

JOÃO MANUEL BARRETO VIEIRA

**OS TRANSFEROSSOMAS COMO SISTEMAS DE
VEICULAÇÃO DO IBUPROFENO PARA
ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA**

Orientador: Prof.^a Doutora Catarina Pereira Leite

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

Lisboa

2021

JOÃO MANUEL BARRETO VIEIRA

**OS TRANSFEROSSOMAS COMO SISTEMAS DE
VEICULAÇÃO DO IBUPROFENO PARA
ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 12/07/2021, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º:216/2021, de 22 de Junho, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof.^a Doutora Tânia Almeida

Orientador: Prof.^a Doutora Maria Catarina Leite

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

Lisboa

2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Catarina Pereira Leite toda a disponibilidade, apoio e interesse ao longo de todo este projeto. Obrigado por me proporcionar todos os meios para concretizar este objetivo final.

Também quero expressar a minha enorme gratidão aos meus pais, por me darem a oportunidade de seguir este caminho e ainda por me terem apoiado em todos os momentos difíceis da minha carreira académica.

Todo o meu apreço ainda para a minha irmã, assim como para o meu cunhado, e para toda a restante família, pelo apoio ilimitado.

Um agradecimento especial para a Inês Castilho, pelo contributo especial que deu à minha vida. Pela sua paciência, incentivo constante e ainda por me guiar sempre no sentido do sucesso.

Aos meus amigos de sempre e aos membros da equipa “Dream Team”, quero deixar um enorme obrigado, pelo companheirismo, pela entreajuda e ainda pelos bons momentos e boas memórias que ficam gravadas para sempre.

Por fim, estou profundamente grato a todos aqueles que participaram neste percurso de 5 anos. A todos vós dedico este trabalho.

Resumo

A utilização de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) para o tratamento de várias patologias, como a dor e a inflamação, representa uma elevada percentagem da utilização de medicamentos em todo o mundo. Apesar da eficácia demonstrada, os AINES não seletivos, como o ibuprofeno, estão habitualmente associados a efeitos adversos que conferem um risco à sua utilização crónica. A pele surge então como alternativa para a administração de AINES, contudo, a veiculação transcutânea está limitada pela reduzida capacidade de permeação dos compostos terapêuticos através da barreira cutânea. De forma a solucionar este problema, têm vindo a surgir várias abordagens nanotecnológicas, que favorecem a veiculação mais segura e eficaz dos compostos bioativos através da pele.

Tendo isto em mente, o principal objetivo desta dissertação foi o desenvolvimento e otimização de uma formulação transferossomal de ibuprofeno de sódio para administração transdérmica. Inicialmente, foram realizados estudos de pré-formulação para se caracterizarem as propriedades espectrofotométricas do ibuprofeno de sódio e a sua solubilidade aquosa. De seguida, foram realizados estudos preliminares no sentido de se seleccionar a composição qualitativa e quantitativa dos transferossomas a desenvolver. Por último, procedeu-se à otimização da formulação com recurso a um desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BBD). Para tal, foram realizados estudos que consistiram na avaliação do impacto da concentração lipídica, do rácio de ativadores de superfície (AS) e do tempo de sonicação no tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) dos transferossomas. Com base na análise estatística dos dados obtidos, definiu-se então a formulação ótima com base nos critérios desejáveis pré-definidos para o tamanho, o PDI e o PZ dos transferossomas.

A formulação transferossomal otimizada apresentou propriedades físico-químicas promissoras: 115 ± 2 nm (tamanho), $0,19 \pm 0,02$ (PDI) e $0,1 \pm 0,4$ mV (PZ), em linha com as previsões teóricas do BBD, sendo assim possível validar o desenho experimental implementado neste estudo. Ainda que haja ainda espaço para melhor otimizar a formulação transferossomal obtida, os resultados deste trabalho representam um grande avanço quanto à veiculação transdérmica do ibuprofeno de sódio.

Palavras Chave: AINES, sistemas de veiculação vesiculares, nanotecnologia, desenho fatorial do tipo Box-Behnken.

Abstract

The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for the treatment of various disorders, such as pain and inflammation, accounts for a high percentage of drug use worldwide. Despite their demonstrated efficacy, non-selective NSAIDs, such as ibuprofen, are commonly associated with adverse effects that pose a risk to their chronic use. The skin then emerges as an alternative route for the administration of NSAIDs, however, transcutaneous delivery is limited by the reduced ability of therapeutic compounds to permeate through the skin barrier. With the intention of overcome this issue, many nanotechnological procedures have been emerging, which favor safer and more effective delivery of bioactive compounds through the skin.

Having this in mind, the principal objective of this dissertation was the development and optimization of a transfersomal formulation of ibuprofen sodium for transdermal administration. Initially, pre-formulation studies were performed to characterize the spectrophotometric properties of ibuprofen sodium and its aqueous solubility. Then, preliminary studies were performed to select the qualitative and quantitative composition of the transfersomes to be developed. Finally, the formulation was optimized using a Box-Behnken factorial design (BBD). To this end, studies were conducted to evaluate the impact of lipid concentration, the ratio of edge activators (EA), and sonication time on the size, polydispersity index (PDI), and zeta potential (PZ) of the transfersomes. Based on the statistical analysis of the obtained data, the optimal formulation was then defined based on the predefined desirable criteria for the size, PDI and PZ of the transferosomes.

The optimized transfersomal formulation showed promising physicochemical properties: 115 ± 2 nm (size), 0.19 ± 0.02 (PDI) and 0.1 ± 0.4 mV (PZ), in line with the theoretical BBD predictions, thus it was possible to validate the experimental design implemented in this study. Although there is still room to better optimize the obtained transfersomal formulation, the results of this work represent a great advance regarding the transcutaneous delivery of ibuprofen sodium.

Keywords: NSAIDs, vesicular delivery systems, nanotechnology, Box-Behnken factorial design.

Abreviaturas e Símbolos

AA	Ácido Araquidónico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
AS	Ativadores de superfície
BBD	Desenho fatorial do tipo Box-Behnken
CC	Capacidade de carga
CE	Envelope Cornificado
COX	Cicloxigenase
Coxibs	Anti-inflamatórios seletivos da COX-2
EE	Eficiência de Encapsulação
FA2	Enzima Fosfolipase
FD	Fator de Diluição
GI	Gastrointestinal
HLB	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
IBU	Ibuprofeno de sódio
LOX	Lipoxigenase
Lt	Leucotrienos
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLVs	Vesículas multilamelares
MVV	Vesículas multivesiculares
OTC	<i>Over the counter</i>
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PC	Lecitina de Soja
PDI	Índice de polidispersão

PGI₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
pK_a	Constante de dissociação ácida
PZ	Potencial Zeta
SC	Estrato córneo
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
Tx	Tromboxanos
ULVs	Vesículas unilamelares
UV/Vis	Ultravioleta-visível

Índice

A. INTRODUÇÃO	1
1. Pele	4
1.1 Anatomofisiologia da pele.....	4
1.2 Barreira epidérmica	8
1.3 Vias de permeação cutânea.....	10
2. Anti-inflamatórios não esteroides.....	12
2.1 Mecanismo de Ação	13
2.2 Toxicidade	15
2.3 Ibuprofeno	16
3. Administração Transdérmica.....	18
4. Abordagens nanotecnológicas	19
5. Sistemas vesiculares	21
5.1 Lipossomas	22
5.2 Etossomas	26
5.3 Niossomas.....	29
5.4 Transferossomas	31
6. Sistemas vesiculares em desenvolvimento para veicular o ibuprofeno.....	34
7. Motivação e objetivos	36
 B. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 38
8. Materiais	39
9. Curva de Calibração	39
10. Estudos de solubilidade	40
11. Preparação de transferossomas	40
12. Caracterização dos transferossomas	41
12.1 Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	41
12.2 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga	41
13. Otimização dos transferossomas	42
 C. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 44
14. Estudos de pré-formulação	45
15. Estudos preliminares.....	48
16. Otimização dos transferossomas	54

D. CONCLUSÃO.....	60
E. REFERÊNCIAS.....	63

Índice de Tabelas

Tabela 1. Vantagens da utilização de vesículas lipídicas (Chacko et al., 2020; Escobar-Chavez et al., 2012)	21
Tabela 2. Sistemas vesiculares em estudos pré-clínicos para a administração de ibuprofeno.....	34
Tabela 3. Concentrações das soluções padrão de ibuprofeno de sódio preparadas para determinação da curvas de calibração em água e tampão PBS.	39
Tabela 4. Variáveis do desenho fatorial Box-Behnken, com respetivos níveis e critérios de desejabilidade.....	43
Tabela 5. Solubilidade do ibuprofeno de sódio (Ibu) em diferentes solventes (n=3, média $\pm$ desvio padrão)	46
Tabela 6. Propriedades físico-químicas de várias formulações transferossomais produzidas com 1% (m/v) de lecitina de soja (PC), várias composições de ativadores de superfície e de ibuprofeno de sódio (IBU), considerando 10 min como tempo de sonicação.	48
Tabela 7. Composição das formulações transferossomais produzidas de acordo com as variáveis independentes pré-estabelecidas e respetiva caracterização das variáveis dependentes em estudo.	54
Tabela 8. Valores ótimos dos fatores (X_1 , X_2 , X_3) necessários ao desenvolvimento da formulação otimizada e as suas respetivas respostas previstas teoricamente e obtidas experimentalmente.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura da pele. Retirado de (Martiderm, 2021).	4
Figura 2. Camadas da epiderme. Adaptado de (Seeley et al., 2008).	6
Figura 3. Vias de permeação através da pele. Retirado de (Alkilani, McCrudden, & Donnelly, 2015).	10
Figura 4. AINES tradicionais (1 e 2) e AINES seletivos da COX-2 (3 e 4). Retirado de (Rao & Knaus, 2008).	14
Figura 5. Estrutura química do ibuprofeno. Retirado de (Patel et al., 2013).	17
Figura 6. Vectorização de fármacos. Adaptado de (Bulbake et al., 2017).	19
Figura 7. Estrutura de um lipossoma. Adaptado de (Carita, Eloy, Chorilli, Lee, & Leonardi, 2018).	22
Figura 8. Mecanismo de ação dos lipossomas. Retirado de (Murthy & Shivakumar, 2010).	23
Figura 9. Classificação das várias categorias de lipossomas. Retirado de (Venuganti & Perumal, 2009).	25
Figura 10. Estrutura de um etossoma. Adaptado de (Kapoor, GuhaSarkar, & Banerjee, 2017).	26
Figura 11. Mecanismos de ação dos etossomas. Retirado de (Venuganti & Perumal, 2009).	27
Figura 12. Estrutura de um niossoma. Retirado de (Raza et al., 2014).	29
Figura 13. Estrutura de um transferossoma. Retirado de (Opatha et al., 2020).	31
Figura 14. Curva de calibração do ibuprofeno de sódio (IBU) em água bidestilada. ...	45
Figura 15. Curva de calibração do ibuprofeno de sódio (IBU) em tampão PBS (pH 7,4).	45
Figura 16. Aspeto macroscópico da Formulação 1 (à esquerda) e da Formulação 2 (à direita).	50
Figura 17. Tamanho (painel superior) e PDI (painel inferior) das formulações 1, 5 e 6 em função do tempo de sonicação.	52

Figura 18. Tamanho (painel superior) e PDI (painel inferior) de transferossomas produzidos com 1% (m/v) de lecitina de soja, (Tween®80:ácido esteárico):PC (10:5):85% (m/m) na ausência de ibuprofeno de sódio em função do tempo de sonicação. 53

Figura 19. Efeito da variação dos fatores – concentração de lípido (X_1), razão Tween® 80/Span® 80 (X_2) e tempo de sonicação (X_3) – no tamanho dos transferossomas. 56

Figura 20. Efeito da variação dos fatores – concentração de lípido (X_1), razão Tween® 80/Span® 80 (X_2) e tempo de sonicação (X_3) – no PDI dos transferossomas. 57

Figura 21. Efeito da variação dos fatores – concentração de lípido (X_1), razão Tween® 80/Span® 80 (X_2) e tempo de sonicação (X_3) – no potencial zeta dos transferossomas. 57

A. Introdução

A. Introdução

A veiculação de um fármaco para um determinado órgão ou tecido, com vista a um tratamento terapêutico eficaz, pode ser problemático devido aos vários fatores implicados. Existem várias vias para a administração de fármacos, contudo, a sua entrega no local alvo é ainda um desafio, pelo que é necessário ter em conta as vantagens e desvantagens da via escolhida e também as propriedades do fármaco, nomeadamente o seu tamanho, a sua degradação e a sua distribuição pelo organismo (Opatha, Titapiwatanakun, & Chutoprapat, 2020; Singh, Pradhan, Nag, & Singh, 2015).

É do conhecimento geral há várias décadas que o uso de anti-inflamatórios não esteroides através da via oral está intimamente ligado ao surgimento de efeitos adversos, sendo que esse conhecimento levou ao estudo de possíveis vias alternativas. De todas as vias disponíveis, a via transdérmica assume-se como a via mais promissora, porque poderá aumentar o perfil de segurança destes fármacos, através da redução dos seus efeitos adversos, em particular a nível gastrointestinal. (Kumar, Verma, Singh, Chalotra, & Utreja, 2018)

A via transdérmica tem-se demonstrado mais e mais como uma via eficiente para a veiculação de fármacos. No entanto, esta via possui um entrave que dificulta a sua utilização, a barreira natural da pele. A barreira cutânea tem diversas funções e, entre elas, está a proteção contra a penetração de agentes externos, pelo que a eficácia dos fármacos administrados pela via transdérmica está dependente da sua passagem através da mesma. Entre as várias camadas da pele, o estrato córneo com a sua matriz lipídica desempenha um papel fundamental para a sua função de proteção. (Kumar et al., 2018; Singh et al., 2015)

Com o objetivo de ultrapassar as limitações impostas pela barreira cutânea e pelas propriedades do fármaco a administrar, surgiu uma nova perspetiva que se baseia no estudo e desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos baseados em nanotecnologia, globalmente conhecidos por nanossistemas.

Os nanossistemas são sistemas de tamanho nanométrico e com propriedades biológicas e físico-químicas otimizadas, que os tornam capazes de aumentar o transporte de fármacos através da barreira cutânea. Estes sistemas podem ser eventualmente funcionalizados, obtendo uma composição alternada, de modo a perturbar a organização do estrato córneo, permitindo a sua passagem através do mesmo, proteger o fármaco de fenómenos de degradação e permitir a sua entrega de modo controlado e num local

específico. A escolha do nanossistema a utilizar deve, então, obedecer às características biofísicas e bioquímicas do fármaco a incluir no sistema e deve também adequar-se à via de administração, porque as suas propriedades determinam o tipo de comportamento que irá ter no organismo. (Escobar-Chavez et al., 2012; Patra et al., 2018; Uchechi, Ogbonna, & Attama, 2014)

A administração de fármacos anti-inflamatórios pela via transdérmica poderá ser bastante promissora, em particular, se forem utilizadas abordagens nanotecnológicas como sistemas de veiculação. Das várias abordagens conhecidas, vários nanossistemas vesiculares como os lipossomas, transferossomas, etossomas e niossomas, têm sido amplamente explorados para administração cutânea, sendo que, atualmente, os transferossomas se encontram em maior destaque. Os transferossomas são particularmente vantajosos para administração transdérmica pela sua ultradeformabilidade, uma vez que, é através desta que estes conseguem atingir zonas mais profundas da pele. (El Zaafarany, Awad, Holayel, & Mortada, 2010; Ghanbarzadeh & Arami, 2013)

Perante esta informação, a secção introdutória desta dissertação passará por expor os desafios relacionados com a administração de anti-inflamatórios não esteroides, em particular do ibuprofeno, objeto de estudo neste caso. Para além do mais, será revista em pormenor a utilidade da nanotecnologia para facilitar a administração transdérmica de fármacos, em particular, dos nanossistemas vesiculares, com maior ênfase quanto aos transferossomas.

1. Pele

1.1 Anatomofisiologia da pele

A pele (Figura 1) é o maior e mais evidente órgão do corpo humano, sendo que cobre toda a superfície do corpo e representa cerca de 15% do peso corporal. A pele exerce múltiplas funções vitais, nomeadamente, interação com meio ambiente, proteção contra agressões externas, prevenção da perda excessiva de água e regulação da temperatura. Estas funções são sustentadas graças a uma elaborada estrutura que associa tecidos de diversas origens (epitelial, conetiva, vascular, muscular e nervosa), que se organizam em três camadas: a hipoderme, a derme e a epiderme. (Kanitakis, 2002)

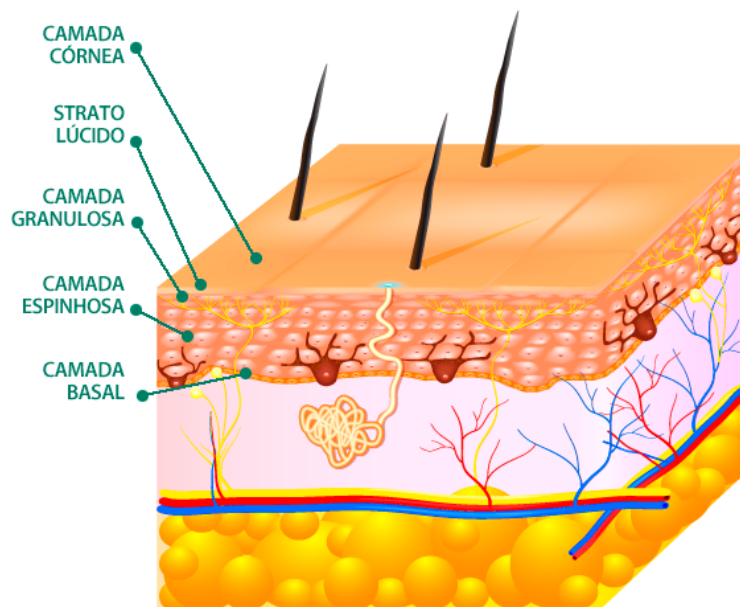


Figura 1. Estrutura da pele. Retirado de (Martiderm, 2021).

