

JÉSSICA MARGARIDA SOUSA CASTELO

**OTIMIZAÇÃO DE TRANSFEROSSOMAS PARA
VEICULAR O IBUPROFENO DE SÓDIO**

Orientador: Prof.^a Doutora Catarina Pereira Leite

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2022

JÉSSICA MARGARIDA SOUSA CASTELO

**OTIMIZAÇÃO DE TRANSFEROSSOMAS PARA
VEICULAR O IBUPROFENO DE SÓDIO**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 27 de junho de 2022, perante o Júri, nomeado pelo Despacho nº139/2022, de 4 de abril, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^a. Doutora Catarina Fialho Rosado

Orientador:

Prof^a. Doutora Maria Catarina Leite

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2022

Agradecimentos

Primeiramente, queria agradecer à Professora Doutora Catarina Pereira Leite, por todo o apoio e disponibilidade na realização deste trabalho. Obrigada por todo o tempo que dedicou ao desenvolvimento deste projeto.

Queria também agradecer a toda a minha família, em especial à minha mãe e à minha irmã, pelas oportunidades que me proporcionaram, e por toda a motivação e apoio que me deram ao longo destes 5 anos.

Um especial agradecimento ao meu avô, pela inspiração e coragem que me transmitiram ao longo de todo o percurso académico.

Não podia deixar de agradecer ao meu namorado, pela ajuda, paciência e incentivo durante a realização deste trabalho.

Por fim, queria também agradecer a todos os meus amigos e aos “Os 5 Magníficos”, por todos os momentos e pela ajuda que me deram, tornando este percurso mais fácil.

Resumo

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são um grupo de fármacos largamente utilizado pela população, especialmente para o tratamento de dores musculares, enxaquecas e reumatismo. Atualmente em Portugal, o ibuprofeno é dos AINEs mais utilizados pela sua eficácia no alívio de dores ligeiras a moderadas. Uma vez que é um medicamento de venda livre, é muitas vezes utilizado em automedicação, levando a uma maior incidência de reações adversas associadas à sua toma recorrente. De forma a solucionar este problema, têm-se recorrido cada vez mais à utilização da nanotecnologia para promover o transporte de fármacos através da pele. Apesar da administração de formulações transdérmicas apresentar várias vantagens, a sua grande limitação continua a ser a dificuldade de permeação cutânea dos fármacos, que pode ser melhorada pelo recurso a nanossistemas vesiculares, como os transferossomas.

Assim, esta dissertação centrou-se na otimização de uma formulação transferossomal contendo ibuprofeno de sódio com vista a uma administração transcutânea.

O desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BBD) permitiu avaliar o impacto da concentração lipídica, razão entre ativadores de superfície e concentração de ibuprofeno de sódio no tamanho, índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC) dos transferossomas. O BBD mostrou ser essencial para a otimização da formulação, permitindo realizar um menor número de ensaios experimentais, reduzindo assim os custos de produção. A formulação otimizada apresentou resultados promissores: com um tamanho de 142 ± 13 nm; $0,22 \pm 0,03$ de PDI; $27 \pm 4\%$ de EE e $0,8 \pm 0,1$ de LC, como previsto pelo BBD. Esta formulação transferossomal apresenta uma EE melhorada e um tamanho adequado à administração transcutânea, sendo um avanço em relação a trabalhos anteriores.

Para além disto, os estudos de estabilidade demonstraram que a formulação otimizada é estável até pelo menos 1 mês, verificando-se apenas uma ligeira redução do EE e LC ao fim de 60 dias. Assim sendo, este projeto constitui mais um passo no desenvolvimento de formulações transferossomais com propriedades anti-inflamatórias para administração transcutânea.

Palavras-chave: anti-inflamatórios não esteroides, desenho fatorial do tipo Box-Behnken, transferossomas, ibuprofeno de sódio.

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of drugs widely used, especially for the treatment of muscle pain, migraine, and rheumatism. Currently in Portugal, ibuprofen is one of the most widely used NSAIDs for its efficacy in relieving mild to moderate pain. Since it is an over-the-counter drug, it is often used in self-medication, leading to a higher incidence of adverse effects associated with its recurrent use. In order to solve this problem, nanotechnology has been increasingly used to promote drug transport through the skin. Although the administration of transdermal formulations has several advantages, its major limitation is still the difficulty of skin permeation of drugs, which can be improved using vesicular nanosystems, such as transfersomes.

Thus, this dissertation was focused on the optimization of a transfersomal formulation containing sodium ibuprofen for transcutaneous administration.

Box-Behnken factorial design (BBD) allowed us to evaluate the impact of lipid concentration, edge activators ratio, and ibuprofen sodium concentration on the size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency (EE), and loading capacity (LC) of the transfersomes. BBD proved to be essential for the formulation optimization, allowing a smaller number of experimental runs to be performed, thus reducing production costs. The optimized formulation showed promising results: with a size of 142 ± 13 nm; 0.22 ± 0.03 of PDI; 27 ± 4 % of EE, and 0.8 ± 0.1 % of LC, as predicted by BBD. This transfersomal formulation exhibits an improved EE and a size suitable for transcutaneous administration and is an advance over previous works.

Furthermore, stability studies have shown that the optimized formulation is stable up to at least 1 month, with only a slight reduction in EE and LC after 60 days. Therefore, this project constitutes a further step in the development of transfersomal formulations with anti-inflammatory properties for transcutaneous administration.

Keywords: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, Box-Behnken factorial design, transfersomes, sodium ibuprofen.

Abreviaturas e Símbolos

AA	Ácido Araquidónico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
AS	Ativadores de superfície
COX	Cicloxigenase
Coxibs	Anti-inflamatórios seletivos da COX-2
EE	Eficiência de Encapsulação
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GI	Gastrointestinal
HLB	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
IBU	Ibuprofeno de sódio
LC	Capacidade de Carga
LUV	Vesículas unilamelares grandes
LogP	Coefficiente de partilha
MLVs	Vesículas multilamelares
OF	Formulação otimizada
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PC	Lecitina de Soja
PDI	Índice de polidispersão
PGI₂	Prostaciclina
pKa	Constante de dissociação ácida
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
Tx	Tromboxanos

Índice

A. Introdução	1
1. Anti-inflamatórios não esteroides.....	2
1.1 Mecanismo de Ação	2
1.2 Reações adversas.....	3
1.3 Ibuprofeno	6
2. Pele	8
2.1 Administração cutânea	11
3. Abordagens nanotecnológicas para administração transdérmica	14
3.1 Lipossomas.....	15
3.2 Niossomas	18
3.3 Etossomas.....	20
3.4 Transferossomas.....	21
4. Motivação e objetivos.....	23
 B. Materiais e Métodos	 25
5. Materiais	26
6. Curva de Calibração	26
7. Preparação dos transferossomas	27
8. Caracterização dos transferossomas	27
9. Otimização dos Transferossomas	28
10. Ensaio de estabilidade	29
 C. Resultados e Discussão	 30
11. Ensaio Preliminares.....	31
12. Otimização dos transferossomas.....	34
13. Avaliação da estabilidade	39
 D. Conclusão	 41
 E. Referências	 43

Índice de Tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do ibuprofeno.	7
Tabela 2. Fatores modeladores de permeação na pele.....	13
Tabela 3. Concentração das soluções padrão de ibuprofeno	26
Tabela 4. Variáveis consideradas no desenho fatorial do tipo Box-Behnken, com os níveis e critérios de desejabilidade estabelecidos.....	29
Tabela 5. Propriedades físico-químicas de várias formulações transferossomais produzidas com lecitina de soja (PC), várias composições de ativadores de superfície (Tween [®] 80/Span [®] 80, T80/S80) e ibuprofeno de sódio (IBU).	32
Tabela 6. Composição das formulações transferossomais produzidas de acordo com as variáveis independentes pré-selecionadas e respectivas respostas obtidas.	34
Tabela 7. Níveis ótimos dos fatores para o desenvolvimento da formulação otimizada e respectivos valores teóricos e experimentais obtidos quanto às respostas analisadas.	36

Índice de Figuras

Figura 1. Inibição da cicloxigenase nas plaquetas e endométrio	5
Figura 2. Estrutura química do Ibuprofeno.	7
Figura 3. Camadas da pele.....	8
Figura 4. Camadas da epiderme	9
Figura 5. Possíveis mecanismos de permeação cutânea.....	11
Figura 6. Tipos de sistemas vesiculares	15
Figura 7. Representação de um lipossoma	16
Figura 8. Estrutura dos vários tipos de lipossomas.	16
Figura 9. Estrutura de um niossoma	18
Figura 10. Possíveis mecanismos de permeação dos niossomas na pele	19
Figura 11. Constituição dos etossomas	20
Figura 12. Constituição dos transferossomas	22
Figura 13. Curva de calibração do ibuprofeno de sódio a 222 nm.....	31
Figura 14. Gráficos de superfície de resposta: (A) Efeito da concentração de lípido e razão Tween [®] 80/Span [®] 80 no tamanho dos transferossomas; (B) Efeito da concentração de lípido e concentração de ibuprofeno de sódio no PDI. (C) Efeito da concentração de lípido e razão Tween [®] 80/Span [®] 80 na EE dos transferossomas; (D) Efeito da concentração de lípido e razão Tween [®] 80/Span [®] 80 na LC dos transferossomas.	35
Figura 15. Espectros de FTIR das três réplicas da formulação otimizada (OF1-OF3) e dos componentes individuais utilizados na preparação dos transferossomas, nomeadamente ibuprofeno, lecitina de soja (PC), Tween [®] 80 e Span [®] 80.	38
Figura 16. Avaliação da estabilidade do tamanho da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.	39
Figura 17. Avaliação da estabilidade do índice de polidispersão (PDI) da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.	39
Figura 18. Avaliação da estabilidade da capacidade de carga (LC) da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.	40

Figura 19. Avaliação da estabilidade da eficiência de encapsulação (EE) da formulação tranferossomal otimizada ao longo de 2 meses.	40
---	----

A. Introdução

1. Anti-inflamatórios não esteroides

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) têm uma ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética, sendo frequentemente utilizados para o tratamento de dores musculares, enxaquecas e reumatismo (Osafo et al., 2017). Esta classe de fármacos pode ser classificada de acordo com a sua seletividade para o alvo terapêutico, sendo classificados como não seletivos e seletivos para COX-2, ou de acordo com a sua estrutura química, podendo diferenciar-se em salicilatos acetilados, salicilatos não acetilados, ácidos propiónicos, ácidos acéticos, ácidos enólicos, ácidos antranílicos e inibidores seletivos de COX-2. (Vonkeman & van de Laar, 2010; Asirvatham et al., 2019)

A descoberta do primeiro AINE deu-se em 1897 com a descoberta do ácido acetilsalicílico (AAS) (Montinari et al., 2019), mas não foi até à década de 1970 que se começou a perceber melhor o seu mecanismo de ação e se descobriu a relação entre a produção de prostaglandinas e a ação de fármacos semelhantes ao AAS. No início de 1900, o ácido acetilsalicílico foi reconhecido como tendo um efeito anti-inflamatório, antipirético e analgésico. (Burian & Geisslinger, 2005) Anos mais tarde, outros fármacos que tinham uma ação terapêutica semelhante, como o ibuprofeno e naproxeno, e que não tinham ação semelhante aos glicocorticoides, ficaram conhecidos como a classe anti-inflamatórios não esteroides. Apesar dos efeitos benéficos demonstrados dos AINEs, também se verificaram várias reações adversas, como problemas renais, cardiovasculares e gástricos, sendo este último o mais recorrente com o uso crónico de AINEs não seletivos (Osafo et al., 2017). Por outro lado, a cardiotoxicidade é frequentemente relatada pela utilização de inibidores seletivos da COX-2 (Arora et al., 2020).

1.1 Mecanismo de Ação

Os anti-inflamatórios não esteroides têm a capacidade de reduzir a perceção e transmissão de estímulos que causam dor (efeito antinociceptivo), devido ao seu efeito inibitório ao nível da enzima ciclooxigenase (COX) envolvida na formação de prostaglandinas. As prostaglandinas são fortes mediadores hiperalgésicos, tendo a capacidade de causar uma resposta aumentada a um estímulo doloroso, aumentando assim a transdução e a transmissão da informação nociceptiva. A inibição das COX vai levar a uma consequente inibição da biossíntese de prostaglandinas em locais centrais e

periféricos, havendo uma normalização do aumento do limiar de dor associado à inflamação (Burian & Geisslinger, 2005).

O ácido araquidónico (AA) é um ácido gordo polinsaturado presente nos fosfolípidos nas membranas celulares, sendo mais abundante no músculo esquelético, fígado, cérebro e baço. A enzima fosfolipase A2 (FA₂) é responsável pela hidrólise dos fosfolípidos presentes nas membranas celulares, formando o AA que vai servir de substrato à enzima COX e lipoxigenase (LOX). Se o AA for metabolizado pela COX vai dar origem a prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TX). Por outro lado, se for metabolizado pela via da lipoxigenase são sintetizados os leucotrienos (Hanna & Hafez, 2018).

A enzima COX, responsável pela catalisação do ácido araquidónico em tromboxano e prostaglandinas, apresenta duas isoformas, a isoforma constitutiva (COX-1) e a isoforma indutível (COX-2) (Qureshi & Dua, 2021) (Ghlichloo & Gerriets, 2021). A COX-1 está envolvida na regularização da agregação plaquetária, na função renal e na proteção da mucosa gástrica, através da inibição da secreção ácida e da estimulação da produção de muco e bicarbonato, aumentando o fluxo sanguíneo e estimulando a proliferação epitelial da mucosa (Qureshi & Dua, 2021) (Sostres et al., 2010).

A COX-2 está sobre-expressa durante os estados inflamatórios, sendo sintetizada pelas células envolvidas neste processo, como macrófagos e monócitos, e encontra-se presente no cérebro, ossos, rins e aparelho reprodutor feminino (Ghlichloo & Gerriets, 2021); Day & Graham, 2004). Os AINEs tradicionais inibem ambas as isoformas, enquanto os AINEs seletivos, também conhecidos por coxibs, inibem a COX-2 (Sostres et al., 2010).

