresenta apenas estabilidade de curto prazo, podendo-se verificar uma rápida agregação de partículas para valores de potencial Zeta na ordem dos -5 mV a +5 mV.

Contudo, em determinadas situações (por exemplo quando tensioativos de elevado peso molecular são usados ou quando ocorre adsorção de moléculas à superfície das partículas) as suspensões podem ser estáveis, mesmo apresentando valores de potencial Zeta da ordem dos 20 mV, ou até inferiores. <sup>119,120</sup>

Neste trabalho, o potencial zeta foi determinado por dispersão dinâmica de luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas utilizando o equipamento Zetasizer .

As medidas foram feitas com a mesma preparação utilizada para determinação de diâmetro médio das partículas.

Na Tabela seguinte apresentam-se os valores de potencial Zeta das mesmas preparações utilizadas para a determinação do tamanho da partícula:

<b>POTENCIAL ZETA (mV)</b>	
<b>T0</b>	- 12,2 ± 5,6
<b>T1</b>	- 21,9 ± 2,1
<b>T2</b>	- 17,6 ± 3,3
<b>T3</b>	- 29,4 ± 3,7
<b>T4</b>	- 25,4 ± 2,0

*Tabela 3 - Determinação do Potencial zeta das vesículas*

A determinação do valor de potencial zeta dos lipossomas é de grande importância, pois este é um indicador da estabilidade das partículas.

De uma maneira geral, os valores de potencial zeta das amostras em estudo, indicam que estas apresentam uma estabilidade de curto prazo. Tal facto pode ser explicado pela sua composição.

Quando utilizados tensioativos não-iónicos, os valores de potencial zeta obtidos irão ser de acordo com a natureza do polímero, apresentando carga positiva ou negativa conforme se trate de um polímero catiónico ou aniónico.<sup>122</sup>

Neste trabalho utilizou-se a fosfatidilcolina do ovo (PC), considerado um fosfolípido “híbrido” ou seja com carga igual a zero, apresentando um grupo positivo (colina) e um grupo negativo (fosfato). Neste caso, o valor negativo do potencial zeta deve poder ser atribuído à presença de ácido fosfatídico na fosfatidilcolina do ovo usada na preparação dos lipossomas.

#### **4.3.4. Doseamento e eficácia de encapsulação da Indometacina e Capsaicina**

Para dosear a quantidade de Indometacina e Capsaicina presentes nas dispersões lipossómicas recorreu-se à separação dos lipossomas por centrifugação com membranas de policarbonato, e subsequente doseamento dos fármacos presentes na fase aquosa e nos lipossomas pela técnica de espectroscopia de UV/Vis.

Para uma melhor compreensão dos métodos espectrofotométricos utilizados, uma breve explicação sobre cada um deles será apresentada na secção seguinte

#### 4.3.4.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis

A espectroscopia é a técnica que analisa a interação da energia radiante incidente numa amostra (ex.: absorção ou emissão) e tem como resultado um gráfico determinado por espectro. <sup>91,93</sup>

Quando um feixe de luz atravessa uma amostra, no estado gasoso, líquido ou sólido, os átomos da amostra absorvem seletivamente certas frequências da energia dos fótons da luz, passando do estado fundamental para o estado excitado, afirmando-se então que ocorreu uma absorção. <sup>91</sup>Ao ocorrer absorção, a intensidade do feixe de luz que é transmitida ( $I_1$ ), relativamente à que incidiu sobre a amostra ( $I_0$ ), diminuiu.

A razão de luz que atravessa a amostra, com um comprimento de onda específico, designa-se por transmitância (T) e é dada pela seguinte equação:

$$T(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I(0)}$$

$T(\lambda)$ = transmitância com um comprimento de onda específico

$I(\lambda)$ = intensidade do feixe de luz transmitido

$I_0$ = intensidade do feixe de luz incidente

A partir da transmitância podemos obter a absorvância, pela seguinte equação:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) c \cdot l$$

$A(\lambda)$ = absorvância (para um  $\lambda$  fixo)

$\varepsilon(\lambda)$  = absorvidade molar ou coeficiente de absorção molar (para um  $\lambda$  fixo)

$c$ = concentração da solução absorvente

$l$ = distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra (normalmente de 1 cm)

A Lei de Lambert-Beer prevê uma proporcionalidade direta entre a absorvância da luz, a cada comprimento de onda, e a concentração da amostra. Esta relação só é válida para radiação monocromática, isto é, se possuir somente um  $\lambda$  e a proporcionalidade deixa de ocorrer em soluções muito concentradas (que devem ser diluídas) e em que exista mais do que uma espécie absorvente. Se existir mais do que

uma espécie absorvente, a absorvância passa a ser a soma das absorvâncias de cada uma das espécies. <sup>94-95</sup>

A absorção depende das características do material, da radiação incidente e das estruturas químicas dos compostos envolvidos. Daí ser importante escolher um solvente transparente na zona de comprimento de onda em análise e descontar a absorvância do solvente e do material utilizado (célula) para analisar a amostra, fazendo antes de uma leitura de absorvância, a subtração da linha de base (em inglês definido como baseline), promovendo a leitura real de absorvância da amostra. <sup>94</sup>

A célula a utilizar tem de ser de quartzo ou sílica fundida porque o vidro e o plástico absorvem UV e causa a reflexão da luz visível, enquanto na região do visível podem ser utilizados materiais mais baratos como o vidro ou plásticos.

A espectroscopia de absorção UV/Vis (ultravioleta-visível) envolve a técnica de espectrofotometria que é um método de análise que utiliza um espectrofotômetro, equipamento que emite radiação eletromagnética, desde o UV até ao IV (infravermelho) (ou seja, desde os 190 aos 2500 nm), utilizando lâmpadas de deutério (D2) para a região do UV (190 a 350 nm) e de tungstênio para a região do Vis e do IV (350 aos 2500 nm). Essa radiação vai passar por um prisma ou rede de difração e uma fenda para uma seleção mais precisa de uma luz monocromática, essencial para aplicação da Lei de Lambert-Beer. A luz monocromática é dividida em dois feixes, um incide na célula de referência (que contém o solvente usado na preparação da amostra) e outro na amostra. O fotodetector deteta a fração de luz que passou pela amostra e referência e transfere para o computador, produzindo um espectro de absorção que representa a variação da absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente.

O  $\lambda$  mais adequado para a determinação da concentração de um cromóforo ou de fluoróforo, através da lei de Lambert-Beer, é o  $\lambda$  de absorvância e de fluorescência mais intensa, ou seja, o pico de absorvância e o pico de fluorescência, respetivamente.

Os valores de absorvância e de fluorescência nesses picos de intensidade máxima serviram para construir as respetivas curvas de calibração, que determinam

concentrações desconhecidas de uma amostra pelos métodos fotométricos, que se expressam por uma equação matemática do tipo:

$$y = mx + b \quad r^2 \approx 1$$

y= absorvância/fluorescência

m= declive da reta

x= concentração da amostra

b= ordenada na origem

r= coeficiente de correlação

O declive (m) deve ter um valor estatisticamente diferente de zero, a ordenada na origem (b) não deverá ser estatisticamente diferente de zero e o coeficiente de correlação da reta de calibração não deve ser significativamente diferente de 1. <sup>95</sup>

A linearidade, ou seja, os resultados linearmente proporcionais à concentração de analito na amostra dentro de um intervalo de concentrações, é frequentemente testada apenas utilizando o coeficiente de correlação, r que indica-nos o grau de dependência entre duas variáveis (x e y). Quando r=1, este parâmetro indica-nos que todos os pontos se encontram exatamente sobre uma linha de declive positivo; quando r=0 indica-nos a falta de correlação entre a variável dependente (y) e a variável independente (x).

#### 4.3.4.2. Construção das curvas de calibração

Para determinar a quantidade de activo que ficou encapsulada na formulação lipossomal foi necessário construir, de antemão, uma curva de calibração da Indometacina e capsaicina solubilizada em água ultrapura, por medições de espectrofotometria UV-Vis (absorvância).

## Indometacina

Para elaborar esta curva de calibração começou-se por preparar uma solução stock de concentração rigorosa de Indometacina solubilizada em etanol absoluto. A partir dessa solução de concentração rigorosa prepararam-se sete padrões, por diluição rigorosa (Tabela 4). Para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta fotométrica é necessário recorrer a um número suficiente de padrões (entre 5 a 8 padrões), devendo abranger toda a gama de concentrações esperadas. A absorção de UV-Vis de cada amostra foi medida entre 250 nm a 600 nm. Para reduzir a razão sinal/ruído, a velocidade de leitura foi ajustada para média, a largura da fenda foi ajustada para 2 nm e a leitura com intervalos de 1 nm. A absorvância foi lida à temperatura ambiente.

### INDOMETACINA

NIVEIS ( $\mu\text{M}$ )	Volume a pipetar da solução Stock	Volume final	Concentração (g/L)
10	0,1 mL	10 mL	0,004
50	0,5 mL	10 mL	0,018
100	1 mL	10 mL	0,036
200	2 mL	10 mL	0,072
300	3 mL	10 mL	0,107
400	4 mL	10 mL	0,143
500	5 mL	10 mL	0,179

Tabela 4- Níveis relativos à curva de calibração da Indometacina

Após a preparação de todos os níveis, foi lida a absorvância de cada solução, baseando-me no comprimento de onda 319 nm, por apresentar um pico mais selectivo e com a menor probabilidade de absorção de o outro tipo de impurezas.

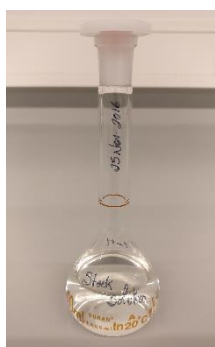


Figura 10 - Solução stock de Indometacina



Figura 11 - Diferentes níveis preparados para a construção da curva de calibração da Indometacina



Inicialmente elaborou-se uma baseline com o solvente utilizado nas soluções e mediu-se o espectro da solução stock.