A hipoderme, camada cutânea mais interna, é uma forma especializada de tecido conjuntivo laxo, sendo essencialmente constituída por adipócitos. Os adipócitos são células responsáveis pelo armazenamento de reservas de gordura e coexistem na hipoderme juntamente com alguns vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Adicionalmente, é na hipoderme que se localiza uma elevada parte da gordura do corpo humano, onde funciona como fonte de energia, isolamento e acolchoamento. (Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011; Seeley, Stephen, & Tate, 2008)

A derme, camada intermédia, é um sistema integrado de tecido conjuntivo fibroso, filamentosos e amorfo que está ligado à epiderme através da membrana basal na junção dermo-epidérmica. Este tecido é composto maioritariamente por fibroblastos, e ainda por alguns adipócitos e macrófagos. Em termos de constituição, esta camada é rica em moléculas fibrosas que são produzidas pelos fibroblastos, nomeadamente as fibras de elastina, as fibras reticulares e o colagénio, que se constitui como a principal. (Kanitakis, 2002; Kolarsick et al., 2011; Seeley et al., 2008)

A derme pode ser dividida em duas zonas maioritárias: a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar ou camada superior é mais fina do que a derme reticular e o seu tecido conjuntivo é mais laxo. A derme reticular ou camada inferior é mais espessa e o seu conteúdo é mais denso. As suas funções incluem proteção da epiderme, proteção dos nervos e recetores capazes de detetar estímulos sensoriais e ainda fornecimento de resistência à tração, flexibilidade e elasticidade. (Campbell & Lichtensteiger, 2016)

A epiderme, camada presente na extremidade cutânea, é constituída por um epitélio estratificado e escamoso onde residem vários tipos de células, nomeadamente queratinócitos, melanócitos, células dendríticas, células de Merkel e células de Langerhans. Apesar da variabilidade das células presentes na epiderme, é possível distinguir dois grandes grupos com base na sua proporção, sendo que o primeiro é representado pelos queratinócitos (90-95%) e o segundo pelas outras populações de células (5-10%). (Kanitakis, 2002; Kolarsick et al., 2011)

As células da epiderme, têm origem nas suas camadas inferiores, através de um processo de divisão celular, em que as novas células empurram as mais maduras em direção à sua superfície. Durante este percurso, estas células sofrem algumas alterações na sua composição e na sua morfologia, num processo que se denomina queratinização. Apesar da queratinização ser um processo cíclico, é possível reconhecer diferentes fases de transição em que as células se alteram, pelo que com base nestas fases, é possível diferenciar a epiderme em 4 camadas (Figura 2): camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. (McLafferty, Hendry, & Farley, 2012)

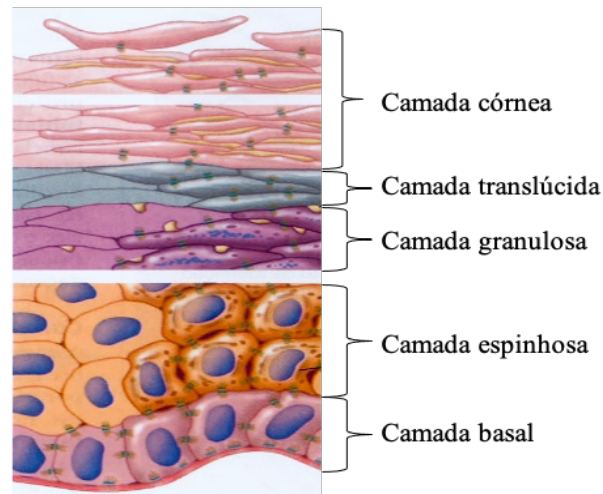


Figura 2. Camadas da epiderme. Adaptado de (Seeley et al., 2008).

A camada basal, também conhecida como estrato germinativo, é a camada mais profunda da epiderme e é composta por células estaminais, também denominadas células basais. Estas células sofrem mitose e dividem-se para dar origem a queratinócitos, que por sua vez, dão origem às células das restantes camadas epidérmicas. Neste sentido, a camada basal é considerada a localização primária das células mitoticamente ativas, uma vez que é a única camada da epiderme que consiste em células capazes de se dividir. (Campbell & Lichtensteiger, 2016; Kolarsick et al., 2011)

A camada espinhosa, também conhecida como estrato espinhoso, localiza-se acima da camada basal e denomina-se espinhosa devido ao facto de as suas células se encontrarem unidas por desmossomas, que lhes confere um aspeto espiculado. Particularmente, as células desta camada não têm capacidade para se dividir e, em consequência disso, unem-se através de desmossomas ou pontes intercelulares que permitem que exista resistência às agressões físicas. Adicionalmente, estas células diferem no aspeto e estrutura consoante a sua localização e à medida que migram em direção à superfície ficam mais achatadas. Por outro lado, é ainda importante referir que as células espinhosas contêm corpos lamelares que são essenciais para a integridade da epiderme, nomeadamente quanto ao fornecimento de precursores dos lípidos presentes no espaço extracelular da camada córnea. (Campbell & Lichtensteiger, 2016)

A camada granulosa, também designada estrato granuloso, localiza-se abaixo do estrato córneo e constitui-se como a primeira camada da epiderme que possui células vivas. O seu nome deve-se aos grânulos proteicos de querato-hialina que se acumulam no citoplasma das suas células. (Losquadro, 2017) Estas células são responsáveis pela síntese

e modificação das proteínas envolvidas na queratinização, nomeadamente através dos seus grânulos que são essenciais para a agregação dos filamentos de queratina com posterior formação de um invólucro proteico. (Kolarsick et al., 2011) Inicialmente, as células mais superficiais da camada granulosa perdem o seu núcleo e organelos, isto é, passam por um processo denominado apoptose. (McLafferty et al., 2012) Em seguida, estas células tornam-se queratinizadas, com um alto teor de queratina, e dão início à formação do estrato córneo.

O estrato córneo (SC), também conhecido como camada córnea, é a camada mais superficial da epiderme e é composto por corneócitos. Os corneócitos são células anucleadas e planas, que já sofreram diferenciação terminal (queratinização), e que se encontram rodeadas por uma matriz extracelular lipídica. Esta matriz advém de lípidos que são secretados pelos corpos lamelares e tem como função atuar como barreira natural da epiderme e ainda servir de meio para a promoção de ligações entre os corneócitos. Geralmente, a estrutura da camada córnea é representada pela teoria dos tijolos e do cimento, em que os corneócitos (tijolos) se encontram inseridos na matriz extracelular lipídica (cimento). (Pouillot, Dayan, Polla, Polla, & Polla, 2008)

Em síntese, cada uma das camadas da epiderme representa uma etapa da vida de uma célula epidérmica, desde a camada mais profunda até à superficial. (McLafferty et al., 2012)

1.2 Barreira epidérmica

Tal como descrito anteriormente, a pele possui diversas funções essenciais, entre as quais a proteção do corpo contra agressões e agentes indesejáveis provenientes do meio ambiente. Esta proteção é conferida pela barreira cutânea que se constitui como um conjunto de barreiras mecânicas que atuam sinergicamente para limitar a passagem de moléculas estranhas para o interior da pele. Assim, a barreira cutânea é considerada o problema maioritário para a aplicação transcutânea de fármacos.

Na pele podem ser encontradas diversas barreiras mecânicas, sendo que as principais se localizam na camada epidérmica. Na epiderme podem ser encontradas barreiras no SC, nas junções oclusivas e na membrana basal. Para além disso, também se consideram como barreiras adicionais, os vasos sanguíneos e os anexos cutâneos, especificamente os folículos pilosos e as glândulas. (Gorzalanny, Mess, Schneider, Huck, & Brandner, 2020)

Primeiramente, o SC tem como função servir como barreira primária para a penetração da maioria dos fármacos. A origem deste estrato é da responsabilidade da epiderme viável e resulta da fase terminal do processo de queratinização, em que, através de diversas mudanças na estrutura e composição, os queratinócitos adultos originam células mortas, denominadas corneócitos. Os corneócitos são células que se apresentam compactadas na superfície da pele. Estas células caracterizam-se pela acumulação de filamentos de queratina no seu interior, graças à proteína filagrina, e também pela presença de um envelope cornificado (CE) que as rodeia. O CE é uma estrutura mista composta por um envelope lipídico e um proteico, que se forma no local da membrana plasmática, e que reside no meio extracelular. Adicionalmente, os corneócitos encontram-se unidos através de desmossomas e em seu redor possuem uma matriz constituída por lípidos apolares que, tal como referido anteriormente, são libertados pelos corpos lamelares (Gorzalanny et al., 2020; Proksch, Brandner, & Jensen, 2008; Seeley et al., 2008)

Os corpos lamelares surgem nas células granulosas e desempenham um papel essencial para o SC, sendo responsáveis pela entrega dos lípidos necessários para a sua formação. No decorrer do processo de entrega, os corpos lamelares deslocam-se para a membrana celular das células granulosas e libertam lípidos, assim como um conjunto de enzimas hidrolíticas no espaço extracelular. Após o momento de exocitose, os lípidos

polares sofrem ação das enzimas e são convertidos em produtos apolares, tais como ceramidas, ácidos gordos e colesterol. (Seeley et al., 2008)

Assim sendo, é possível perceber que no SC existem diversos fatores que estão relacionados com a sua função de barreira. Por um lado, os lípidos apolares estão fundamentalmente ligados à função de barreira, na medida em que o seu conteúdo, composição e organização afetam a permeação de compostos. Por outro, é também importante realçar o papel da filagrina, que não contribuindo diretamente para a função de barreira, está envolvida na organização estrutural dos corneócitos e na manutenção do SC. Tendo em conta os diversos aspetos apresentados, o SC constitui-se como uma barreira altamente seletiva, de tal forma que apenas algumas moléculas conseguem ultrapassá-lo e penetrar nas camadas mais profundas da pele. (Gupta, Dwadasi, Rai, & Mitragotri, 2019; Kezic & Jakasa, 2016)

Seguidamente, as junções oclusivas surgem como uma barreira contínua localizada no estrato granuloso da epiderme. Estas junções consistem em proteínas de adesão transmembranares que selam as membranas plasmáticas de células adjacentes e controlam a difusão de moléculas entre os compartimentos celulares. Deste modo, as junções oclusivas formam uma barreira seletiva para as moléculas que circulam através da via intercelular. (Gorzalanny et al., 2020)

Por último, a membrana basal é uma interface que se localiza junto do estrato basal na junção dermo-epidérmica, isto é, entre o limite inferior da epiderme e o limite superior da derme. Esta membrana consiste numa matriz reticulada constituída por diferentes proteínas e hidratos de carbono. Relativamente às suas funções, é de realçar que esta membrana é essencial para a adesão da camada epidérmica à dérmica, funcionando também como barreira semipermeável e, por isso, é também considerada uma barreira epidérmica. (Campbell & Lichtensteiger, 2016; Gorzalanny et al., 2020)

1.3 Vias de permeação cutânea

Apesar do SC desempenhar a função primordial de barreira para controlar a penetração de compostos na pele, têm sido estudadas várias abordagens com vista a ajudar ou melhorar a permeação de certos compostos com interesse clínico na pele. Perante esta situação, o conhecimento das diversas vias de permeação cutânea é essencial.

A permeação cutânea de compostos através da pele envolve a sua difusão inicial através da epiderme e também através dos denominados canais naturais da pele, mais conhecidos como apêndices cutâneos. (Uchechi et al., 2014) Assim, existem dois trajetos principais de permeação pelas quais um composto pode atravessar o SC, sendo estes a rota dos apêndices cutâneos e a rota transepidérmica (Figura 3).

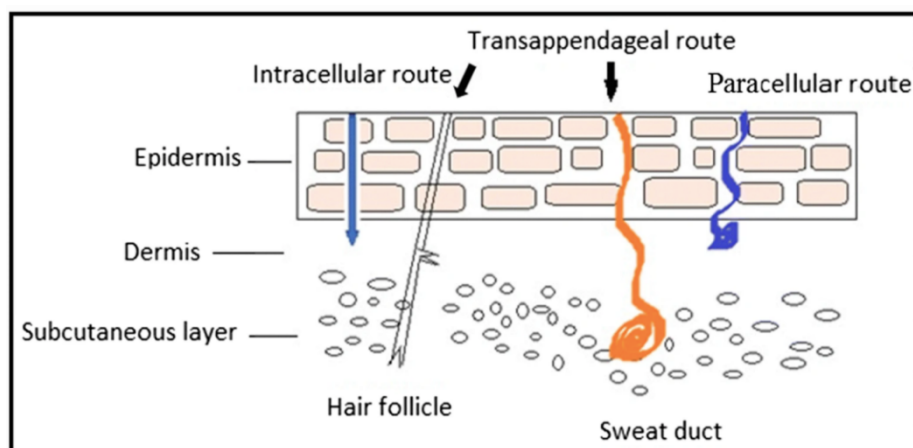


Figura 3. Vias de permeação através da pele. Retirado de (Alkilani, McCrudden, & Donnelly, 2015)

A via dos apêndices é constituída pelos canais naturais da pele, que são hidrofílicos, e inclui a permeação através das glândulas (sebáceas e sudoríparas) e dos folículos pilosos. Apesar de ser considerada como uma possibilidade para a permeação, a via dos apêndices não é considerada primária para a permeação cutânea, porque os apêndices ocupam apenas uma pequena porção da área total da superfície da pele. (El Maghraby, Barry, & Williams, 2008; Zhou et al., 2018)

Relativamente à via transepidérmica, esta consiste na permeação dos compostos através do SC, com entrada na derme e eventual absorção sistémica através dos vasos sanguíneos. Aquando da passagem dos compostos pelo SC, a via transepidérmica assume duas vias secundárias, a via transcelular, que engloba a permeação através dos corneócitos

e dos lípidos intercelulares, e a via intercelular, que consiste na permeação exclusivamente pelos lípidos intercelulares.

Tendo em conta que a via transcelular implica a passagem através de dois compartimentos com diferentes afinidades para os compostos, esta é considerada a via com menor utilização, uma vez que requer processos de partição e difusão através dos mesmos. Por outro lado, o transporte pela via intercelular envolve a permeação dos compostos pelos lípidos que se encontram entre os corneócitos e é a principal forma de permeação para a maioria dos compostos. (Zhou et al., 2018)

Os lípidos intercelulares são compostos maioritariamente por ácidos gordos livres, ceramidas e colesterol, servindo como base para a matriz lipídica localizada entre os corneócitos. A matriz lipídica possui uma organização lamelar e está dividida em duas áreas: uma área permeável (fase líquida cristalina) e uma área não permeável (fase gel). O facto de a matriz lipídica apresentar esta organização permite que seja permeável a compostos lipídicos e anfifílicos, sendo que é a principal via de permeação na pele. Apesar de permitir a permeação de vários compostos, os lípidos intercelulares desempenham um papel essencial para a função barreira do SC, porque possuem ligações covalentes (formadas entre as suas ceramidas e as membranas dos corneócitos) que possibilitam a criação de uma rede densa e relativamente impermeável. (Escobar-Chavez et al., 2012; Pathak & Thassu, 2016; Pouillot et al., 2008)

2. Anti-inflamatórios não esteroides

O início da história dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) remonta aos primórdios da humanidade em que Hipócrates, pai da medicina, terá prescrito a casca de salgueiro no sentido de melhorar o estado geral de um indivíduo. Desde o tempo desta descoberta, os AINEs têm sido uma das classes farmacológicas mais utilizadas mundialmente em virtude da sua eficácia no alívio da dor e no tratamento da inflamação, sendo que ocupam uma elevada percentagem dos medicamentos prescritos atualmente. (Osafo, Agyare, Obiri, & Antwi, 2017)

O processo inflamatório é um mecanismo natural de defesa marcado pela resposta biológica e fisiológica dos tecidos a um estímulo de origem física, química ou infecciosa. Este processo tem como principal objetivo o isolamento da área afetada e inicia-se com um processo de vascularização inicial, que conduz à orientação de elementos celulares e mediadores químicos de origem plasmática ou celular para o local lesado. (Pinto & Rosa, 2013)

Na base de muitos processos fisiopatológicos, existe uma determinada agressão que atinge as membranas celulares, desencadeando a formação de diversos metabolitos que se denominam eicosanoides, entre os quais se incluem as prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LT) e os tromboxanos (Tx). Os eicosanoides são moléculas importantes com funções de regulação que participam na resposta inflamatória que surge após uma agressão. A produção de eicosanoides resulta de um processo inicial de recrutamento de citocinas inflamatórias para o local da lesão e na ativação da enzima fosfolipase A₂ (FA₂), que, por sua vez, hidrolisa os fosfolípidos presentes nas membranas celulares, dando origem ao ácido araquidónico (AA). (Hanna & Hafez, 2018)

O AA é um ácido gordo polinsaturado que está presente nas membranas celulares, sendo um substrato comum a duas enzimas: a cicloxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX). Quando o AA é metabolizado pela COX, as PGs, as prostaciclina (PGI₂) e os Tx são sintetizados. Por outro lado, se este for metabolizado pela LOX, são sintetizados os leucotrienos. Nesse sentido, o conjunto de metabolitos resultantes de ambas as vias enzimáticas (COX e LOX) denomina-se eicosanoides, como já referido anteriormente. (Pinto & Rosa, 2013)

Com o objetivo de reduzir ou eliminar os sintomas resultantes do processo inflamatório, os AINEs assumem-se como uma alternativa de primeira linha. Dentro da classe farmacológica dos AINEs, existem diversos perfis estruturais e farmacodinâmicos.

Contudo, todos os seus fármacos atuam no sentido de se obter os mesmos efeitos terapêuticos. Assim, apesar das diferenças estruturais dos AINES, estes são agrupados porque possuem propriedades terapêuticas semelhantes, incluindo as ações analgésica, anti-inflamatória e antipirética.

2.1 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação dos AINES fundamenta-se na inibição de duas isoenzimas COX, que se apresentam sob a forma de: COX-1 e COX-2.

A primeira (COX-1) é constitutiva e expressa-se na maioria das células e tecidos, como a mucosa gastrointestinal, as plaquetas, os rins e o endotélio vascular. Esta isoforma desempenha funções de regulação e está principalmente envolvida na homeostase dos tecidos, sendo o ponto de partida para a síntese de PGs, PGI₂ e Tx que controlam a função de barreira da mucosa do trato gastrointestinal (GI), a agregação plaquetária e a homeostase renal. (Osafo et al., 2017; Tomić, Micov, Pecikoza, & Stepanović-Petrović, 2017; Wongrakpanich, Wongrakpanich, Melhado, & Rangaswami, 2018)

A segunda (COX-2) é predominantemente indutível, sendo sobreexpressa aquando da lesão dos tecidos e após estímulo de marcadores inflamatórios nos macrófagos e sinoviócitos. Esta isoenzima está ativa nos locais de lesão, funciona como mediadora das repostas inflamatórias e é responsável pela produção de prostaglandinas relacionadas com a inflamação, dor e febre. (Osafo et al., 2017; Wongrakpanich et al., 2018)

Em conjunto, ambas as COX contribuem para a produção de prostanóides (conjunto de PG, PGI₂ e Tx) que estão envolvidos nas funções homeostáticas e inflamatórias. No entanto, a contribuição relativa destas duas isoenzimas difere, sendo que a COX-1 está mais relacionada com a manutenção da homeostase e a COX-2 com a indução da inflamação. (Tomić et al., 2017; Wongrakpanich et al., 2018)

Tendo em conta que os AINES atuam através da inibição da atividade das COX, o seu efeito está dependente da função fisiológica que cada enzima desempenha num determinado tecido. Neste sentido, a inibição da COX-2 está essencialmente relacionada com o efeito desejado da resposta anti-inflamatória, antipirética e analgésica, enquanto a inibição da COX-1 desempenha um papel importante na génese dos efeitos adversos indesejados, como a toxicidade no sistema GI e renal. (Wongrakpanich et al., 2018)

Segundo a tendência para a inibição de determinada isoforma, os AINES são agrupados em dois grandes grupos: os AINES tradicionais ou não seletivos, que apresentam diversos graus de seletividade, e AINES seletivos da COX-2.