1.2 Reações adversas

Apesar de todos os benefícios demonstrado pelos AINEs, a sua utilização é limitada pelos seus efeitos adversos, tendo sido descrita toxicidade gastrointestinal (GI), cardiovascular, renal e hepática (Vonkeman & van de Laar, 2010).

- Gastrointestinais

A utilização dos anti-inflamatórios não esteroides está relacionada com a ocorrência de lesões tóxicas da mucosa GI, devido essencialmente à redução de prostaglandinas produzidas pela COX-1. As lesões tóxicas provocadas na mucosa GI podem também dever-se às propriedades ácidas dos AINEs. Estes ácidos fracos encontram-se na sua forma não ionizada no lúmen estomacal, o que proporciona a migração para as células epiteliais de superfície, onde ocorre a dissociação dos AINEs, libertando iões de hidrogénio que podem provocar a lesão na mucosa.

A probabilidade de ocorrerem problemas gastrointestinais vai depender da presença de fatores de risco, como idade, o uso prolongado de AINEs e a existência previa de úlcera péptica, sendo este o mais decisivo (Sostres et al., 2010). A toxicidade GI é a mais reportada pelos utilizadores de AINEs e pode apresentar 3 fases diferentes. O primeiro e mais comum, que ocorre em 15 a 40% dos utilizadores, é o aparecimento de azia, dor abdominal, dispepsia, náuseas e vómitos. O segundo estado é o surgimento de lesões na mucosa, que surgem em 5 a 20% dos utilizadores. O terceiro, e mais grave, são as complicações potencialmente fatais, como as úlceras e perfurações, que ocorrem em 1 a 2% dos utilizadores recorrentes, e apresenta uma mortalidade de 10 a 15% (Vonkeman & van de Laar, 2010).

- Renais

A utilização prolongada dos anti-inflamatórios não esteroides pode levar à nefrotoxicidade, principalmente em doentes idosos. Em pacientes com função renal normal, a inibição das prostaglandinas não tem muito impacto na função hemodinâmica do rim. No entanto, em pacientes com disfunção renal, a redução das prostaglandinas é mais prejudicial. A inibição da síntese de prostaglandinas, provocada por AINEs seletivos e não seletivos, pode causar distúrbios hídricos e eletrolíticos, disfunção renal aguda, necrose papilar renal e nefrite intersticial (Whelton, 1999).

- Cardiovasculares

A cardiotoxicidade (insuficiência cardíaca, enfarte do miocárdio e hipertensão) resulta de um desequilíbrio entre a produção de prostaciclina e tromboxano provocado pela utilização dos coxibs. Devido à elevada probabilidade de ocorrência de problemas cardiovasculares, a toma de inibidores seletivos da COX-2 deve ser feita na menor dose eficaz possível e durante pouco tempo. Para as pessoas que têm alto risco cardiovascular

que necessitem de tomar AINEs, deve ser usado preferencial o naproxeno, uma vez que é o que apresenta menos toxicidade cardiovascular, em associação com um inibidor da bomba de prótons (Meek et al., 2010).

Os inibidores da COX-2 mostraram algumas vantagens relativamente aos inibidores de COX-1, como a diminuição do risco de úlceras gástricas, no entanto foram registados um maior número de insuficiência cardíaca e hipertensão (Meek et al., 2010). A cardiotoxicidade resulta de um desequilíbrio entre a produção de prostaciclina e tromboxano provocado pelos inibidores seletivos da COX-2. Os AINES não seletivos bloqueiam tanto a produção de TXA_2 como de PGI_2 , mantendo o equilíbrio hemostático, enquanto a COX-2 interfere apenas na produção de prostaciclina (Figura1). Este desequilíbrio leva a uma ativação excessiva do tromboxano que leva a um estado pró-trombótico e resulta em cardiotoxicidade. (Arora et al., 2020; Curtis et al., 2019).

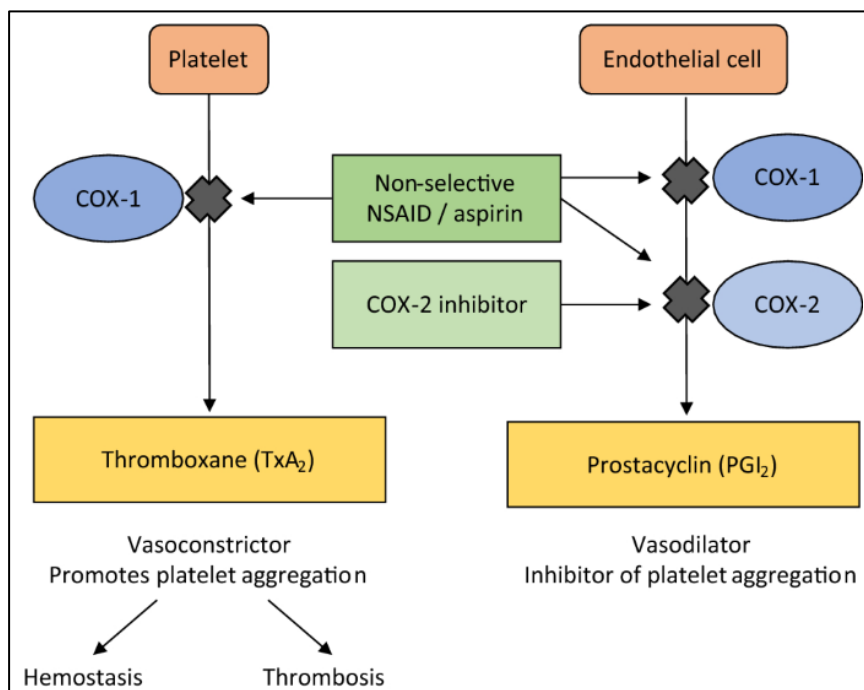


Figura 1. Inibição da cicloxigenase nas plaquetas e endométrio. Retirado de (Curtis et al., 2019).

1.3 Ibuprofeno

O ibuprofeno foi registado em 1961 por Stewart Adams e Dr. Nicholson como ácido 2- (4-isobutilfenil) propiónico, sendo mais tarde conhecido como ibuprofeno e comercializado como Brufen. Esta descoberta deu-se quando Stewart Adams procurava um fármaco para o alívio da dor em artrite reumatoide melhor e mais tolerável que a aspirina, mas que não fosse um esteroide. Nos ensaios clínicos comprovou ser eficaz no alívio de dor da artrite reumatoide com boa tolerância gástrica, quando comparado com outros compostos, e mais tarde por mostrar a eficácia e a segurança do composto (Halford et al., 2012). Em 1969 o ibuprofeno passou a ser vendido em forma de comprimido, apenas com prescrição médica, e em 1983 passou a ser um medicamento de venda livre no Reino Unido (Patel et al., 2013). Atualmente, em Portugal o ibuprofeno é o AINEs mais utilizado, seguindo o diclofenac e a nimesulida. Um estudo realizado em 2016, sobre as 50 principais substâncias ativas vendidas em Portugal, mostrou que o ibuprofeno ficou em nono lugar da lista, sendo que este é um medicamento de venda livre numa dosagem mais baixa (Monteiro et al., 2017).

Em 1998 o ibuprofeno teve 5,7 milhões de prescrições, sendo o segundo AINE mais prescrito no Reino Unido, a seguir ao diclofenac, e o mais prescrito na Inglaterra, Irlanda do Norte e Escócia (Jones, 2001). Ao longo dos anos, o ibuprofeno tem sido principalmente utilizado para o alívio de dores leves a moderadas, como dores de cabeça, dores de dentes, dores musculares, cólicas menstruais e redução de febre, assim como dores de origem inflamatória derivadas de doenças crónicas como a arterite reumatoide. No entanto, novos estudos têm mostrado vantagens na sua utilização na doença de Parkinson, e no encerramento do canal arterial em bebés prematuros, em substituição da indometacina (Halford et al., 2012).

O ibuprofeno é solúvel em álcool e na maioria dos solventes orgânicos, mas apresenta uma solubilidade de 25 mg/L (25°C) em água, tornando-o praticamente insolúvel neste meio. Este composto é um derivado do ácido carboxílico (Figura 2), e apresenta uma baixa solubilidade no estômago devido ao seu pK_a elevado (4.4-5.2) (Tabela 1). Na administração por via oral, mais de 60% de quantidade administrada é excretada em 24 h através da urina, sofrendo um elevado efeito de primeira passagem (Patel et al., 2013).

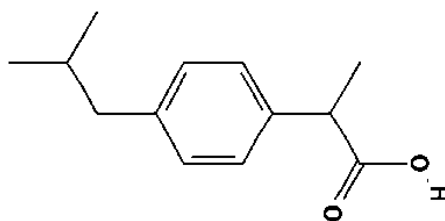


Figura 2. Estrutura química do Ibuprofeno. Retirado de (Patel et al., 2013).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do ibuprofeno. Adaptado de (Patel et al., 2013)

Fórmula Molecular	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Peso Molecular	206.28 g/mol
LogP	3.97
pKa	4.91- 5.2
Solubilidade em água	21 mg/L (25 °C)

Em relação às formas farmacêuticas existentes, atualmente existe uma grande variedade de apresentações do ibuprofeno, como comprimidos, granulados, suspensões orais, cápsulas, supositórios, soluções parentéricas, emplastos e gel.

A administração oral deste fármaco continua a ser a mais comum, no entanto devido às graves reações adversas referidas anteriormente, a administração por via cutânea tem sido cada vez mais explorada. A eficácia terapêutica de um fármaco utilizado para aplicação cutânea depende da sua forte atividade farmacológica e capacidade de penetração. Em comparação com outros AINEs, como o diclofenac, apesar do ibuprofeno mostrar ser menos potente, apresenta uma capacidade de penetração cutânea maior, sendo um bom candidato para formulações transcutâneas (Hadgraft & Valenta, 2000).

2. Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e desempenha várias funções, sendo considerado a primeira linha de defesa contra fatores externos. Tem também um papel importante na regulação da temperatura corporal e na perda excessiva de água, graças à sua barreira lipídica. A pele é composta por três principais camadas: a hipoderme, a derme e a epiderme (Figura 3) (Boer et al., 2016); Yousef et al., 2021).

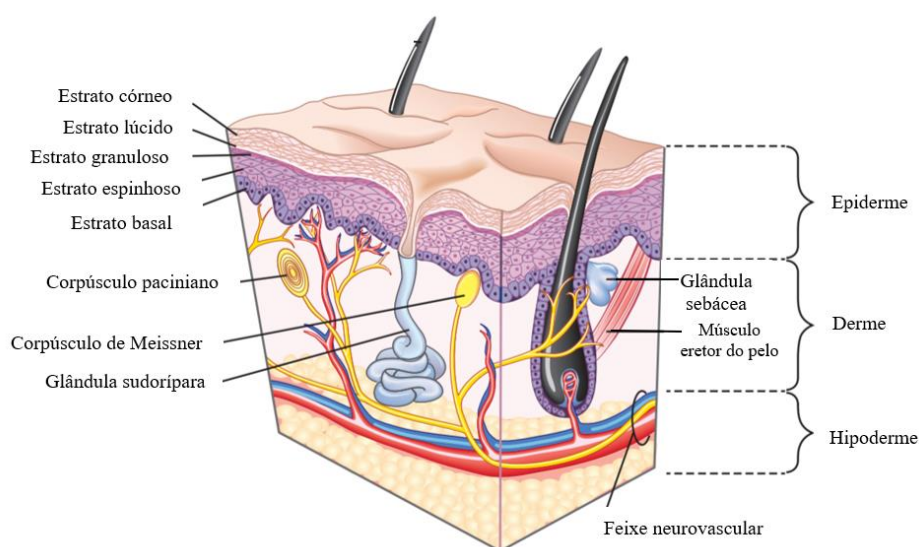


Figura 3. Camadas da pele. Adaptado de (Campbell & Lichtensteiger, 2003).

A hipoderme é o tecido subcutâneo mais interno e é composta por tecido adiposo e conjuntivo. No tecido adiposo encontram-se os adipócitos, que são responsáveis pelo armazenamento de energia, uma vez que armazenam uma grande parte dos lípidos existentes no corpo. Por esta razão, a hipoderme oferece também proteção mecânica e isolamento térmico (Baroni et al., 2012).

A derme é uma camada altamente vascularizada, composta com fibras elásticas, colagénio, e vários tipos de células como os fibroblastos e os macrófagos. Os fibroblastos são responsáveis pela renovação da matriz extracelular, enquanto os macrófagos estão encarregues de eliminar partículas externas e tecido danificado. É nesta camada de tecido

conjuntivo fibroso que se encontram os folículos capilares, as glândulas sudoríparas e as glândulas sebáceas (Baroni et al., 2012; Schoellhammer et al., 2014).

A epiderme apresenta uma camada estratificada de epitélio escamoso, possuindo vários tipos de células, como os melanócitos, as células de Langerhans, as células de Merkel, as células dendríticas e os queratinócitos, sendo que estes últimos representam a maior percentagem (80%). Esta camada externa da pele encontra-se em constante divisão celular, sendo possível observar a sua subdivisão em várias camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, a camada lúcida e camada córnea (Figura 4) (J Kolarsick & Ann Kolarsick, 2009; Campbell & Lichtensteiger, 2003).

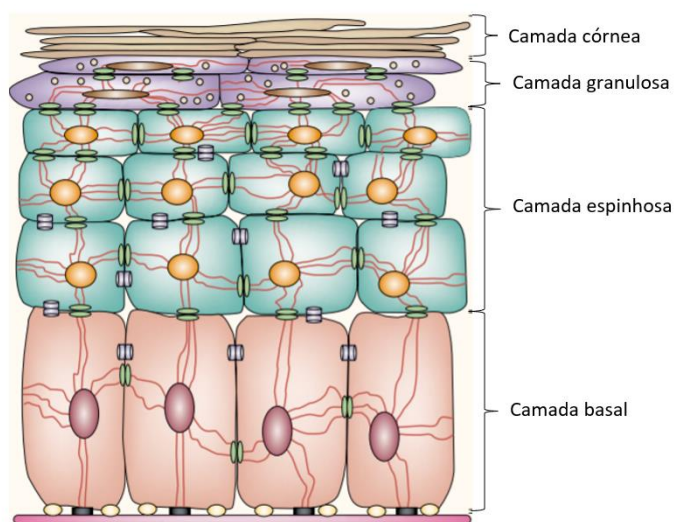


Figura 4. Camadas da epiderme. Adaptado de (Fuchs & Raghavan, 2002).