Utilizando o mesmo comprimento de onda (319 nm), mediram-se as absorvâncias dos restantes soluções nesse mesmo comprimento de onda, obtendo os seguintes resultados:

<b>INDOMETACINA</b>				
<b>NIVEIS (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Abs (319 nm)</b>	<b>Média (Abs)</b>	<b>RSD</b>
<b>10</b>	0,0035779	0,0616	0,062	0,1
		0,0617		
		0,0617		
<b>50</b>	0,0178895	0,3473	0,347	0,0
		0,3474		
		0,3474		
<b>100</b>	0,035779	0,6155	0,615	0,0
		0,6154		
		0,6155		
<b>200</b>	0,071558	1,2671	1,267	0,0
		1,2670		
		1,2669		
<b>300</b>	0,107337	1,8898	1,890	0,0
		1,8898		
		1,8900		
<b>400</b>	0,143116	2,4740	2,474	0,0
		2,4726		
		2,4741		
<b>500</b>	0,178895	2,9994	3,000	0,0
		3,0011		
		3,0002		

*Tabela 5 - Abs obtidas após análise dos diferentes níveis da curva de calibração da Indometacina*

Após a determinação da regressão obtive:

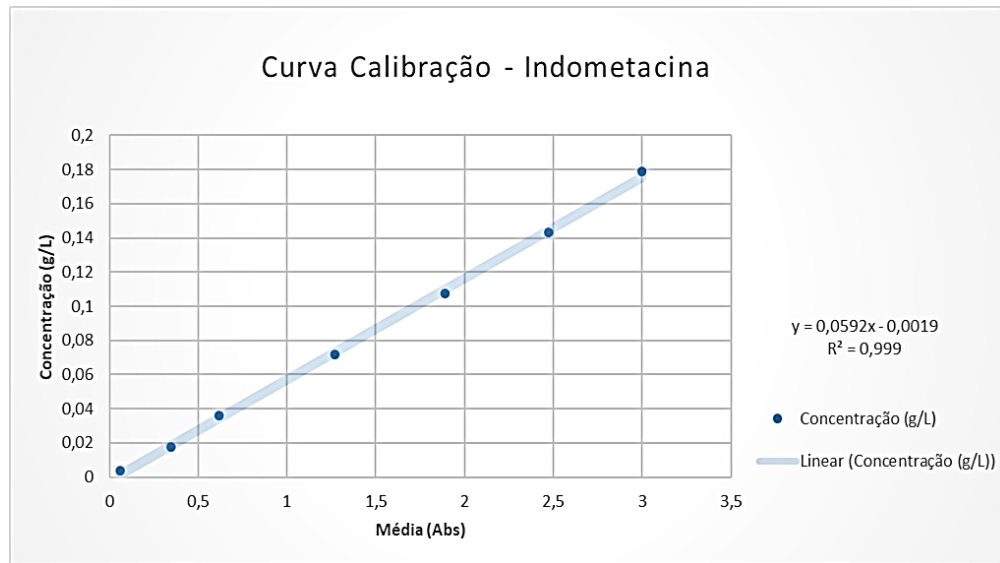


Gráfico 1 - Curva de calibração da Indometacina

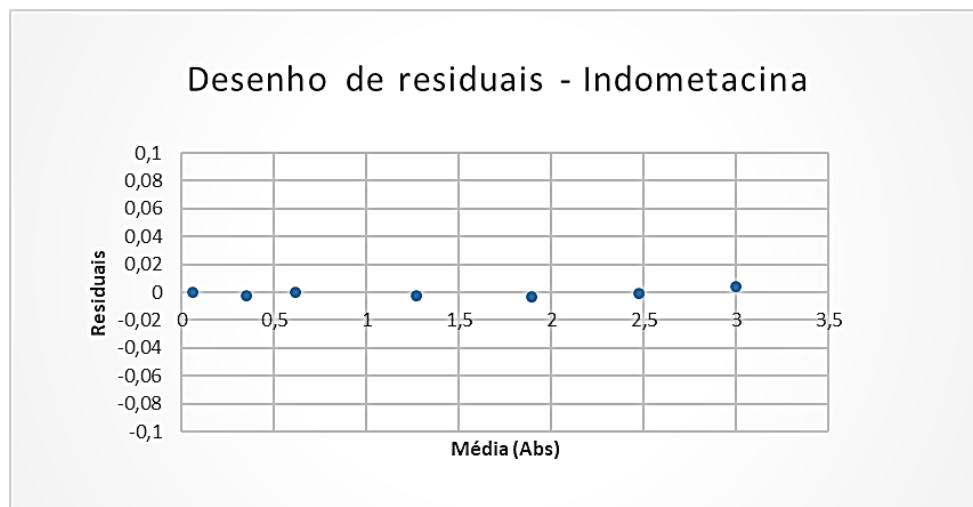


Gráfico 2 - Desenho de Residuais da Indometacina

Elaborando o mesmo processo para a Capsaicina basei-me na seguinte tabela:

### CAPSAICINA

<b>NIVEIS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Volume a pipetar da solução Stock</b>	<b>Volume final</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
<b>10</b>	0,1 mL	10 mL	0,003
<b>50</b>	0,5 mL	10 mL	0,015
<b>100</b>	1 mL	10 mL	0,030
<b>200</b>	2 mL	10 mL	0,061
<b>300</b>	3 mL	10 mL	0,092
<b>400</b>	4 mL	10 mL	0,122
<b>500</b>	5 mL	10 mL	0,153

*Tabela 6 - Níveis relativos à curva de calibração da Capsaicina*

Em semelhança ao elaborado no doseamento anterior, após a preparação de todos os níveis, foi lida a absorvência de cada solução, baseando-me no comprimento de onda 280 nm, por apresentar um pico mais selectivo e com a menor probabilidade de absorção de outro tipo de impurezas.

Inicialmente elaborou-se uma baseline com o solvente utilizado nas soluções e mediu-se o espectro da solução stock.

Utilizando o mesmo comprimento de onda (280 nm), iniciei a medição dos restantes níveis nesse mesmo comprimento de onda, obtendo os seguintes resultados:

**CAPSAICINA**

<b>NIVEIS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Molar (M)</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Abs (280 nm)</b>	<b>Média (Abs)</b>	<b>RSD</b>
<b>10</b>	0,00001	0,0030541	0,0360	0,036	0,2
			0,0359		
			0,0359		
<b>50</b>	0,00005	0,0152705	0,1620	0,162	0,0
			0,1621		
			0,1621		
<b>100</b>	0,0001	0,030541	0,3130	0,313	0,0
			0,3130		
			0,3131		
<b>200</b>	0,0002	0,061082	0,6333	0,633	0,0
			0,6333		
			0,6334		
<b>300</b>	0,0003	0,091623	0,9383	0,938	0,0
			0,9383		
			0,9382		
<b>400</b>	0,0004	0,122164	1,2509	1,250	0,1
			1,2498		
			1,2494		
<b>500</b>	0,0005	0,152705	1,5681	1,568	0,0
			1,5681		
			1,5678		

*Tabela 7 - Abs obtidas após análise dos diferentes níveis da curva de calibração da Capsaicina*

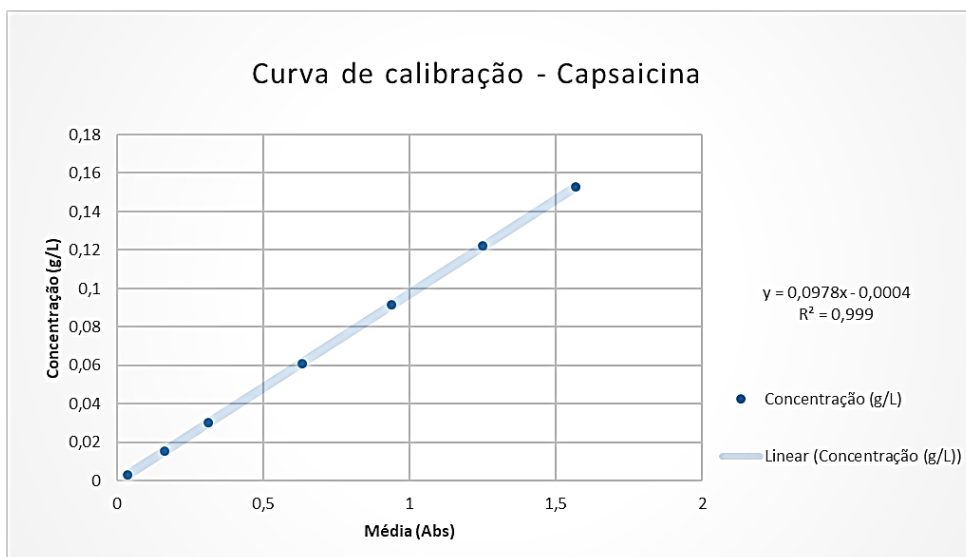


Gráfico 3 - Curva de calibração da Capsaicina

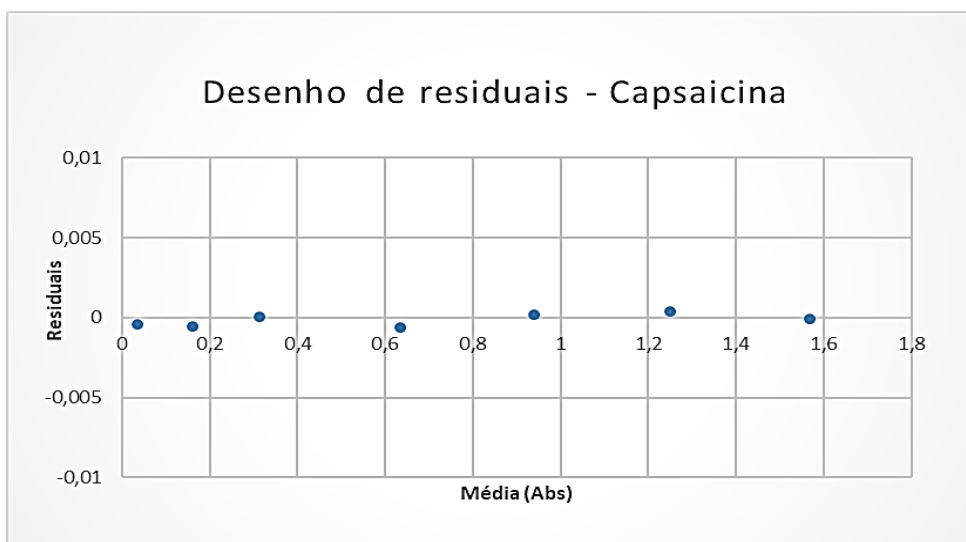


Gráfico 4 - Desenho de residuais da Capsaicina

Após a elaboração e avaliação das curvas de calibração, e já conhecidos os comprimentos de absorção dos dois ativos, é altura de avaliar a eficácia de encapsulação das formulações lipossomais desenvolvidas.

#### 4.3.4.3. Espectrofotometria derivativa

Para determinar a quantidade total de fármacos encapsulados nos lipossomas, foi necessário realizar uma centrifugação seguida de uma leitura espectrofotométrica do sobrenadante.