Os AINES tradicionais (Figura 4) apresentam capacidade para inibir ambas as isoformas da COX. Contudo, alguns destes fármacos são mais efetivos na inibição da COX-1 do que a COX-2, sendo que apresentam maiores efeitos adversos e menor atividade terapêutica. Assim, com o intuito de diminuir a ocorrência de efeitos adversos e maximizar a eficácia da resposta anti-inflamatória, surgiram os AINES seletivos da COX-2, particularmente conhecidos por coxibs. (Rao & Knaus, 2008; Vane & Botting, 1998)

Os coxibs apresentam um mecanismo diferencial de inibição seletiva da COX-2 e assumiram-se inicialmente como uma alternativa credível aos AINES tradicionais com base em dois aspetos. O primeiro reside no facto de a enzima COX-2 estar intimamente ligada à produção de PGs inflamatórias, pelo que a sua inibição resulta na obtenção de um maior efeito anti-inflamatório. O segundo está relacionado com a segurança, dado que a inibição seletiva da COX-2 permite que a COX-1 continue a produzir prostaglandinas que possuem funções de manutenção e regulação do trato GI. (Harirforoosh, Asghar, & Jamali, 2014; Sostres, Gargallo, & Lanas, 2013)

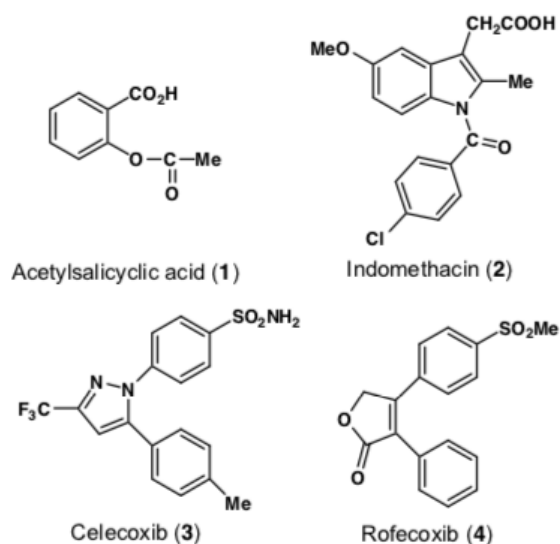


Figura 4. AINES tradicionais (1 e 2) e AINES seletivos da COX-2 (3 e 4). Retirado de (Rao & Knaus, 2008).

2.2 Toxicidade

Tal como referido anteriormente, os AINES são fármacos cujo mecanismo interfere com a homeostasia e as funções dos diversos sistemas presentes no corpo humano. Neste contexto, a utilização terapêutica dos AINES tem vindo a ser associada com a ocorrência de efeitos adversos que se apresentam em diversos sistemas de órgãos, nomeadamente no sistema GI, sistema renal e sistema cardiovascular. Os efeitos adversos são resultado da inibição das COX e a sua presença específica em determinados órgãos pode ser justificada com base na expressão das enzimas COX em determinados tecidos. (Harirforoosh et al., 2014)

Os AINES tradicionais, que inibem ambas as isoformas da COX, são essencialmente responsáveis pela ocorrência de efeitos adversos no trato GI (dispepsia, úlceras e sangramento), não sendo de excluir a sua participação em fenómenos tóxicos que envolvam o sistema renal e o sistema cardiovascular. Por outro lado, os coxibs estão principalmente associados a efeitos adversos no sistema cardiovascular (enfarte do miocárdio, hipertensão e insuficiência cardíaca). Em sequência, é efetivamente importante perceber que a ocorrência dos efeitos adversos está diretamente relacionada com a capacidade que os AINES apresentam para bloquear as isoformas da COX. (Schjerning, McGettigan, & Gislason, 2020; Sostres et al., 2013)

Atualmente, existem muitas preocupações associadas à segurança dos AINES, uma vez que estes não possuem um elevado perfil de segurança, e que a mesma está comprometida pelo seu uso em doses superiores, por longos períodos e ainda por doentes de risco. A toxicidade relacionada com os AINES está intimamente ligada à sua via de administração, pelo que existe a necessidade de ajustar a sua avaliação toxicológica a este aspeto. (Balmaceda, 2014)

No geral, o tratamento da dor e inflamação inclui o uso de AINES, quer seja sob a forma oral ou tópica. Os AINES, quando administrados por via oral, sofrem absorção e são distribuídos pelo sangue para todas as partes do corpo, com o objetivo de atingir altas concentrações plasmáticas e teciduais passíveis de serem eficazes no local da dor ou inflamação. Nesse sentido, as altas concentrações assumem-se como essenciais, mas em contrapartida, constituem-se como um mais que provável problema de toxicidade, nomeadamente pelo facto de aumentarem a probabilidade da ocorrência de vários efeitos adversos. (Derry, Conaghan, Da Silva, Wiffen, & Moore, 2016)

Inicialmente, estas necessidades levaram ao desenvolvimento e à utilização de coxibs, que se julgava serem alternativas seguras aos AINES tradicionais. No entanto, com o decorrer do tempo, foi comprovado que estes fármacos não conseguiam mitigar as preocupações em torno dos efeitos adversos, e por isso, surgiram novas formulações, os AINES tópicos. (Balmaceda, 2014)

Os AINES para administração tópica são formulações com melhores perfis de segurança e aparecem como uma potencial alternativa para reduzir o risco das formulações orais. (Zeng et al., 2018) As formulações tópicas possuem o mesmo mecanismo de ação do que as orais, onde inicialmente procuram atingir uma concentração ótima que lhes permita inibir as enzimas COX e assim produzir os efeitos terapêuticos desejados. Porém, estas formulações possuem determinadas características que lhes conferem maior segurança, com o mesmo efeito benéfico das formulações orais. As características residem no facto das formulações tópicas apresentarem menor distribuição pelo organismo e ainda de evitarem o efeito de primeira passagem, que lhes permite obter o mesmo efeito sem que seja necessário aumentar a dose. (Balmaceda, 2014; Hawthorn, 2020)

Em síntese, os AINES tópicos possuem diversas vantagens que se traduzem num aumento de eficácia e segurança (por elevada ação local sem exposição sistémica elevada), devendo, por isso, ser considerados como uma alternativa interessante para evitar a toxicidade dos AINES orais. (Hawthorn, 2020; Rannou, Pelletier, & Martel-Pelletier, 2016)

2.3 Ibuprofeno

O ibuprofeno é um anti-inflamatório tradicional que se insere no grupo dos “over-the-counter” (OTC) e assume-se como um dos AINES de maior utilização pela população no geral, devido à facilidade com que pode ser adquirido. (Rainsford, 2013) O seu mecanismo de ação consiste na inibição não seletiva da atividade de ambas as COX e na redução da síntese de PG, sendo que é usado no tratamento de várias condições clínicas que envolvam dor e inflamação.

O ibuprofeno é um ácido carboxílico (Figura 5) e a sua farmacocinética é marcada pela sua baixa solubilidade no estômago devido ao seu elevado pK_a e, para além disso, pelo seu elevado efeito de primeira passagem, pelo que parte da sua dosagem inicial é metabolizada. (Irvine, Afrose, & Islam, 2018; Rainsford, 2013)

Tendo em conta o seu mecanismo, o ibuprofeno predispõem-se como um dos AINES responsáveis por efeitos adversos relacionados com o trato GI. O ibuprofeno encontra-se disponível no mercado sob a forma várias apresentações orais (comprimidos, cápsulas, soluções e suspensões) e tópicas (géis, pomadas, cremes e sprays). As apresentações orais foram as primeiras a surgir e apresentam uma alta eficácia para suprimir a dor e a inflamação generalizadas, embora sejam responsáveis pela maioria dos efeitos adversos do ibuprofeno. Deste modo, surgiram as apresentações tópicas, que são administradas na superfície da pele e atuam essencialmente ao nível dos tecidos, sendo que também poderão permitir, de forma limitada, a entrega do fármaco para a corrente sanguínea. As formulações tópicas são teoricamente preferidas em relação às formulações orais, porque possuem diversas vantagens que residem na sua facilidade de administração e ainda no facto de estarem pouco relacionadas com a ocorrência de efeitos adversos.

Apesar de se constituírem como uma ótima alternativa ao uso das formulações orais, as formulações tópicas apresentam uma menor biodisponibilidade, pelo que, atualmente, não existe evidência suficiente que possa comprovar que a sua eficácia seja semelhante à existente nas formulações orais. (Derry et al., 2016) Assim, as formulações tópicas de ibuprofeno são recomendadas apenas para condições clínicas mais localizadas, sendo que têm sido realizados estudos para otimizar a sua administração e a abrangência da sua eficácia. (Irvine et al., 2018)

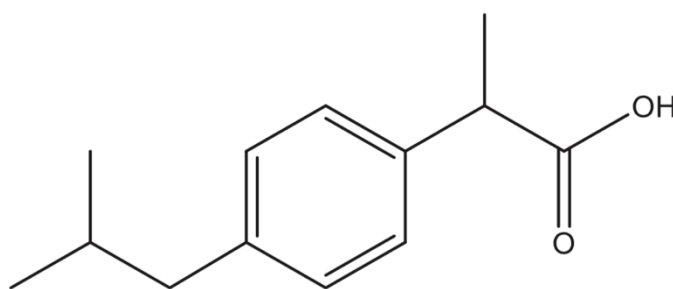


Figura 5. Estrutura química do ibuprofeno. Retirado de (Patel et al., 2013)

3. Administração Transdérmica

As preparações transdérmicas remontam aos tempos do antigo Egito, em que foram utilizadas matérias de diversas origens para o tratamento de patologias da pele, que se encontram descritas no papiro de Ebers. No século XI, Avicena, autor do segundo volume do Cânone de Medicina, terá sido o primeiro a abordar a sua utilização, defendendo que estas preparações possuíam essencialmente duas porções, a porção mole que penetrava na pele, e a porção dura que não penetrava. Através da sua forma de encarar a administração transdérmica, Avicena desenvolveu o que se considera como a base para o conhecimento atual. (H. A. E. Benson, Grice, Mohammed, Namjoshi, & Roberts, 2019)

Inicialmente, a administração transdérmica era considerada linear e baseava-se na inclusão de um composto bioativo num veículo, capaz de ser doseado na superfície da pele, para obtenção de um efeito terapêutico. (Kumar et al., 2018) Porém, com o avançar dos tempos, alcançou uma nova dimensão e constituiu-se como uma alternativa à administração por outras vias, sendo utilizada para o tratamento de diferentes patologias. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005; Prausnitz & Langer, 2008) Assim, atualmente, a administração transdérmica define-se como o transporte de compostos bioativos através da pele que tem como objetivo alcançar a circulação sistémica ou um determinado tecido alvo. (Brown, Martin, Jones, & Akomeah, 2006; Singh et al., 2015)

A administração transdérmica possui inúmeras vantagens em relação a outros métodos de administração, sendo que estas incluem: maior segurança no que diz respeito a possíveis efeitos adversos, maior eficácia porque evita alguns processos metabólicos e enzimáticos (como o efeito de primeira passagem) e ainda maior adesão dos doentes à terapêutica devido à facilidade de administração. (Singh et al., 2015) No entanto, embora disponha de inúmeras vantagens, a administração transdérmica ainda padece de algumas desvantagens que residem principalmente na resistência da barreira cutânea à permeação de compostos bioativos, nos possíveis efeitos locais devido à libertação imediata dos compostos e ainda na necessidade de repetição de aplicação em alguns casos. (Rajendran, Kumar, Houreld, & Abrahamse, 2018; Zhou et al., 2018)

Como forma de ultrapassar os desafios da administração transdérmica surge a área da nanomedicina. A utilização de estratégias nanotecnológicas poderá ser uma solução ideal, na medida em que promove uma sinergia entre as vantagens da administração transdérmica, propriamente dita, e as vantagens adjacentes à utilização de nanossistemas.

4. Abordagens nanotecnológicas

Nas últimas décadas, a administração transdérmica de fármacos tem sido potenciada em virtude das suas vantagens em relação a outras vias. Porém, apesar das suas vantagens, o seu uso ainda é reduzido. Atualmente, existem muitos desafios que afetam a sua possível utilização, nomeadamente a complexidade das características físico-químicas das moléculas bioativas e a sua inacessibilidade aos alvos terapêuticos. (Pathak & Thassu, 2016) Nesse sentido, para ultrapassar estes problemas, nasceu o interesse pela nanomedicina, que se define como a aplicação da nanotecnologia no campo da medicina, através do uso das propriedades dos nanomateriais e nanossistemas. (Patra et al., 2018)

A nanotecnologia baseia-se na produção e aplicação de sistemas ou estruturas baseadas na manipulação da forma e tamanho de nanomateriais, cujo tamanho varia entre 1 e 1000 nm. (Kumar et al., 2018; Santos et al., 2019) Nos últimos tempos, a nanotecnologia tem-se constituído como elo de ligação entre as áreas das ciências biológicas e físicas, no sentido de alcançar novos avanços tecnológicos, especialmente no campo da medicina. (Patra et al., 2018)

Tendo em conta as dificuldades apresentadas pela administração transdérmica, a nanotecnologia oferece a possibilidade de vectorização de fármacos, ou seja, libertação dirigida dos mesmos. A vectorização de fármacos (Figura 6) é conseguida através da utilização de nanossistemas que se baseiam na inserção de um fármaco num vector e têm como propósito principal, a maximização da eficácia e da segurança de administração de determinados fármacos, obtendo possíveis avanços terapêuticos.

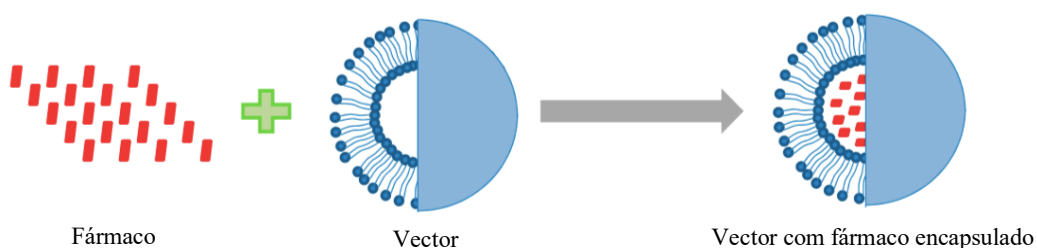


Figura 6. Vectorização de fármacos. Adaptado de (Bulbake et al., 2017).

Neste contexto, para que se possa atingir o principal propósito, o desenvolvimento de nanossistemas procura: tornar a distribuição do fármaco apenas dependente das características do vector, melhorar a transposição das barreiras biológicas e assegurar a especificidade do fármaco para o alvo. De acordo com estes aspetos, os nanossistemas têm em conta três importantes parâmetros: as características do fármaco, as características do vector e ainda o estado/localização da patologia. (Brown et al., 2006)

Existem vários tipos de nanossistemas, contudo nesta dissertação serão abordados os que possuem maior ênfase para a administração transdérmica de fármacos. Nesse sentido, os nanossistemas que se têm demonstrado mais relevantes para a administração transdérmica são os vesiculares, nomeadamente lipossomas, transferossomas, etossomas, niossomas. Tendo em conta a sua diversidade, é efetivo que cada sistema possui as suas vantagens e desvantagens, pelo que cada um melhor se adequa a um determinado tipo situação.

Genericamente, os nanossistemas apresentam diversas vantagens, como o aumento da biodisponibilidade e eficácia do fármaco, o aumento da sua estabilidade, o aumento da sua seletividade e especificidade da administração, o aumento da sua biocompatibilidade e a diminuição dos seus efeitos adversos. Contudo, estes sistemas também apresentam algumas desvantagens, como a sua capacidade limitada para encapsular fármacos e ainda a sua possível instabilidade como sistema. (Benbow & Campbell, 2019; Escobar-Chavez et al., 2012; Singh et al., 2015)

O processo de desenvolvimento dos nanossistemas consiste inicialmente na pesquisa de um vector, que pode assumir diversas formas, e na sua adaptação ao fármaco, isto é, de acordo com as características físico-químicas do mesmo. Em seguida, existe o estudo do processo de encapsulação do fármaco no sistema e também da sua estabilidade como sistema. Por fim, é realizado o processo de inserção do sistema vectorial contendo o fármaco no veículo a administrar.

5. Sistemas vesiculares

Os sistemas vesiculares são modelos experimentais baseados em membranas biológicas, cuja evolução resultou na sua utilização como transportadores de fármacos. Estes sistemas são compostos por partículas coloidais que possuem um elevado teor em água e que consistem em moléculas anfífilas dispostas numa bicamada. A sua preparação pode ser realizada a partir de diversos constituintes, contudo, é com base nos principais componentes presentes nas suas estruturas, que estes podem ser classificados em: lipossomas, transferossomas, etossomas e niossomas. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005; Singh et al., 2015)

Adicionalmente, é importante referir que a composição dos sistemas vesiculares é fundamental para o seu comportamento como sistemas de veiculação de fármacos, isto porque influencia as suas propriedades físico-químicas, assim como o tipo de fármacos passíveis de serem transportados. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005)

Entre os vários métodos estudados para ultrapassar a barreira cutânea ou para aumentar a permeação de fármacos através da mesma, os sistemas vesiculares demonstraram alguma eficácia na literatura, pelo que a sua utilização é bastante promissora. Graças à sua composição lipídica, os sistemas vesiculares apresentam diversas vantagens (Tabela 1), sendo que uma das mais importantes reside na sua capacidade elevada de penetração na pele. (Chacko, Ghate, Dsouza, & Lewis, 2020)

Neste contexto, os sistemas vesiculares apresentam dois mecanismos principais de ação na pele, que incluem: a penetração integral da vesícula na barreira cutânea e a capacidade de disrupção da organização estrutural do SC, levando ao aumento da fluidez dos lípidos cutâneos. (Singh et al., 2015)

Tabela 1. Vantagens da utilização de vesículas lipídicas (Chacko et al., 2020; Escobar-Chavez et al., 2012)

Vantagens das vesículas
Biocompatibilidade na sua grande maioria
Aumento da penetração na barreira cutânea
Prolongamento da duração da ação dos fármacos
Aumento da biodisponibilidade dos fármacos
Diminuição dos problemas de toxicidade e de segurança dos fármacos
Possibilidade de incorporação de fármacos com diferentes polaridades

5.1 Lipossomas

Os lipossomas foram descobertos em 1960 por Alec D. Bangham, contudo a sua utilização para administração transdérmica foi apenas descrita em 1980, por Mezei e Gulasekharam. (Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz, & Car, 2012; Zhou et al., 2018) Atualmente, os lipossomas estão entre os nanossistemas mais estudados e de maior preferência para a administração de fármacos por vários motivos. Estes motivos residem nas suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, inerentes à natureza dos seus componentes, e ainda na sua polaridade, que é adaptável e adequada para a maioria dos fármacos a encapsular. (Akbarzadeh et al., 2013; Bozzuto & Molinari, 2015; Escobar-Chavez et al., 2012; Patra et al., 2018)

Os lipossomas (Figura 7) são estruturas vesiculares esféricas de dimensões coloidais (0,025 μm e os 2,5 μm), nas quais se dispõem uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas que encerram um compartimento aquoso interno. (Zununi Vahed, Salehi, Davaran, & Sharifi, 2017) Para além disso, os lipossomas são sistemas essencialmente constituídos por fosfolípidos, moléculas de natureza anfipática, que compõem as bicamadas concêntricas e, eventualmente, por colesterol.