A camada basal (camada mais profunda da epiderme), encontra-se em constante renovação. Apenas 15% destas células estão em constante proliferação enquanto as restantes se encontram em repouso, intervindo apenas quando existe necessidade de um aumento da renovação celular, como no caso de feridas. As células basais vão dar origem aos queratinócitos (responsáveis pela produção de lípidos e proteínas estruturais), responsáveis pela formação das restantes camadas da epiderme (Baroni et al., 2012).

O estrato espinhoso, ou camada espinhosa, encontra-se acima da camada basal com uma espessura de 5-10 camadas de células. O nome surgiu devido à ligação das células por desmossomas, que vistos ao microscópio têm uma aparência espinhosa (Barbieri et al., 2014; Yousef et al., 2021). Os queratinócitos tornam-se progressivamente mais planos à medida que migram em direção ao estrato córneo. A existência de grânulos

lamelares também é essencial para fortalecer as ligações entre os corneócitos presentes no estrato córneo (Campbell & Lichtensteiger, 2003).

O estrato granuloso encontra-se abaixo do estrato córneo e é a camada mais superficial da epiderme que contém células vivas. O número de camadas vai variar conforme a espessura da camada córnea que se encontra em diferentes zonas do corpo. Por exemplo, nas zonas com pouca camada córnea, a camada granular pode ter entre 1-3 camadas de espessura, enquanto que em zonas como a palma das mãos ou sola dos pés, já se pode encontrar uma camada granular com 10 camadas de espessura (J Kolarsick & Ann Kolarsick, 2009). Nesta camada, os corneócitos estão na fase de maturação, onde ocorre a apoptose do núcleo e outros organelos, seguindo-se o processo de queratinização e migração para a superfície, formando o estrato córneo (Barbieri et al., 2014). Os queratinócitos que se encontram nesta camada, têm uma forma mais plana e irregular que os da camada espinhosa, e contêm grandes quantidades de grânulos de querato-hialina e grânulos lamelares. Os grânulos de querato-hialina são precursores da queratina, enquanto os grânulos lamelares libertam glicolípidos essenciais para a formação de uma barreira impermeável à água (Yousef et al., 2021).

O estrato lúcido tem entre 2-3 camadas e só é visível na pele mais grossa como a palma das mãos e a planta dos pés. É constituído por queratinócitos achatados e eleidina, uma proteína derivada da querato-hialina rica em lípidos, que dá uma cor transparente a esta camada (Yousef et al., 2021).

O estrato córneo, ou camada córnea, é constituído por 18-20 camadas de corneócitos densamente compactados e lípidos intercelulares, que formam a principal barreira física da pele. (Menon et al., 2012). Os corneócitos são células anucleadas que sofreram queratinização e encontram-se rodeados de lípidos (ceramidas (50%), colesterol (25%) e ácidos gordos livres), sendo o estrato córneo frequentemente descrito pela teoria dos tijolos (corneócitos) rodeados por cimento (matriz lipídica) (Pouillot et al., 2008; Schoellhammer et al., 2014).

2.1 Administração cutânea

Como referido anteriormente, uma das principais funções da pele é a proteção do corpo contra agressões externas. Embora esta proteção seja fundamental, o interesse em estudar novas formas para aumentar a permeação de compostos ativos tem vindo a crescer, principalmente na área cosmética e farmacêutica (Pouillot et al., 2008).

A permeação de produtos cosméticos ou fármacos pode ocorrer por três vias: a via transcelular, a via intercelular ou através dos apêndices cutâneos (Figura 5) (Antonio et al., 2014). Na via transcelular, as moléculas passam através dos corneócitos e da matriz lipídica, tornando este processo longo e complicado, uma vez que requer a passagem por dois locais com diferentes afinidades para as substâncias. A via intercelular é um trajeto mais simples, onde as moléculas contornam as células, circulando através dos lípidos, que constituem 1-5% do estrato córneo. A passagem de compostos através dos apêndices (glândulas sudoríparas, sebáceas ou folículos pilosos) mostrou ser uma via de penetração significativa para algumas substâncias, no entanto, não é considerada a via principal por representar uma área pequena, os folículos capilares ocupam apenas 1-2% da superfície cutânea (Alkilani et al., 2015; Pouillot et al., 2008).

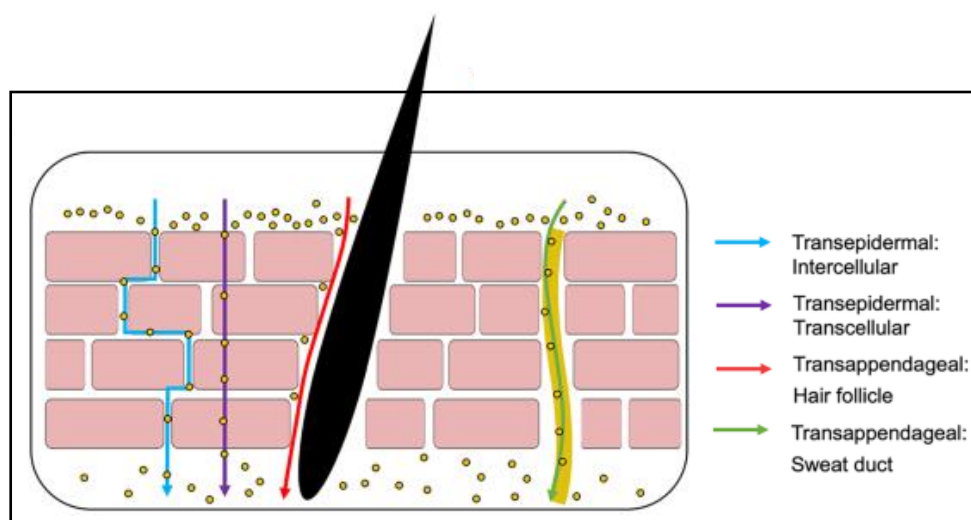


Figura 5. Possíveis mecanismos de permeação cutânea. Adaptado de (Ramadon et al., 2021).

O estrato córneo é a primeira e umas das principais barreiras à penetração de fármacos na pele. A sua constituição e estrutura organizada impede a penetração passiva

da maioria dos compostos (Benbow & Campbell, 2019). Ao longo dos anos, tem-se procurado desenvolver um sistema transdérmico que permita a entrega de fármacos com boa biodisponibilidade, sem causar dor, inflamação, eritema ou edema. Os sistemas vesiculares têm sido o foco de estudos recentes, por permitirem uma veiculação passiva sem causar irritação local (Jeong et al., 2021; Mishra et al., 2018; Yang et al., 2017).

Dentro dos principais obstáculos à utilização de formulações transdérmicas, temos a incompatibilidade biológica, sendo muito limitados os excipientes compatíveis com a pele que podem ser utilizados para aumentar a permeabilidade cutânea. Para ultrapassar estes problemas, tem-se recorrido cada vez mais à investigação e desenvolvimento de nanossistemas, que aumentam a permeabilidade de pequenas moléculas sem causar dor ou desconforto, como o caso do ibuprofeno (Benbow & Campbell, 2019).

A taxa de permeação pode ser influenciada por fatores biológicos ou físico-químicos. Como fatores físico-químicos temos: o peso molecular, com um máximo de 500 Da para favorecer a penetração no estrato córneo, sendo que quanto mais pequeno melhor; a concentração, a solubilidade, o coeficiente de partição, o pH da formulação, e a utilização de co-solventes; a temperatura, havendo uma maior penetração a temperaturas mais elevadas, e ainda a inclusão de promotores de permeação nas formulações (Tabela 2) (Pouillot et al., 2008). O ibuprofeno tem um peso molecular perto dos 200 Da, sendo um bom candidato à utilização em aplicações transcutâneas (Benbow & Campbell, 2019).

Os principais fatores biológicos a ter em conta quanto a uma possível aplicação transdérmica incluem a idade, o estado da pele, o metabolismo e a hidratação. Com o aumento da idade a pele sofre alterações, como a capacidade de retenção de água, maior sensibilidade e descamação, resultando numa barreira cutânea mais fraca. Doenças cutâneas que levam a alterações do estado da pele, como a psoríase, também vão afetar a absorção e permeação de compostos na pele (Mishra et al., 2018).

Em resumo, um fármaco ideal para uma administração transdérmica teria uma distribuição adequada; boa permeabilidade (equilíbrio hidrofílico/lipofílico, baixo peso molecular e ponto de fusão); compatibilidade cutânea (não sofrer metabolização, não causar irritação e sensibilidade) e não causar efeitos adversos (Mishra et al., 2018).

Tabela 2. Fatores modeladores de permeação na pele. Retirado de (Pouillot et al., 2008).

Fatores Físicos e Químicos	Fatores Biológicos
Massa molecular	Idade
Concentração	Estado da pele
Solubilidade	Metabolismo da pele
Coeficiente de Partilha	Hidratação da pele
Variação de pH	Interação entre o composto e a pele
Co-Solventes	
Temperatura	
Promotores de permeação	

3. Abordagens nanotecnológicas para administração transdérmica

Nos últimos anos tem havido um grande interesse na descoberta e desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos, para ultrapassar as principais desvantagens da administração oral, sendo um dos principais focos de interesse a administração transdérmica. Esta via também aumenta a probabilidade de uma maior adesão dos pacientes à terapêutica em relação às vias de administração parentéricas, uma vez que não é invasiva (Chen et al., 2019; Jadhav et al., 2012; Touitou et al., 2000).

Existem vários nanossistemas focados na aplicação transdérmica, como as nanoemulsões, dendrímeros, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas e sistemas vesiculares (Uchechi et al., 2014).

Os sistemas vesiculares têm-se demonstrado bastante promissores, ultrapassando algumas desvantagens apresentadas pelos outros nanossistemas. Estes sistemas permitem aumentar a permeação da barreira cutânea, reduzir a toxicidade, são biodegradáveis e podem encapsular fármacos com diferentes polaridades (Hua, 2015; Jadhav et al., 2012). As propriedades físico-químicas (carga superficial, tamanho, forma e flexibilidade) destes nanossistemas vão influenciar a sua eficácia e eficiência de permeação cutânea, sendo todas estas propriedades dependentes da sua composição (Uchechi et al., 2014).

Para melhorar a capacidade de penetração dos lipossomas convencionais, têm vindo a ser feitas modificações na sua constituição, originando novas gerações de nanossistemas vesiculares como os etossomas, os transferossomas e os niossomas (Figura 6) (Hua, 2015).

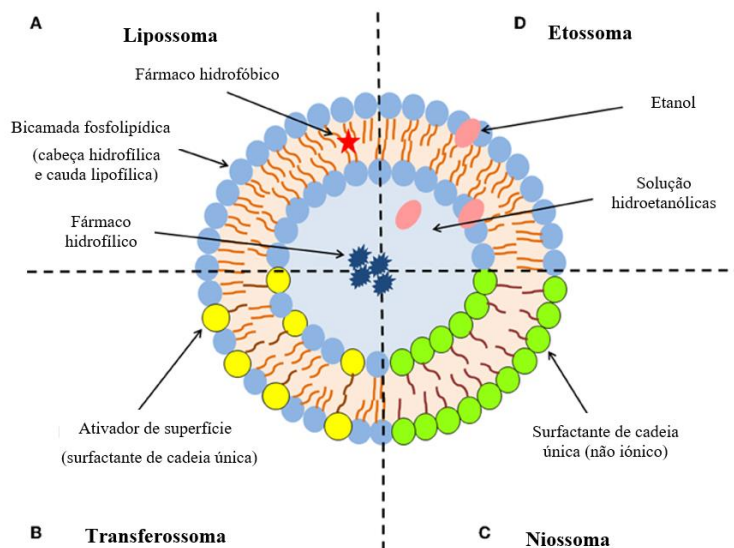


Figura 6. Tipos de sistemas vesiculares. Adaptado de (Hua, 2015).

3.1 Lipossomas

Os lipossomas foram descobertos na década de 60 por Alec D. Bangham, um hematologista britânico, quando testava um novo microscópio, adicionando coloração negativa a fosfolípidos secos (Daraee et al., 2016).

Estas vesículas, de forma esférica, são constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas (Figura 7) (Akbarzadeh et al., 2013). A adição de colesterol é comum e tem um papel importante na diminuição da permeabilidade da membrana aos fármacos hidrossolúveis e na rigidez do lipossoma (Gillet et al., 2011). Atualmente podem ser compostos por lípidos naturais ou sintéticos, mas inicialmente as primeiras formulações continham apenas lípidos naturais. Desde a sua descoberta, este nanossistema têm-se demonstrado muito promissor como transportador de fármacos, pela sua capacidade de incorporar tanto fármacos hidrofílicos, no vacúolo interno aquoso, e hidrofóbicos, na bicamada lipídica (Akbarzadeh et al., 2013; Bozzuto & Molinari, 2015).

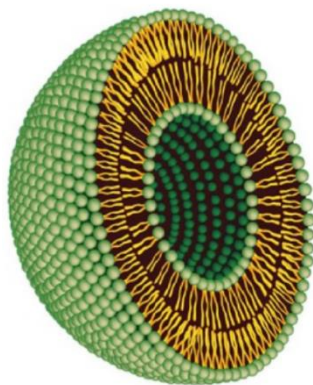


Figura 7. Representação de um lipossoma. Adaptado de (Bozzuto & Molinari, 2015).

As propriedades dos lipossomas podem ser influenciadas pela escolha do fosfolípido utilizado e o método de preparação aplicado. O tamanho destas vesículas vai afetar o tempo de circulação dos lipossomas no corpo e a sua capacidade de encapsulação (Akbarzadeh et al., 2013).