Como observado no tópico anterior, os fármacos utilizados absorvem num comprimento de onda bastante próximo, embora a concentração da indometacina possa ser determinada a 319 nm sem interferência da capsaicina. No entanto, o espectro da capsaicina sofre interferência da indometacina em toda a sua extensão, pelo que foi necessário recorrer à técnica de espectrofotometria derivativa para conseguir determinar a quantidade total deste composto presente na dispersão.

<sup>130,132,133</sup>

A espectrofotometria derivativa tem sido largamente utilizada como uma importante ferramenta no controlo da qualidade dos medicamentos, pois permite aumentar a sensibilidade e a seletividade na análise de misturas onde possa ocorrer sobreposição dos espectros de absorção. Apresentando essa maior seletividade quando comparada aos resultados da espectrofotometria convencional, esta técnica analítica tem sido empregada com bons resultados na determinação simultânea de misturas de fármacos.

Esta técnica mantém todas as características de espectrofotometria clássica como a lei Lambert-Beer, e consiste na transformação do espectro normal por derivação e consequente separação dos espectros. <sup>131,134,135</sup>

Os espectros derivados são obtidos utilizando apenas as informações contidas no espectro clássico ou de ordem zero. Deste modo, a derivação não aumenta o conteúdo de informações, pois apenas individualiza melhor os constituintes dos espectros pelo aumento do número de bandas de absorção, permitindo a eliminação de bandas largas e melhorando a detetabilidade das pequenas características espectrais.

O aumento da seletividade deve-se à separação das bandas sobrepostas, enquanto que o aumento da sensibilidade é devido à amplificação do sinal da derivada e a diminuição do ruído. O seu uso está baseado no fato de o sinal obtido, numa determinada faixa de concentração, ser proporcional à concentração da substância, ou seja, seguindo a lei de Lambert-Beer. <sup>137</sup>

É exequível a utilização de 3 ordens de derivação, proporcionais à separação mais detalhada dos espectros, sendo a derivada de ordem 3 mais selectiva que a de ordem 1, mas apresentado como consequência um erro de determinação maior.

A ordem derivativa utilizada neste trabalho foi a 2ª, tendo sido calculada com o programa Origin 8.5.1.

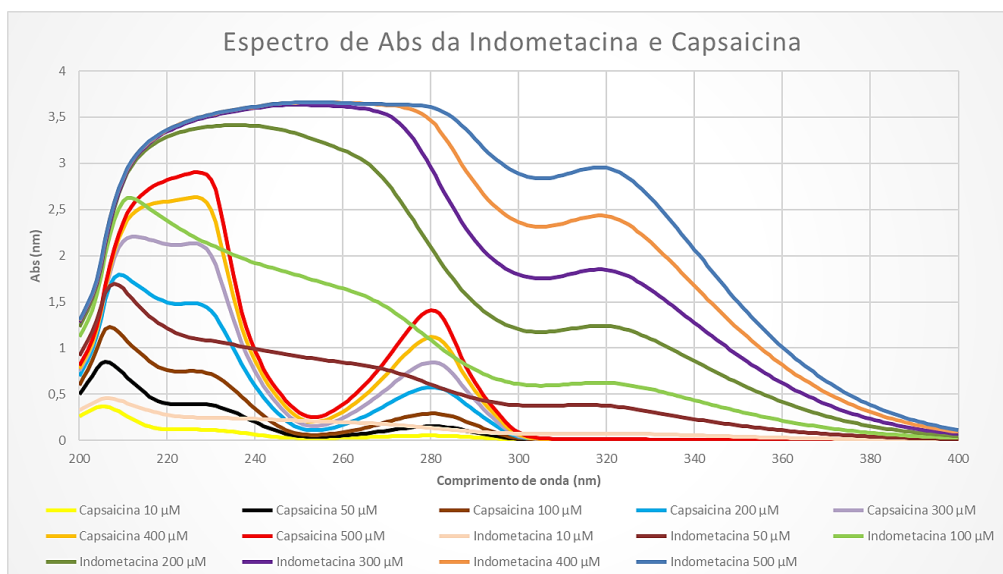


Gráfico 5 – Espectros de Abs da Indometacina e Capsaicina

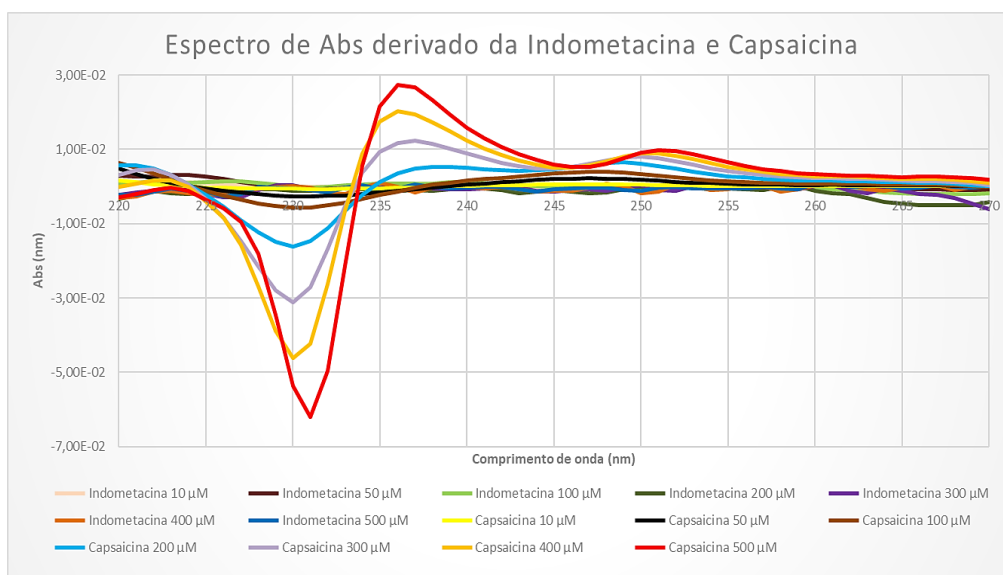


Gráfico 6 - Espectros de Abs da Indometacina e Capsaicina derivados

O pico que apresenta melhor resolução para o espectro da capsaicina é o de 230 nm, onde a absorvância derivativa da indometacina é muito próxima de zero. A reta de calibração obtida a este comprimento de onda pode ser observada na figura seguinte, que inclui também a absorvância da indometacina(praticamente zero):

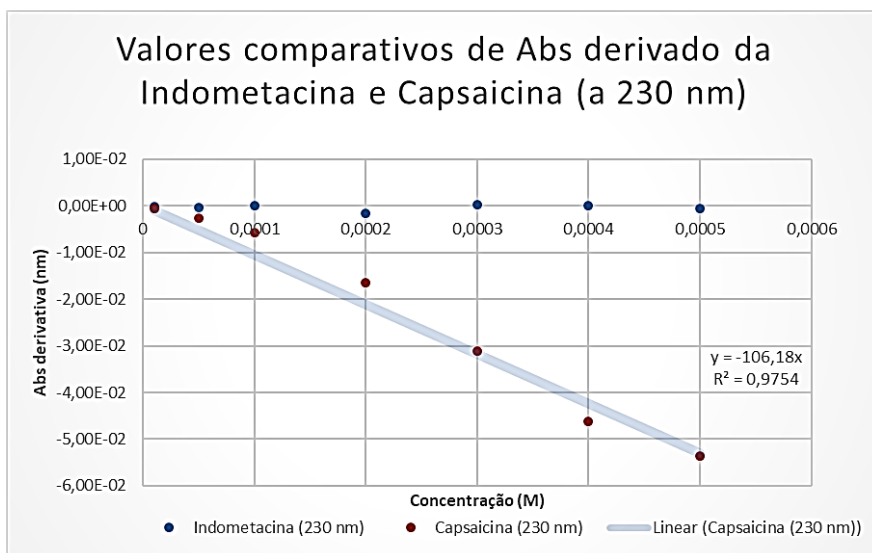


Gráfico 5 - Valores comparativos de Abs derivada da Indometacina e Capsaicina

#### 4.3.4.4. Eficácia de Encapsulação da Indometacina e Capsaicina

A determinação da quantidade total de fármaco nos lipossomas, apresenta uma determinada complexidade devido ao facto de tais estruturas terem tamanho reduzido e não serem solúveis numa grande percentagem de líquidos.

Contudo, uma ótima técnica de separação, bastante utilizada, é a centrifugação com utilização de membranas seletivas na qual a concentração de ativos livres na suspensão é determinada no sobrenadante, após centrifugação.

Tal técnica permite-nos avaliar a eficácia de encapsulação dos compostos utilizados que se traduz na quantidade de fármaco encapsulado relativamente a quantidade total de fármaco adicionado.

Para tal avaliação, foi utilizada uma técnica indirecta, que consistiu em calcular primeiramente a quantidade de fármaco total presente na suspensão de lipossomas, e para tal, uma determinada quantidade da suspensão foi diluída em etanol absoluto na proporção de 1:100 e agitada ligeiramente durante 1 min.

Uma alíquota da mesma suspensão foi sujeita a técnica de filtração/centrifugação usando dispositivos filtrantes (tubos de centrifuga especiais com uma membrana filtrante), sujeitos a centrifugação e a uma rotação de 3500 rpm durante 1 hora, usando centrifuga ThermoFisher Scientific Heraeus Multiuge X1R (Alemanha).



A Indometacina e Capsaicina não encapsulados e presentes na suspensão lipossômica passam pela membrana, enquanto que as vesículas contendo Indometacina e Capsaicina encapsuladas ficam retidas na membrana filtrante.

A quantidade de Indometacina e Capsaicina não encapsulada foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (JASCO V-650, Japão) a um comprimento de onda de 320 nm, no caso da Indometacina, e a 280 nm e com a utilização da espectroscopia derivativa no que concerne à Capsaicina, com auxílio das retas relativas às curvas de calibração obtidas anteriormente.

A eficácia de encapsulação (EE) foi determinada usando a seguinte equação:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade total de fármaco} - \text{Quantidade de Fármaco livre}}{\text{Quantidade total de fármaco}}$$

Os resultados obtidos podem ser observados nas tabela 8 e 9, respectivamente.