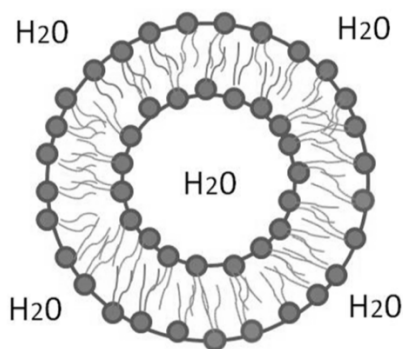


Figura 7. Estrutura de um lipossoma. Adaptado de (Carita, Eloy, Chorilli, Lee, & Leonardi, 2018).

A sua formação ocorre instantaneamente em ambiente aquoso e é resultado da interação dos seus fosfolípidos com água, uma vez que, estes sofrem um rearranjo (os seus grupos fosfato orientam-se para o ambiente hidrofílico), formando vesículas de uma ou mais bicamadas concêntricas. Tendo em conta a sua estrutura, os lipossomas permitem a incorporação de fármacos hidrofílicos no seu compartimento aquoso, hidrofóbicos associados à sua bicamada e ainda anfipáticos que se dividem entre ambos. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005; Pathak & Thassu, 2016; Van Der Meel et al., 2014)

Relativamente ao seu mecanismo de permeação (Figura 8), os lipossomas apresentam três modos de atuação, sendo estes, a sua adsorção ao SC com transferência do fármaco para interior da pele; a sua fusão e mistura com a matriz lipídica do SC, aumentando a partição do fármaco para o interior da pele e a sua penetração integral na pele, com consequentes alterações nas estruturas dos lípidos intercelulares, levando ao aumento da permeação da sua estrutura vesicular. (El Maghraby et al., 2008; Kulkarni, 2010; Opatha et al., 2020)

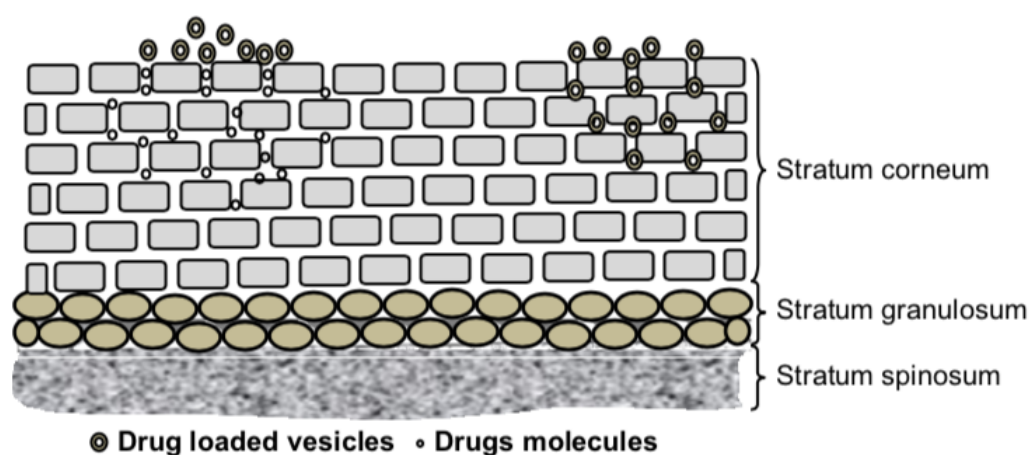


Figura 8. Mecanismo de ação dos lipossomas. Retirado de (Murthy & Shivakumar, 2010).

A eficiência resultante da utilização de lipossomas está diretamente relacionada com a sua interação face às várias camadas da pele. Nesse sentido, é necessário ter em conta vários fatores que influenciam o seu modo de permeação na pele, nomeadamente o seu tamanho, a sua carga superficial, a sua lamelaridade, o estado do SC, a sua composição lipídica e o seu modo de aplicação. (Escobar-Chavez et al., 2012; Kulkarni, 2010; Patra et al., 2018)

Neste contexto, a utilização de lipossomas para a administração transcutânea possui vantagens e desvantagens. As vantagens são semelhantes aos motivos que sustentam a sua utilização, embora ainda seja importante considerar a facilidade da sua produção e a sua capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Em relação às desvantagens, os lipossomas apresentam uma estrutura instável, estão sujeitos à oxidação, impossibilitam a entrega de fármacos para a circulação sistémica e estão suscetíveis à perda ou fusão dos fármacos encapsulados. (Opatha et al., 2020; Singh et al., 2015)

Os lipossomas podem ser classificados com base no seu método de preparação, no seu tamanho e ainda no seu número de bicamadas. Em relação à sua preparação, conhecem-se vários métodos que resultam na produção de lipossomas com diferentes características, sendo que a escolha do mesmo está dependente de diversos fatores como: as propriedades físico-químicas dos constituintes do lipossoma e do composto a encapsular; a concentração e toxicidade; a natureza do solvente onde os lipossomas se dispersam; os processos envolvidos durante a entrega dos lipossomas; as dimensões e a farmacocinética desejada para uma aplicação de sucesso e ainda os custos, a reprodutibilidade e a adequação a um possível scale-up. (Bozzuto & Molinari, 2015)

O método de hidratação de um filme lipídico, também denominado método Bangham, é um dos primeiros métodos tradicionais utilizados e envolve três passos essenciais que incluem, a dissolução da porção lipídica (fosfolípidos e colesterol) num solvente orgânico, a sua separação e secagem através da evaporação do mesmo e a sua dispersão final num meio aquoso. (Liu, Hou, Tong, & Li, 2020) Durante este processo é importante perceber que da técnica de evaporação resulta um filme lipídico que após hidratado induz a formação de vesículas multilamelares (MLVs) heterogéneas. A inserção de um composto de interesse pode ser realizada neste mesmo passo, isto é, o composto pode ser adicionado ao meio aquoso (composto hidrofílico) ou ao filme lipídico (composto hidrofóbico), consoante a sua maior afinidade. (Akbarzadeh et al., 2013; Bozzuto & Molinari, 2015; Samad, Sultana, & Aqil, 2007)

Tendo em conta o método de Bangham resulta em MLVs de tamanho e heterogeneidade não adequados à administração transdérmica, surge a necessidade de utilização de uma técnica que permita a produção de vesículas unilamelares (ULVs), das quais se destacam a sonicação e a extrusão. A sonicação é uma das técnicas mais utilizadas para a produção de ULVs e consiste na emissão de ondas ultrassónicas que incidem na dispersão lipídica. Por sua vez, a extrusão é uma técnica que consiste na

passagem da dispersão lipídica através de um filtro com tamanho de poro pré-definido. (Liu et al., 2020; Maherani, Arab-Tehrany, R. Mozafari, Gaiani, & Linder, 2011)

Do ponto de vista da classificação (Figura 9), os lipossomas podem então ser divididos em ULVs, constituídas por uma bicamada fosfolipídica, MLVs, quando contêm várias bicamadas concêntricas, e ainda em vesículas multivesiculares (MVV), quando possuem várias vesículas englobadas no interior de uma de maiores dimensões. Dependendo do seu tamanho, as vesículas unilamelares podem ainda ser classificadas como grandes (LUV) ou pequenas (SUV), sendo que os seus tamanhos oscilam entre os 20-100 nm e 100-1000 nm, respetivamente. (Akbarzadeh et al., 2013; Samad et al., 2007)

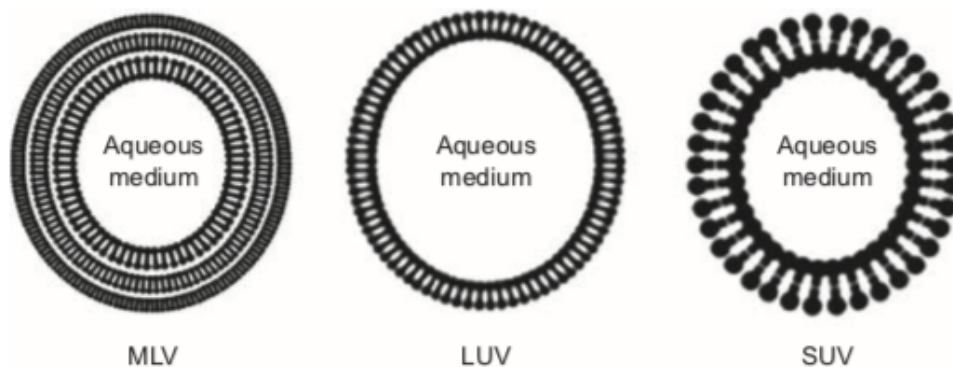


Figura 9. Classificação das várias categorias de lipossomas. Retirado de (Venuganti & Perumal, 2009)

5.2 Etossomas

Os etossomas são transportadores vesiculares lipídicos cuja origem remonta a 1996, altura em que foram desenvolvidos por Tóuítou, no decurso de estudos relacionados com o uso de vesículas lipídicas como sistemas de administração. As suas estruturas (Figura 10) são compostas por fosfolípidos, água e etanol, em elevadas concentrações (45% v/v). De acordo com a sua composição, é possível diferenciar os etossomas dos restantes transportadores vesiculares, uma vez que são os únicos que possuem álcool na sua composição.

Neste contexto, a presença de álcool nos etossomas constitui-se como importante, porque provoca a fluidificação das suas membranas, o que se traduz no aumento da sua flexibilidade e maleabilidade, e porque é responsável por perturbar a organização e aumentar a fluidez dos lípidos intercelulares cutâneos. (Murthy & Shivakumar, 2010; Tóuítou et al., 2000)

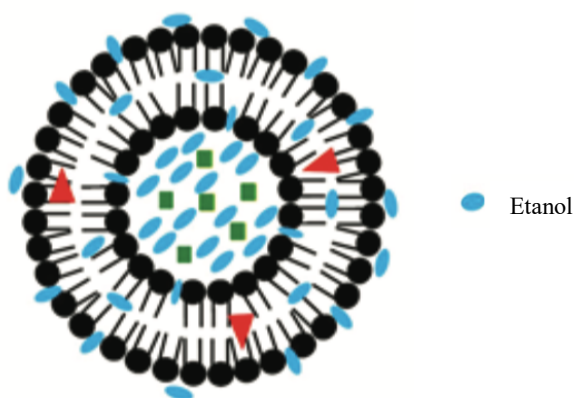


Figura 10. Estrutura de um etossoma. Adaptado de (Kapoor, GuhaSarkar, & Banerjee, 2017)

Relativamente ao seu tamanho, os etossomas apresentam dimensões na escala manométrica, sendo que quando comparados aos lipossomas convencionais apresentam menor tamanho. Esta característica pode também ser justificada com base na sua concentração em álcool, dado que um aumento da mesma confere uma carga negativa à superfície dos etossomas e induz a redução do seu tamanho. (Uchechi et al., 2014)

Os etossomas apresentam diversos mecanismos de permeação cutânea (Figura 11), sendo que é possível distinguir dois mecanismos principais: o de libertação do conteúdo alcoólico e o de interação direta com a com os fosfolípidos cutâneos. O primeiro mecanismo consiste num processo em que os etossomas conseguem permear através da libertação do seu conteúdo alcoólico, que aumenta a fluidez dos lípidos intercelulares e

reduz a densidade da camada lipídica cutânea. O segundo mecanismo envolve a interação entre os etossomas e os lípidos cutâneos, em que os etossomas através da sua maleabilidade e fusão com os lípidos, permitem a abertura de novos caminhos e permeiam através das várias camadas cutâneas. (Singh et al., 2015; Venuganti & Perumal, 2009)

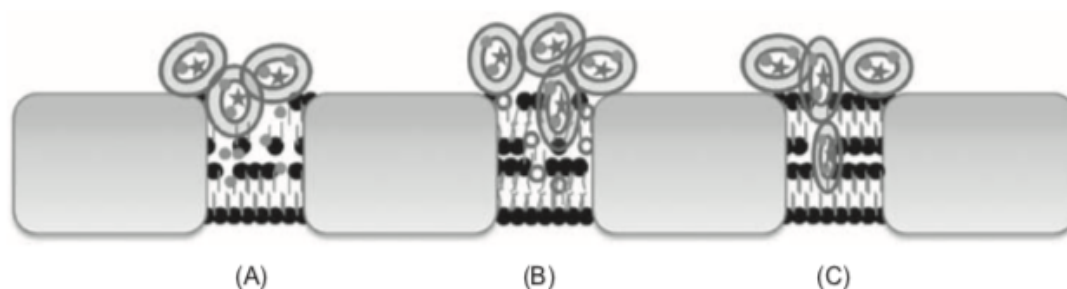


Figura 11. Mecanismos de ação dos etossomas. Retirado de (Venuganti & Perumal, 2009).

Graças à sinergia das suas propriedades principais (tamanho reduzido, flexibilidade e composição alcoólica), os etossomas assumem a função de sistema de veiculação de fármacos e de outros agentes até às camadas mais profundas da pele, podendo realizar a sua libertação diretamente na circulação sistémica. (Kumar et al., 2018; Uchechi et al., 2014)

Nesse sentido, é efetivo que a utilização de etossomas para o transporte de fármacos está relacionada com diversas vantagens. Essas vantagens são: a sua biodegradabilidade e baixa toxicidade; a sua maleabilidade e flexibilidade, que permite uma maior eficiência de permeação; a estabilidade da sua estrutura; a sua alta eficiência de encapsulação devido ao seu conteúdo alcoólico que facilita a solubilização dos fármacos e ainda a sua habilidade para a veiculação de fármacos em locais alvo. (Uchechi et al., 2014) Apesar das vantagens envolvidas, é ainda necessário ter conta as desvantagens inerentes à utilização destas vesículas, sendo que estas incluem: possibilidade da existência de irritações na pele devido à presença de álcool; a predisposição dos seus lípidos para a oxidação e os seus custos elevados de produção. (Escobar-Chavez et al., 2012; Singh et al., 2015)

No que diz respeito ao método de produção, estas vesículas apresentam o mesmo método de produção dos lipossomas tradicionais, em que pela dissolução dos lípidos e dos componentes a encapsular numa solução alcoólica, com posterior agitação, se obtêm etossomas. Contudo, apesar destas semelhanças, os etossomas têm menor necessidade de

serem submetidos à técnica de sonicação ou extrusão, isto porque, como já foi referido, a presença de álcool na sua composição causa a diminuição do seu tamanho. (Pathak & Thassu, 2016; Venuganti & Perumal, 2009)

5.3 Niossomas

Os niossomas são vesículas elásticas compostas pela associação de colesterol, surfactantes não iónicos e moléculas indutoras de carga. Estas vesículas foram inicialmente descritas nos anos 70 pela indústria cosmética e o seu desenvolvimento permitiu que fossem consideradas como uma alternativa à utilização de lipossomas. (Chen, Hanning, Falconer, Locke, & Wen, 2019; Marianecci et al., 2014)

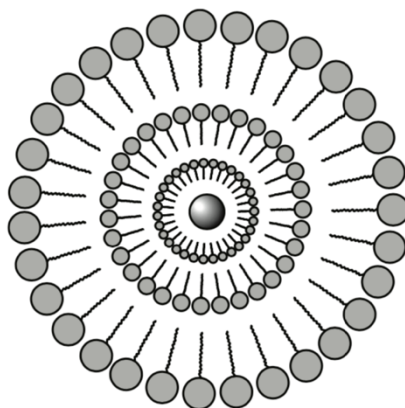


Figura 12. Estrutura de um niossoma. Retirado de (Raza et al., 2014)

As propriedades dos niossomas e dos lipossomas dependem essencialmente da sua composição e dos seus métodos de preparação. No entanto, apesar da sua composição química distinta, os niossomas apresentam muitas semelhanças com os lipossomas, estando estas relacionadas com a sua função, com o seu método de preparação e com a sua estrutura. Assim, à semelhança dos lipossomas, os niossomas podem ser classificados em relação ao seu número de bicamadas (ULV e MLV) e ao seu tamanho (SUV e LUV), dependendo do seu método de preparação. Para além disso, estruturalmente, os niossomas são idênticos aos lipossomas, na medida em que apresentam uma bicamada, capaz de transportar fármacos hidrofóbicos no seu interior, e um meio aquoso interno que permite a incorporação de fármacos hidrofílicos. (Hamishehkar, Rahimpour, & Kouhsoltani, 2013; Singh et al., 2015)

Os niossomas apresentam algumas características que os permitem superar as desvantagens apresentadas pelos lipossomas, nomeadamente, a sua estabilidade química, promovida pela ausência de fosfolípidos suscetíveis à oxidação, o seu baixo custo de produção e a presença de surfactantes não irritantes que atribuem uma maior flexibilidade

à sua estrutura, sem prejudicar a sua biocompatibilidade. (Kapoor et al., 2017; Marianecci et al., 2014; Zhou et al., 2018)

Adicionalmente, os niossomas apresentam outras vantagens como a sua capacidade para encapsular fármacos em elevadas quantidades e de diferentes polaridades; a fácil modificação das suas características através da alteração do seu método de produção e da sua composição; a sua biodegradabilidade, a sua não imunogenicidade e a sua capacidade para fomentar a permeação cutânea e o controlo da libertação de fármacos através da pele. (Hamishehkar et al., 2013; Rajera, Nagpal, Singh, & Mishra, 2011)

Em relação à sua aplicação, os niossomas têm sido estudados para administração de fármacos e cosméticos por diversas vias (oral, ocular, pulmonar, tópica e transdérmica). No entanto, as suas características permitem sobretudo maximizar as vantagens da via tópica e transdérmica. (Chen et al., 2019) Com base nessas características, os niossomas assumem-se como estruturas capazes de atuar como “reservatórios” de fármaco no corpo, aumentando o seu tempo de residência na pele e proporcionando uma libertação controlada de fármacos encapsulados. De outro modo, permitem o transporte e a entrega direcionada de fármacos, uma vez que podem alcançar o local alvo e proceder à libertação direta dos mesmos, minimizando a dose necessária para o efeito terapêutico e a ocorrência de possíveis efeitos adversos. (Kumar et al., 2018; Singh et al., 2015; Uchechi et al., 2014)

Relativamente ao seu mecanismo de permeação, os niossomas podem atuar por diversos mecanismos que incluem: a sua adesão e fusão à superfície cutânea, levando à existência de um gradiente que atua como força motriz para a indução da permeação dos fármacos através do SC; a modificação estrutural do SC através da sua ação nos lípidos intercelulares, resultando num aumento de permeação; a entrada das suas vesículas no SC e a atuação dos seus surfactantes como agentes indutores da permeação, levando à fluidez do envelope lipídico e ainda a sua ação na perda transepidérmica de água, que promove o aumento da hidratação do SC e a perda das suas propriedades de barreira. (Chen et al., 2019)

5.4 Transferossomas

Os transferossomas, também conhecidos como lipossomas elásticos ou ultra-flexíveis, foram descobertos por Cevc, que pretendia mitigar a menor permeação na pele dos lipossomas convencionais (Ascenso et al., 2015). Apesar da sua estrutura semelhante às membranas biológicas, os lipossomas convencionais possuíam alguma rigidez estrutural resultante de uma menor fluidez das suas bicamadas e, nesse sentido, surgiram os transferossomas.