Estas nanopartículas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas (Figura 8), podendo ser classificados como vesículas multilamelares (MLV) e vesículas unilamelares, constituídas apenas por uma só bicamada lipídica que envolve a parte aquosa. As vesículas unilamelares são ainda diferenciadas em grandes (LUV) ou pequenas (SUV), de acordo com as suas dimensões (Akbarzadeh et al., 2013).

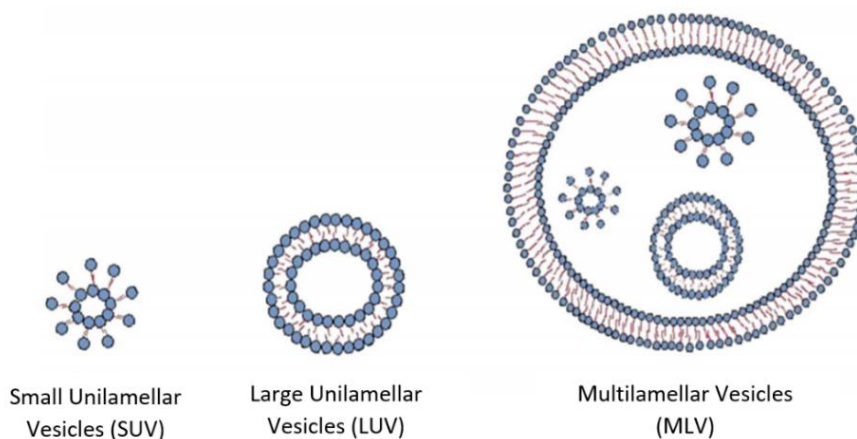


Figura 8. Estrutura dos vários tipos de lipossomas. Adaptado de ((Khoee & Yaghoobian, 2017).

No que diz respeito à sua aplicação, desde a sua descoberta, este nanossistema tem vindo a ser utilizado em diversas áreas clínicas, e vias de administração, como a via pulmonar, parenteral, dérmica e transdérmica (Isalomboto Nkanga et al., 2019; Gregoriadis, 2016).

A sua utilização na medicina inclui a entrega de fármacos e vacinas, tratamento de cancros e doenças infecciosas, como a tuberculose e infeções fúngicas. . Também tem vindo a ser estudada a aplicação tópica para diversas patologias cutâneas, como o tratamento de cancro de pele, acne e psoríase (Pattni et al., 2015; Bulbake et al., 2017).

Os diferentes tamanhos das vesículas permite a sua aplicação em diversas doenças. Os lipossomas pequenos (SUV), além de permanecerem mais tempo em circulação, têm a capacidade atravessar a barreira hematoencefálica, sendo assim boas alternativas para o tratamento de doenças como o Alzheimer. Por outro lado, os lipossomas de maiores dimensões, devido ao seu tamanho, são fagocitados pelos macrófagos, tornando-os uma boa opção para o tratamento de doenças e infeções que afetem estas células (Isalomboto Nkanga et al., 2019; Pattni et al., 2015). O primeiro medicamento lipossomal foi aprovado em 1995, comercializado como Doxil[®], para o tratamento de cancro dos ovários e sarcoma de Kaposi (Bulbake et al., 2017).

Relativamente aos métodos de preparação de lipossomas, são conhecidos vários métodos, sendo um dos mais utilizados e conhecidos o método de hidratação do filme lipídico ou método de Bangham. Este processo começa com a utilização de um solvente orgânico para dissolver os lípidos, seguido da sua evaporação e hidratação do filme lipídico com um meio aquoso. Apesar de ser um método simples, esta técnica apresenta alguns problemas, já que é muito morosa e leva à formação de partículas de grandes dimensões (MLV) e apresenta uma baixa encapsulação de fármacos hidrofílicos (Pattni et al., 2015; Maherani et al., 2011). Uma vez que esta técnica leva à formação de MLV, é necessário um passo adicional para a formação de vesículas unilamelares pequenas, sendo os métodos mais utilizados a sonicação via sonda ou banho de água (Isalomboto Nkanga et al., 2019).

O mecanismo de permeação cutânea dos lipossomas ainda é muito incerto, estando em discussão vários possíveis mecanismos, como a libertação do fármaco da vesícula, havendo de seguida a permeação na pele, a fusão das vesículas com o estrato córneo e permeação total das vesículas. No entanto, já foi descrito que a permeação

integral das vesículas na pele é um mecanismo pouco provável, uma vez, o gradiente osmótico não permitiria a penetração das vesículas muito além do estrato córneo (Gillet et al., 2011).

Relativamente às suas desvantagens, os lipossomas possuem algumas limitações como: instabilidade devido aos seus fosfolípidos que sofrem oxidação; o nível de pureza dos lípidos naturais utilizados é muito incerto; custo de produção elevado em comparação com outros sistemas vesiculares; baixa capacidade de deformação que resulta numa menor penetração das vesículas; possibilidade de rompimento e perda de fármaco (Rajan et al., 2011; Akbarzadeh et al., 2013).

As limitações de permeação dos lipossomas levou ao desenvolvimento de novos sistemas vesiculares com a adição de novos componentes, como o etanol e os ativadores de superfície, que deram origem aos etossomas e transferossomas, respetivamente (Gillet et al., 2011).

3.2 Niossomas

Os niossomas foram criados como uma alternativa aos lipossomas com o objetivo de aumentar a estabilidade e eficácia de encapsulação dos fármacos. São constituídos por surfactantes não iónicos e colesterol que formam uma bicamada, havendo também a possibilidade da utilização de anfifílicos iónicos (Kapoor, 2017; Opatha et al., 2020; Ge et al., 2019).

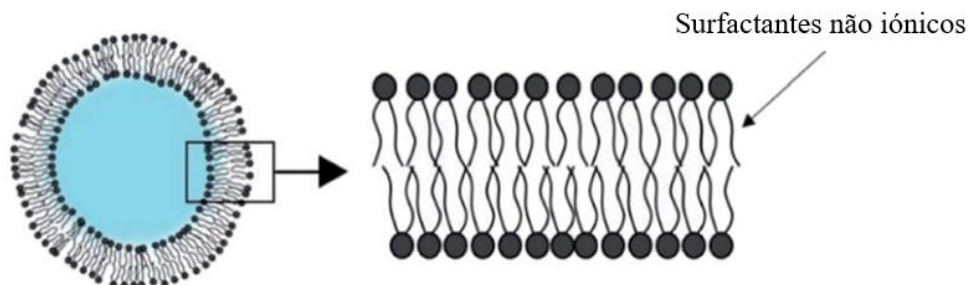


Figura 9. Estrutura de um niossoma. Adaptado de (Richard et al., 2020).

Estas nanopartículas têm a capacidade de transportar tanto fármacos hidrofílicos, na parte interna aquosa, como fármacos hidrofóbicos, na bicamada à semelhança dos lipossomas (Figura 9) (Kapoor, 2017).

Relativamente às suas vantagens em comparação com os lipossomas, os niossomas apresentam uma maior estabilidade química, maior biodisponibilidade, capacidade de encapsulação de elevadas quantidades de fármaco e maior flexibilidade da estrutura, devido à utilização de surfactantes não iónicos, assim como um baixo custo de produção. Os surfactantes não iónicos têm também a vantagem de não causar irritação celular e inibirem a glicoproteína-P, ajudando a uma maior absorção do fármaco (Opatha et al., 2020).

Relativamente à sua utilização, os niossomas têm sido utilizados para transporte de fármacos anti-tumorais, tendo demonstrado eficácia no direccionamento dos fármacos, assim como na promoção de libertação controlada sem causar toxicidade adicional. Foram produzidos pela primeira vez em 1975, por uma empresa de cosméticos em França, a L'Oréal, e desde a sua descoberta têm sido desenvolvidos vários produtos cosméticos baseados em niossomas, como antirrugas, despigmentantes e hidratantes (Chen et al., 2019).

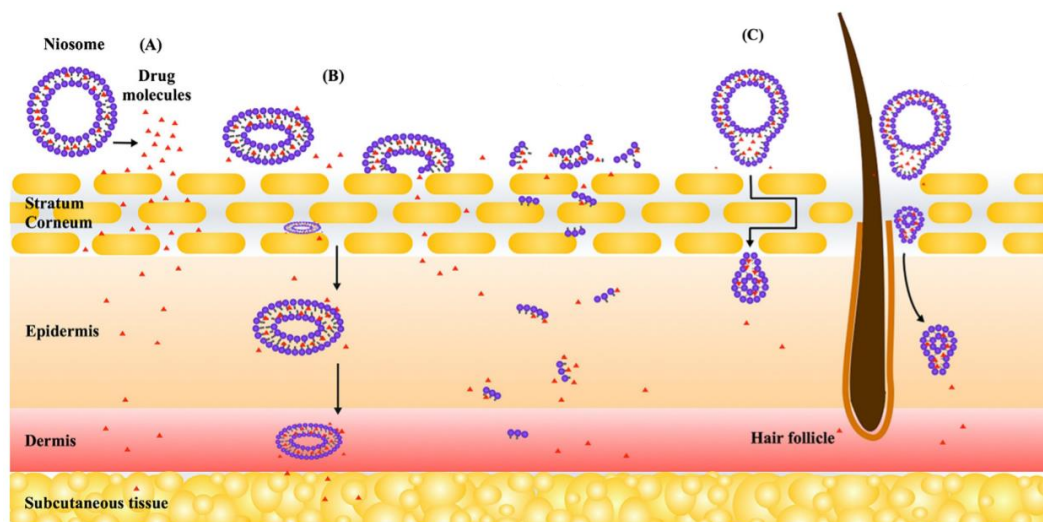


Figura 10. Possíveis mecanismos de permeação dos niossomas na pele. Adaptado de (Chen et al., 2019).

Foram propostos vários mecanismos de permeação cutânea dos niossomas (Figura 10): o primeiro (A) sugere a adsorção e fusão das vesículas com o estrato córneo, formando um gradiente de atividade termodinâmica, favorecendo a penetração do fármaco na pele; o segundo (B) sugere a passagem da vesícula através da reorganização estrutural dos lípidos do estrato córneo; por último, os niossomas levam a uma redução da perda transepidermica de água, o que resulta numa maior hidratação do estrato córneo e diminuição da espessura da estrutura celular (Chen et al., 2019).

3.3 Etossomas

Os etossomas foram produzidos pela primeira vez em 1996 por Touitou, quando este estudava a utilização de vesículas lipídicas como veículos de entrega de fármacos (Uchechi et al., 2014).

Estes nanossistemas são constituídos por fosfolípidos, etanol e água, sendo que a utilização de etanol na sua constituição é o fator diferenciador dos etossomas em relação aos restantes sistemas vesiculares (Figura 11). A utilização deste álcool em concentrações elevadas (20%–45%) tem como objetivo aumentar a permeação das vesículas na pele, podendo alcançar as camadas mais profundas da pele e eventualmente a circulação sistémica (Uchechi et al., 2014; Verma & Pathak, 2010).

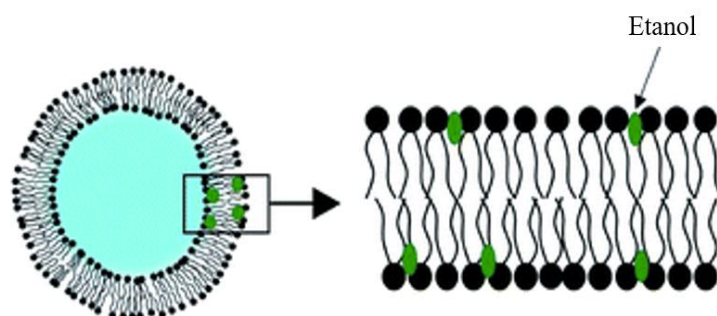


Figura 11. Constituição dos etossomas. Adaptado de (Richard et al., 2020).

O etanol é um agente promotor de permeação, interferindo com a matriz do estrato córneo e com as propriedades físico-químicas dos etossomas. Esta perturbação confere menos rigidez à estrutura da vesícula, causando a redução do seu tamanho e conferindo carga superficial negativa, contribuindo para a formação de vesículas com membranas

mais fluidas, que conseguem passar pelos poros, aumentando assim a permeabilidade cutânea (Richard et al., 2020).

Um possível mecanismo de permeação deste sistema, proposto por Touitou, é a sinergia entre o etanol, as vesículas e os lípidos da pele. Apesar do etanol ser um promotor de permeação, vários estudos verificaram que as soluções hidroetanólicas têm uma permeação muito menor que os etossomas, concluindo que só a sua presença não é suficiente para aumentar a permeação (Elsayed et al., 2007).

Pensa-se que a interação do etanol com as cabeças polares dos lípidos do estrato córneo aumenta a sua fluidez e permeabilidade. A fusão do etossoma com a camada lipídica da pele permite então a sua passagem e a libertação do fármaco na circulação sistémica (Elsayed et al., 2007; Touitou et al., 2000).

Outra característica atribuída à utilização de etanol é a formação de etossomas mais pequenos em relação aos lipossomas. A incorporação de grandes concentrações de etanol resulta numa carga superficial negativa que leva a uma redução de tamanho das vesículas, para além de permitir uma maior solubilidade de muitos fármacos (Elsayed et al., 2007).

3.4 Transferossomas

O desenvolvimento de transferossomas para veiculação transdérmica de fármacos surgiu em 1992, por Cevc, com o objetivo de criar lipossomas extremamente flexíveis e deformáveis para a sua utilização como transportadores de fármacos (Garg et al., 2016; El Zaafarany et al., 2010).

Os transferossomas diferem dos lipossomas pela sua membrana mais maleável e flexível, permitindo uma maior permeação. Estes sistemas são nanoestruturas lipídicas constituídos por uma camada externa de fosfolípidos e ativadores de superfície (AS), e um núcleo interno aquoso, o que possibilita o transporte de fármacos com um grau de solubilidade variável (Figura 12) (Opatha et al., 2020; Rajan et al., 2011; Kapoor, 2017).