<b>INDOMETACINA</b>	<b>ABS</b>	<b>CONC. g/L</b>	<b>CONC. REAL</b>	<b>EE (%)</b>
<b>LIPOSSOMAS (1:100)</b>	0,287917	0,01709	1,709011	98%
<b>SOBRENADANTE</b>	0,006058	0,00036	0,03596	

*Tabela 8 – Eficácia de encapsulação da Indometacina*

<b>CAPSAICINA</b>	<b>ABS DERIVADA</b>	<b>CONC. g/L</b>	<b>CONC. REAL</b>	<b>EE (%)</b>
<b>LIPOSSOMAS (1:100)</b>	-0,00215	0,00619	<b>0,619418</b>	100%
<b>SOBRENADANTE</b>	0,000561	-0,00162	<b>-0,16167</b>	

*Tabela 9 - Eficácia de encapsulação da Capsaicina*

#### 4.4. Estudo, avaliação e análise do perfil de libertação *in vitro*

O estudo e análise do perfil de libertação *in vitro* apresenta-se com uma elevada importância no que concerne à avaliação da qualidade dos produtos no sector farmacêutico, ajudando a detetar possíveis irregularidades quer nas matérias primas, quer na formulação ou até mesmo no processo de fabrico. Tudo isto representa uma melhoria no desempenho e na biodisponibilidade da forma farmacêutica. <sup>140</sup>

Neste trabalho, estudo de libertação *in vitro* foi realizado pelo método de diálise que no decorrer dos anos tem sido usada para avaliar a libertação *in vitro* de fármacos a partir de carregadores submicrométricos. <sup>141</sup>

Esta técnica consiste num processo onde moléculas em solução são separadas através de uma membrana semipermeável seletiva ao tamanho das partículas; os compostos solubilizados passarão seletivamente, enquanto as partículas maiores ficarão retidas dentro da membrana. <sup>142</sup>

Para o sucesso e bom desempenho desta técnica, as condições experimentais devem simular ao máximo as condições “*in vivo*”, ou seja, temperaturas próximas das temperaturas fisiológicas, agitação homogênea e meio de dissolução com pH adequado. <sup>141</sup>

Posto isto, uma porção da dispersão lipossómica (5mL) foi depositada em membranas de diálise hermeticamente fechadas e distribuídas num meio recetor constituído por água.



Figura 13 - Suspensão lipossómica no interior da membrana de diálise



Figura 12 - Membrana de diálise mergulhada no meio

O sistema foi deixado sob agitação contínua, a temperatura constante ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e em tempos predeterminados, cerca de 1 mL do meio foi retirado e quantificada a quantidade de ativos presentes pelo método de espectrofotometria UV/vis diluídos em etanol absoluto.

Contudo, é de extrema importância ressaltar que após a recolha da amostra (1 mL) a mesma quantidade de meio era colocado no sistema de forma a manter sempre as mesmas condições iniciais.



Figura 14 - Exemplificação do sistema de diálise completo

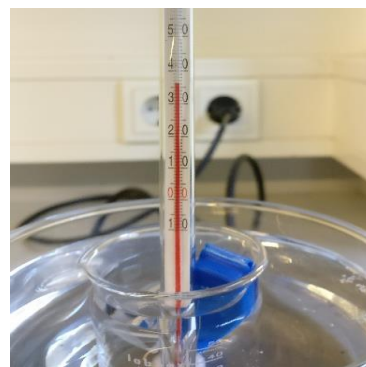


Figura 15 - Controle da temperatura do meio de imersão da membrana

Os tempos em que ocorreu esta recolha foram após 30 min, 60min, 120 min, 180 min, 240 min.

Como descrito anteriormente, após cada tempo foi retirada uma porção de 1 mL do meio envolvente da membrana, foi diluído em álcool absoluto na diluição de 1:10 e posteriormente lido no espectrofotômetro de absorção UV/vis.

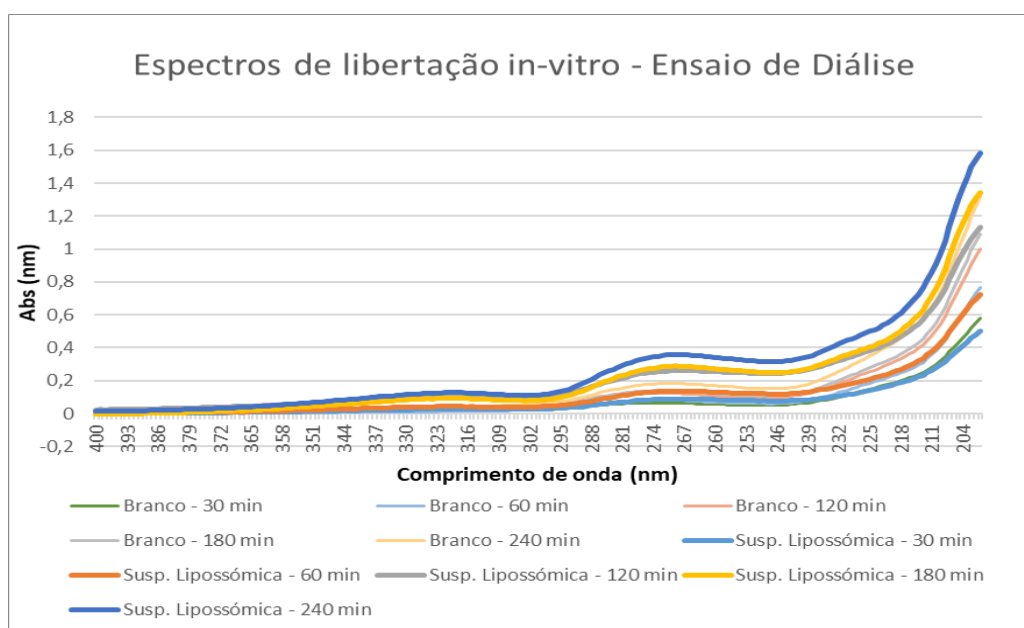


Gráfico 6 - Espectros de libertação in vitro da Indometacina e Capsaicina

O gráfico 8 representa o varrimento espectral da suspensão lipossômica em comparação com o varrimento espectral de uma solução sem Indometacina e Capsaicina na sua composição (Branco).

Analisando apenas o comprimento de onda escolhido para a avaliação do doseamento de cada um dos compostos usados (Indometacina e Capsaicina), obtemos um gráfico de leitura mais simplificada (gráficos 9) e de um melhor esclarecimento no que concerne à liberação dos ativos de forma seletiva de dentro para fora da membrana de diálise.

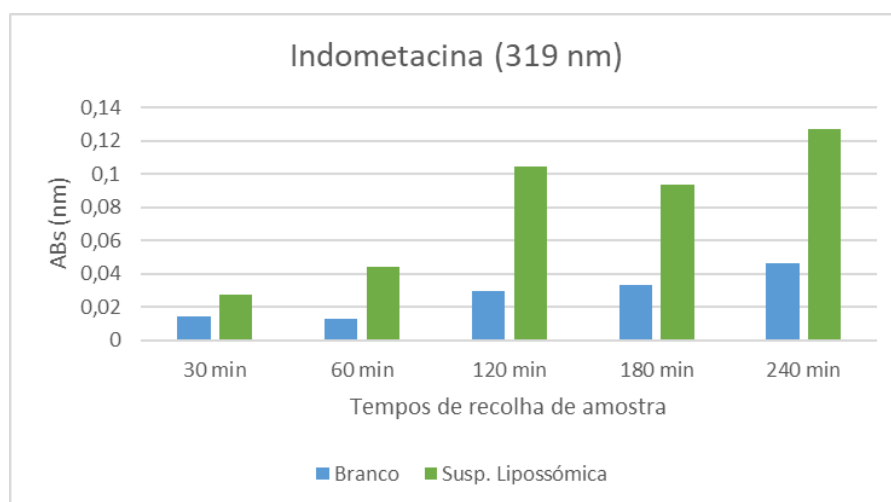


Gráfico 7 - Comparação entre a liberação in vitro entre o branco e a Indometacina

A segunda derivada dos espectros mostrou que a absorvância correspondente à capsaicina é praticamente igual a zero.

## **CAPÍTULO 5 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO A DISPERSÃO LIPOSSÓMICA DE INDOMETACINA E CAPSAICINA**

Na generalidade, os géis classificam-se em dois grupos, hidrófobos (ou óleogéis) e hidrófilos (ou hidrogéis). No primeiro caso os seus excipientes são gordurosos, como parafina líquida e óleos diversos, enquanto nos segundos, os excipientes base são a água ou diversos glicóis, como glicerina e propilenoglicol.<sup>144</sup>

O gel preparado neste trabalho foi um gel hidrófilo baseado em carbopol 940.

O Carbopol 940 é um polímero sintético do ácido acrílico, de alto peso molecular e carácter aniónico, utilizado como agente emulsionante, viscosificante, suspensor e gelificante, em fórmulas como soluções, suspensões, cremes, géis e pomadas, que se pode administrar por via oftálmica, rectal e tópica.<sup>144</sup>

O Carbopol, pode ser incorporado na maioria das emulsões, permitindo desse modo o espessamento da fase aquosa e em que a máxima viscosidade é obtida quando o pH da solução fica entre os valores de 6-11.<sup>144</sup>

Os géis de Carbopol são frequentemente utilizados na indústria cosmética em anti seborreicos, hidratantes e revitalizantes, funcionando também como protetores cutâneos e aumentando também a viscosidade de suspensões e champôs.<sup>145</sup>

Após a sua preparação, o gel de Carbopol, apresenta-se sob forma de gel termoestável, pelo que uma das possíveis e vastas aplicações é a formulação de géis fluidos para lágrimas artificiais, no tratamento dos olhos secos e irritados.<sup>146</sup>

Outra utilização bastante frequente do gel de Carbopol onde é frequentemente chamado de "gel condutor de ultra-sons" ou "gel de contacto para ecografias" é um gel aquoso ou hidroalcoólico ao qual se adiciona mais ou menos álcool conforme se queira que seja mais ou menos refrescante.

### 5.1. Preparação do gel de carbopol

Na preparação do gel de carbopol é de relativa importância seguir o critério de preparação, caso contrário não se conseguirá obter uma otimização do produto final.

Esta preparação pode ser descrita da seguinte forma:

- 1) Triturar o Carbopol 940 num almofariz de porcelana.
- 2) Juntar aos poucos a água purificada contendo o metilparabeno, com agitação contínua até homogeneizar a suspensão
- 3) Adicionar o propilenoglicol ainda com agitação constante.
- 4) Adicionar a suspensão lipossômica aos poucos.
- 5) Juntar (espaçadamente) a solução de NaOH gota a gota, até a mistura apresentar um pH neutro, em contínua agitação.



*Figura 16 - Gel lipossômico preparado*

### 5.2. Caracterização do gel contendo a dispersão lipossômica

Após a preparação da formulação, esta foi armazenada em recipientes de acrílico e ao abrigo da luz para procedermos à realização dos ensaios de estabilidade.