Os transferossomas (Figura 13) são sistemas vesiculares compostos por uma bicamada lipídica, que integra ativadores de superfície (AS), e ainda por um meio interno aquoso. Estes sistemas possuem um tamanho até 300 nm e assemelham-se aos lipossomas em morfologia, mas funcionalmente, são diferentes devido à sua composição. (H. A. Benson, 2006; Jain, Jain, Umamaheshwari, & Jain, 2003; Santos et al., 2019)

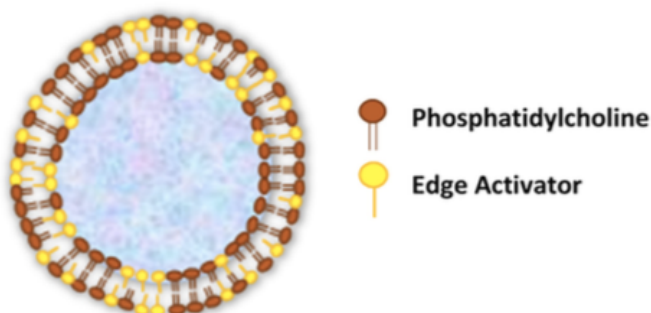


Figura 13. Estrutura de um transferossoma. Retirado de (Opatha et al., 2020).

O AS é um surfactante de cadeia única e é responsável pela destabilização da bicamada lipídica dos transferossomas e pela diminuição da sua tensão interfacial, sendo que leva à principal característica dos transferossomas, a sua deformabilidade. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005; Uchechi et al., 2014; Venuganti & Perumal, 2009) Adicionalmente, é importante referir que os AS possuem outras funções, como indutores de permeação através da solubilização dos lípidos cutâneos e como facilitadores da solubilização de fármacos. (Opatha et al., 2020) Face à sua presença, os transferossomas assumem-se como estruturas capazes de se deformar e comprimir sem perda de conteúdo, conseguindo permear com maior eficácia através de poros e outros canais cutâneos menores que o seu próprio tamanho.

O mecanismo de permeação cutânea dos transferossomas está diretamente ligado a três fatores que influenciam a sua eficácia. Estes fatores são a capacidade de deformação da sua membrana, a sua hidrofília e ainda a capacidade de manutenção da sua estrutura. (Uchechi et al., 2014) Neste contexto, é ainda importante entender que interação dos transferossomas com a pele depende não só das suas características físico-químicas, mas também do seu modo de aplicação (oclusivo ou não oclusivo). A diferença de aplicação constitui-se como importante porque a força motriz da sua permeação é o gradiente osmótico que resulta dos diferentes graus de hidratação da pele. Tendo em conta que o gradiente é afetado pela oclusão do local de aplicação, é imperativo afirmar que a eficácia de permeação depende do modo de aplicação. Nesse sentido, a aplicação sob condições não oclusivas resulta numa melhor permeação dos transferossomas, uma vez que não elimina o gradiente osmótico que é essencial para a sua permeação. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005; Venuganti & Perumal, 2009)

Com base nas suas características e na sua mecanística, é possível perceber que a utilização de transferossomas como sistemas de veiculação de fármacos tem várias vantagens. Essas vantagens incluem a otimização do transporte, com menores perdas e com maior seletividade na entrega dos fármacos através da sua deformabilidade e elasticidade; a possibilidade de encapsulação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos face à sua composição; a minimização de efeitos adversos dos fármacos e proteção da sua degradação e a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade devido à natureza dos seus componentes. Embora os transferossomas estejam intimamente ligados a diversas vantagens, é também fundamental destacar algumas das suas desvantagens. Assim, estes sistemas apresentam desvantagens como a sua instabilidade química pelo facto de ser uma formulação lipídica com tendência para a oxidação; a dificuldade na obtenção da pureza dos seus fosfolípidos (de origem natural) e ainda os custos associados à sua produção que são problemáticos para a transposição de escala. (Opatha et al., 2020)

Relativamente à sua produção, os transferossomas podem ser preparados por diversos métodos, sendo que a escolha do método mais adequado deve ter em conta a sua composição, o fármaco a encapsular e o local onde se encontra o alvo terapêutico. De todos os métodos existentes, será abordado com maior detalhe o método de hidratação do filme lipídico, que se caracteriza por quatro etapas distintas: a dissolução dos lípidos e do AS numa mistura de solventes orgânicos; a evaporação da mistura de solventes através do uso de um evaporador rotativo, com consequente formação de um filme lipídico; a hidratação do filme com uma solução tamponada e a sonicação para obtenção de vesículas

homogéneas e unilamelares. Nesta fase, é essencial perceber que o fármaco a encapsular será adicionado numa das etapas descritas, dependendo do seu carácter lipofílico ou hidrofílico. Assim, a adição de um fármaco lipofílico deve ocorrer na etapa de dissolução em solventes orgânicos, enquanto que a adição de um hidrofílico deve ocorrer na etapa de hidratação com solução tamponada. (Opatha et al., 2020)

6. Sistemas vesiculares em desenvolvimento para veicular o ibuprofeno

Dadas as potencialidades e os avanços na área dos nanossistemas, atualmente existem diversos sistemas em estudo para veiculação de fármacos, tal como, o ibuprofeno. Os vários nanossistemas em desenvolvimento foram desenhados com o propósito de melhorar o efeito terapêutico do ibuprofeno (Tabela 2), através da modelação das suas propriedades farmacocinéticas e ainda de melhorar o seu perfil de segurança. (Bulbake, Doppalapudi, Kommineni, & Khan, 2017; Opatha et al., 2020)

Tabela 2. Sistemas vesiculares em estudos pré-clínicos para a administração de ibuprofeno.

Tipo de sistema	Aplicação	Fase	Resultado	Ref.
Niossomas	Subcutânea	Pré-clínica	↑ Eficácia ↑ Biodisponibilidade	(Rinaldi et al., 2017)
	Transdérmica	Investigação	↑ Permeação	(Ghanbarzadeh, Khorrami, & Arami, 2015)
Proniossomas	Transdérmica	Investigação	↑ Estabilidade	(Hu & Rhodes, 2000)
Lipossomas	Transdérmica	Pré-clínica	↑ Permeação	(Gaur, Bajpai, Mishra, & Verma, 2016)
			↑ Eficácia ↑ Biodisponibilidade	
Etossomas	Transdérmica	Pré-clínica	↑ Permeação	(Shumilov, Bercovich, Duchi, Ainbinder, & Touitou, 2010)
			↑ Biodisponibilidade	
Transferossomas	Transdérmica	Investigação	↑ Permeação	(Irfan, Verma, & Ram, 2012)
			↑ Biodisponibilidade	(Darusman, Raisya, & Priani, 2018)
			↑ Permeação	

As formulações acima expostas representam as diversas melhorias descritas através do uso de nanossistemas para a administração de fármacos. O recurso aos nanossistemas é sustentado pela utilização de vários componentes e técnicas que permitem a otimização do processo de administração dos fármacos, sendo que estes podem ser adaptados consoante o local designado para o efeito terapêutico. Assim, de forma alternativa, estas formulações podem aumentar a permeação dos fármacos através das camadas cutâneas, de modo a que estes possam chegar à circulação sistémica, ou então, possam ficar retidos num tecido específico. Para além disso, garantem um aumento nos seus perfis de segurança e condicionam a sua distribuição, pelo que permitem a utilização de doses inferiores. (Al-Lawati, Binkhathlan, & Lavasanifar, 2019)

Dentro das várias categorias de formulações vesiculares em desenvolvimento, é possível verificar que, no geral, todas contribuem para um aumento da capacidade de permeação do ibuprofeno na pele, ainda que os niossomas, os etossomas e os transferossomas sejam mais eficazes, em virtude das suas vantagens em relação aos lipossomas. No que diz respeito à estabilidade, os estudos descritos na literatura apontam para uma maior estabilidade do ibuprofeno nos proniossomas, devido ao facto de estes se apresentarem na forma desidratada, evitando possíveis problemas de estabilidade física e de oxidação. Um outro aspeto a destacar é o aumento da biodisponibilidade do ibuprofeno nos vários sistemas vesiculares apresentados, sobretudo nos lipossomas e nos niossomas, onde foi possível verificar uma maior quantidade de fármaco disponível no local de ação com consequente aumento da eficácia anti-inflamatória.

7. Motivação e objetivos

A administração oral de AINES representa uma preocupação constante ao longo das últimas décadas devido à sua ligação com a ocorrência de efeitos adversos. Os AINES são frequentemente utilizados para o tratamento de várias patologias e os seus efeitos adversos são problemáticos para os utentes que recorrem à sua utilização com maior regularidade, sendo que estes estão relacionados com eventos prejudiciais para os diversos sistemas fisiológicos que são essenciais para a homeostasia do corpo humano.

Os efeitos adversos mais habituais surgem ao nível do sistema GI, no entanto, a origem da sua expressão pode variar consoante o tipo de fármaco administrado. De entre os vários AINES tradicionais, é de destacar o ibuprofeno, devido à sua não seletividade para ambas as COX e ainda pelo facto de ser um fármaco de fácil acesso e com elevada comercialização, sendo um dos anti-inflamatórios mais usados em todo o mundo. (Rainsford, 2013)

O ibuprofeno pode ser vendido sem prescrição, está disponível em diversas doses e a sua utilização durante o período recomendado está pouco associada à ocorrência de efeitos adversos. Tendo em conta o seu perfil de segurança equilibrado, devido ao facto de ser um fármaco não seletivo, e as circunstâncias da sua utilização, é efetivo que o ibuprofeno pode ser considerado um fármaco seguro. No entanto, apesar dos seus benefícios, este fármaco é responsável por múltiplos problemas no trato GI e está presente em muitos casos de automedicação, pelo que a sua utilização não controlada se constitui como problemática para a população no geral. (Rainsford, 2013; Varrassi, Pergolizzi, Dowling, & Paladini, 2020)

Face a estes problemas, surgiu a hipótese de se utilizar uma via alternativa para a administração de AINES, e a via transdérmica assumiu-se como potencialmente vantajosa, uma vez que possibilita a minimização de vários problemas de segurança que estão relacionados com a administração oral de AINES. Assim, a administração de AINES através da pele apresenta-se como uma possível solução, porque a via transdérmica é mais seletiva e está sujeita a menores variáveis de distribuição, permitindo que se atinja o alvo terapêutico com maior segurança. (Benbow & Campbell, 2019) Porém, apesar de ser uma opção bastante viável e inovadora, a administração transdérmica de AINES possui alguns desafios, que associados às suas desvantagens, tornam a sua utilização ainda limitada.

Nesse sentido, o trabalho experimental desenvolvido no âmbito desta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de transferossomas com vista a otimizar a administração transdérmica de ibuprofeno. Com vista à obtenção do nanossistema ideal, inicialmente realizaram-se estudos de pré-formulação quanto às propriedades físico-químicas do ibuprofeno e, de seguida, fez-se um estudo preliminar para definir a composição dos transferossomas a serem otimizados. Por último, realizou-se a otimização do nanossistema transferossomal através de uma estratégia de *quality-by-design*, nomeadamente o desenho experimental do tipo Box-Behnken.

B. Materiais e Métodos

B. Materiais e Métodos

8. Materiais

Para a preparação dos transferossomas foram utilizados: lecitina de soja (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha), Span[®] 80 (Merck, Darmstadt, Alemanha), Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), ibuprofeno de sódio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), clorofórmio (Scharlab SL, Sentmenat, Espanha) e metanol (Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Itália).

O tampão fosfato (PBS, pH 7,4) foi preparado através da dissolução de cloreto de sódio (137 mM, José M. Vaz Pereira SA, Benavente, Portugal), de cloreto de potássio (2,7 mM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), do hidrogenofosfato dissódico di-hidratado (10 mM, Scharlab SL, Sentmenat, Espanha) e de fosfato de potássio monobásico (1,8 mM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) em água bidestilada.

9. Curva de Calibração

Para a determinação das curvas de calibração do ibuprofeno de sódio foram preparadas duas soluções mãe de 0,8 mg/ml, sendo que uma foi preparada em tampão PBS e a outra em água bidestilada. Em seguida, foram preparadas 10 soluções padrão por diluição a partir de cada uma das soluções mãe (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações das soluções padrão de ibuprofeno de sódio preparadas para determinação das curvas de calibração em água e tampão PBS.

Solução N°.	Concentração (mg/ml)
1	0
2	0,01
3	0,05
4	0,1
5	0,15
6	0,2
7	0,3
8	0,4
9	0,6
10	0,8

Os espectros de absorvância das soluções padrão foram obtidos no comprimento de onda de 264 nm, utilizando o espectrofotómetro Evolution® 300 (Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra).

10. Estudos de solubilidade

A solubilidade do ibuprofeno de sódio foi determinada em tampão PBS (pH 7,4) e água bidestilada. Para tal, foi adicionado fármaco em excesso a um volume fixo (3 ml) de solvente em estudo, em quadruplicado. Estas misturas foram submetidas a um processo de agitação a 25 ± 2 °C durante 72 h, usando o agitador IKA VIBRAX VXR®, (LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Alemanha). Na etapa seguinte, todas as misturas foram filtradas, de modo a remover o soluto em excesso, e foi determinada a concentração de ibuprofeno de sódio, através do método da curva de calibração por espectrofotometria UV/Vis.

11. Preparação de transferossomas

Neste trabalho foram preparados transferossomas, constituídos por lecitina de soja e dois ativadores de superfície (AS), nomeadamente Span® 80 e Tween® 80, através do método de hidratação do filme lipídico com subsequente sonicação.

Numa primeira fase, dissolveu-se a lecitina de soja e os AS em clorofórmio:metanol (3:1, v/v). Em seguida, procedeu-se à evaporação da mistura de solventes, num evaporador rotativo a 40 °C durante 45 min, com consequente obtenção de filmes contendo lípido e AS. Por último, os filmes lipídicos foram submetidos a vácuo durante 2 h, para a remoção de eventuais vestígios dos solventes orgânicos utilizados.

Numa segunda fase, procedeu-se à hidratação dos filmes lipídicos com uma solução de ibuprofeno de sódio a 2% (m/v), seguida por um processo de agitação vigorosa e pelo processo de sonicação com uma amplitude de 50%, usando o QSonica Sonicator 500 (Newtown, EUA).

12. Caracterização dos transferossomas

12.1 Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

Anteriormente à análise do tamanho, do índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta (PZ), cada amostra foi diluída com água destilada, segundo um fator de diluição (FD) de 1/20.

A execução deste processo, teve como objetivo a obtenção de uma concentração adequada para a análise por espectroscopia de correlação fotónica, acoplada à determinação da mobilidade eletroforética, no caso da determinação do PZ. As análises foram efetuadas em triplicado a 23 ± 2 °C, utilizando o equipamento DelsaTM Nano C da Beckman Coulter, Inc (Brea, CA, EUA).

12.2 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada indiretamente através do isolamento da porção livre (não-encapsulada) de ibuprofeno de sódio. A concentração de ibuprofeno encapsulada foi calculada através da diferença entre a concentração total utilizada para preparar os transferossomas (C_T) e a concentração de ibuprofeno presente na porção livre (C_{PL}), que permitiu então o cálculo da EE (Equação 1).

$$EE = \frac{C_T - C_{PL}}{C_T} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Para se determinar a porção livre de ibuprofeno de sódio, uma alíquota de formulação (500 µL) foi diluída 2x em tampão PBS antes de ser transferida para dispositivos de centrifugação VIVASPIN 500 (Sartorius, Goettingen, Alemanha). De seguida, procedeu-se à centrifugação a 15.000 g durante 45 min a 25 ± 2 °C, utilizando a centrífuga HERMLE Z 323 K (Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemanha). Depois de se verificar que os transferossomas tinham ficado retidos nos filtros dos dispositivos de centrifugação, procedeu-se à determinação da C_{PL} no sobrenadante separado através da utilização do método da curva de calibração. Para isso, foram realizadas análises em triplicado, a 264 nm, por espectrofotometria UV/Vis

(espectrofotómetro Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra) e a concentração foi calculada com base na curva de calibração previamente estabelecida.

A capacidade de carga (CC), representa a quantidade moléculas de fármaco encapsula por cada molécula de lípido sendo calculada através da Equação 2, em que se utiliza como referencial a concentração total de lípido (C_{TL}):

$$CC = \frac{C_T - C_{PL}}{C_{TL}} \quad \text{Eq. 2}$$

Tendo em conta que os valores de C_T e C_{PL} são idênticos aos presentes na Eq. 1, para o cálculo da LC, resta apenas calcular o valor da C_{TL} , que pode ser obtido com base na quantidade de lípido pesada inicialmente para a preparação dos transferossomas.

13. Otimização dos transferossomas

Com vista à otimização dos sistemas transferossomais, foi utilizado uma estratégia de *quality-by-design* de otimização multifatorial, de modo a avaliar a importância e a significância estatística dos efeitos dos fatores escolhidos e suas interações nas respostas em estudo. (Ferreira et al., 2007)

Assim, o processo de otimização dos transferossomas para veicular ibuprofeno de sódio baseou-se num desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BBD) com 15 séries, conforme descrito anteriormente. (Pereira-Leite & Ventura, 2020) Neste processo, inicialmente, estabeleceram-se dois tipos de variáveis, as variáveis independentes, classificadas como fatores quantitativos, e as variáveis dependentes, classificadas como respostas. Os fatores considerados neste estudo foram três: concentração de lípido (X_1), razão de Tween:Span (X_2) e tempo de sonicação (X_3). Adicionalmente, foram avaliadas diferentes respostas, nomeadamente: o tamanho (Y_1), o PDI (Y_2) e o PZ (Y_3) dos transferossomas. Tal como se descreve na Tabela 4, foram definidos à partida 3 níveis de cada fator para serem testados, assim como os critérios de desejabilidade para as variáveis dependentes. Neste ponto, é importante referir, que os níveis atribuídos a cada uma das variáveis independentes foram sustentados por dados da literatura e pelos resultados

obtidos em estudos preliminares, enquanto os critérios de desejabilidade foram baseados em fundamentos existentes na literatura.