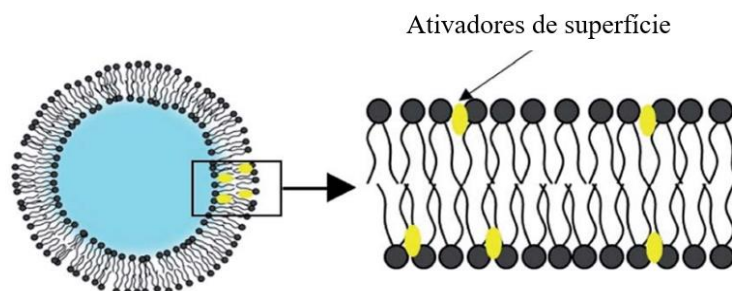


Figura 12. Constituição dos transferossomas. Adaptado de (Richard et al., 2020).

Os ativadores de superfície conferem propriedades únicas a estas vesículas por terem a capacidade de reduzir a tensão interfacial, que vai interferir com a estabilidade da bicamada lipídica, permitindo a passagem através da pele (Sguizzato et al., 2021). Têm também um papel importante na solubilidade de compostos hidrofóbicos, permitindo encapsular maiores quantidades. A escolha do tipo de surfactante (catiônico, não iônico ou aniônico) vai influenciar a capacidade de penetração na pele (Rajan et al., 2011). As formulações consistem na utilização de 10-25% de surfactantes de cadeia única, como o Tween e o Span, por serem compostos biodegradáveis e aumentarem significativamente a flexibilidade das vesículas. Podem também conter cerca de 3-10% de álcool, que vai ajudar a reduzir a densidade das vesículas, aumentando a penetração cutânea (Opatha et al., 2020).

A sua capacidade de deformação permite a passagem de vesículas intactas, em passagens muito estreitas, com um diâmetro de 5-10 vezes menor que a própria vesícula, sendo possível a passagem de vesículas até 500 nm de pelo estrato córneo, podendo chegar à epiderme e à circulação sanguínea (Rajan et al., 2011).

O mecanismo de permeação destes nanossistemas deve-se ao gradiente osmótico transdérmico, que ocorre devido à diferença de água das zonas profundas da epiderme e do estrato córneo. A epiderme profunda tem cerca de 75% de água enquanto o estrato córneo tem apenas 15%-20%, devido à perda de água por evaporação, o que leva à passagem das vesículas lipídicas polares de um espaço mais seco (estrato córneo) para um mais hidratado (epiderme profunda). Uma vez que a sua permeação vai depender do gradiente osmótico, é importante que os transferossomas sejam aplicados em condições

não oclusivas, ou seja, num estrato córneo pouco hidratado (Benson, 2005; Rajan et al., 2011; Richard et al., 2020).

Relativamente às suas vantagens, a utilização de transferossomas permite uma entrega de fármacos mais seletiva e eficiente devido a sua elasticidade e capacidade de deformação; apresentam uma elevada biocompatibilidade e biodegradação, para além de não causarem toxicidade, por serem compostos por fosfolípidos naturais, têm também a capacidade de encapsular tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos, para além de permitirem uma libertação de fármaco controlada. Quanto às suas desvantagens, os transferossomas têm tendência a sofrer oxidação, tornando-os quimicamente instáveis; a necessidade de obtenção de um elevado grau de pureza na utilização de fosfolípidos naturais, bem como todo o equipamento necessário para a sua produção, tornam o seu custo de fabrico elevado caso seja produzido a grande escala (Opatha et al., 2020).

Quanto à sua produção, o método mais utilizado é o método de hidratação do filme lipídico, referido anteriormente na produção de lipossomas. Este método começa com a dissolução dos lípidos e dos ativadores de superfície, utilizando solventes orgânicos voláteis, num balão de fundo redondo; segue-se a evaporação dos solventes, usando um evaporador rotativo, levando à formação de um filme lipídico. A hidratação do filme lipídico usando uma solução tampão, com agitação e seguida de sonicação permite obter vesículas pequenas e homogéneas. O fármaco utilizado pode ser adicionado na fase de dissolução em solventes orgânicos, caso seja lipofílico, ou na etapa de hidratação do filme lipídico, se for uma substância hidrofílica (Opatha et al., 2020).

4. Motivação e objetivos

O ibuprofeno é um dos AINEs mais utilizados a nível mundial, dado ser um fármaco que pode ser adquirido sem receita médica, e apresentar um bom perfil de segurança e eficácia no tratamento de dores ligeiras a moderadas (Rainsford, 2013). Uma vez que pode ser facilmente adquirido, está também muito associado a complicações e reações adversas causadas por automedicação (Varrassi et al., 2020).

O ibuprofeno é maioritariamente administrado por via oral e os seus efeitos adversos mais recorrentes são a nível gastrointestinal, apesar de estar também associado a efeitos a nível hepático e renal (Varrassi et al., 2020). A sua frequente utilização e

probabilidade de ocorrência de reações adversas levou à procura de novas vias de administração. A administração por via cutânea permite não só reduzir significativamente a probabilidade de desenvolvimento de efeitos adversos, como aumentar a biodisponibilidade, permitindo assim que exerça um efeito terapêutico mais direcionado e seguro. Atualmente já existem formulações cutâneas para a veiculação de ibuprofeno, no entanto, a sua falta de sucesso deve-se essencialmente à sua baixa permeação cutânea (Rainsford, 2013; Irvine et al., 2018).

Esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação transferossomal, como vetor para a veiculação do ibuprofeno de sódio por via transcutânea. Inicialmente foram realizados estudos preliminares no sentido de definir as formulações a testar para se obter a formulação otimizada. De seguida, recorreu-se a um desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BBD) para se otimizar a formulação transferossomal para veicular o ibuprofeno de sódio. A formulação otimizada foi então caracterizada quanto ao seu tamanho, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, capacidade de carga e através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Por último, realizaram-se estudos de estabilidade a longo prazo durante armazenamento refrigerado.

B. Materiais e Métodos

5. Materiais

Os transferossomas foram preparados com lecitina de soja (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha), ibuprofeno de sódio e Tween[®]80, ambos adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), Span[®]80 (Merck, Darmstadt, Alemanha), clorofórmio (Scharlab SL, Sentmenat, Espanha) e metanol (Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Itália).

Para a preparação do tampão PBS (pH 7,4), procedeu-se à dissolução, em água destilada do cloreto de potássio (0,0027 M; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), cloreto de sódio (0,137 M; José M. Vaz Pereira SA, Benavente, Portugal), hidrogeno fosfato dissódico di-hidratado (0,01 M; Scharlab SL, Sentmenat, Espanha) e do fosfato de potássio monobásico (0,0018 M; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Para ajustar o pH utilizou-se uma solução de ácido clorídrico (1M) ou hidróxido de sódio (1M). A solução tampão foi armazenada a 4 °C.

6. Curva de Calibração

Para ser possível determinar a quantidade não-encapsulada de ibuprofeno de sódio, foi necessário determinar a sua curva de calibração. Para tal, foram preparadas 6 soluções padrão a partir da diluição da solução mãe de 200 µg/ml (Tabela 3) e os espectros de absorção (200-400 nm) foram obtidos no espectrofotómetro Evolution[®] 300 (Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra) a 25 ± 2 °C.

Tabela 3. Concentração das soluções padrão de ibuprofeno

Soluções Padrão	[Ibuprofeno] µg/ml
1	0
2	10
3	15
4	20
5	30
6	40

7. Preparação dos transferossomas

Os transferossomas foram preparados através do método de hidratação do filme lipídico, conforme descrito anteriormente com algumas modificações (Júlio et al., 2022).

O Tween[®]80, Span[®]80 e a lecitina de soja foram dissolvidos em 12 ml de clorofórmio:metanol (3:1, v/v). De seguida, procedeu-se à evaporação dos solventes orgânicos no evaporador rotativo a 40 °C e 100 rpm, durante 30 min. Os resíduos de solvente que permaneceram no filme lipídico foram removidos a vácuo, durante 2 h.

O filme lipídico foi hidratado com uma solução tamponada (PBS) de ibuprofeno de sódio e agitado no vórtex até remover todo o filme das paredes do balão. Posteriormente, realizou-se a sonicação da dispersão no equipamento QSonica Sonicator Q125 (Newtown, CT, EUA), durante 10 min a 50% de amplitude. Após a sonicação, a formulação foi submetida a agitação durante 30 min a 200 rpm utilizando o equipamento IKA-VIBRAX-VXR (LTF Labortechnik, Bodensee, Alemanha).

8. Caracterização dos transferossomas

Os transferossomas produzidos foram caracterizados em relação ao tamanho e índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC).

Para determinação do tamanho e PDI, foram diluídos 40 µl da formulação em 2000 µl de água destilada, em triplicado, antes da sua caracterização no aparelho Delsa[™] Nano C da Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, EUA).

Para avaliar a EE e LC procedeu-se inicialmente à lavagem dos dispositivos de centrifugação VIVASPIN 500 (MW 10000, Sartorius, Goettingen, Alemanha) com água destilada seguido por centrifugação no equipamento HERMLE Z 323 K (Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemanha), durante 15 min a 14000 xg. Depois de retirar o volume residual de água, colocou-se 500 µl de formulação diluída (1:10) no dispositivo de centrifugação, a qual foi centrifugada durante 30 min a 14000 xg. Do sobrenadante obtido, diluiu-se 150 µl com 850 µl de PBS, antes de se obter os espectros de absorção no espectrofotómetro Evolution[®] 300 (Thermo Scientific, Inglaterra). A

partir dos espectros obtidos, registou-se o valor máximo de absorvência a 222 nm de forma a calcular a quantidade de ibuprofeno de sódio não encapsulada com base numa curva de calibração previamente obtida. A concentração de fármaco encapsulada foi então calculada pela diferença entre a concentração de fármaco adicionada inicialmente e a que não foi encapsulada. A EE e o LC foram, por fim, calculadas através das seguintes fórmulas:

$$\%EE = \frac{Q_T - Q_F}{Q_T} \times 100$$

$$\%LC = \frac{Q_T - Q_F}{Q_L} \times 100$$

em que Q_T representa a quantidade total de ibuprofeno de sódio adicionado à formulação, Q_F a quantidade não-encapsulada de ibuprofeno de sódio e Q_L a quantidade total de lípidos adicionados.

A formulação transferossomal otimizada foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando o equipamento PerkinElmer® Spectrum 400 (Waltham, MA, EUA) acoplado a um dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). Para obtenção de cada espetro de FTIR, cada amostra foi submetida a 50 acumulações, com uma resolução de 4 cm^{-1} entre 4000 e 400 cm^{-1} . Antes da leitura dos componentes utilizados, foi realizado um branco com ar, para a leitura do ibuprofeno de sódio, Tween®80, Span®80 e lecitina de soja, e um branco com PBS para a leitura das 3 réplicas da formulação otimizada.

9. Otimização dos Transferossomas

Para a otimização dos transferossomas para veicular ibuprofeno de sódio recorreu-se a uma estratégia de *quality-by-design*, em particular o desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BBD). O BBD permite avaliar o impacto da variação dos valores dos fatores e como estes influenciam as respostas, através da realização de um menor número de ensaios experimentais (Rainsford, 2013; Irvine et al., 2018).

Neste desenho experimental existem dois tipos de variáveis: as variáveis dependentes, que são as respostas, e as variáveis independentes, classificadas como fatores quantitativos. A concentração de lípido, razão de Tween/Span e a concentração de ibuprofeno de sódio foram estabelecidos como fatores, com base em resultados obtidos previamente (Vieira, 2021). O tamanho, o PDI, a EE e a LC foram definidos como

respostas a analisar, já que são dependentes dos valores dos fatores (Pereira-Leite & Ventura, 2020; Ferreira et al., 2007). Foram selecionados 3 níveis para cada um dos fatores a testar, assim como os resultados desejáveis para as 4 variáveis dependentes. A partir dos níveis definidos para os fatores a testar, foram preparadas e caracterizadas 15 formulações quanto às respostas a analisar, estabelecidas previamente.

Tabela 4. Variáveis consideradas no desenho fatorial do tipo Box-Behnken, com os níveis e critérios de desejabilidade estabelecidos.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
Concentração de lípido (% m/v)	4	6	8
Razão Tween®80/Span®80 (m/m)	2,5:12,5	7,5:7,5	12,5:2,5
Concentração de ibuprofeno (% m/v)	0,05	0,1	0,15
Variáveis dependentes	Desejabilidade		
	Baixa	Média	Elevada
Tamanho (nm)	180	130	80
PDI	0,30	0,22	0,15
EE (%)	10	25	40
LC (%)	0,10	0,45	0,90

PDI: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação; LC: capacidade de carga.

Para a realização do tratamento estatístico do desenho experimental recorreu-se ao software STATISTICA (Statsoft, Inc., OK, EUA), que permite obter os valores ótimos para cada um dos fatores selecionados de modo a atingir os valores de resposta desejáveis. A formulação otimizada indicada pelo software foi então produzida e caracterizada, em triplicado, de forma a validar as respostas teóricas previstas pelo BBD.

10. Ensaio de estabilidade

Após a sua produção, a formulação transferossomal otimizada foi armazenada a 4 ± 2 °C durante 60 dias. As medições foram realizadas após 15, 30 e 60 dias. Para avaliar a sua estabilidade, foi analisado novamente o seu tamanho, PDI, EE e LC, conforme detalhado no ponto 7, de forma a verificar se existiu alguma alteração nos seus resultados (Júlio et al., 2022).

C. Resultados e Discussão

11. Ensaios Preliminares

O primeiro passo do trabalho experimental prendeu-se com a determinação da curva de calibração do ibuprofeno de sódio que foi essencial para a determinação da quantidade não-encapsulada de ibuprofeno de sódio durante os estudos de eficiência de encapsulação. O máximo de absorvência foi registada a um comprimento de onda de 222 nm, onde se obteve um declive de 0,0382 e um R^2 de 0,9999 (Figura 13).