Os ensaios programados foram:

- Ensaio de estabilidade:
  - Viscosidade,
  - pH,
  - Textura
  - Características organolépticas

Todos estes ensaios foram planeados para um período de 30 dias sendo que T0 corresponde ao dia de preparação da formulação, T1 corresponde a um dia após a preparação, T15 corresponde a quinze dias após a preparação e o T30 corresponde ao último dia de ensaios, ou seja, trinta dias após a preparação.

### 5.2.1. Caracterização organolética

A caracterização organolética foi realizada de acordo com o descrito na literatura, e de acordo com tal descrição o gel preparado não apresentou alterações organoléticas ao longo do tempo. Nem em repouso (quando devidamente acondicionado) nem após a realização de cada ensaio, mantendo-se sempre com a mesma intensidade de coloração, o mesmo aroma e a mesma textura ao toque (sendo que aqui, este parâmetro é apenas avaliado pelo tato).<sup>144</sup>

### 5.2.2. Determinação do pH da formulação

A determinação do pH de uma preparação para aplicação cutânea constitui um parâmetro extremamente importante, uma vez que cada produto deve apresentar pH compatível com o pH fisiológico. A pele tem normalmente um pH médio de 5,5, embora este valor possa variar ligeiramente consoante as diferentes zonas do corpo. O pH natural da pele provém das secreções das glândulas apócrinas e endócrinas que conduzem à formação de uma película de proteção sobre toda a superfície cutânea, designada de filme hidrolipídico.<sup>145</sup>

Neste trabalho, a determinação do pH foi efetuada sobre a amostra de gel ao longo dos tempos T0, T1, T15 e T30, e os resultados obtidos (Tabela X onde n=3) demonstram que a nível do pH, a formulação se encontra estável.

Tempos	pH
T0	5,7 ± 0,05
T1	5,6 ± 0,05
T15	5,5 ± 0,05
T30	5,6 ± 0,05

*Tabela 10 - Resultados relativos ao pH do gel*

### 5.2.3. Viscosidade do gel

Segundo a lei de Newton, para os líquidos ideais a tensão de corte (*shear stress*) é diretamente proporcional à velocidade de deformação em corte (*shear rate*). Neste casos, a viscosidade é independente da velocidade de deformação. No entanto, as preparações complexas, como por exemplo, as preparações semissólidas, apresentam um comportamento não Newtoniano, que se caracteriza por variações da viscosidade aparente em função da velocidade de corte aplicada à formulação.<sup>146</sup>

Os sistemas podem ser classificados quanto ao tipo de escoamento em reofluidificantes (ou pseudoplásticos), reofluidificantes com valor de cedência (plásticos), e reoespessantes ou dilatantes.

A viscosidade ( $\eta$ ) traduz a resistência ao escoamento e é expressa em Pas. Para a determinação da viscosidade aparente, foi utilizado um viscosímetro rotativo Brookfield que mede a força requerida para rodar uma agulha imersa na formulação onde a viscosidade é medida pela razão entre a tensão da rotação da sonda e a adesão da preparação, razão vulgarmente chamada de coeficiente de viscosidade dinâmica sendo que as unidades utilizadas nestes métodos foram os centiPoises (cP).

146

Após a finalização das preparações e após repouso, ao abrigo da luz e em recipiente fechado, foram realizados os ensaios nos tempos T1, T15 e T30, com 3 medições em cada rotação ( $n=3$ ), utilizando a agulha número 7, nas velocidades de 1,5 , 3, 4, 5, 10, 12, 20, 30 rpm, em condições de 25 °C obtendo os seguintes resultados:

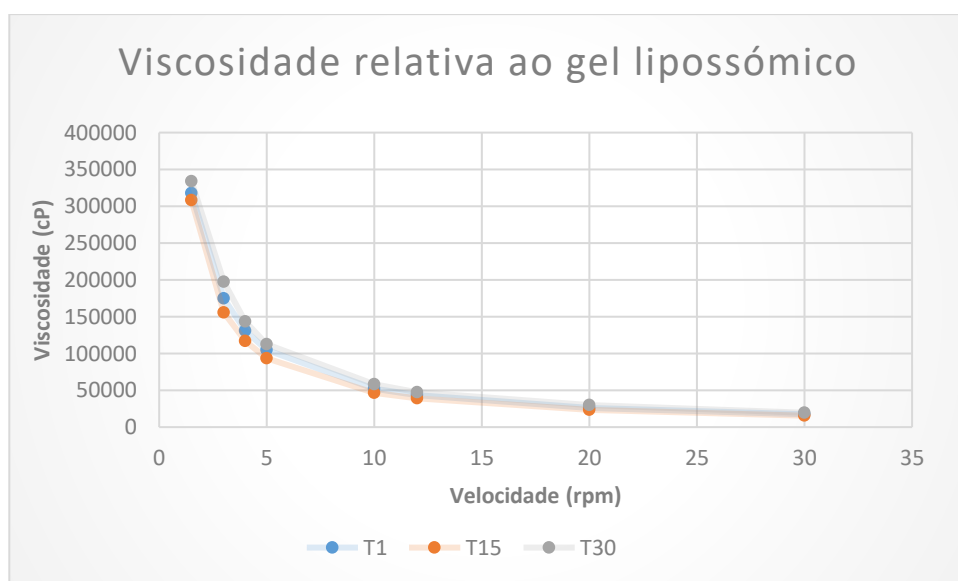


Gráfico 8 - Resultados da análise da viscosidade



A análise dos gráficos demonstra que a formulação não sofreu alterações durante o tempo de armazenamento. Verificamos que as formulações apresentaram um comportamento reofluidificante, sendo consideradas como fluidos não-Newtonianos.

O gráfico 10 revela que a viscosidade decresce com o aumento da velocidade de deformação em corte. As curvas ascendente e descendente sobrepõem-se, o que indica que a viscosidade aparente não depende do tempo.

A tixotropia consiste na diminuição da viscosidade com o tempo de deformação. Este fenómeno é geralmente reversível e, após cessar a deformação, o fluido retoma a sua viscosidade inicial.

Tendo em conta o seu uso tópico, estes tipos de produtos devem ser facilmente aplicados na pele e facilmente removidos dos recipientes de acondicionamento, o que implica apresentarem “baixas” viscosidades. Através deste ensaio, verificamos que a formulação apresenta boas características para a aplicação tópica, uma vez que, a agitação provoca a diminuição da viscosidade aparente, facilitando a remoção do produto da embalagem e, em repouso, a viscosidade inicial é recuperada contribuindo para manter o produto no local de aplicação.

#### **5.2.4. Análise da textura da formulação**

A reologia é a parte da física que estuda as propriedades de escoamento e de deformação da matéria quando é aplicada uma tensão (*shear stress*). A determinação das propriedades reológicas permite estudar o efeito que alterações na formulação, temperatura e tempo de armazenagem têm na estabilidade e permite, também, a avaliação da formulação na perspectiva do consumidor.<sup>147</sup>

A organização internacional de normalização (ISO - International Organization for Standardization) define textura como o conjunto das propriedades reológicas e atributos estruturais percebidos por meios mecânicos, tácteis e, quando apropriados, pelos receptores auditivos e visuais.<sup>148</sup>

Várias definições foram propostas por diferentes autores, porventura nenhuma completamente satisfatória.

A textura compreende todas as características físicas percebidas pelo sentido do tato que estão relacionadas com a deformação sob ação de uma força e são medidas com objetividade em termos de força, distância e tempo. Esta definição considera um ponto fundamental que é o facto da textura não poder ser avaliada se o material não for deformado.<sup>149</sup>

Com efeito, nesta área, é grande o interesse na análise de textura, tendo-se desenvolvido vários instrumentos para avaliação das propriedades de textura e procurado estabelecer correlação com parâmetros sensoriais.

No desenvolvimento de formas farmacêuticas de aplicação tópica, existem vários atributos desejáveis e que podem contribuir para a aceitação por parte dos pacientes e até mesmo pela melhoria da eficácia clínica.

Estes incluem boa adesividade (para assegurar a retenção no local de aplicação) e propriedades mecânicas adequadas (facilidade de remover o conteúdo do recipiente de acondicionamento e facilidade de aplicação).<sup>149</sup>

Um dos ensaios mais utilizados é a análise do perfil de textura (TPA - "Texture Profile Analysis"), no qual a amostra é comprimida a uma distância e velocidade definidas, existindo um período de espera entre as compressões. A análise do gráfico Força-Distância ou Força-Tempo resultante permite a obtenção de parâmetros que são correlacionados com propriedades mecânicas.

Para a análise da textura, geralmente realiza-se o teste da penetração, no qual uma sonda penetra na amostra a uma determinada velocidade e a uma distância pré-definida, voltando depois para uma posição a uma distância pré-determinada acima da superfície da amostra.<sup>148</sup>

As condições utilizadas foram, uma célula de carga de 5 kg, uma sonda cilíndrica P/05 de 13 mm de diâmetro, 5 mm de distância de penetração (para a análise de firmeza e adesividade), velocidades (pré-teste e pós-teste) de 3 mm/s e modo de compressão e *trigger force* de 0,050 N.

Para o ensaio de espalhabilidade foi utilizada a sonda cônica HDP/SR, nas mesmas condições da análise anterior de firmeza e adesividade.

Após penetrar a amostra, a sonda volta para uma posição de 70 mm acima da plataforma de suporte, sendo esta a sua posição inicial.