Tabela 4. Variáveis do desenho fatorial Box-Behnken, com respetivos níveis e critérios de desejabilidade.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
X ₁ : concentração de lípido (% m/v)	0,5	0,75	1
X ₂ : razão Tween [®] 80/Span [®] 80 (m/m)	5:10	7,5:7,5	10:5
X ₃ : tempo de sonicação (min)	10	15	20
Variáveis dependentes	Desejabilidade		
	Baixa	Média	Elevada
Y ₁ : tamanho (nm)	150	100	50
Y ₂ : PDI (índice de polidispersão)	0,25	0,20	0,15
Y ₃ : PZ (Potencial zeta, mV)	1	0	-1

O desenho experimental foi realizado com o recurso ao software STATISTICA (Statsoft, Inc., OK, EUA), de modo a se obter o valor ótimo para cada um dos fatores de forma a se obterem as respostas desejáveis. Com base nos valores teóricos previstos pelo software como valores ótimos para os fatores, foi produzida e caracterizada a formulação otimizada, em triplicado, para que fosse então possível validar as respostas teóricas previstas pelo software.

C. Resultados e Discussão

C. Resultados e Discussão

14. Estudos de pré-formulação

Para a obtenção dos resultados da solubilidade do ibuprofeno de sódio (IBU) em água bidestilada e tampão PBS foi inicialmente necessário obter as curvas de calibração relativas a cada um dos solventes em estudo (Figura 12 e 13).

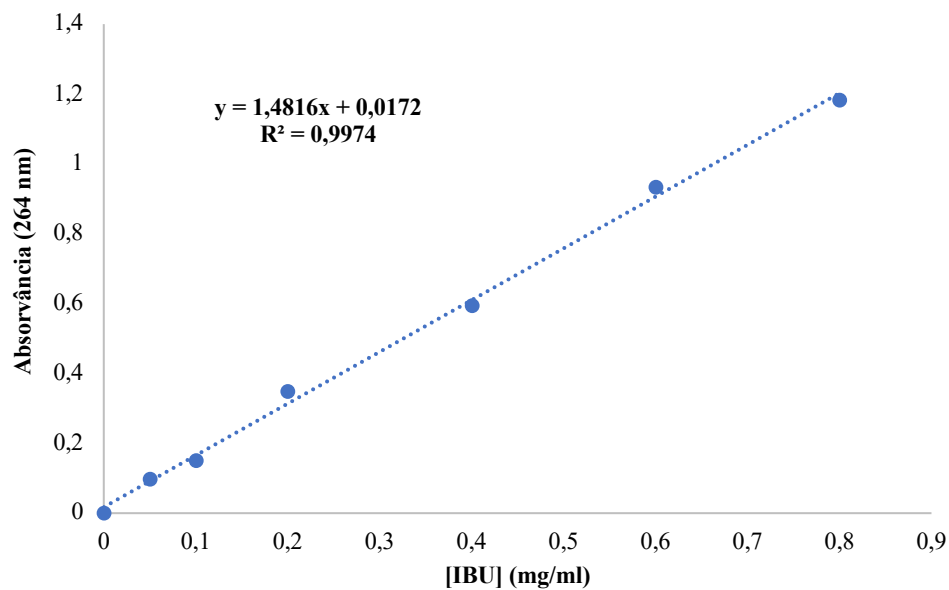


Figura 14. Curva de calibração do ibuprofeno de sódio (IBU) em água bidestilada.

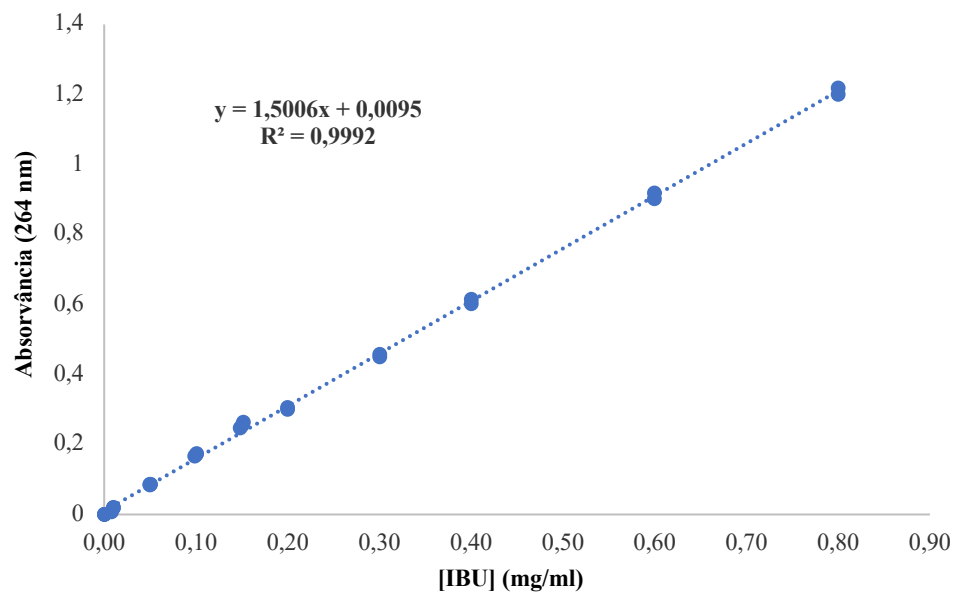


Figura 15. Curva de calibração do ibuprofeno de sódio (IBU) em tampão PBS (pH 7,4).

As curvas de calibração obtidas revelam declives de 1,4816 e de 1,5006 para a água e para o PBS, respetivamente. Perante estes dados é possível perceber que as curvas de calibração demonstram uma certa proximidade, pelo que a relação gráfica entre os seus valores de absorvância e de concentração é bastante semelhante. Segundo a evidência presente em várias publicações, as retas de calibração do ibuprofeno num comprimento de onda máximo de 264 nm, apresentam declives que variam entre 1,1 e 1,5, sendo que estão em consonância com as retas de calibração obtidas neste trabalho. (Dugar, Gajera, & Dave, 2016; Venceslau Fernandes, 2016)

Com recurso às curvas de calibração, foi determinada a solubilidade do ibuprofeno de sódio. Os resultados obtidos (Tabela 5) indicam que o ibuprofeno é mais solúvel em água bidestilada do que em tampão PBS.

Tabela 5. Solubilidade do ibuprofeno de sódio (Ibu) em diferentes solventes (n=3, média $\pm$ desvio padrão)

Solvente	[IBU] (mg/ml)
Água bidestilada	285 $\pm$ 10
Tampão PBS (pH 7,4)	161 $\pm$ 12

De acordo com vários estudos já realizados, o ibuprofeno apresenta baixa solubilidade em água, sendo que apenas se torna mais solúvel quando está sob determinados valores de pH que sustentem a sua forma ionizada. (Patel et al., 2013) Adicionalmente, com base em diversos artigos, foi ainda possível verificar que o ibuprofeno revela uma solubilidade aumentada na presença de uma solução tampão de PBS. (Chatani et al., 2019; Levis, Lane, & Corrigan, 2003)

Assim, tendo em conta a influência do pH na solubilidade desta molécula, seria expectável que esta se apresentasse mais solúvel em tampão PBS (pH 7,4) do que em água bidestilada (pH 5,5). Contudo, é essencial referir que partimos do sal de ibuprofeno de sódio, que à partida apresenta solubilidade aumentada, e que na solução de PBS existe uma grande quantidade de sais dissolvidos que podem competir pelas interações com a água, provocando uma diminuição da solubilidade do ibuprofeno de sódio, num fenómeno geralmente denominado “salting out”.

Ainda que a solubilidade seja efetivamente superior em água, o solvente escolhido para ser utilizado na preparação dos sistemas vesiculares foi o tampão PBS. Esta escolha baseia-se no facto do ibuprofeno ser um ácido fraco ($pK_a = 4,85$), pelo que a pH 7,4 a sua estrutura molecular se encontra ionizada (carregada negativamente), o que poderá contribuir para a sua permanência no compartimento aquoso vesicular e ainda para a estabilização coloidal dos sistemas. Por outro lado, a utilização de um sistema tampão para produzir os sistemas vesiculares será mais vantajosa para se obter um melhor controlo do pH das formulações.

15. Estudos preliminares

No sentido de se verificar a possibilidade de produção de transferossomas com diferentes razões de Tween[®]80/Span[®]80, foram realizados diversos estudos preliminares. Estes estudos consistiram numa componente de análise das propriedades físico-químicas e ainda numa componente de avaliação do aspeto macroscópico, de forma a perceber o impacto da mistura de AS nas formulações transferossomais.

Para tal, foram produzidas 8 formulações com diferentes razões Tween[®]80/Span[®]80 e diferentes concentrações de ibuprofeno de sódio (2-8 % (m/v)), mantendo constante a concentração de lecitina de soja (1% (m/v)) e considerando 10 min como tempo de sonicação (Tabela 6). Os resultados obtidos através da caracterização do tamanho, PDI e PZ das formulações (Tabela 6) demonstram que, no geral, o tamanho dos transferossomas e o PDI das formulações depende do tipo e da concentração de AS utilizados. Os transferossomas de menores dimensões e com menor homogeneidade de tamanho de partículas (> PDI) foram produzidos na presença de 10% (m/m) de AS (Tween[®]80/Span[®]80 5:5) (Formulação 7). Por outro lado, as formulações transferossomais com tamanho superior e mais uniforme (< PDI) foram obtidas com 15% (m/m) de Span[®]80 (Formulação 6).

Tabela 6. Propriedades físico-químicas de várias formulações transferossomais produzidas com 1% (m/v) de lecitina de soja (PC), várias composições de ativadores de superfície e de ibuprofeno de sódio (IBU), considerando 10 min como tempo de sonicação.

Formulação Nº.	(Tween [®] 80:Span [®] 80):PC % (m/m)	IBU % (m/v)	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)
1	(7,5:7,5):85	2	109,6	0,244	-0,27
2	(7,5:7,5):85	4	ND	ND	ND
3	(15:0):85	8	ND	ND	ND
4	(0:15):85	8	ND	ND	ND
5	(15:0):85	2	117,1	0,165	0,81
6	(0:15):85	2	206,4	0,105	0,05
7	(5:5):90	4	67,3	0,308	-0,07
8	(2,5:2,5):95	4	81,3	0,248	0,11

ND: não detetável; PDI: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta.

Segundo vários estudos presentes na literatura, é possível inferir que as propriedades físico-químicas dos sistemas transferossomais se modificam essencialmente devido a quatro variáveis, sendo estas a concentração de AS, a hidrofilia da cabeça do AS, o comprimento da sua cadeia de carbono e o seu equilíbrio lipofílico-hidrofílico (HLB). Para além disso, foi ainda possível verificar que, geralmente, propriedades como o tamanho e o PDI variam inversamente à concentração de AS. (Bnyan et al., 2018; Chaudhary, Kohli, & Kumar, 2013; Opatha et al., 2020)

Apesar das informações recolhidas na literatura, os resultados obtidos a partir das formulações 6 e 7, permitiram concluir que a relação inversa entre as propriedades analisadas e a concentração de AS nem sempre se verifica. Esta situação pode ser justificada pelo HLB dos AS utilizados que se reflete nas suas solubilidades, características que afetam a adsorção dos AS na superfície dos sistemas transferossomais e, consecutivamente, o seu mecanismo de redução da tensão superficial das vesículas.

Assim, o reduzido tamanho dos transferossomas da formulação 7 tem origem no HLB de ambos os AS utilizados, em que o Span[®] 80 (HLB 4,3) e o Tween[®] 80 (HLB 15), pelo seu amplo espectro de afinidade lipofílica e hidrofílica, são capazes de uma adsorção completa nas camadas transferossomais, permitindo uma redução mais eficaz do tamanho destes sistemas. Em contrapartida, o maior PDI apresentado por esta formulação pode ser explicado com base no rácio AS:Lípido, em que a menor quantidade de AS em relação à quantidade de lípido pode não ser suficiente para garantir a equidistribuição de AS por vesícula, diminuindo a homogeneidade de tamanho de partícula. (Bnyan et al., 2018) Em contrapartida, verificou-se uma diminuição do PDI nas formulações com maior quantidade de um único AS presente na formulação (formulações 5 e 6), já que desta forma provavelmente se verifica uma distribuição mais homogênea de AS por vesícula.

Relativamente à formulação 6, verificou-se um aumento de tamanho e uma diminuição do PDI dos transferossomas analisados na presença de apenas Span[®] 80. De acordo com vários estudos já descritos, o uso de surfactantes com HLB inferiores dão origem a vesículas de tamanho superior, devido à sua maior afinidade para os fosfolípidos, o que implica a diminuição mais acentuada da tensão superficial e, em consequência disso, um aumento do tamanho das vesículas. (Ahmed, 2015)

Perante todos resultados obtidos, é efetivo que o tipo e a quantidade de AS desempenham um papel fundamental a modular as propriedades físico-químicas dos sistemas transferossomais, pelo que a sua escolha e variação deve ser enquadrada nas características pretendidas.

No que diz respeito às concentrações de ibuprofeno testadas (Tabela 6), verifica-se que estas têm um forte impacto na estabilidade coloidal dos sistemas e nas suas propriedades, já que concentrações superiores a 2% (m/v) de ibuprofeno impediram a formação de sistemas vesiculares caso a concentração de AS fosse superior a 10% (m/m), com obtenção de formulações praticamente límpidas, que sugerem a formação de sistemas micelares (Figura 16). Tais resultados sugerem que a presença de ibuprofeno em quantidades superiores, concomitantemente com quantidades elevadas de AS, provoca a destabilização dos sistemas transferossomais. Assim, considerou-se uma concentração de 2% (m/v) de ibuprofeno de sódio para os estudos subsequentes.

Tendo em conta as diferenças de composição das várias formulações, foi ainda realizada uma análise macroscópica das formulações. Nesta análise, cada formulação foi observada contra um fundo preto e verificou-se que as formulações 1, 5, 6, 7 e 8 eram mais turvas do que as restantes (Figura 16). Correlacionando estas diferenças com os resultados apresentados na Tabela 6, verifica-se que as formulações de maior opacidade são aquelas que apresentaram valores detetáveis de tamanho, PDI e PZ. Assim, é possível afirmar que as formulações com melhores propriedades físico-químicas apresentam um aspeto visual típico de formulações vesiculares, pelo que se pode concluir que a composição das formulações tem um impacto direto na estabilidade vesicular e nas propriedades macroscópicas das formulações desenvolvidas.

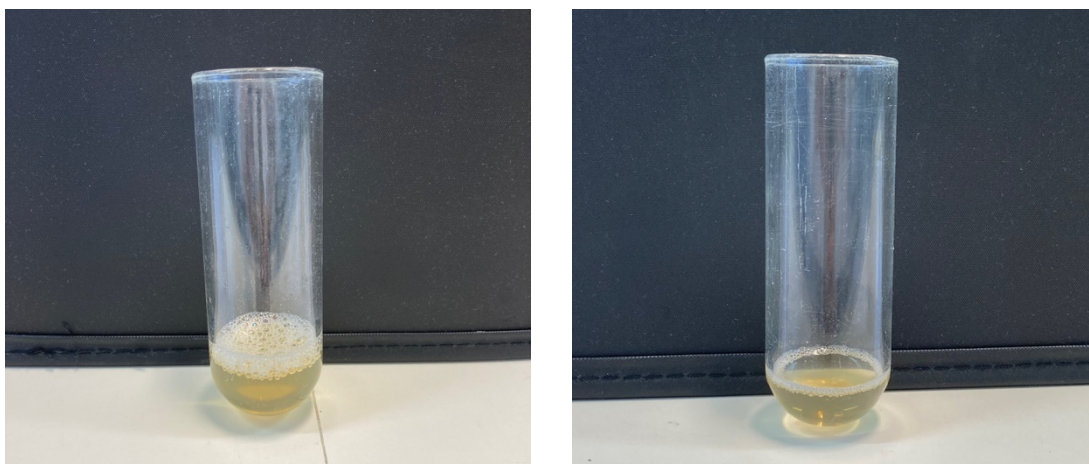


Figura 16. Aspeto macroscópico da Formulação 1 (à esquerda) e da Formulação 2 (à direita).

Um outro parâmetro crítico para a otimização de formulações transferossomais é o tempo de sonicação utilizado durante a sua produção. Os ciclos de sonicação devem ser projetados de acordo com as propriedades físico-químicas pretendidas, nomeadamente o tamanho e o PDI. Nesse contexto, com o objetivo de se estudar a influência do tempo de sonicação nestas propriedades foram realizados ciclos de sonicação com duração variável (0-30 min), sendo as formulações caracterizadas em termos de tamanho e PDI ao fim de cada período de sonicação. Tal estudo foi realizado apenas considerando as formulações 1, 5 e 6, devido ao facto de apresentarem 2% (m/v) de ibuprofeno de sódio na sua composição.

Através dos resultados obtidos (Figura 17), pode perceber-se que os primeiros ciclos de sonicação ($t=1$ e $t=5$) proporcionam uma diminuição considerável do tamanho dos transferossomas. Contudo, não permitem reduzir de forma pronunciada os valores de PDI. De facto, os resultados indicam que os tamanhos se mantêm praticamente constantes e à volta de 100 nm independentemente do tempo de sonicação (1-30 min). Por outro lado, valores de PDI por volta de 0,2 foram apenas obtidos a partir dos 10 min de sonicação. Assim, de forma a obterem-se formulações transferossomais com tamanhos por volta de 100 nm e com PDI por volta de 0,2, fará sentido considerar ciclos de sonicação de 10 a 20 min.

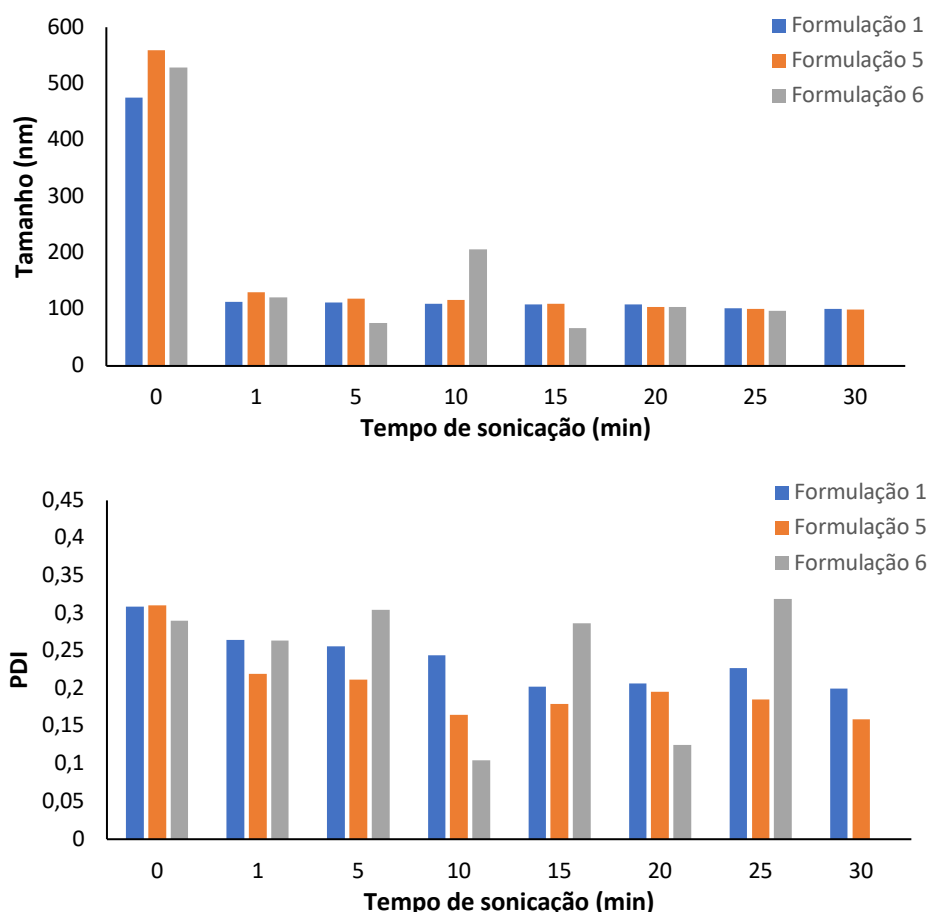


Figura 17. Tamanho (painel superior) e PDI (painel inferior) das formulações 1, 5 e 6 em função do tempo de sonicação.