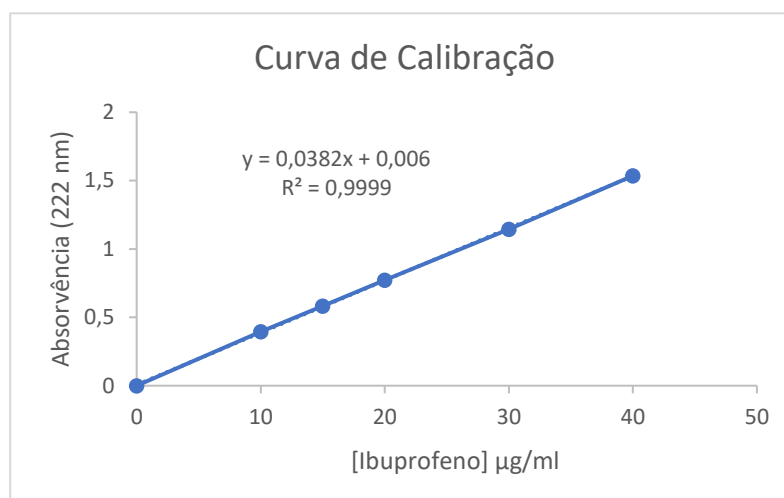


Figura 13. Curva de calibração do ibuprofeno de sódio a 222 nm.

Os restantes ensaios preliminares tiveram como objetivo melhorar a encapsulação do ibuprofeno de sódio a partir de uma formulação previamente desenvolvida (Vieira, 2021). Para tal, foram produzidas várias formulações para avaliar o tamanho, PDI, EE e LC dos transferossomas em função de diferentes razões de Tween[®]80/Span[®]80, concentrações de lecitina de soja (PC) e concentrações de ibuprofeno de sódio (Tabela 5).

Tabela 5. Propriedades físico-químicas de várias formulações transferossomais produzidas com lecitina de soja (PC), várias composições de ativadores de superfície (Tween[®]80/Span[®]80, T80/S80) e ibuprofeno de sódio (IBU).

Form.	(PC) (% m/v)	T80/S80 (m/m)	IBU (% m/v)	Tamanho (nm)	PDI	EE (%)	LC (%)
F0	0,50	8,75/6,25	2	115 ± 2	0,19 ± 0,02	11,9 ± 4,3	51,3 ± 19
F1	0,50	8,75/6,25	0,2	155 ± 77	0,18 ± 0,07	ND	ND
F2	5,00	8,75/6,25	0,2	117 ± 10	0,18 ± 0,03	24 ± 5	1,0 ± 0,2
F3	8,00	8,75/6,25	0,15	135 ± 4	0,16 ± 0,05	22 ± 0,7	0,41 ± 0,01
F4	4,00	2,5/12,5	0,05	143 ± 2	0,27 ± 0,01	17 ± 0,7	0,26 ± 0,01
F5	8,00	12,5/2,5	0,15	85 ± 1	0,26 ± 0,01	26 ± 3	0,51 ± 0,05

No sentido de melhorar uma formulação previamente desenvolvida (F0) (Vieira, 2021), começou-se por diminuir a concentração de ibuprofeno de sódio de 2,0% para 0,2%, no entanto, verificou-se que não era possível determinar com exatidão a EE e LC com esta quantidade de ibuprofeno e excipientes.

Assim, preparou-se a formulação F2, com uma concentração de ibuprofeno de sódio reduzida e um aumento de 10x na quantidade de excipientes. Com estas alterações foi possível verificar um aumento pronunciado na EE dos transferossomas, com um aumento para cerca de 24%, mantendo um tamanho e o PDI baixos, conforme pretendido. Ao aumentar ainda mais a quantidade de excipientes e reduzindo a quantidade de ibuprofeno de sódio (formulação F3), obteve-se uma EE semelhante, mas uma redução considerável da LC, mantendo os valores de tamanho e PDI.

As formulações F4 e F5 foram desenvolvidas no sentido de testar o efeito das duas condições mais extremas de cada fator escolhido para o desenho fatorial que seria iniciado de seguida. A F4 representa os valores mínimos de concentração de PC, de concentração de ibuprofeno de sódio e da razão de Tween[®]80/Span[®]80, enquanto a F5 representa os valores máximos das mesmas variáveis. Conforme pretendido, estas formulações apresentaram diferenças em termos de tamanho, EE e LC, sendo que a formulação F5 apresentou uma EE elevada, uma LC considerável e um tamanho inferior, com cerca de 85 nm.

Através da observação dos resultados, comparando as formulações F3 e F5, é possível verificar que uma maior quantidade de Tween[®]80 resulta numa diminuição pronunciada do tamanho de vesículas, com um ligeiro aumento de PDI e resultados semelhantes de EE e LC.

Vários estudos indicam que as propriedades físico-químicas das vesículas dependem do comprimento da cadeia de carbono, dos valores de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), da concentração de ativador de superfície e da hidrofília da sua cabeça (Bnyan et al., 2018).

Um dos principais objetivos de uma formulação vesicular para entrega de fármacos é a obtenção de valores de EE e LC elevados. Apesar de não haver provas concretas da influência de propriedades específicas dos surfactantes na EE, já foi demonstrado existir uma relação entre a concentração de ativador de superfície e a EE (Bnyan et al., 2018). Neste trabalho, utilizámos o Tween[®]80 e o Span[®]80 como ativadores de superfície, que possuem um valor de HLB de 15 e 4,3, respetivamente. Como referido na literatura, o HLB vai influenciar a encapsulação do fármaco, sendo que um surfactante com um valor HLB baixo vai facilitar a encapsulação de fármacos lipofílicos, enquanto que um HLB elevado vai aumentar a encapsulação de fármacos hidrofílicos (Bnyan et al., 2018) (Opatha et al., 2020). O ibuprofeno de sódio, considerado uma substância hidrofílica, apresenta um EE mais elevado na formulação F5, que tem a maior quantidade de Tween[®]80 e menor de Span[®]80, estando os resultados obtidos de acordo com a literatura.

Relativamente à formulação F4, verificou-se que apresenta o maior tamanho de vesículas, assim como o maior conteúdo de Span[®]80. Este resultado está de acordo com a literatura, já que a elevada afinidade dos fosfolípidos com surfactantes de HLB inferior provoca uma tensão superficial mais baixa, resultando num aumento do tamanho das vesículas (Ahmed, 2015).

É de notar que os estudos preliminares realizados foram imprescindíveis para definir os fatores a considerar na otimização dos transferossomas, assim como os níveis de cada fator a testar, tal como descrito na próxima seção.

12. Otimização dos transferossomas

Como referido anteriormente, recorreu-se a uma estratégia de *quality-by-design* do tipo Box-Behnken (BBD), para se obter uma formulação otimizada de transferossomas para veicular ibuprofeno de sódio. Neste desenho experimental foram considerados 3 fatores e 4 respostas, tal como descrito na Tabela 4. A partir dos níveis definidos para cada fator, foram preparadas 15 formulações tal como previsto pelo software STATISTICA, cuja composição se encontra descrita na Tabela 6. Todas as formulações foram preparadas com um tempo de sonicação de 10 min, que foi determinado como um tempo suficiente para obtenção de vesículas com tamanho e PDI desejáveis em trabalhos anteriores (Vieira, 2021; Pereira-Leite & Ventura, 2020). Após a preparação, as formulações foram caracterizadas quanto às variáveis dependentes selecionadas - tamanho, PDI, EE e LC – cujos resultados estão representados na Tabela 6.

Através da observação da Tabela 6, é possível verificar que o tamanho dos transferossomas teve uma variação entre os 85 nm e 172 nm; 0,17 e 0,28 para o PDI; 9,5% e 38,4% de EE; e 0,08% e 0,88% de LC, concluindo assim que os níveis selecionados para as variáveis independentes foram adequados para obter respostas dentro de valores desejáveis.

Tabela 6. Composição das formulações transferossomais produzidas de acordo com as variáveis independentes pré-selecionadas e respetivas respostas obtidas.

#	Variáveis independentes				Variáveis dependentes		
	[PC] (% m/v)	T80/S80 (m/m)	[IBU] (% m/v)	Tamanho (nm)	PDI	EE (%)	LC (%)
1	4	2,5:12,5	0,1	(172 ± 36)	(0,17 ± 0,06)	(35 ± 1)	(0,88 ± 0,03)
2	8	2,5:12,5	0,1	(155 ± 1)	(0,26 ± 0,01)	(38 ± 2)	(0,50 ± 0,03)
3	4	12,5:2,5	0,1	(85 ± 1)	(0,27 ± 0,01)	(24 ± 2)	(0,63 ± 0,06)
4	8	12,5:2,5	0,1	(126 ± 5)	(0,28 ± 0,02)	(26 ± 3)	(0,34 ± 0,03)
5	4	7,5:7,5	0,05	(136 ± 7)	(0,21 ± 0,05)	(21 ± 6)	(0,26 ± 0,08)
6	8	7,5:7,5	0,05	(148 ± 1)	(0,18 ± 0,01)	(23 ± 2)	(0,15 ± 0,01)
7	4	7,5:7,5	0,15	(103 ± 3)	(0,26 ± 0,01)	(19 ± 1)	(0,71 ± 0,05)
8	8	7,5:7,5	0,15	(132 ± 3)	(0,19 ± 0,03)	(16 ± 2)	(0,29 ± 0,03)
9	6	2,5:12,5	0,05	(161 ± 6)	(0,23 ± 0,02)	(34 ± 2)	(0,34 ± 0,02)
10	6	12,5:2,5	0,05	(98 ± 2)	(0,28 ± 0,01)	(10 ± 3)	(0,08 ± 0,03)
11	6	2,5:12,5	0,15	(136 ± 2)	(0,26 ± 0,02)	(27 ± 2)	(0,67 ± 0,04)
12	6	12,5:2,5	0,15	(167 ± 6)	(0,29 ± 0,02)	(16 ± 1)	(0,32 ± 0,09)
13	6	7,5:7,5	0,1	(127 ± 3)	(0,19 ± 0,02)	(16 ± 2)	(0,26 ± 0,04)
14	6	7,5:7,5	0,1	(131 ± 3)	(0,18 ± 0,02)	(12 ± 1)	(0,19 ± 0,01)
15	6	7,5:7,5	0,1	(121 ± 1)	(0,19 ± 0,01)	(18 ± 1)	(0,30 ± 0,02)

[PC]: concentração de lecitina de soja; T80/S80: razão Tween®80/Span®80; [IBU]: concentração de ibuprofeno de sódio.

Recorreu-se ao modelo matemático de interações bidirecionais (linear x quadrático) para correlacionar os resultados experimentais e os valores teóricos previstos com 95% de confiança, já que foi este modelo matemático que permitiu obter os valores de R^2 mais elevados ($>0,979$) para as quatro respostas analisadas, nomeadamente tamanho, PDI, EE e LC.

Com base nas análises de regressão realizadas com base no modelo matemático selecionado, foi possível obter gráficos de superfície de resposta, representado em três dimensões, de forma a melhor perceber a influência da variação de dois fatores selecionados na resposta obtida (Figura 14).

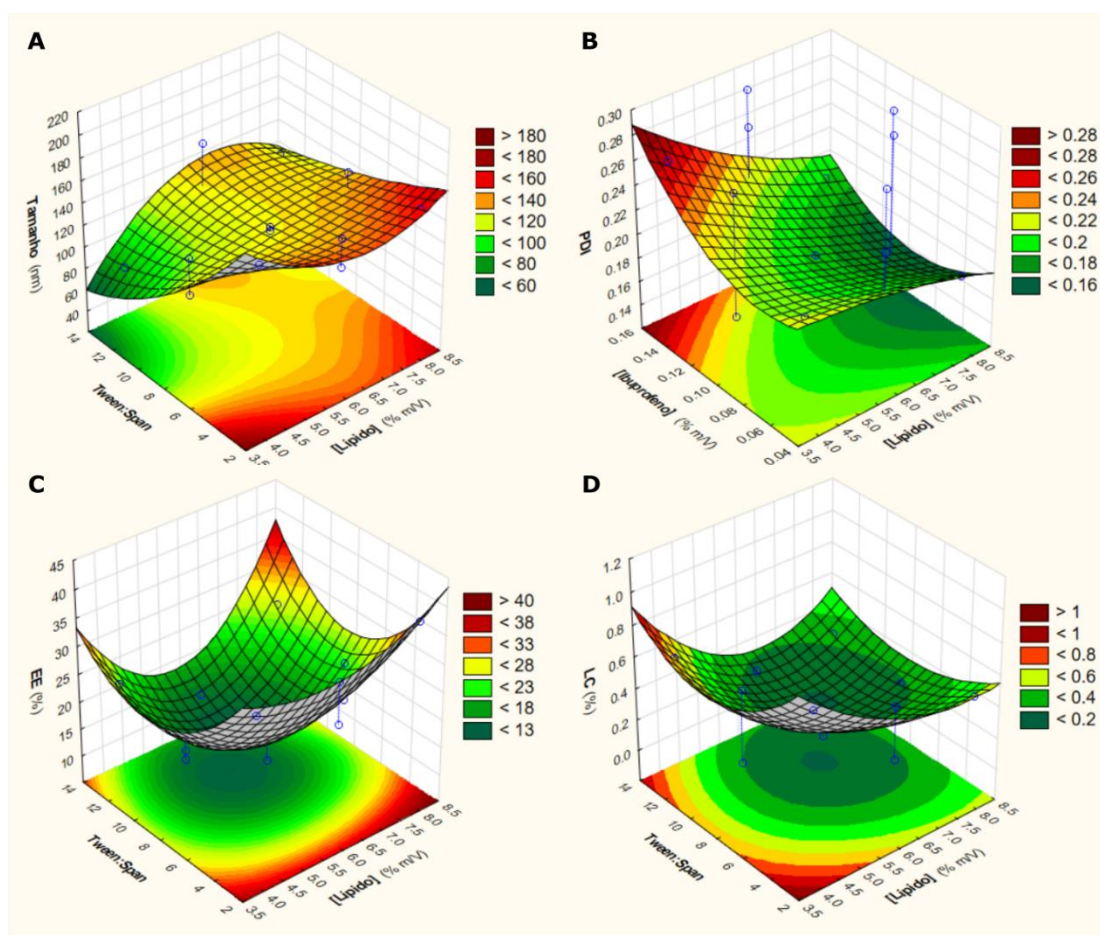


Figura 14. Gráficos de superfície de resposta: (A) Efeito da concentração de lípido e razão Tween[®]80/Span[®]80 no tamanho dos transferossomas; (B) Efeito da concentração de lípido e concentração de ibuprofeno de sódio no PDI. (C) Efeito da concentração de lípido e razão Tween[®]80/Span[®]80 na EE dos transferossomas; (D) Efeito da concentração de lípido e razão Tween[®]80/Span[®]80 na LC dos transferossomas.