Figura 17 - Texturómetro TA-TX2i da Stable Micro System UK

Os gráficos seguintes mostram os valores relativos à firmeza, adesividade e espalhabilidade do gel formulado:

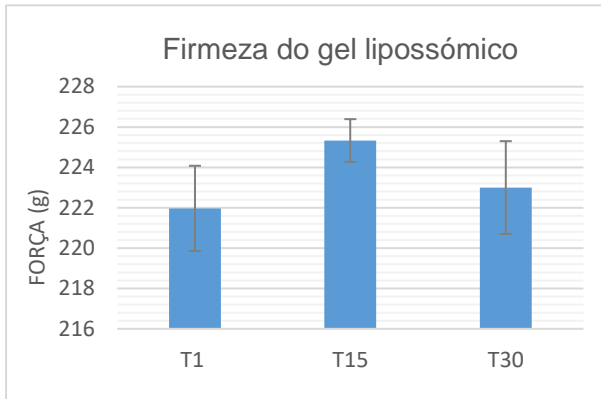


Gráfico 11 - Resultados da firmeza do gel

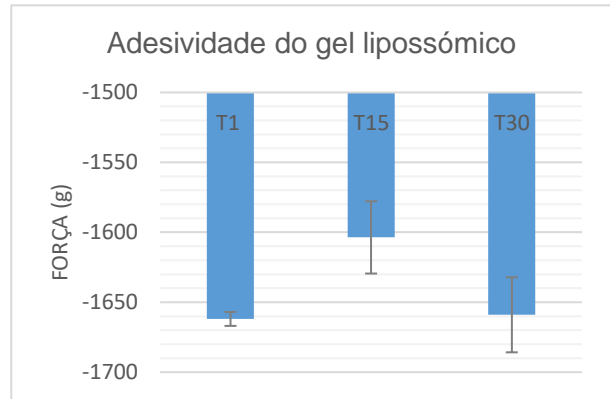


Gráfico 12 - Resultados da adesividade do gel

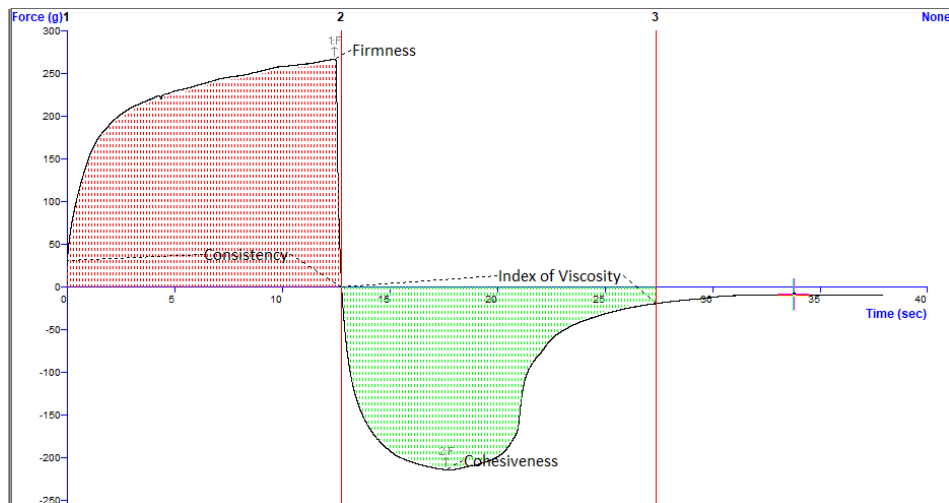


Figura 18 - Desenho gráfico da análise de firmeza e adesividade

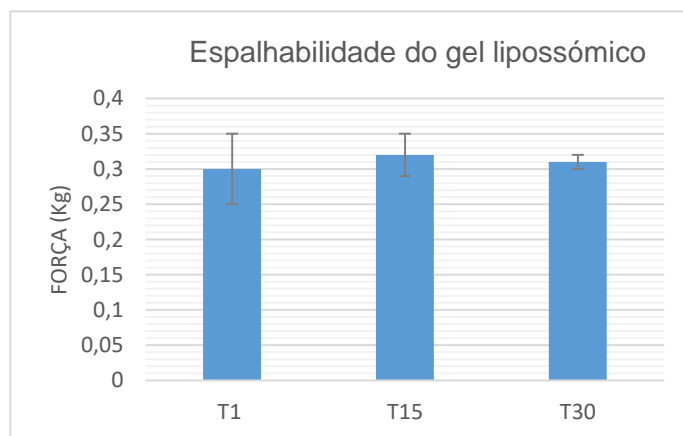


Gráfico 93- Resultados da espalhabilidade do gel

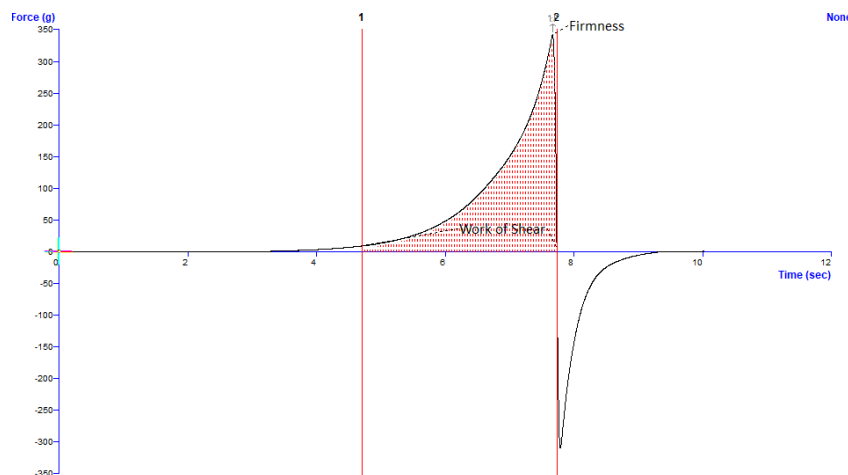


Figura 109 - Desenho gráfico da análise da espalhabilidade

Os valores registados sugerem que o gel apresenta uma firmeza e adesividade satisfatórias, podendo concluir que também no que diz respeito à espalhabilidade, que não é necessário uma elevada força para a aplicação do gel quer para uso, quer para acondicionamento. <sup>149</sup>

## CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVA DE FUTURO

A multidisciplinaridade inerente à tecnologia farmacêutica, mais propriamente à nanotecnologia farmacêutica, resultou no desenvolvimento de lipossomas como sistemas de liberação de fármacos eficazes nas mais inúmeras terapêuticas.

A utilidade destes sistemas foi continuamente melhorada seguindo um fluxo de estudos que, de um certo modo, permitiram em larga escala um aumento da estabilidade e a compreensão das características físico-químicas e interação com tecidos biológicos.

Devido à sua tão elevada versatilidade estrutural em termos dos mais diversos fatores como: o tamanho, a composição, a carga, a fluidez e veiculação de compostos, os lipossomas tornaram-se assim potentes sistemas terapêuticos capazes (após inúmeros estudos comparativos) de melhorar assim a farmacodinâmica (potenciando o efeito terapêutico), a farmacocinética (controlando a absorção e distribuição) e como referido, os efeitos toxicológicos (reduzindo a toxicidade local e sistêmica), sendo avaliados como excelentes alternativas a algumas terapêuticas convencionais.

Atualmente as pesquisas estão voltadas para a obtenção de lipossomas com elevado grau de especificidade e seletividade, e isso possibilitará o uso de medicamentos com reduzidos efeitos colaterais. Assim sendo, toda esta pesquisa visa o bem estar do paciente, pois trará acréscimos na qualidade da sua terapêutica e, conseqüentemente, beneficiará a sua qualidade de vida. <sup>150</sup>

Contudo, sendo esta uma pesquisa para o desenvolvimento de preparações para aplicação tópica, é necessário ter em consideração determinadas características mecânicas, como viscosidade e a textura, visto que são determinantes para a aceitação do produto por parte do consumidor e que vão, de um certo modo, condicionar a adesão do doente à terapêutica. <sup>151</sup>

Os ensaios realizados permitiram concluir que os lipossomas caracterizados com mais pormenor apresentam características propícias à veiculação num gel simples de carbopol que após análise se concluiu que em função do seu comportamento reofluidificante.

O seu interesse nesta aplicação deverá ser explorado através da avaliação das características de cedência em meios *in vivo*.

Com vista a complementar a investigação, a caracterização destes sistemas e realçar novas aplicações, outros ensaios poderão apresentar interesse, como o estudo microbiológico e a biodisponibilidade em membranas biológicas. <sup>152</sup>

Com vista a avaliar a adequação à aplicação tópica seria interessante efetuar os mesmos ensaios reológicos efetuados neste trabalho, mas a uma temperatura de 32 °C.

Para finalizar, é importante realçar que no decorrer deste trabalho, foram várias as formulações que não atingiram as especificações pré-definidas, o que levou ao não aprofundamento do seu estudo. A otimização dessas formulações poderá conduzir à obtenção de sistemas com características desejáveis.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Berlin Jr., C.M., et al. (Committee on Drugs of American Academy of Pediatrics). "Alternative Routes of Drug Administrations – Advantages and Disadvantages (Subject Review)" *Pediatrics* 100.1 (1997)
- 2- Li, V., e V. Lee. "Influence of Drug Properties and Routes of Drug Administration on the Design of Sustained and Controlled Release Systems." *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*. Eds. J. R. Robinson e V. H. Lee. New York: Marcel Dekker,
- 3- Torchilin, Vladimir P. "Drug Targeting." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2000)
- 4- Drug Delivery Systems for Cancer Therapy." *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde* (2007)
- 5- Benoit, P., et al. "Drug Targeting - A New Way for Drug Delivery." *Journal de Pharmacie de Belgique* 41.5 (1986)
- 6- Roblot-Treupel, L., e F. Puisieux. "Distribution of Magnesium Stearate on the Surface of Lubricated Particles." *International Journal of Pharmaceutics*
- 7- Frézard, F., et al. "Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia."
- 8- Orive, G. "Micro and Nano Drug Delivery Systems in Cancer Therapy."
- 9- Jones, N., e D. Micelles, Monolayers and Biomembranes. New York: Wiley-Liss Inc., 1995.
- 10- Dandamudi, S., e B. Campbell. "The Drug Loading, Cytotoxicity and Tumor Vascular Targeting Characteristics of Magnetite in Magnetic Drug Targeting."
- 11- Vasir, K., K. Reddy, e V. Labhasetwar. "Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges." *Current Nanoscience* 1 (2005)
- 12- Kumar Thakur, V., Kumari Thakur, M. "Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies" (2015)
- 13- Kapoor, B., Singh, S., et al, "Application of liposomes in treatment of rheumatoid arthritis: quo vadis" *Review Article, India* (2014)
- 14- Batista, C., Carvalho, C., Magalhães N. (2007) "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas." - *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*
- 15- Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox: "Principles of Biochemistry"
- 16- Lasic, D. "Liposomes - from Physics to Applications".
- 17- New, R. C. "Liposomes - a practical approach". Oxford University Press.