É ainda importante salientar que foram também realizados estudos preliminares quanto à incorporação de Tween® 80 e ácido esteárico como ativadores de superfície em formulações transferossomais. Na ausência de ibuprofeno de sódio, foi possível obter formulações com propriedades físico-químicas interessantes com a incorporação de Tween®80:ácido esteárico:lecitina de soja (10:5:85) (Figura 18). No entanto, a incorporação adicional de ibuprofeno de sódio resultou quase sempre na destabilização das formulações vesiculares, novamente com obtenção de dispersões límpidas, típicas de sistemas micelares. Assim sendo, foi abandonada a hipótese de incorporação de ácido esteárico nas formulações transferossomais.

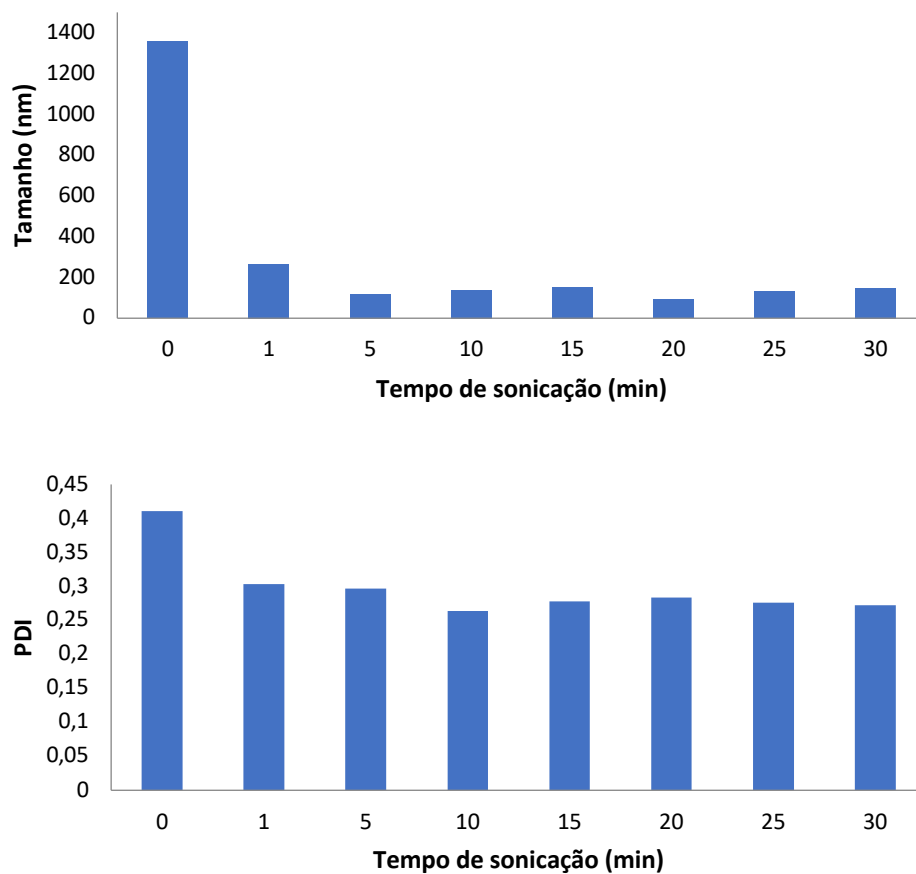


Figura 18. Tamanho (painel superior) e PDI (painel inferior) de transferossomas produzidos com 1% (m/v) de lecitina de soja, (Tween®80:ácido esteárico):PC (10:5):85% (m/m) na ausência de ibuprofeno de sódio em função do tempo de sonicação.

16. Otimização dos transferossomas

Tal como descrito anteriormente, a otimização das formulações de transferossomas teve por base uma estratégia de *quality-by-design* designada desenho experimental do tipo Box-Behnken (BBD), onde se consideraram 15 séries com três fatores e três respostas. De acordo com os fatores e respetivos níveis a testar, previamente estabelecidos com base nos estudos preliminares e em dados provenientes da literatura (Tabela 4), utilizou-se o software STATISTICA para se determinar as quinze formulações a produzir em laboratório, fazendo variar as variáveis independentes – concentração de lípido (X_1), razão Tween[®] 80/Span[®] 80 (X_2), tempo de sonicação (X_3) – tal como se especifica na Tabela 7. (Pereira-Leite & Ventura, 2020)

Após o processo de produção, todas as formulações foram caracterizadas em relação às variáveis dependentes pré-definidas – tamanho (Y_1), PDI (Y_2) e PZ (Y_3) – e os resultados obtidos para cada formulação encontram-se também descritos na Tabela 7. Nesta etapa é importante realçar que foi também determinada a EE e a CC para todas as formulações, contudo, devido a problemas relacionados com o método inicialmente escolhido para separar a fração não-encapsulada de ibuprofeno de sódio, não foi possível a obtenção de valores fidedignos para a C_{PL} , pelo que estes valores não foram considerados para o BBD.

Tabela 7. Composição das formulações transferossomais produzidas de acordo com as variáveis independentes pré-estabelecidas e respetiva caracterização das variáveis dependentes em estudo.

Formulação	Variáveis independentes			Variáveis dependentes		
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	0,75	5:10	20	(128 ± 1)	(0,15 ± 0,02)	(0,1 ± 0,3)
2	0,50	5:10	15	(126 ± 1)	(0,17 ± 0,01)	(-0,1 ± 0,2)
3	0,75	7,5:7,5	15	(125 ± 1)	(0,17 ± 0,01)	(0,0 ± 0,3)
4	0,75	10:5	10	(121 ± 4)	(0,17 ± 0,02)	(-0,1 ± 0,1)
5	0,50	7,5:7,5	10	(126 ± 2)	(0,17 ± 0,01)	(0,3 ± 0,2)
6	1,00	5:10	15	(132 ± 1)	(0,16 ± 0,01)	(0,1 ± 0,5)
7	0,50	7,5:7,5	20	(157 ± 5)	(0,24 ± 0,02)	(-0,2 ± 0,1)
8	0,75	7,5:7,5	15	(124 ± 1)	(0,14 ± 0,00)	(0,0 ± 0,2)
9	1,00	7,5:7,5	10	(134 ± 2)	(0,16 ± 0,02)	(0,0 ± 0,2)
10	0,50	10:5	15	(120 ± 1)	(0,17 ± 0,02)	(0,0 ± 0,2)
11	0,75	7,5:7,5	15	(87 ± 7)	(0,15 ± 0,02)	(-0,2 ± 0,1)
12	0,75	10:5	20	(108 ± 4)	(0,17 ± 0,01)	(0,1 ± 0,2)
13	0,75	5,0:10	10	(95 ± 8)	(0,22 ± 0,02)	(0,1 ± 0,3)
14	1,00	7,5:7,5	20	(122 ± 3)	(0,17 ± 0,01)	(0,0 ± 0,2)
15	1,00	10:5	15	(47 ± 3)	(0,25 ± 0,03)	(0,1 ± 0,1)

X₁: concentração de lípido (% (m/v)), X₂: razão Tween[®] 80/Span[®] 80 (% (m/m)), X₃: tempo de sonicação (min), Y₁: tamanho (nm), Y₂: PDI, Y₃: PZ (mV). Todos os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Após uma breve análise da tabela 7, é possível perceber que os resultados médios obtidos apresentam uma variação entre os 47 nm e 157 nm para o tamanho (Y₁); 0,14 e 0,25 para o PDI (Y₂) e -0,2 e 0,3 para o PZ (Y₃). Assim, pode concluir-se que os níveis atribuídos às variáveis independentes foram apropriados, uma vez que permitiram obter resultados dentro dos critérios desejáveis definidos.

Considerando os valores de R² obtidos, foi selecionado o modelo matemático mais adequado para correlacionar os resultados experimentais obtidos e os valores previstos pelo software STATISTICA. Esta correlação foi melhor descrita pelo modelo de interações bidirecionais (linear x quadrático), já que se obtiveram valores de R² superiores a 0,8 (0,895; 0,972; 0,905) para as três variáveis dependentes analisadas (Y₁, Y₂, Y₃, respetivamente), com 95% de nível de confiança. Em linha com o referido, é efetivo concluir que os efeitos promovidos pelos fatores nas respostas justificam a utilização de um modelo cúbico para a modelação dos dados experimentais que são fundamentais para prever a formulação desejável.

Através de análises de regressão baseadas no modelo de interações bidirecionais (linear x quadrático), foram obtidos gráficos de superfície de resposta, em três dimensões, com o intuito de melhor demonstrar os efeitos da variação de dois fatores em cada resposta (Figuras 19, 20 e 21). Nesse sentido, conforme as representações gráficas exibidas, é possível inferir que transferossomas menores são obtidos para uma razão de Tween[®] 80/Span[®] 80 (X₂) superior a 9:6 quando a concentração de lípido (X₁) se situa no intervalo de 0,9-1,1 % (m/v) (Figura 19) e ainda para um tempo de sonicação (X₃) de cerca de 14 min quando a concentração de lípido (X₁) é de cerca de 0,8 % (m/v).

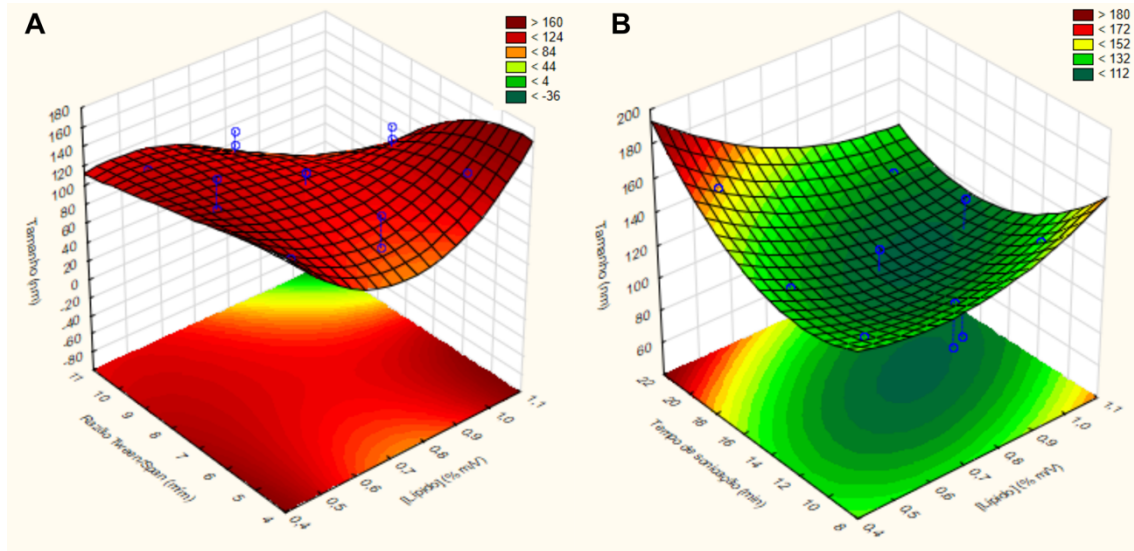


Figura 19. Efeito da variação dos fatores – concentração de lípido (X_1), razão Tween[®] 80/Span[®] 80 (X_2) e tempo de sonicação (X_3) – no tamanho dos transferossomas.

A propósito dos gráficos de superfície de resposta correspondentes ao PDI (Figura 20), verifica-se que é possível obter valores de PDI inferiores a 0,23, exceto se forem utilizadas razões de Tween[®] 80/Span[®] 80 superiores a 10:5 concomitantemente com concentrações de lípido superiores a 1% (m/v). Por outro lado, os valores de PDI são superiores a 0,23 quando se utilizam tempos de sonicação superiores a 16 min e concentrações de lípido menores que 0,6% (m/v).

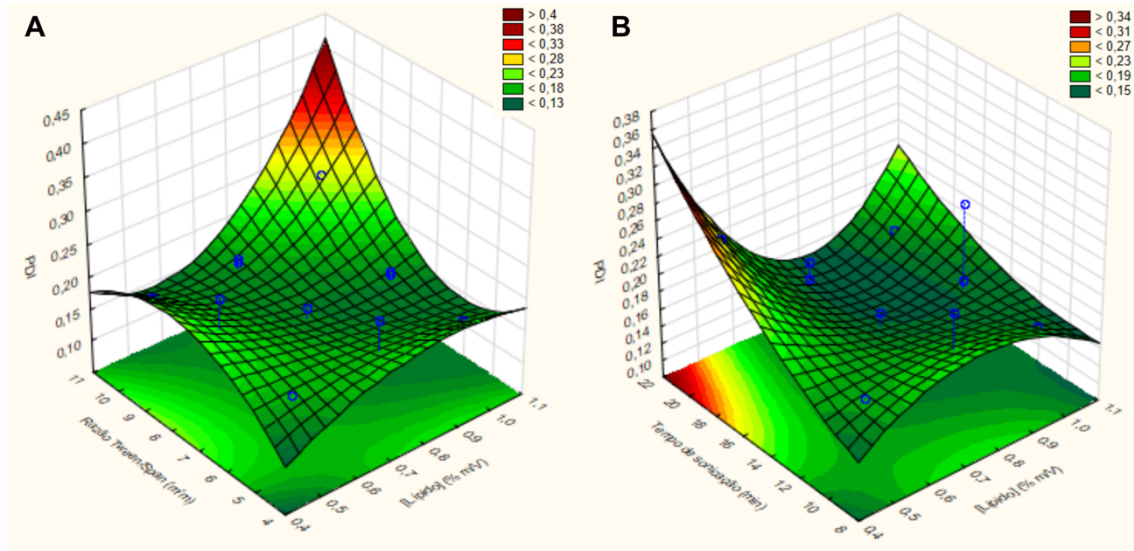


Figura 20. Efeito da variação dos fatores – concentração de lípido (X_1), razão Tween[®] 80/Span[®] 80 (X_2) e tempo de sonicação (X_3) – no PDI dos transferossomas.

Relativamente ao PZ (Figura 21), verifica-se que os menores valores são obtidos com razões de Tween[®] 80/Span[®] 80 menores que 5:10 na presença de menos do que 0,5% (m/v) de concentração de lípidos. Por outro lado, tempos de sonicação entre os 20 e os 22 min quando a concentração de lípido assume valores próximos de 0,4% (m/v) também permite reduzir ligeiramente o valor do potencial zeta.

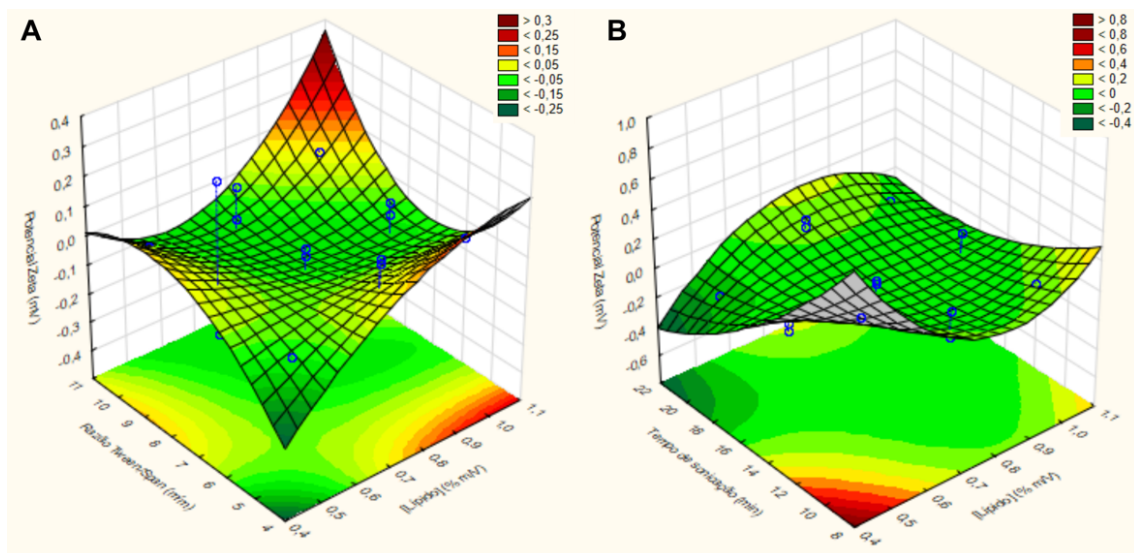


Figura 21. Efeito da variação dos fatores – concentração de lípido (X_1), razão Tween[®] 80/Span[®] 80 (X_2) e tempo de sonicação (X_3) – no potencial zeta dos transferossomas.

Com base nas conclusões retiradas a partir da análise de regressão efetuada e dos gráficos de superfície de resposta, utilizou-se o software STATISTICA para o cálculo dos valores ótimos de cada fator necessários para se obter a formulação otimizada com os critérios desejáveis pré-definidos, assim como para se obter uma previsão teóricas das respostas a obter (Tabela 8). De modo a validar os valores teóricos previstos para cada uma das respostas (Y_1 , Y_2 , Y_3), foram produzidas e, posteriormente caracterizadas, três réplicas independentes da formulação otimizada. Neste ponto é relevante mencionar que foram determinados os parâmetros de EE e de CC para todas as réplicas produzidas, ainda que estes não tenham sido previstos pelo BBD (Tabela 8).

Tabela 8. Valores ótimos dos fatores (X_1 , X_2 , X_3) necessários ao desenvolvimento da formulação otimizada e as suas respetivas respostas previstas teoricamente e obtidas experimentalmente.