Os gráficos de superfície de resposta em três dimensões estão representados com diferentes cores, sendo que o verde claro retrata o nível de resposta mais baixo e o vermelho escuro um nível de resposta mais elevado. Através da observação do gráfico A (Figura 14), concluímos que é possível obter um tamanho inferior a 100 nm, quando se utiliza uma razão Tween[®]80/Span[®]80 superior a 10:5 juntamente com uma concentração de lípido inferior a 4,5% (m/v).

O gráfico B (Figura 14) mostra a influência da concentração de ibuprofeno de sódio e da concentração de lípido no PDI dos transferossomas. Concluímos que é possível obter um PDI inferior a 0,18 quando se utiliza uma concentração de lípido superior a 6,5% (m/v) concomitantemente com uma concentração de ibuprofeno de sódio entre os 0,04% (m/v) e os 0,12% (m/v).

O gráfico C (Figura 14) mostra que um valor de EE superior a 30% pode ser conseguido quando é utilizada uma razão Tween[®]80/Span[®]80 inferior a 4:11, independentemente da concentração de lípido (entre 3,5 e 8,5 % m/v). Por outro lado, os melhores valores de LC, por volta de 1%, podem ser obtidos com uma concentração de lípido inferior a 4,5% (m/v), quando se utiliza uma razão de Tween[®]80/Span[®]80 inferior a 4:11 ou superior a 13:2.

Através da análise estatística realizada, o software STATISTICA determinou os valores ótimos para cada fator estudado (Tabela 7) de forma a preparar a formulação otimizada, considerando os critérios de desejabilidade previamente selecionados (Tabela 4). Para além disso, este software apresentou também os valores teóricos que se espera obter com a formulação otimizada. Para confirmar se os valores teóricos são reproduzíveis experimentalmente, prepararam-se 3 réplicas da formulação otimizada e determinou-se experimentalmente as respostas, previamente previstas computacionalmente.

Tabela 7. Níveis ótimos dos fatores para o desenvolvimento da formulação otimizada e respetivos valores teóricos e experimentais obtidos quanto às respostas analisadas.

Formulação otimizada	Resposta	Valores experimentais	Valores teóricos	- 95% CI	+ 95% CI
4; (2,5:12,5); 0,125	Tamanho (nm)	142 ± 13	153,18	130,03	176,32
	PDI	0,22 ± 0,03	0,19	0,16	0,22
[PC] (% m/v); T80/S80 (m/m); [IBU] (% m/v)	EE (%)	27 ± 4	32,60	17,53	47,68
	LC (%)	0,8 ± 0,1	0,99	0,73	1,24

[PC]: concentração de lecitina de soja; T80/S80: razão Tween[®]80/Span[®]80; [IBU]: concentração de ibuprofeno de sódio; CI: intervalo de confiança dos valores teóricos.

Através da observação da Tabela 7, é possível concluir que o desenho experimental é válido, uma vez que os resultados obtidos estão dentro dos valores teóricos previstos pelo BBD. Os valores experimentais mostraram-se promissores, com um tamanho médio de 142 nm, estando abaixo dos 300 nm, reportado como um tamanho essencial para penetrar até zonas profundas da pele (Fernández-García et al., 2020), assim como um PDI favorável ($< 0,3$) que permite garantir uma boa homogeneidade de tamanho das vesículas (Danaei et al., 2018). Para além disso, com este trabalho foi ainda possível melhorar a EE dos transferossomas (27%) em comparação com o trabalho anteriormente desenvolvido (12%) com uma composição qualitativa semelhante (Vieira, 2021).

Em comparação com outros resultados publicados relativamente a transferossomas para veicular ibuprofeno, Abdallah et al. em 2019 desenvolveu transferossomas compostos apenas por Tween[®]80 como ativador de superfície e foram atingidos valores de EE superiores, de cerca de 48% a 88%. No entanto, o fármaco encapsulado foi o ibuprofeno e não o ibuprofeno de sódio e estes transferossomas apresentavam um tamanho de 211 nm, a 306 nm, o que poderá afetar a capacidade de permeação cutânea (Abdallah et al., 2019). Um outro estudo publicado em 2012 relativamente ao desenvolvimento de transferossomas compostos por Tween[®]80 ou Span[®]80, também descreve um EE bastante positivo, com valores entre 48% e 41%, mas com tamanhos de partícula entre 962 nm e 3640 nm, o que praticamente inviabiliza a sua utilização por uma via transcutânea (Irfan et al., 2012).

Recorreu-se à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com o objetivo de confirmar se os componentes utilizados na preparação dos transferossomas se encontravam na formulação otimizada, conforme previsto.

Este é um método analítico quantitativo, que permite a análise de grupos químicos através da intensidade de vibração das moléculas, quando estas são expostas a comprimentos de onda específicos (Peak, 2013). Assim, obtiveram-se os espectros das três réplicas preparadas da formulação otimizada, assim como de cada um dos seus constituintes individuais, nomeadamente ibuprofeno, lecitina de soja (PC), Tween[®]80 e Span[®]80 (Figura 15).

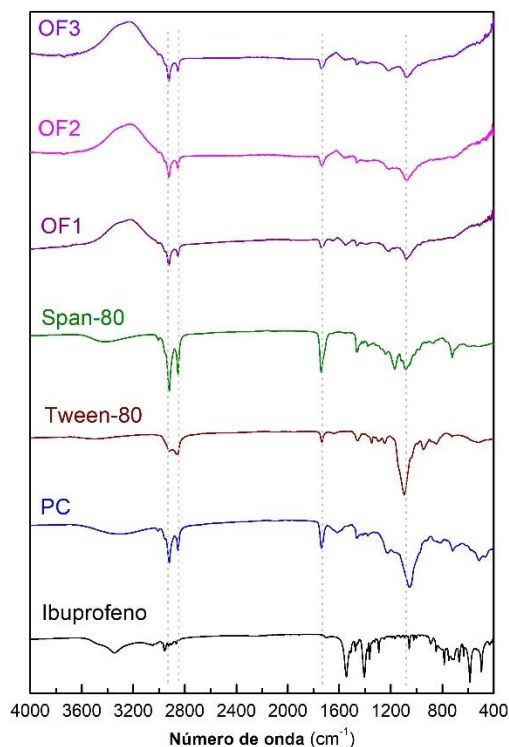


Figura 15. Espectros de FTIR das três réplicas da formulação otimizada (OF1-OF3) e dos componentes individuais utilizados na preparação dos transferossomas, nomeadamente ibuprofeno, lecitina de soja (PC), Tween[®]80 e Span[®]80.

Na figura 15 é possível observar que as bandas mais visíveis nas 3 réplicas da formulação otimizada (OF) estão também presentes nos espectros do Span[®]80 e da lecitina de soja, que são os componentes maioritários destas formulações. Relativamente ao ibuprofeno, não foi possível confirmar a sua presença na formulação otimizada, uma vez que as suas bandas características estão provavelmente mascaradas com a presença de água e dos restantes excipientes.

Apesar de não haver muitos estudos disponíveis para comparar com os resultados, é de realçar que o presente estudo traduz um avanço científico já que descreve transferossomas constituídos por ativadores de superfície mistos para veicular o ibuprofeno de sódio. Estes nanossistemas vesiculares apresentarem propriedades bastante satisfatórias, uma vez que se conseguiu manter o tamanho das vesículas bastante abaixo dos 300 nm (essencial para garantir a permeação cutânea) e se conseguiu melhorar a EE relativamente ao estudo anterior realizado no mesmo grupo de investigação.

13. Avaliação da estabilidade

A estabilidade a longo prazo da formulação otimizada foi avaliada considerando um armazenamento refrigerado das formulações a 5 ± 2 °C. A estabilidade foi analisada quanto ao tamanho, PDI, EE e LC da formulação otimizada, em três momentos diferentes: a primeira avaliação foi realizada 15 dias após a data de preparação, a segunda após 30 dias e a última após 60 dias (Figuras 16-19).

Através da observação dos gráficos abaixo é possível concluir que tanto o tamanho, como o PDI dos transferossomas se mantiveram estáveis durante dois meses (Figura 16 e 17), não havendo variações pronunciadas nos seus valores. Verificou-se apenas uma ligeira redução da EE e LC ao fim de 60 dias (Figura 18 e 19), sendo assim é possível garantir a estabilidade de todos os parâmetros analisados até 1 mês sob armazenamento refrigerado.

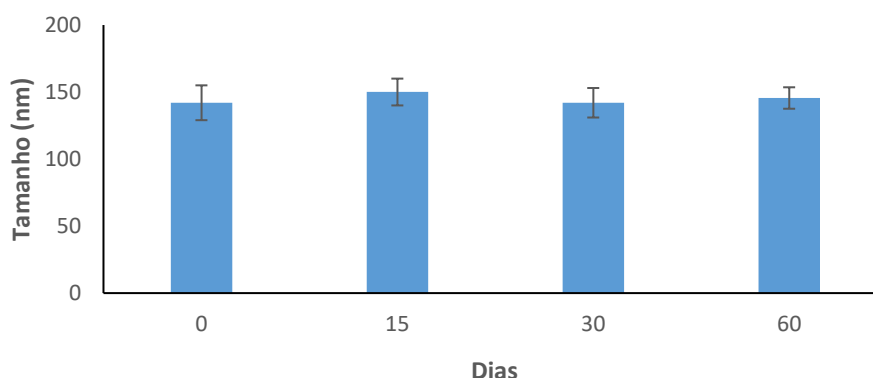


Figura 16. Avaliação da estabilidade do tamanho da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.

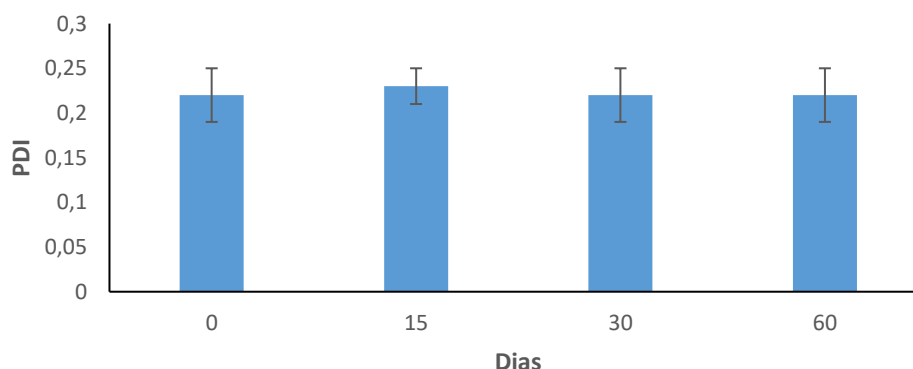


Figura 17. Avaliação da estabilidade do índice de polidispersão (PDI) da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.

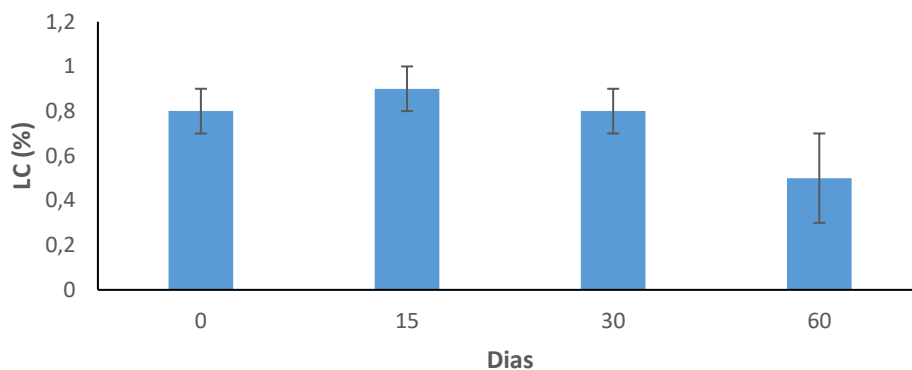


Figura 18. Avaliação da estabilidade da capacidade de carga (LC) da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.

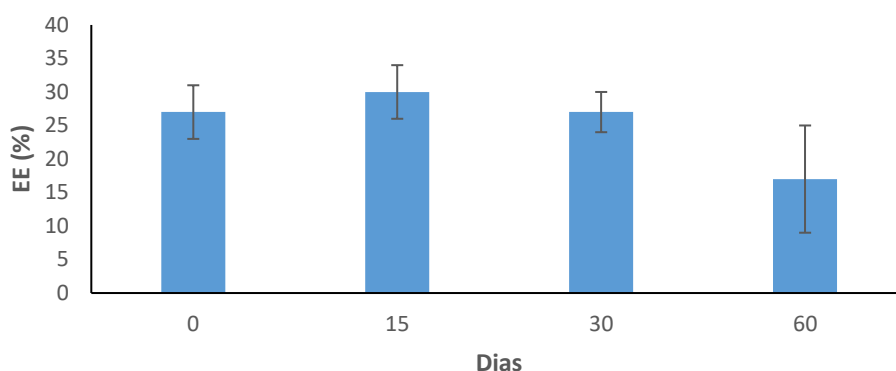


Figura 19. Avaliação da estabilidade da eficiência de encapsulação (EE) da formulação transferossomal otimizada ao longo de 2 meses.