- 18- Li, J., Wang, X., Zhang, T. et al, "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems", China (2015)
- 19- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Woo Joo S., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. – "Liposome: classification, preparation and applications" (2013)
- 20- QSONICA® Ultrasonic Liquid Processors – Catalog (2015)
- 21- Jones, M. N., Chapman, D. (1995). "Micelles, monolayers and biomembranes".
- 22- Conceição, A., Matos, C., Moutinho C. – "Encapsulação de fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e mototrexato) em lipossomas unimelares"
- 23- Sessa, G., Weissmann, G. (1968). "Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes".
- 24- Sharma, A., Sharma, U. S. (1997). "Liposomes in drug delivery: progress and limitations".
- 25- Vemuri, S., Rhodes, C. T. (1995). "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review."
- 26- Fendler, J. H. (1982). "Membrane Mimetic Chemistry".
- 27- Seelig, A. (1987). "Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. "
- 28- Ceve, G. (1990). "Membrane electrostatics."
- 29- Voet, D., Voet, J. G. (2004). Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- 30- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., Cullis, P. R. (1985). "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential."
- 31- Perkins, W. R., Minchey, S. R., Ahl, P. L, Janoff, A. S. (1993). "The determination of liposome captured volume."
- 32- Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., Janoff, A. S. (1985). "Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles."
- 33- Machleidt, H., Royh, S., Seeman, P. (1972). "The hydrophobic expansion of erythrocyte membranes by the phenol anesthetics."
- 34- Pandley V.P., J. Ruby, "Nanoparticles in pharmaceutical Technology" – World Journal of pharmacy and pharmaceuticals Sciences
- 35- Garcia, F., "Avanços da nanomedicina" – Rev. Ciências Saúde Nova Esperança, Pernambuco, Brasil
- 36- Barbosa, C., "Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossômicas de monofosfato de vidarabina para o tratamento da hepatite B crônica". (1996)
- 37- Peatrics® "Alternative Routes of Drug Administration – Advantages and Disadvantages"- Official Journal of the American Academy of Pediatrics



- 38- Brochado, P., "Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica" , Lisboa (2013)
- 39- Schaffazick, Scheila R., Guterres, S., "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos", Porto Alegre, Brasil (2003)
- 40- Morais, H., Barbosa, C., Delvivo, F., et al "Estabilidade e Avaliação Sensorial de lipossomas contendo hidrolisados de caseína", Brazilian Journal (2002)
- 41- Pierri, E., Gremião, M., "Metodos de preparação de lipossomas", Araraquara, Brasil (1999)
- 42- Vishvakrama, P., Sharma, S., "Liposomes: Na Overview", International Journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences (2012)
- 43- Coutteau, P., Caerms, M., Curé, K, Gajardo, G., "Supplementation of lipid emulsions to algal diets in the hatchery rearing of bivalves", Chile (1996)
- 44- Naeem S, Kiew, L, et al, "Liposomes as amphiphilic carriers: Encapsulation and stability aspects" (2016)
- 45- Machado, L., Gnoatto S., Klüppel, M., "Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura." (2007)
- 46- Riaz, M., "Liposomes preparations methods", Faculty of pharmacy, University of the Punjab (1996)
- 47- Antunes, C., "Lipossomas e as suas aplicações na actualidade", Universidade de Évora
- 48- Sapra, P., Allen, T.M., "Ligand-targeted liposomal anticancer drugs: review", University of Alberta, Canada (2003)
- 49- Rico, L., "Sistemas nanoparticulados e a vectorização de fármacos no tratamento do cancro" Universidade do Algarve (2013)
50. Kolarsick, A.J., Kolarsick M.A., "Chapter 1: Anatomy and Physiology of the skin".
51. McGrath, J.A., Eady, R., Pope, F.M, "Chapter 3: Anatomy and Organization of Human Skin".
52. BENSON, Heather A. E. e WATKINSON, Adam H. "Transdermal and Topical Drug delivery, Principles and Practice." (2012).
53. KULKARNI, Vitthal S. "Handbook of Non-invasive Drug delivery Systems" USA (2010)
54. Brink HE, Stalling SS, Nicoll SB. "Influence of serum on adult and fetal dermal fibroblast migration, adhesion, and collagen expression in vitro cell" (2005)

55. Prista, L. Nogueira; Alves, A. Correia; Morgado, Rui; Tecnologia Farmacêutica, I, II e III Volume (4ª edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996
56. Esteves, A., Mota, A., Matias, A., Sebastião, A., et al. (2001). "Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas", 4ª edição. Porto Editora, Lda., Porto.
57. Carvalho, W. A., Carvalho, R. D. S., Rios-Santos, F. (2004). "Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos."
58. Hawkey, C. J. (2001). "COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*"
59. Brooks, P. (1998). "Use and Benefits of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs."
60. Cryer, B., Feldman, M. (1998). "Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs"
61. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L. (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression."
62. Schwab, J. M., Beiter, T., Linder, J. U., Laufer, S., Schulz, J. E., Meyermann, R., Schluesener, H. (2003). "COX-3 a virtual pain target in humans?"
63. Rainsford, K. D. (1999). "Profile and Mechanisms of Gastrointestinal and Other Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)."
64. Luger, P., Daneck, K., Engel, W., Trummlitz, G., Wagner, K. (1996). "Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID"
65. Luger, P., Daneck, K., Engel, W., Trummlitz, G., Wagner, K. (1996). "Structure and physicochemical properties of meloxicam"
66. DeWitt, D. L., Meade, E. A., Smith, W. L. (1993). "Prostaglandin H synthase isoenzyme selectivity: the potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs."
67. Hawkey, C. J. (1999). "COX-2 Inhibitors."
68. Rainsford, K. D. (1978). "Structure-activity relationships of non steroidal antiinflammatory drugs I: gastric ulcerogenic activity."
69. Balon, K., Riebesehl, B. U., Muller, B. W. (1999). "Determination of liposome partitioning of ionizable drugs by titration."
70. Lichtenberger, L. M., Wang, Z. M., Romero, J. J., Ulloa, C, Perez, J. C, Giraud, M. N., Barreto, J. C. (1995). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associated with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID- induced gastrointestinal injury."

71. Luega, A., Mourelle, M., Guarner, F., Domingo, A., Salas, A., Malagelada, J. R. (1994). "Phosphatidylcholines as mediators of adaptive cytoprotection of the rat duodenum. *Gastroenterology*"
72. Ribeiro, A., "A importância dos canais de aquoporinas na hidratação da pele"
73. Roosterman, D., Goerge, T., et al "Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ" (2006)
74. Isaac, C., Ladeira, P., Rêgo, F., et al "Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica" São Paulo (2010)
75. Kolarsick, P., Kolarsick, M., "Anatomy and Physiology of the skin" Feature Article (2011)
76. Amaral, C., Benites, J., Correa, P., Bertoldi, C., "Tratamentos em estéticas: um levantamento teórico da microdermoabrasão e do peeling químico"
77. Holbrook, K., Odland, G. "The fine structure of the developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm" (1975)
78. McLefferty, E., et al, "The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin" (2012)
79. Sweetman, Sean C, "MARTINDALE: The complete drug reference." 36th ed. (2009)
80. Alfa Aesar® "Ficha de dados de segurança da Indometacina", Alemanha (2015)
81. ACOFARMA® "Ficha de dados de segurança da Capsaicina", Espanha (2009)
82. Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C, Matos, C, Reis, S., "Location and partition coefficients of antiinflammatory drugs in EPC liposomes. A fluorescence quenching study using n-(9-antroyloxy)-stearic probes" (2001)
83. Matos, C, Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C, Reis, S. "Zeta potential measurements as a tool to quantify the effect of charged drugs on the surface potential of egg phosphatidylcholine liposomes" (2004)
84. Luger, P., Daneck, K., Engel, W., Trummlitz, G., Wagner, K., "Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID." (1996)
85. McLaughlin, S. "Salicylates and phospholipid bilayer membranes." (1973)
86. Nagai, N., Yoshioka, C and Ito, Y, "Topical therapies for Rheumatoid Arthritis by gel ointments contains Indomethacin" (2015)
87. Duangjit, S., Chairat, W., et al " Development, Characterization and Skin Interaction of Capsaicin- Loaded Microemulsion-Based Nonionic Surfactant" (2016)
88. Tavano, L., Alfano, P. et al , "Niosomes vs microemulsions: New carriers for topical delivery of Capsaicin" (2011)

89. Teixeira, M., Menezes, L., Silva, V. et al, "Liposomal topical capsaicin in post-herpetic neuralgia: a safety pilot study" São Paulo (2014)
90. Ingólfsson, H. and Adersen, O., "Screening for small Molecules, Bilayer-Modifying" (2010)
91. Kapoor, B, Singh, S., Gulati, M et al. "Applications of Liposomes in treatment of rheumatoid arthritis." (2014)
92. Renata V. Contri , Tatiele Katzer , Adriana R. Pohlmann & Silvia S. Guterres "Chitosan Hydrogel Containing Capsaicinoids - Loaded Nanocapsules: An Innovative Formulation for Topical Delivery" (2010)
93. Sarwa, K., Pranab, J. and Mazumder, B., "A nanovesicle topical formulation" (2014)
94. Jitendriya Swain and Ashok Kumar Mishra "Location, Partitioning Behavior, and Interaction of Capsaicin with Lipid Bilayer Membrane: Study Using Its Intrinsic Fluorescence" (2015)
95. Agrawal, U. Gupta, M., Vyas, S., "Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles" (2013)
96. Yuan Zhu, Miaomiao Wang, Jiajia Zhang , Wei Peng, Caleb Kesse Firempong, et al "Improved oral bioavailability of capsaicin via liposomal nanoformulation: preparation, in vitro drug release and pharmacokinetics in rats" (2015)
97. Sugihara, H., Ymamoto, H., et al "effectiveness of submicronized chitosan-coated liposomes of indomethacin" (2012)
98. Raza, K., Singh, B, et al "Design and evaluation of flexible membrane vesicles for topical deliveryof capsaicin" (2011)
99. Petro, E., Páal, T, et al "Drug realese from semisolid dosage forms: a comparison of two testing methods" (2013)
100. Petro, E., Páal, T, et al "Drug realese from semisolid dosage forms: a comparison of two testing methods" (2013)
101. Leithy, E., Ibrahim, H. et al, " In vitro and in vivo evaluation of indomethacin nanoemulsion as transdermal delivery system" (2013)
102. Gamal M. El Maghraby, "Self-microemulsifying and microemulsion systems for transdermal delivery of indomethacin: Effect of phase transition" (2010)
103. Nagle, A., Goyal, A. et al, "Efficacy study of vesicular gel containig methotrexate and menthol combination on parakeratonic rat skin model" (2011)
104. Gamal, M., Mona, F, Osman, M., "Microemulsion for simultaneous transdermal delivery of benzocaine and indomethacin" (2013)