Formulação otimizada	Resposta	Valores teóricos	Valores experimentais	-95% CI	+ 95% CI
0,5: (8,75:6,25) :10 ($X_1 : X_2 : X_3$)	Y_1	129,5	115 ± 2	34,2	224,8
	Y_2	0,159	$0,19 \pm 0,02$	0,096	0,222
	Y_3	0,330	$0,1 \pm 0,4$	- 0,127	0,786
	EE (%)	-	12 ± 4	-	-
	CC (%)	-	51 ± 15	-	-

X_1 : concentração de lípido (% (m/v)), X_2 : razão Tween[®] 80/Span[®] 80 (% (m/m)), X_3 : tempo de sonicação (min), Y_1 : tamanho (nm), Y_2 : PDI, Y_3 : PZ (mV); CI, intervalo de confiança; EE: eficiência de encapsulação (%), CC: Capacidade de carga (%). Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Através dos valores experimentais obtidos (Tabela 8), pode concluir-se que o desenho experimental é válido para a otimização das formulações em estudo, uma vez que estes estão em conformidade com os valores teóricos previstos pelo software. Para além disso, é relevante notar que a CC apresenta um valor bastante satisfatório, apesar da EE ter ficado abaixo das expectativas, quando comparada com os resultados obtidos por outros autores. (Darusman et al., 2018; Irfan et al., 2012)

Na literatura existem alguns estudos quanto ao desenvolvimento de transferossomas para veicular o ibuprofeno. Segundo um estudo publicado em 2012, as melhores formulações apresentaram tamanhos de 962 nm e 2250 nm, com um PZ de -16,1 e -17,5, respetivamente. (Irfan et al., 2012) Paralelamente a este estudo, foi desenvolvido um outro em 2018, onde a formulação de melhores características exibiu

um tamanho de 1254 nm, não havendo qualquer tipo de informação para o PZ. (Darusman et al., 2018)

Estabelecendo uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo e os resultados provenientes dos estudos referidos, é importante constatar que a formulação otimizada (Tabela 8) representa uma evidente evolução quanto às suas propriedades físico-químicas, com exceção do PZ. O tamanho de 129,5 nm e o PDI de 0,159 permitem comprovar que a formulação desenvolvida neste estudo possui propriedades mais vantajosas para a veiculação de ibuprofeno de sódio por via transdérmica, já que apresenta um tamanho ótimo para penetrar até zonas profundas da pele (reportado como tendo de ser menor que 300 nm) (H. A. Benson, 2006; Vinod et al., 2012), com uma homogeneidade de tamanho de vesículas ideal.. Embora os resultados sejam promissores, é importante referir que o PZ obtido (0,330 mV) não garante uma repulsão efetiva entre as partículas, normalmente obtida para valores de PZ maiores do que $|30|$ mV (Uskoković, 2012), pelo que a sua melhoria é necessária para garantir a estabilidade coloidal da formulação.

D. Conclusão

D. Conclusão

A utilização de sistemas de veiculação para administração cutânea veio oferecer uma solução possível para os problemas relacionados com a segurança e o transporte de compostos terapêuticos através da pele. Apesar das suas vantagens intrínsecas, existem alguns desafios relacionados com a impermeabilidade da barreira cutânea e com as propriedades do fármaco a administrar que impedem muitas vezes a implementação clínica de sistemas de veiculação para administração cutânea. Cada vez mais têm sido sugeridas novas estratégias para ultrapassar estes desafios, que consistem muitas vezes na utilização de nanossistemas para veicular compostos através da barreira cutânea, enquanto se mantêm as propriedades físico-químicas dos mesmos.

Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de uma formulação baseada num nanossistema transferossomal, com vista à administração transdérmica de ibuprofeno de sódio. Para isso, inicialmente foram realizados estudos de pré-formulação de forma a se obter a caracterização do ibuprofeno de sódio, quanto à sua solubilidade e propriedades espectrofotométricas. De seguida, realizaram-se estudos preliminares para se selecionarem os componentes (e respetivas quantidades) a serem empregues no desenvolvimento da formulação transferossomal. E, por último, recorreu-se a um desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BBD) para se otimizar as várias propriedades dos transferossomas (tamanho, PDI e PZ), através do estudo inicial do impacto das variáveis independentes selecionadas (X_1 , X_2 , X_3) nessas mesmas propriedades.

A formulação transferossomal otimizada neste trabalho apresentou tamanho (115 ± 2 nm) e PDI ($0,19 \pm 0,02$) muito promissores para administração transdérmica. Quanto ao PZ ($0,1 \pm 0,4$ mV), EE ($12 \pm 4\%$) e CC ($51 \pm 15\%$) obtidos, há ainda alguma margem para se melhorar a formulação, de forma a melhorar a estabilidade coloidal da formulação e eficiência de encapsulação do ibuprofeno de sódio. Ainda assim, os valores experimentais obtidos estão de acordo com as previsões teóricas do BBD, pelo que a abordagem de *quality-by-design* utilizada é válida para a otimização de transferossomas. Para além disso, a formulação desenvolvida neste trabalho foi um avanço significativo quanto a uma possível administração transdérmica do ibuprofeno de sódio, já que, até ao momento, foram apenas descritas formulações transferossomais de ibuprofeno na escala micrométrica, a qual inviabiliza a sua aplicação transdérmica.

Apesar dos avanços supracitados, há ainda espaço para melhorar o nanossistema de veiculação desenvolvido. Assim, é imperativo que as pesquisas futuras sejam abrangentes e aprofundadas de modo a confirmar a potencialidade da formulação desenvolvida e garantir o benefício da sua utilização por via transdérmica, através, por exemplo, de estudos de elasticidade dos transferossomas e de estudos *in vitro* de permeação cutânea. Seria também muito importante avaliar a segurança da formulação, através de estudos *in vitro* de citotoxicidade, seguidos de estudos *in vivo* de compatibilidade cutânea. Por último, seria interessante comparar a performance da formulação desenvolvida em relação a formulações já utilizadas na clínica atualmente.

E. Referências

E. Referências

- 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., Hanifehpour, Y., ... Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102.
<https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Al-Lawati, H., Binkhathlan, Z., & Lavasanifar, A. (2019). Nanomedicine for the effective and safe delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of preclinical research. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142(April), 179–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.025>
- Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438–470.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>
- Ascenso, A., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Praça, F., Bentley, V., ... Simões, S. (2015). Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5837.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S86186>
- Balmaceda, C. M. (2014). Evolving guidelines in the use of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-15-27>
- 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. A. (2006). Transfersomes for transdermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3(6), 727–737. <https://doi.org/10.1517/17425247.3.6.727>
- Benson, H. A. E., Grice, J. E., Mohammed, Y., Namjoshi, S., & Roberts, M. S. (2019). Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart

- Technologies. *Current Drug Delivery*, 16(5), 444–460.
<https://doi.org/10.2174/1567201816666190201143457>
- 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>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A., & Akomeah, F. K. (2006). Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery*, 13(3), 175–187. <https://doi.org/10.1080/10717540500455975>
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, 9(4), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Campbell, K. L., & Lichtensteiger, C. A. (2016). 1 Structure and Function of the Skin. Em I. D. Papel, J. L. Frodel, G. R. Holt, W. F. Larrabee, N. E. Nachlas, S. S. Park, ... D. M. Toriumi (Eds.), *Facial Plastic and Reconstructive Surgery* (pp. 1–9). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-0036-135547>
- Carita, A. C., Eloy, J. O., Chorilli, M., Lee, R. J., & Leonardi, G. R. (2018). Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 25(5), 606–635.
<https://doi.org/10.2174/0929867324666171009120154>
- Chacko, I. A., Ghatge, V. M., Dsouza, L., & Lewis, S. A. (2020). Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 195(June), 111262.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111262>
- Chatani, H., Goto, S., Kataoka, H., Fujita, M., Otsuka, Y., Shimada, Y., & Terada, H. (2019). Effects of phosphate on drug solubility behavior of mixture ibuprofen and lidocaine. *Chemical Physics*, 525(June), 110415.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110415>
- Chaudhary, H., Kohli, K., & Kumar, V. (2013). Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(1), 367–380. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.031>
- 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(August), 18–39.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.015>
- Darusman, F., Raisya, R., & Priani, S. E. (2018). Development, characterization, and performance evaluation of transfersome gel of ibuprofen as a transdermal drug delivery system using nanovesicular carrier. *Drug Invention Today*, 10(Special Issue 5), 3750–3755. Obtido de <https://jprsolutions.info/files/ms-file-5c2da484a56007.32573214.pdf>
- Derry, S., Conaghan, P., Da Silva, J. A. P., Wiffen, P. J., & Moore, R. A. (2016). Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 96(9), 573–574.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007400.pub3>
- Dugar, R. P., Gajera, B. Y., & Dave, R. H. (2016). Fusion Method for Solubility and Dissolution Rate Enhancement of Ibuprofen Using Block Copolymer Poloxamer 407. *AAPS PharmSciTech*, 17(6), 1428–1440. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0482-6>
- El Maghraby, G. M., Barry, B. W., & Williams, A. C. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4–5), 203–222. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.05.002>
- 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>
- Escobar-Chavez, J., Diaz-Torres, R., Rodriguez-Cruz, I. M., Domínguez-Delgado, Sampere-Morales, Angeles-Anguiano, & Melgoza-Contreras. (2012). Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, (May 2014), 3. <https://doi.org/10.2147/RRTD.S32621>
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., ... 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>
- Gaur, P. K., Bajpai, M., Mishra, S., & Verma, A. (2016). Development of ibuprofen nanoliposome for transdermal delivery: Physical characterization, in vitro/in vivo

- studies , and anti-inflammatory activity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 370–375. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953631>
- Ghanbarzadeh, S., & Arami, S. (2013). Enhanced Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium via Conventional Liposomes, Ethosomes, and Transfersomes. *BioMed Research International*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/616810>
- Ghanbarzadeh, S., Khorrami, A., & Arami, S. (2015). Nonionic surfactant-based vesicular system for transdermal drug delivery. *Drug Delivery*, 22(8), 1071–1077. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.873837>
- Gorzalanny, C., Mess, C., Schneider, S. W., Huck, V., & Brandner, J. M. (2020). Skin Barriers in Dermal Drug Delivery: Which Barriers Have to Be Overcome and How Can We Measure Them? *Pharmaceutics*, 12(7), 684. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070684>
- Gupta, R., Dwadasi, B. S., Rai, B., & Mitragotri, S. (2019). Effect of Chemical Permeation Enhancers on Skin Permeability: In silico screening using Molecular Dynamics simulations. *Scientific Reports*, 9(1), 1456. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37900-0>
- Hamishehkar, H., Rahimpour, Y., & Kouhsoltani, M. (2013). Niosomes as a propitious carrier for topical drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(2), 261–272. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.746310>
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, 11(March 2018), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
- Harirforoosh, S., Asghar, W., & Jamali, F. (2014). Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 821. <https://doi.org/10.18433/J3VW2F>
- Hawthorn, C. (2020). A Narrative Review: The Use of the Topical NSAID Ibuprofen for the Treatment of Knee Osteoarthritis. Supporting Clinician Decision-Making in the First-Line Treatment of Osteoarthritis. *Rehabilitation Process and Outcome*, 9, 117957272091494. <https://doi.org/10.1177/1179572720914945>
- Honeywell-Nguyen, P. L., & Bouwstra, J. A. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.003>
- Hu, C., & Rhodes, D. G. (2000). Proniosomes: a novel drug carrier preparation.

- International journal of pharmaceutics*, 206(1–2), 110–122. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11202988>
- 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. Obtido de https://www.researchgate.net/publication/272149413_Preparation_and_characterization_of_Ibuprofen_loaded_transferosome_as_a_novel_carrier_for_transdermal_drug_delivery_system
- 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>
- Jain, S., Jain, P., Umamaheshwari, R. B., & Jain, N. K. (2003). Transfersomes—A Novel Vesicular Carrier for Enhanced Transdermal Delivery: Development, Characterization, and Performance Evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(9), 1013–1026. <https://doi.org/10.1081/DDC-120025458>
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD*, 12(4), 390–399; quiz 400–401. Obtido de https://www.researchgate.net/publication/11279803_Anatomy_histology_and_immunohistochemistry_of_normal_human_skin
- Kapoor, M. S., GuhaSarkar, S., & Banerjee, R. (2017). Stratum corneum modulation by chemical enhancers and lipid nanostructures: implications for transdermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8(8), 701–718. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0045>
- Kezic, S., & Jakasa, I. (2016). Filaggrin and Skin Barrier Function. Em *Current problems in dermatology* (Vol. 49, pp. 1–7). <https://doi.org/10.1159/000441539>
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Kulkarni, V. S. (2010). Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Em *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (First Edit, pp. 59–94). Oxford, UK: Vitthal S. Kulkarni. Obtido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780815520252100034>
- Kumar, L., Verma, S., Singh, M., Chalotra, T., & Utreja, P. (2018). Advanced Drug

- Delivery Systems for Transdermal Delivery of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. *Current Drug Delivery*, 15(8), 1087–1099.
<https://doi.org/10.2174/1567201815666180605114131>
- Levis, K. A., Lane, M. E., & Corrigan, O. I. (2003). Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 253(1–2), 49–59. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00645-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00645-2)
- Liu, G., Hou, S., Tong, P., & Li, J. (2020). Liposomes: Preparation, Characteristics, and Application Strategies in Analytical Chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1805293>
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
- 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>
- Marianecchi, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Celia, C., Paolino, D., Alhaique, F., ... Carafa, M. (2014). Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 187–206.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.018>
- Martiderm. (2021). No Title. Obtido 15 de Janeiro de 2021, de <https://www.martiderm.pt/a-pele/descubra-a-pele>
- McLafferty, E., Hendry, C., & Farley, A. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*, 27(3), 35–42.
<https://doi.org/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>
- Murthy, N. S., & Shivakumar, N. H. (2010). Topical and Transdermal Drug Delivery. Em V. S. Kulkarni (Ed.), *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (First edit, pp. 1–35). Mississippi: Elsevier.
- Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., & Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 12(9), 855. <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. Em *Nonsteroidal Anti-Inflammatory*

- Drugs* (Vol. 16, pp. 509–527). 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>
- Pathak, Y., & Thassu, D. (2016). *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. (Y. Pathak & D. Thassu, Eds.), *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781420078053>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Pereira-Leite, C., & Ventura, C. (2020). Optimization of gallic acid-loaded transfersomes using a Box-Behnken factorial design. *Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal*, 17(2), 1–13. <https://doi.org/10.19277/bbr.17.2.244>
- Pinto, M. A., & Rosa, S. M. (2013). Resposta inflamatória. Em *Fisiopatologia Fundamentos e Aplicações* (2ª Edição, pp. 185–217). Lisboa: Lidel- Edições Técnicas, Lda.
- Pouillot, A., Dayan, N., Polla, A. S., Polla, L. L., & Polla, B. S. (2008). The stratum corneum: a double paradox. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7(2), 143–148. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00379.x>
- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1261–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- 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>
- Rajendran, N. K., Kumar, S. S. D., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). A review on nanoparticle based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.009>
- Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2011). Niosomes: A controlled

- and novel drug delivery system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(7), 945–953. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.945>
- Rannou, F., Pelletier, J.-P., & Martel-Pelletier, J. (2016). Efficacy and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(4), S18–S21. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.11.007>
- Rao, P., & Knaus, E. E. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81. <https://doi.org/10.18433/J3T886>
- Raza, K., Kumar, M., Kumar, P., Malik, R., Sharma, G., Kaur, M., & Katare, O. P. (2014). Topical Delivery of Aceclofenac: Challenges and Promises of Novel Drug Delivery Systems. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/406731>
- Rinaldi, F., Del Favero, E., Rondelli, V., Pieretti, S., Bogni, A., Ponti, J., ... Carafa, M. (2017). pH-sensitive niosomes: Effects on cytotoxicity and on inflammation and pain in murine models. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 538–546. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1268607>
- Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery*, 4(4), 297–305. <https://doi.org/10.2174/156720107782151269>
- Santos, A. C., Morais, F., Simões, A., Pereira, I., Sequeira, J. A. D., Pereira-Silva, M., ... Ribeiro, A. (2019). Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(4), 313–330. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1585426>
- Schjerning, A. M., McGettigan, P., & Gislason, G. (2020). Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs. *Nature Reviews Cardiology*, 17(9), 574–584. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0366-z>
- Seeley, R. R., Stephen, D. T., & Tate, P. (2008). *Anatomy & Physiology*. (Lusociência, Ed.) (8th ed.). Boston: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Shumilov, M., Bercovich, R., Duchi, S., Ainbinder, D., & Touitou, E. (2010). Ibuprofen Transdermal Ethosomal Gel: Characterization and Efficiency in Animal Models. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6(5), 569–576. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1153>
- Singh, D., Pradhan, M., Nag, M., & Singh, M. R. (2015). Vesicular system: Versatile

- carrier for transdermal delivery of bioactives. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 43(4), 282–290. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.883401>
- Sostres, C., Gargallo, C. J., & Lanás, A. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Research & Therapy*, 15(Suppl 3), S3. <https://doi.org/10.1186/ar4175>
- Tomić, M., Micov, A., Pecikoza, U., & Stepanović-Petrović, R. (2017). Clinical Uses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Potential Benefits of NSAIDs Modified-Release Preparations. Em *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* (pp. 1–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804017-1.00001-7>
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., & Eliaz, M. (2000). Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*, 65(3), 403–418. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00222-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00222-9)
- Uchechi, O., Ogbonna, J. D. N., & Attama, A. A. (2014). Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. Em *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech. <https://doi.org/10.5772/58672>
- Uskoković, V. (2012). Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(12), 1762–1786. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.625523>
- Van Der Meel, R., Fens, M. H. A. M., Vader, P., Van Solinge, W. W., Eniola-Adefeso, O., & Schiffelers, R. M. (2014). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. *Journal of Controlled Release*, 195, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.049>
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *The American Journal of Medicine*, 104(3), 2S–8S. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)00203-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00203-9)
- 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>
- Venceslau Fernandes, A. Ri. (2016). *Enhancing the Solubility of Ibuprofen*. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Obtido de https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/36512/1/DM_ARFernandes.pdf
- Venuganti, V. V., & Perumal, O. P. (2009). Nanosystems for Dermal and Transdermal

- Drug Delivery. Em Y. Pathak & D. Thassu (Eds.), *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization* (pp. 126–148). South Dakota, U.S.A.: Informa Healthcare. Obtido de <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.3109/9781420078053-13/nanosystems-dermal-transdermal-drug-delivery-venkata-vamsi-venuganti-omathanu-perumal>
- Vinod, K. R., Kumar, M. S., Anbazhagan, S., Sandhya, S., Saikumar, P., Rohit, R. T., & Banji, D. (2012). Critical issues related to transfersomes - novel vesicular system. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, 11(1), 67–82. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230977>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., & Rangaswami, J. (2018). A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging and Disease*, 9(1), 143. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0306>
- Zeng, C., Wei, J., Persson, M. S. M., Sarmanova, A., Doherty, M., Xie, D., ... Zhang, W. (2018). Relative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *British Journal of Sports Medicine*, 52(10), 642–650. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-098043>
- Zhou, X., Hao, Y., Yuan, L., Pradhan, S., Shrestha, K., Pradhan, O., ... Li, W. (2018). Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. *Chinese Chemical Letters*, 29(12), 1713–1724. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.10.037>
- Zununi Vahed, S., Salehi, R., Davaran, S., & Sharifi, S. (2017). Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1327–1341. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.073>