Os transferossomas têm tendência a sofrer degradação oxidativa, que pode ser diminuída se o meio aquoso for purificado com gases inertes ou armazenado a baixas temperaturas e proteger da luz também pode aumentar a estabilidade. O processo de liofilização também pode aumentar a estabilidade dos transferossomas (Opatha et al., 2020). Assim, estas estratégias poderiam ser utilizadas no futuro para melhorar a estabilidade a longo prazo da formulação otimizada. Para uma melhor avaliação da estabilidade da formulação, teria sido importante a determinação do potencial zeta dos transferossomas, uma vez que permite determinar a probabilidade de agregação das vesículas, através da medição da força de repulsão entre as partículas (Zhang et al., 2008). Assim, sugiro também que este estudo seja realizado no futuro para melhor caracterizar a estabilidade da formulação transferossomal de ibuprofeno de sódio.

D. Conclusão

Nos últimos anos tem havido um grande interesse na descoberta e desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos, para ultrapassar as principais desvantagens da administração oral, sendo um dos principais focos de interesse a administração transdérmica. Os sistemas vesiculares, como os transferossomas, têm-se demonstrado bastante promissores, ultrapassando algumas desvantagens apresentadas pelos outros nanossistemas vesiculares, particularmente quanto à capacidade de permeação cutânea.

Esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação transferossomal para veicular o ibuprofeno de sódio por uma via transcutânea.

A utilização do desenho experimental do tipo Box-Benhken mostrou ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento e otimização de sistemas vesiculares, sendo que a formulação otimizada apresentou propriedades promissoras: com 142 ± 13 nm de tamanho; $0,22 \pm 0,03$ de PDI; $27 \pm 4\%$ de EE e $0,8 \pm 0,1\%$ de LC. Os estudos de estabilidade a longo prazo também foram promissores, já que a formulação otimizada se manteve estável durante pelo menos 1 mês sob armazenamento refrigerado, havendo apenas uma ligeira redução na EE e LC após 2 meses.

Este trabalho mostrou um avanço considerável no desenvolvimento de transferossomas contendo ibuprofeno de sódio, apresentando um tamanho de vesícula pequeno, essencial para uma permeação transcutânea, assim como eficiência de encapsulação satisfatória e superior a outros trabalhos já realizados. Os resultados obtidos neste trabalho poderão também ser úteis para o desenvolvimento de novas formulações transferossomais que venham a ser desenvolvidos no futuro.

Caso fosse possível continuar este projeto, o próximo passo seria a realização de estudos de permeação *in vitro*, de forma a confirmar a capacidade de permeação da formulação desenvolvida. Também seria importante no futuro a realização de estudos de toxicidade celular *in vitro* e de estudos de biocompatibilidade cutânea *in vivo*, para garantir a segurança da formulação numa futura utilização *in vivo*.

E. Referências

- Abdallah, M. H., Lila, A. S. A., Anwer, M. K., Khafagy, E.-S., Mohammad, M., & S. Soliman, M. (2019). Formulation, Development and Evaluation of Ibuprofen Loaded Nano-transferosomal Gel for the Treatment of Psoriasis. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 31(6), 1–8. <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v31i630356>
- Ahmed, T. A. (2015). Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett-Burman design and characterization. *Journal of Liposome Research*, 25(1), 1–10. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.950276>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). *Liposome : classification , preparation , and applications*. 1–9.
- Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS7040438>
- Antonio, J. R., Antônio, C. R., Cardeal, I. L. S., Ballavenuto, J. M. A., & Oliveira, J. R. (2014). Nanotechnology in Dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(1), 126. <https://doi.org/10.1590/ABD1806-4841.20142228>
- Arora, M., Choudhary, S., Singh, P. K., Sapra, B., & Silakari, O. (2020). Structural investigation on the selective COX-2 inhibitors mediated cardiotoxicity: A review. *Life Sciences*, 251(December 2019), 117631. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117631>
- Asirvatham, S., Dhokchawle, B. V., & Tauro, S. J. (2019). Quantitative structure activity relationships studies of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3948–3962. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2016.03.002>
- Barbieri, J. S., Wanat, K., & Seykora, J. (2014). Skin: Basic Structure and Function. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, 1134–1144. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2>
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2011.08.007>
- Benbow, T., & Campbell, J. (2019). Microemulsions as transdermal drug delivery systems for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a literature review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(12), 1849–1855. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1680996>
- Benson, H. (2005). Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, 2(1), 23–33. <https://doi.org/10.2174/1567201052772915>
- Bnyan, R., Khan, I., Ehtezazi, T., Saleem, I., Gordon, S., O'Neill, F., & Roberts, M. (2018). Surfactant Effects on Lipid-Based Vesicles Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(5), 1237–1246.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.005>

- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 33(1), 1. <https://doi.org/10.5114/PDIA.2015.48037>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*, 9(2), 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Burian, M., & Geisslinger, G. (2005). COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology and Therapeutics*, 107(2), 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.02.004>
- Campbell, K. L., & Lichtensteiger, C. A. (2003). Structure and Function of The Skin. *Small Animal Dermatology Secrets*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-1-56053-626-0.50005-7>
- Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M., & Wen, J. (2019). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 144(May), 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.015>
- Curtis, E., Fuggle, N., Shaw, S., Spooner, L., Ntani, G., Parsons, C., Corp, N., Honvo, G., Baird, J., Maggi, S., Dennison, E., Bruyère, O., Reginster, J. Y., & Cooper, C. (2019). Safety of Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs and Aging*, 36(1), 25–44. <https://doi.org/10.1007/S40266-019-00664-X/TABLES/4>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(1), 381–391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>
- Day, R. O., & Graham, G. G. (2004). The vascular effects of COX-2 selective inhibitors. *Australian Prescriber*, 27(6), 142–145. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2004.119>
- El Zaafarany, G. M., Awad, G. A. S., Holayel, S. M., & Mortada, N. D. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 397(1–2), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.034>
- Elsayed, M. M. A., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F., & Khalafallah, N. M. (2007). Lipid

- vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1–2), 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.005>
- Fernández-García, R., Lalatsa, A., Statts, L., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M. P., & Serrano, D. R. (2020). Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118817. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118817>
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179–186.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Fuchs, E., & Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews. Genetics*, 3(3), 199–209. <https://doi.org/10.1038/NRG758>
- Garg, V., Singh, H., Bimbrawh, S., Singh, S. K., Gulati, M., Vaidya, Y., & Kaur, P. (2016). Ethosomes and Transfersomes: Principles, Perspectives and Practices. *Current Drug Delivery*, 14(5), 613–633.
<https://doi.org/10.2174/1567201813666160520114436>
- Ge, X., Wei, M., He, S., & Yuan, W. E. (2019). Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(2).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020055>
- Ghlichloo, I., & Gerriets, V. (2021). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). *Treatment of Chronic Pain Conditions: A Comprehensive Handbook*, 77–79.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6976-0_21
- Gillet, A., Evrard, B., & Piel, G. (2011). Liposomes and parameters affecting their skin penetration behaviour. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50004-8](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50004-8)
- Gregoriadis, G. (2016). Liposomes in drug delivery: How it all happened. *Pharmaceutics*, 8(2), 1–5. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020019>
- Hadgraft, J., & Valenta, C. (2000). pH, pK a and dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 200. www.elsevier.com/locate/ijpharm
- Halford, G. M., Lordkipanidzé, M., & Watson, S. P. (2012). 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: An interview with Dr Stewart Adams. *Platelets*, 23(6), 415–422. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.632032>
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, 11, 23–32.
<https://doi.org/10.1016/J.JARE.2018.03.005>
- Hua, S. (2015). Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in Pharmacology*, 6(SEP), 2011–2015.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00219>
- Irfan, M., Verma, S., & Ram, A. (2012). Preparation and characterization of Ibuprofen loaded transferosome as a novel carrier for transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 162–165.

- Irvine, J., Afrose, A., & Islam, N. (2018). Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(2), 173–183. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1391838>
- Isalomboto Nkanga, C., Murhimalika Bapolisi, A., Ikemefuna Okafor, N., & Werner Macedo Krause, R. (2019). General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. *Liposomes - Advances and Perspectives*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84255>
- J Kolarsick, P. A., & Ann Kolarsick, M. (2009). *Anatomy and Physiology of the Skin*. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Jadhav, S. M., Morey, P., Karpe, M. M., & Kadam, V. (2012). Novel vesicular system: An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(1), 193–202.
- Jeong, W. Y., Kwon, M., Choi, H. E., & Kim, K. S. (2021). Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review. *Biomaterials Research*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/S40824-021-00226-6>
- Jones, R. (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: Past, present, and future. *American Journal of Medicine*, 110(1 SUPPL. 1), S4–S7. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00627-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00627-6)
- Júlio, A., Costa, J. G., Pereira-Leite, C., & de Almeida, T. S. (2022). Transfersomils: From ionic liquids to a new class of nanovesicular systems. *Nanomaterials*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano12010007>
- Kapoor, M. S. (2017). *Stratum corneum modulation by chemical enhancers and lipid nanostructures: implications for transdermal drug delivery*. 8, 701–718.
- Khoee, S., & Yaghoobian, M. (2017). Niosomes: a novel approach in modern drug delivery systems. In *Nanostructures for Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-46143-6.00006-3>
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R. Mozafari, M., Gaiani, C., & Linder, M. (2011). Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*, 7(3), 436–452. <https://doi.org/10.2174/157341311795542453>
- Meek, I. L., van de Laar, M. A. F. J., & Vonkeman, H. E. (2010). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. *Pharmaceuticals*, 3(7), 2146. <https://doi.org/10.3390/PH3072146>
- Menon, G. K., Cleary, G. W., & Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
- Mishra, D. K., Pandey, V., Maheshwari, R., Ghode, P., & Tekade, R. K. (2018). Cutaneous and transdermal drug delivery: Techniques and delivery systems. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00015-7>
- Monteiro, C., Miranda, C., Brito, F., Fonseca, C., & Araujo, A. R. T. S. (2017). Consumption patterns of NSAIDs in central Portugal and the role of pharmacy professionals in promoting their rational use. *Drugs and Therapy Perspectives*, 33(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s40267-016-0352-z>

- Montinari, M. R., Minelli, S., & De Caterina, R. (2019). The first 3500 years of aspirin history from its roots – A concise summary. *Vascular Pharmacology*, 113, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2018.10.008>
- Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., & Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: A promising nanoencapsulation technique for transdermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 12(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090855>
- Osafo, N., Agyare, C., Obiri, D. D., & Antwi, A. O. (2017). Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. In *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. InTech. <https://doi.org/10.5772/68090>
- Patel, A., Bell, M., O'Connor, C., Inchley, A., Wibawa, J., & Lane, M. E. (2013). Delivery of ibuprofen to the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 457(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.09.019>
- Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. (2015). New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 115(19), 10938–10966. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>
- Peak, D. (2013). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Methods of Soil Analysis. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (Issue July). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.05170-8>
- Pereira-Leite, C., & Ventura, C. (2020). Optimization of gallic acid-loaded transfersomes using a Box-Behnken factorial design. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(2), 1–13. <https://doi.org/10.19277/BBR.17.2.244>
- Pouillot, A., Dayan, N., Polla, A. S., Polla, L. L., & Polla, B. S. (2008). Back to Basics The stratum corneum : a double paradox. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1, 143–148.
- Qureshi, O., & Dua, A. (2021). COX Inhibitors. *Encyclopedia of Immunotoxicology*, 218–218. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54596-2_100140
- Rainsford, K. D. (2013). Ibuprofen: From invention to an OTC therapeutic mainstay. *International Journal of Clinical Practice*, 67(SUPPL. 178), 9–20. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12055>
- Rajan, R., Vasudevan, D., Biju Mukund, V., & Jose, S. (2011). Transfersomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(3), 138. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.85524>
- Ramadon, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., & Donnelly, R. F. (2021). Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Delivery and Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/S13346-021-00909-6>
- Richard, C., Cassel, S., & Blanzat, M. (2020). Vesicular systems for dermal and transdermal drug delivery. *RSC Advances*, 11(1), 442–451. <https://doi.org/10.1039/d0ra09561c>
- Schoellhammer, C. M., Blankschtein, D., & Langer, R. (2014). Skin Permeabilization for Transdermal Drug Delivery: Recent Advances and Future Prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(3), 393.

<https://doi.org/10.1517/17425247.2014.875528>

- Sguizzato, M., Esposito, E., & Cortesi, R. (2021). Lipid-based nanosystems as a tool to overcome skin barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22158319>
- Sostres, C., Gargallo, C. J., Arroyo, M. T., & Lanás, A. (2010). Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 24(2), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>
- Touitou, E., Godin, B., & Weiss, C. (2000). Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers. *Drug Development Research*, 50(3–4), 406–415. [https://doi.org/10.1002/1098-2299\(200007/08\)50:3/4<406::AID-DDR23>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4<406::AID-DDR23>3.0.CO;2-M)
- Uchechi, O., Ogbonna, J. D. N., & Attama, A. A. (2014). Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. <https://doi.org/10.5772/58672>
- Varrassi, G., Pergolizzi, J. V., Dowling, P., & Paladini, A. (2020). Ibuprofen Safety at the Golden Anniversary: Are all NSAIDs the Same? A Narrative Review. *Advances in Therapy*, 37(1), 61–82. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01144-9>
- Verma, P., & Pathak, K. (2010). Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(3), 274. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.72415>
- Vieira, M. B. (2021). OS TRANSFEROSSOMAS COMO SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DO IBUPROFENO PARA.
- Vonkeman, H. E., & van de Laar, M. A. F. J. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. In *Seminars in Arthritis and Rheumatism* (Vol. 39, Issue 4, pp. 294–312). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.08.001>
- Whelton, A. (1999). Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *The American Journal of Medicine*, 106(5), 13S–24S. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00113-8)
- Yang, R., Wei, T., Goldberg, H., Wang, W., Cullion, K., & Kohane, D. S. (2017). Getting Drugs across Biological Barriers. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 29(37). <https://doi.org/10.1002/ADMA.201606596>
- Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2021). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Zhang, Y., Yang, M., Portney, N. G., Cui, D., Budak, G., Ozbay, E., Ozkan, M., & Ozkan, C. S. (2008). Zeta potential: A surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices*, 10(2), 321–328. <https://doi.org/10.1007/s10544-007-9139-2>