105. Raza, K., Shareef, M. et al “Lipid-based capsaicin-loaded nano-colloidal biocompativble topical carriers with enhanced analgesic potential and decreased dermal irritation” (2014)
106. Nagle, A., Goyal, A., Kesarla, R., and Murthy, R., “Efficacy study of vesicular gel containing methotrexate and menthol combination on parakeronic rat skin model” (2011)
107. Image Adapted from Bitounis, D., Fanciullino, R. et al, “Optimizing druggability through liposomal formulations” disponível em: “[https://www.dovepress.com/cr\\_data/article\\_fulltext/s68000/68861/img/IJN-68861-F01.jpg](https://www.dovepress.com/cr_data/article_fulltext/s68000/68861/img/IJN-68861-F01.jpg)” acedido a 01.Jul.2016
108. “Schematic, chemical and physcal structures of a phospholipid molecule”, disponível em: “<http://images.iop.org/objects/bio/news/1/5/9/Cicuta5Slide16.gif>”, visitado em 01.Jul.2016
109. “Classificação dos Lipossomas”, disponível em: “<http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2013/LC/c2lc41121k/c2lc41121k-f2.gif>”, visitado em 01.Jul.2016
110. “Método de Hidratação do filme lipídico”, disponível em: “[https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcThWiZXRh6Un4NRfuc2mlEBDIKU4Elam2cW06f8h-flX\\_5b9D5C](https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcThWiZXRh6Un4NRfuc2mlEBDIKU4Elam2cW06f8h-flX_5b9D5C)”, visitado em 01.Jul.2016
111. “Estrutura da Pele”, disponível em: [http://www.cosmeticinnovation.com.br/wp-content/uploads/2016/03/camadas\\_pele.jpg](http://www.cosmeticinnovation.com.br/wp-content/uploads/2016/03/camadas_pele.jpg), visitado em 2.Jul.2016
112. “Representação da ação das diferentes COX no organismo”, disponível em: [http://3.bp.blogspot.com/\\_DFpQPOfGmZ8/TTOSle6pTXI/AAAAAAAAAOg/I9FhF35Vh2c/s1600/acao\\_cox1\\_cox2.gif](http://3.bp.blogspot.com/_DFpQPOfGmZ8/TTOSle6pTXI/AAAAAAAAAOg/I9FhF35Vh2c/s1600/acao_cox1_cox2.gif), visitado em 03.Jul.2016
113. “Localização dos diferentes tipos de moléculas nos lipossomas”, disponível em: [https://www.google.pt/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjuiuy2pbOAhWCXRoKHdR9A6lQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fwww.wikilectures.eu%2Findex.php%2FLiposomes\\_as\\_drug\\_carriers&bvm=bv.128153897,d.d2s&psig=AFQjCNEAN4T7vqgLkYMDa0mc0OHhGN4wYg&ust=1469822694600059](https://www.google.pt/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjuiuy2pbOAhWCXRoKHdR9A6lQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fwww.wikilectures.eu%2Findex.php%2FLiposomes_as_drug_carriers&bvm=bv.128153897,d.d2s&psig=AFQjCNEAN4T7vqgLkYMDa0mc0OHhGN4wYg&ust=1469822694600059)
114. Doktorovova S, Souto EB. Nanostructured lipid carrier-based hidrogel formulations for drug delivery: A comprehensive review. Expert Opin Drug Deliv
115. Dowling TC, Arjomand M, Lin ET, Allen LV Jr, McPherson ML. Relative bioavailability of Ketoprofen 20% in a poloxamer-lecithin organogel. Am J Health Syst Pharm

116. Duan Y, Cai X, Du H, Zhai G. Novel in situ gel systems based on P123/TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*
117. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*
118. Dumortier G, Grossiord JL, Zuber M, Couarraze G, Chaumeil JC. Rheological study of a thermoreversible morphine gel. *Drug Dev Ind Pharm*
119. Durrani AM, Davies NM, Thomas M, Kellaway IW. Pilocarpine bioavailability from a mucoadhesive liposomal ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm*
120. Edsman K, Carlfors J, Petersson R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci*
121. El-Bagory IM, Bayomi MA, Mahrous GM, Alanazi FK, Alsarra IA. Effect of Gamma Irradiation on Pluronic Gels for Ocular Delivery of Ciprofloxacin: In Vitro Evaluation. *Aust J of Basic Appl Sci*
122. El-Kamel AH. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *Int J Pharm*
123. Escobar-Chavez JJ, Lopez-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*
124. Erukova VY, Krylova OO, Antonenko YN, Melik-Nubarov NS. Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. *Biochim Biophys Acta*.
125. Fang JY, Leu, YL, Wang YY, Tsai YH. In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model. *Eur J Pharm Sci*
126. Figueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Souto EB. Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. *Colloids Surf B: Biointerfaces*
127. Figueiro JF, Andreani T, Fernandes L, Garcia ML, Egea MA, Silva AM, et al. Physicochemical characterization of epigallocatechin gallate lipid nanoparticles (EGCG-LNs) for ocular instillation. *Colloids Surf B: Biointerfaces*
128. Figueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Silva AM, et al. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. *Int J Pharm*
129. Farmacopeia Portuguesa, 9.0 ed. Lisboa: Infarmed - Ministerio da Saude; 2009.

130. Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance, assessment and evaluation of precorneal retention. *Int J Pharm*
131. Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of Paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release*
132. Feng Y, Gordts SC, Chen F, Hu Y, Craeyveld EV, Jacobs F, et al. Topical HDL administration reduces vein graft atherosclerosis in apo E deficient mice. *Atherosclerosis*.
133. Finch PM, Knudsen L, Drummond PD. Reduction of allodynia in patients with complex regional pain syndrome: A double-blind placebo-controlled trial of topical Ketamine. *Pain*
134. Finke JH, Schmolke H, Klages CP, Müller-Goymann CC. Controlling solid lipid nanoparticle adhesion by polyelectrolyte multilayer surface modifications. *Int J Pharm*
135. Fitzgerald RR, Walters JD. Accumulation of topical naproxen by cultures oral epithelium. *J Dent Res*
136. Fresta M, Panico AM, Bucolo C, Giannavola C, Puglisi G. Characterization and in-vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir. *J Pharm Pharmacol* 1999
137. Gallarate M, Chirio D, Bussano R, Peira E, Battaglia L, Baratta F, et al. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. *Int J Pharm*
138. Gan L, Han S, Shen J, Zhu J, Zhu C, Zhang X, et al. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving precorneal retention and ocular bioavailability. *Int J Pharm* 2010
139. Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*
140. Gaudana R, Jwala J, Baddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res*
141. Geethalakshmia A, Karkib R, Sagib P, Jhac SK, Venkatesh DP. Temperature Triggered In situ Gelling System for Betaxolol in Glaucoma. *J App Pharm Sci* 2013
142. Genta I, Conti B, Perugini P, Pavanetto F, Spadaro A, Puglisi G. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *J Pharm Pharmacol*

143. Gil ES, Hudson SM. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci*
144. Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli MA, Puglisi G, et al. Influence of preparation conditions on acyclovir loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res* 2003
145. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC, Palin KJ. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *J Control Deliv*
146. Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van Oproy S, Marzin D, et al. Evaluation of modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicol In Vitro*
147. Giordano J, Daleo C, Sacks SM. Topical ondansetron attenuates nociceptive and inflammatory effects of intradermal capsaicin in humans. *Eur J Pharmacol*
148. Glisson JK, Wood RL, Kyle PB, Cleary JD. Bioavailability of promethazine in a topical pluronic lecithin organogel: A pilot study. *Int J Pharma Comp*
149. Gokce EH, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Guneri T, et al. Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int J Pharm*
150. Gong C, Shi S, Dong P, Kan B, Gou M, Wang X, et al. Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *Int J Pharm*
151. Gonjari ID, Karmarkar AB, Kasture PV. In vitro evaluation of different transnasal formulations of sumatriptan succinate: A comparative analysis. *Drug Discov Ther*
152. Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids Surf B Biointerfaces*
153. Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Calpena AC, Egea MA, Souto EB, Souto MI. Improved and safe transcorneal delivery of flurbiprofen by NLC and NLC based hydrogels. *J Pharm Sci*
154. Grace D, Rogers J, Skeith K, Anderson K. Topical diclofenac versus placebo: a double blind, randomised clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee. *J Rheumat* 1999
155. Grainger ST, El-Sayed MEH. Stimuli-Sensitive Particles for Drug Delivery. In: Jabbari E, Khademhosseini A (editors). *Biologically-responsive Hybrid Biomaterials: A Reference for Material Scientists and Bioengineers*. 1th ed. Danvers: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.



156. Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmento VH, Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*
157. Gratieri T, Gelfuso GM, de Freitas O, Rocha EM, Lopez RF. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *Eur J Pharm Biopharm*
158. Greaves JL, Olejnik O, Wilson CG. Polymers and the precorneal tear film. *STP Pharma Sci*
159. Gupta H, Aquil M, Khar RK, Bhatnagar A, Mittal G. An alternative in situ gel-formulation of levofloxacin eye drops for prolong ocular retention. *J Pharm Bioallied Sci*
160. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Nanoparticles laden in situ gel of levofloxacin for enhanced ocular retention. *Drug Deliv*
161. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Nanoparticles laden in situ gel for sustained ocular drug delivery. *J Pharm Bioallied Sci*
162. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine*
163. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *J Drug Target*
164. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G, et al. Development and characterization of Tc-99m timolol maleate for evaluating efficacy of in situ ocular drug delivery system. *AAPS Pharm Sci Tech*
165. Gupta H, Jain S, Mathur R, Mishra P, Mishra AK, Velpandian T. Sustained Ocular Drug Delivery from a Temperature and pH Triggered Novel In-situ Gel System. *Drug Deliv*
166. Gupta H, Sharma A, Shrivastava B. Pluronic and Chitosan based In situ gel system for periodontal application. *Asian J Pharm*
167. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*
168. Gupta S, Samanta MK, Raichur AM. Dual-Drug Delivery System Based on In-Situ Gel-Forming Nanosuspension of Forskolin to Enhance Antiglaucoma Efficacy. *AAPS PharmSciTech*
169. Gupta S, Vyas SP. Carbopol/chitosan based pH triggered in situ gelling system for ocular delivery of timolol maleate. *Sci Pharm*
170. Gupta VD. Chemical Stability of Hydrocortisone in an Oral Liquid Dosage Form without Suspending Agents. *Int J Pharm Compound*.

171. Gurny R. Preliminary study of prolonged acting drug delivery systems for the treatment of glaucoma. *Pharm Acta Helv*
172. Gurny R, Boye T, Ibrahim H. Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery. *J Control Release* 1985
173. Hao J, Wang X, Bi Y, Teng Y, Wang J, Li F, et al. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*
174. Harris DC. *Análise química quantitativa*. 8th ed. Nova Iorque: LTC;
175. Hartmann V, Keipert S. Physico-chemical, in vitro and in vivo characterization of polymers for ocular use. *Pharmazie* 2000
176. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed*