

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia

Departamento de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica



# **Nanotecnologia Aplicada a Formulações Tópicas de Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteróides**

**Giuliana Mancini**

Doutoramento em Farmácia

Especialidade em Tecnologia Farmacêutica

2014

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia

Departamento de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica



# **Nanotecnologia Aplicada a Formulações Tópicas de Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteróides**

**Giuliana Mancini**

Tese orientada pelo Prof. Doutor António J. L. Das Neves Almeida, pelo Dr. António Bica e pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Helena Margarida Marques Ribeiro, especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor no ramo de Farmácia, especialidade de Tecnologia Farmacêutica

## Agradecimentos

Alla mia famiglia, perché hanno sempre creduto in me, perché nonostante abbiano visto la propria figlia lasciarsi tutto alle spalle per inseguire il suo sogno, mi hanno sempre appoggiato, nei momenti di sconforto nonostante ci separassero km erano sempre lì, a darmi una mano e un abbraccio per poter andare avanti nel mio sogno a testa alta, perché senza di loro, senza il loro aiuto, senza la loro educazione sicuramente non sarei mai arrivata dove sono arrivata sino ad oggi, perché nonostante tutti i ringraziamenti che potrò fargli non saranno mai abbastanza comparati con i sacrifici che hanno fatto per potermi sempre accontentare in tutto.

Aos Meus Orientadores: al Prof Antonio perché nonostante tutto mi ha dato sempre fiducia, e sempre stato al mio fianco per difendermi quando ne avevo bisogno, per tutto l'aiuto e la pazienza che ha avuto in questi anni, perché sicuramente senza il suo aiuto non avrei mai raggiunto il traguardo. Alla Profssa Helena, perché anche lei con la sua allegria e la sua decisione mi ha aiutato ad andare sempre avanti, con determinazione e forza, per tutte le volte che ha avuto pazienza nei miei momenti di sconforto e mi ha aiutato a rialzarmi ed andare avanti. Al Dr Antonio Bica, per avermi dato la possibilità di svolgere questa tesi in parte nei laboratori LEF, per l'aiuto datomi nella sua visione sicuramente più pratica e industriale dello svolgimento di questa tesi.

A Prima Lara, perché non c'è sicuramente bisogno di nessun legame di sangue per sentirsi veramente uniti come se fossimo della stessa famiglia, perché bastava uno sguardo per capirci, per intenderci. Perché quando tu sei andata via parte di me è partita con te, e anche ora che sono rientrata nella mia amata terra penso a quanto sarebbe bello averti al mio fianco, perché sei la persona più allegra che conosco, e sono sicura che nonostante la lontananza, il nostro legame rimarrà tale.

A Querrida Lidia, va a lei un ringraziamento più che speciale, perché senza il suo aiuto, non sarei mai riuscita ad arrivare sino al traguardo, perché lei con il suo ingegno è riuscita a farmi arrivare anche dove da sola non ci sarei mai riuscita, lei che mi ha sempre supportato nei momenti di sconforto e in quelli di felicità per i buoni risultati ottenuti, alle nostre interminabili chiacchierate di scienza e non, perché in questi anni a

Lisbona, mi ha insegnato oltre la scienza anche la vita, comportandosi come una seconda mamma.

Ai miei colleghi del Lab112, del laboratorio di Tecnologia Farmaceutica e dell'Ineti perché con allegria e aiuto reciproco ci siamo sempre supportati, un grazie particolare va a Joaquina, perché con la sua allegria e voglia di fare mi ha sempre spronato, mi ha sempre detto proviamo e vediamo come va, anche quando avevo perso le speranze, per tutte le volte che mi ha ascoltato e aiutata, sia a livello scientifico e non; un altro grazie va a Rui, lui sempre disponibile a dare una mano a tutti alle volte lasciando il suo lavoro indietro, lo ringrazio per tutto l'aiuto dato nel corso di questi anni, di tutte le volte che ha dovuto sopportare i miei scleri e aiutarmi soprattutto con l'inglese. A Sara per essere stata sempre e comunque presente. Vorrei anche ringraziare Sandra Simões e Pedro Pinto (PhDTrials) per l'aiuto negli esperimenti *in vivo*.

Agli studenti Erasmus, italiani e non che hanno portato sempre un momento di allegria nei quattro anni di studi e soprattutto mi hanno aiutato a sentirmi a casa quando ne avevo bisogno, in modo particolare a Pier e Laura che sono praticamente diventati i miei figli adottivi e a Ilaria che ha portato gioia nell'anno più difficile, l'ultimo.

A tutti i colleghi del NanoDDS, per i momenti passati insieme in allegria e sostegno.

Ai miei colleghi dei laboratori LEF, per l'aiuto prestatomi in ogni occasione, per avermi fatto sentire sempre e comunque a casa, un ringraziamento particolare va a Maria João, per avermi aiutato a sviluppare il metodo di dosaggio del farmaco, a Andreia, a Rita, a Paula, a Sara, ao Paulo, ao João per tutte le volte che c'erano con simpatia e pazienza.

A nonna, perché con la sua fede mi ha sempre insegnato ad andare avanti, a tutti i miei parenti perché anche loro hanno creduto in me.

A Piera perché nonostante la lontananza lei era sempre lì, sempre lì per me, per sorreggermi, per sostenermi, perché forse solo lei sa quanto sono stati difficili questi anni passati lontano da casa, solo lei sa quanto sia stato difficile portare avanti questo sogno sino ad arrivare al tanto ambito traguardo, grazie amica mia, perché hai sempre trovato il tempo per ascoltarmi.

A Massy, perché anche tu eri sempre lì, soprattutto nell'ultimo anno, quello per me più difficile, perché mi hai aiutato a continuare senza perdere le speranze, agli altri miei cari amici, Claudio, Francesco e Roberta, Emanuel e Emanuel, Giovanni, Francesca, Valentina, Marco M, Marco P, Alessandro, Carla e Mary per tutte le volte che mi avete ricaricato le pile per affrontare altri 6 mesi di distanza, e per quest'ultimo anno, perché le amicizie quelle vere non si perdono.

A Daniel e famiglia, perché nonostante tutto sei sempre stato lì e ci sei ancora.

<b>Índice</b>	
Resumo	I
Abstract	III
Lista de abreviaturas	V
Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XVII
Objectivos	XIX
<b>I. Introdução</b>	1
1.1. Administração Tópica de Anti-inflamatórios não Esteróides.	2
1.2. Estrutura da Pele	2
1.3. Formas Farmacêuticas para Administração Tópica de AINE	7
1.4. Sistemas de partículas para administração tópica	10
1.4.1 Administração tópica de AINE utilizando partículas lipídicas	14
1.5. Métodos de preparação de NLS transponíveis para a escala industrial	14
1.5.1. Produção por homogeneização a alta pressão (HPH)	15
1.5.2. Produção por microemulsão	20
1.5.3. Produção por coacervação	21
1.5.4. Produção pela tecnologia de fluidos supercríticos	22
1.5.5. Produção por contactores de membrana	25
1.5.6. Produção pelo método da temperatura de inversão de fases (PIT)	27
1.5.7. Produção por <i>electrospray</i>	28
1.6. Preparação de NLS por métodos de produção não transponíveis para a escala industrial	30
1.6.1. Produção por emulsificação-evaporação de solvente	30
1.6.2 Produção por emulsificação-substituição de solvente	30
1.6.3 Produção por emulsificação-difusão de solvente	31
Bibliografia	31
<b>II. Produção de NLS por Método de Emulsificação-Evaporação de Solvente</b>	43
1. Introdução	44
2. Materiais	45
3. Métodos	46
3.1. Preparação das formulações de NLS	46

3.2. Preparação de NLS contendo agentes conservantes.	47
3.3. Esterilização por calor húmido	47
3.4. Liofilização	48
3.5. Caracterização físico-química das NLS	48
3.5.1. Diâmetro médio das partículas	48
3.5.2. Carga eléctrica superficial	48
3.5.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	49
3.5.4. Dispersão dinâmica da luz (DLS)	49
3.5.5. Microscopia de electrónica transmissão (TEM)	49
3.6. Estudos de estabilidade	50
3.7. Análise estatística	50
4. Resultados e discussão	50
4.1. Preparação das NLS	50
4.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	52
4.3. Estudos de dispersão dinâmica de luz (DLS)	53
4.4. Microscopia electrónica de transmissão (TEM)	55
4.5. Conservação antimicrobiana das NLS	55
4.6. Esterilização das NLS	57
4.7. Liofilização das NLS na presença de crioprotector	59
4.8. Estabilidade das NLS	60
4.8.1. Estabilidade das NLS contendo parabenos	61
4.8.2. Estabilidade das NLS após esterilização	63
5. Conclusões	64
Bibliografia	65
<b>III. Produção de NLS pelo método de fusão-emulsificação</b>	71
1. Introdução	72
2. Materiais	72
3. Métodos	73
3.1. Preparação das NLS	73
3.2. Caracterização física das NLS	74
3.2.1. Microscopia de força atómica (AFM)	74
3.2.2. Eficiência de encapsulação	74

3.2.3. Determinação do etofenamato e ibuprofeno por HPLC	75
3.3. Estudos de absorção percutânea <i>in vitro</i>	76
3.3.1. Estudos de libertação <i>in vitro</i>	76
3.3.2. Estudos de permeação	77
3.3.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	77
3.3.4. Estudos de internalização celular	79
3.4. Estudos de estabilidade física	79
3.5. Estudos de transposição de escala em laboratório	79
4. Resultados e discussão	82
4.1. Preparação e caracterização das NLS	82
4.2. Incorporação dos fármacos nas NLS	84
4.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	86
4.4. Dispersão dinâmica de luz (DLS)	88
4.5. Microscopia de transmissão electrónica (TEM)	89
4.6. Microscopia de força atómica (AFM)	90
4.7. Estudos <i>in vitro</i> de absorção cutânea	92
4.7.1. Ensaio de libertação dos fármacos	92
4.7.2 Ensaio de permeação dos fármacos	94
4.8. Estudos de citotoxicidade e de captação celular	95
4.9. Estudos de estabilidade física das NLS	99
4.10. Transposição de escala em laboratório de 10 ml para 1000 ml	102
5. Conclusões	103
Bibliografia	103
<b>IV. Estudo de desenvolvimento de um gel para aplicação tópica</b>	107
1. Introdução	108
2. Materiais	108
3. Métodos	109
3.1. Preparação das NLS	109
3.2. Estudos de pré-formulação do gel	109
3.2.1. Escolha do polímero e dos agentes humectantes	109
3.2.2. Selecção do método de preparação	109
3.3. Caracterização físico-química	109

3.3.1. Determinação do pH	110
3.3.2. Determinação das propriedades reológicas	110
3.3.3. Distribuição do diâmetro médio das partículas	110
3.3.4. Eficácia microbiológica dos conservantes	110
3.3.5. Controlo microbiológico	111
3.4. Formulação e preparação da formulação final	111
3.5. Estudos de estabilidade	112
3.6. Estudos <i>in vivo</i>	112
3.6.1. Human repeated insult patch test (HRIPT)	112
3.6.2. Efeitos biológicos	113
3.7. Análise estatística	114
4. Resultados e discussão	114
4.1. Estudos de pré-formulação	114
4.1.1. Selecção do polímero e do agente humectante	114
4.1.2. Selecção do método de preparação	117
4.2. Eficácia microbiológica dos conservantes	118
4.3. Preparação e caracterização da formulação final	121
4.4. Estabilidade da formulação final	123
4.4.1. Características organolépticas	123
4.4.2. Distribuição do diâmetro médio das partículas	123
4.4.3. pH e viscosidade	124
4.4.4. Controlo microbiológico	125
4.5. Estudos <i>in vivo</i>	125
4.5.1. Human repeated insult patch test (HRIPT)	125
4.5.2. Efeitos biológicos	125
5. Conclusões	128
Bibliografia	129
<b>V. Desenvolvimento de geles para aplicação tópica contendo AINE nanoencapsulados</b>	<b>133</b>
1. Introdução	134
2. Materiais	135
3. Métodos	135

3.1. Preparação das formulações	135
3.1.1. Escolha do agente humectante	135
3.2. Caracterização físico-química	136
3.2.1. Eficácia microbiológica do conservantes e validação	136
3.2.2. Determinação do etofenamato e ibuprofeno por HPLC	136
3.3. Estudos de estabilidade	136
3.4. Estudos <i>in vitro</i> de absorção percutânea	136
3.4.1. Estudos de libertação	137
3.4.2. Estudos de permeação cutânea	137
3.4.3. Ensaio de viabilidade celular	137
4. Resultados e discussão	137
4.1. Preparação das formulações e escolha do agente humectante	137
4.2. Características organolépticas	138
4.2.1. Diâmetro médio das partículas	139
4.2.2. pH e viscosidade	140
4.2.3. Eficácia microbiológica do conservante	141
4.3. Estudos de estabilidade	143
4.3.1. Características organolépticas	143
4.3.2. Diâmetro médio das partículas e distribuição granulométrica	143
4.3.3. pH e Viscosidade	147
4.3.4. Controlo microbiológico	148
4.3.5. Quantificação dos fármacos	148
4.4. Estudos <i>in vitro</i> de absorção cutânea	151
4.4.1. Libertação dos fármacos	152
4.4.2. Permeação dos fármacos	153
4.5. Estudos de viabilidade celular	155
5. Conclusões	158
Bibliografia	159
<b>VI. Estudos <i>in vivo</i> dos geles de NLS contendo etofenamato e ibuprofeno</b>	<b>163</b>
1. Introdução	164
2. Materiais	164
3. Métodos	165

3.1. Actividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	165
3.2. Histologia da pata	166
4. Resultados e discussão	166
4.1. Actividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	166
4.2. Histologia da pata	168
5. Conclusões	170
Bibliografia	171
<b>VII. Conclusões gerais</b>	173

#### **Anexos. Desenvolvimento dos métodos de quantificação dos fármacos**

Anexo I. Desenvolvimento do método de quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para o etofenamato incorporado numa formulação tópica a 0,6%.

Anexo II. Desenvolvimento do método de quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para o ibuprofeno incorporado numa formulação tópica a 0,3%.

## RESUMO:

Os geles constituem formas galénicas amplamente utilizadas para a veiculação tópica de fármacos. A penetração e o transporte de um fármaco na pele é um requisito para que o mesmo desempenhe a sua actividade terapêutica. A maioria dos fármacos não consegue permear a pele, pelo que é necessário um veículo para os transportar ou para promover a sua libertação no local de acção.

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINE) são largamente prescritos na prática clínica para o tratamento da dor e inflamação. A sua baixa permeação cutânea e os efeitos adversos, designadamente a irritação cutânea, limitam, no entanto, o seu uso prolongado. Nos últimos anos desenvolveram-se novos sistemas de aplicação destes fármacos utilizando abordagens nanotecnológicas.

Nesta dissertação foram revistas e avaliadas as estratégias mais recentes para a veiculação dos AINE e para a promoção da sua permeação cutânea. Os veículos mais recentes incluem, entre outros, partículas lipídicas, lipossomas, transferosomas e partículas poliméricas. A utilização de partículas lipídicas é desejável a nível industrial, uma vez que os métodos de fabrico utilizados são de fácil transposição para esta escala.

Este projecto teve com principal objectivo o desenvolvimento de um gel contendo AINE encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) numa concentração inferior àquela observada nas formulações existentes no mercado, mantendo-se ou mesmo melhorando, a sua eficácia terapêutica.

Neste âmbito, desenvolveram-se NLS contendo 0,6% de etofenamato e 0,3% de ibuprofeno, com um diâmetro médio inferior a 250 nm. As NLS desenvolvidas foram caracterizadas, avaliando-se os perfis de libertação e permeação através de membranas sintéticas e de pele humana. Adicionalmente estudou-se a acção anti-inflamatória *in vivo*, comparando os resultados obtidos com formulações de referência, convencionais, disponíveis no mercado. Foi também avaliada a robustez do método de preparação efectuando uma transposição de escala a nível laboratorial.

As NLS desenvolvidas foram gelificadas e as suas características físicas e químicas estudadas, avaliando-se a estabilidade física, química e microbiológica da formulação final, de acordo com os requisitos farmacêuticos. Estes estudos demonstraram que as formulações desenvolvidas são estáveis, pelo menos durante 12 meses.

Finalmente, os efeitos biológicos e a avaliação da segurança foram conduzidos para o placebo (geles sem fármaco). Relativamente ao estudo dos efeitos biológicos (perda de água transepidermica, corneometria e viscoelasticidade) do placebo, foi possível observar que este contribuiu para restaurar a barreira cutânea, devido ao aumento da hidratação da pele.

Os estudos de permeação demonstraram que as formulações desenvolvidas permitem obter concentrações de fármaco superiores às obtidas com os medicamentos de referência, que utilizam formulações convencionais. Este aumento foi atribuído à presença das NLS e dos vários excipientes utilizados como promotores de permeação.

Os estudos *in vivo* demonstraram que as formulações diminuem a inflamação e o edema na pata do rato albino, em cerca de 85%, quando comparadas com os respectivos controlos.

## ABSTRACT

In order to achieve a therapeutic activity drugs have to penetrate the skin. However, active substances lack the ability to penetrate the stratum corneum, and have to be incorporated in suitable dosage forms, such as gels, which are widely used in pharmaceutical products for topical drug delivery.

The non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely prescribed for topical treatments but usually present low skin permeation and several adverse effects, including skin irritation that limits their extended use. To overcome these drawbacks, novel topical dosage forms have been discovered and proposed in the last years, such as liposomes, transfersomes and polymeric and lipid-based nanoparticles.

In the present thesis the use of solid lipid nanoparticles (NLS) was studied as a strategy for topical application to increase the skin permeation of NSAID molecules, i.e. etofenamate and ibuprofen. It also includes the development of a gel containing these active substances encapsulated in NLS, thus combining the advantages of both systems (gel and lipid nanoparticles).

NLS with a mean particle size <250 nm were developed containing 0.6% etofenamate and 0.3% ibuprofen. Formulation studies included physicochemical characterisation, *in vitro* release profiles using synthetic membranes, *in vitro* permeation using human skin (both in Franz diffusion cells), physicochemical and microbiological stability evaluation. Stability studies demonstrated the formulations are stable during 12 months. Preliminary scale-up studies have also been performed indicating the preparation technique may be transposed to at least a 100x larger scale.

Biological effects and safety evaluation were conducted with the placebo gel according to the European legislation of cosmetics. Results from transepidermal water loss, skin hydration and viscoelasticity studies of the placebo formulation suggested a reinforcement of the skin barrier caused of the skin hydration after treatment.

The *in vivo* anti-inflammatory activity of the developed formulations was compared to that of the reference marketed formulations using a murine model. The NLS-containing formulations were found to decreased in ca. 85% the experimentally induced inflammation and edema of male Wistar rats. It was found that encapsulation in NLS allowed the use of lower drug concentrations when compared the commercial formulations of both NSAIDs.



## ABREVIATURAS

AFM - Microscopia de força atômica

AE - Álcool etílico

AI - Álcool isopropílico

AINE - Anti-inflamatório não esteróide

ANOVA - Análise de variância

A/O – Água em óleo

A/O/A - Água em óleo em água

BPC - Boas Práticas Clínicas

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

COX – Cicloxigenase

DCS - Desoxicolato de sódio

Df – Linha celular de fibroblastos

DLS - Dispersão dinâmica de luz (*Dynamic light scattering*)

DMSO - dimetilsulfóxido

DSC- Calorimetria diferencial de varrimento (*Differential scanning calorimetry*)

EE - Eficiência de encapsulação

EC - Estrato córneo

FGP - Formulário Galénico Português

FP9 – Farmacopeia Portuguesa 9

GAMA - *Gas assisted melting atomization*

GAS/SAS - *Gas/supercritical antisolvent process*

GI - Gastrointestinal

GNLS Eto - Gel de NLS contendo etofenamato

GNLS Ibu - Gel de NLS contendo ibuprofeno

GNLS Vaz - Gel de NLS sem fármaco.

GRAS - *Generally regarded as safe*

HaCaT – Linha celular de queratinócitos

HEC – Hidroxietilcellulose

HPH - Homogeneização a alta pressão

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HPMC – Hidroxipropilmetilcellulose

HR - Humidade relativa

HRIPT - *Human repeated insult patch test*

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for  
Registration of Pharmaceuticals for Human Use

Kp - Coeficiente de permeação

MTT - Azul de formazano

MR - Medicamento de referência

n.d. - não determinado

NLC - Transportadores lipídicos nanoestruturados

NLS - Nanopartículas lipídicas sólidas

NLS Eto - Nanopartículas contendo etofeato

NLS Ibu - Nanopartículas contendo ibuprofeno

NLS Vaz - Nanopartículas sem fármaco

NSAIDs – *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*

O/A – Óleo em água

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico  
(*Organisation for Economic Co-operation and Development*)

*p.a.* – pro-analise

PBS - Tampão de fosfato isotónico pH 7.4

PCA - *Precipitation from compressed antisolvent*

PEV - Partículas deformáveis

PG - Prostaglandinas

PGSS - *Particles from gas saturated solutions*

Ph. Eur. - Farmacopeia Europeia

PI - Índice de polidispersão (*polydispersity index*)

PIT - Temperatura de inversão de fases (*phase inversion temperature*)

PLGA - Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PMMA - Polimetilmetacrilato

PPG - Propilenoglicol

PTEA - Perda transepidérmica de água

PVA - Álcool polivínico

R – Parâmetro correspondente à recuperação total da pele

RESS - *Rapid expansion of supercritical solutions*

SCF - Fluidos supercríticos (*supercritical fluids*)

SDS - Laurilsulfado de sódio

SFEE - *Supercritical fluid extraction emulsions*

SLN – *Solid lipid nanoparticles*

SSF - *Static supercritical fluid process*

TEM - Microscopia electrónica de transmissão

Triton X100 - Octil-fenoxi-polietoxietanol

UA - Unidade arbitrária

UCF - Unidade formadora de colónias

Uf – Parâmetro correspondente à distensão total da pele

U.I. – Unidades Internacionais

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organisation*)



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b>	Estrutura da pele (adaptada de Kielhorn <i>et al.</i> , 2006).	3
<b>Figura 1.2.</b>	Mecanismos de absorção percutânea (adaptado de Rahimpour e Hamishehkar, 2012).	5
<b>Figura 1.3.</b>	Modelos teóricos para a estrutura das NLS. Os quadrados pretos representam as moléculas de fármaco (adaptado de Souto <i>et al.</i> , 2007).	12
<b>Figura 1.4.</b>	Representação simplificada do processo de HPH (adaptado de Junghanns e Müller, 2008).	15
<b>Figura 1.5.</b>	Esquema representativo do processo de HPH (adaptado de Cruz <i>et al.</i> , 2003).	16
<b>Figura 1.6.</b>	Esquema representativo de um homogeneizador de alta pressão de AVESTIN ( <a href="http://www.avestin.com/English/products.html">http://www.avestin.com/English/products.html</a> ).	17
<b>Figura 1.7.</b>	a) Homogeneizador Gaulin 5.5 b) Pormenor do disco de dissolução (adaptado de Shegokar <i>et al.</i> , 2011).	18
<b>Figura 1.8.</b>	Aparelho de microemulsificação (adaptado de Marengo <i>et al.</i> , 2000).	20
<b>Figura 1.9.</b>	Diagrama de fases do CO <sub>2</sub> (adaptado de Chattopadhyay <i>et al.</i> , 2005).	23
<b>Figura 1.10.</b>	Esquema representativo do processo SFEE (adaptado de Luther e Braeuer, 2012).	24
<b>Figura 1.11.</b>	Aparelho para obtenção de micro e nanopartículas pelo processo GAMA. Reservatório de CO <sub>2</sub> (1); válvulas on-off (2,6,7,11,13); permutador de calor (3); bomba (4); resistências eléctricas (5,12,16,19); indicador de pressão (PI); indicador de temperatura (TI); misturador (8); câmara de fusão (10); sistema de aquecimento (14); bomba de <i>spraying</i> (15); entrada de ar (17); redutor de pressão (18); bocal (20); compressor para o fluxo de ar (21); vaso de precipitação (22); filtro (23); medidor de fluxo (24). Adaptado de Salmaso <i>et al.</i> (2009).	25
<b>Figura 1.12.</b>	Esquema representativo do método de produção de	26

nanopartículas lipídicas por contactor de membrana (adaptado Charcosset *et al.*, 2005).

<b>Figura 1.13.</b>	Representação do método de <i>electrospray</i> (adaptado de Wu <i>et al.</i> , 2012).	29
<b>Figura 2.1.</b>	Influência do agente emulsivo no diâmetro médio das partículas e PI (Média±DP; n=3;*p<0,05 F1 e F2 - F3; **p<0,05 F3-F4).	51
<b>Figura 2.2.</b>	Termogramas das matérias primas (a) e das formulações (b).	53
<b>Figura 2.3.</b>	Variação do diâmetro médio das formulações de NLS determinada por DLS: F1 (a), F2 (b), F3 (c) e F4 (d).	54
<b>Figura 2.4.</b>	Fotografias obtidas por TEM das formulações de NLS.	55
<b>Figura 2.5.</b>	Influência da adição de parabenos no diâmetro médio das partículas e PI. Formulações sem parabenos (■); formulações com parabenos (■); formulações com concentrado de parabenos (■) (Média±DP; n=3).	56
<b>Figura 2.6.</b>	Efeito dos diferentes processos de esterilização no diâmetro das NLS e no PI: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3; *p<0,05).	58
<b>Figura 2.7.</b>	Efeito da liofilização sobre o diâmetro médio das partículas e PI das formulações antes e após esterilização em autoclave a 121°C/15 min: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3; * p<0,05).	59
<b>Figura 2.8.</b>	Estabilidade das NLS contendo parabenos adicionados durante a preparação: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3).	61
<b>Figura 2.9.</b>	Estabilidade das NLS contendo concentrado de parabenos adicionados durante a preparação: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3).	62
<b>Figura 3.1.</b>	Fórmulas de estrutura do AINE estudados: a) etofenamato; b) ibuprofeno.	73
<b>Figura 3.2.</b>	Influência da incorporação do etofenamato nas características das NLS de Compritol®; a) Diâmetro médio das partículas e PI; b) Potencial zeta (Média±DP; n=3).	85
<b>Figura 3.3.</b>	Influência da incorporação do ibuprofeno nas características das	85

	NLS de Compritol <sup>®</sup> ; a) Diâmetro médio das partículas e PI; b) Potencial zeta (Média±DP; n=3).	
<b>Figura 3.4.</b>	Eficiência de encapsulação do etofenamato (a) e ibuprofeno (b) nas NLS (Média±DP, n=3).	86
<b>Figura 3.5.</b>	Termogramas do fármaco, excipientes e NLS de Compritol <sup>®</sup> preparadas com etofenamato (NLS Vaz = NLS sem fármaco).	87
<b>Figura 3.6.</b>	Termogramas do fármaco, excipientes e NLS de Compritol <sup>®</sup> preparadas com ibuprofeno (NLS Vaz = NLS sem fármaco).	87
<b>Figura 3.7.</b>	Influência da temperatura no diâmetro médio das NLS de Compritol <sup>®</sup> , determinada por DLS.	88
<b>Figura 3.8.</b>	Influência da temperatura no diâmetro médio das NLS Eto (a) e das NLS Ibu (b) determinada por DLS.	89
<b>Figura 3.9.</b>	Micrografias das NLS obtidas por TEM: a) NLS Vaz; b) NLS Eto; c e d) NLS Ibu.	90
<b>Figura 3.10.</b>	Micrografias obtidas por AFM do alto e em secção transversal: a) NLS Vaz; b) NLS Ibu; c) NLS Eto.	91
<b>Figura 3.11.</b>	Perfil de libertação do etofenamato incorporado em NLS de Compritol <sup>®</sup> , através da membrana Tuffryn <sup>®</sup> ; a) após 6 horas, b) após 24 horas (Média±DP; n = 6).	92
<b>Figura 3.12.</b>	Perfil de libertação do ibuprofeno incorporado em NLS de Compritol <sup>®</sup> , através da membrana Tuffryn <sup>®</sup> ; a) após 6 horas, b) após 24 horas (Média±DP; n=6).	93
<b>Figura 3.13.</b>	Perfil de permeação do etofenamato incorporado em NLS de Compritol <sup>®</sup> , através do estrato córneo (Média±DP; n=6).	94
<b>Figura 3.14.</b>	Perfil de permeação do ibuprofeno incorporado em NLS de Compritol <sup>®</sup> , através do estrato córneo (Média±DP; n=6).	94
<b>Figura 3.15.</b>	Viabilidade da linha celular Df determinada pelo teste do MTT, após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu (3 mgml <sup>-1</sup> ); NLS Eto (6 mgml <sup>-1</sup> ); Eto - fármaco livre (1,2 mgml <sup>-1</sup> ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio (10 mgml <sup>-1</sup> ); Meio - meio de cultura das células (Média±SD; n=9; **p<0,05 vs meio).	96

<b>Figura 3.16.</b>	Viabilidade da linha celular HaCaT em MTT após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu (3 mgml <sup>-1</sup> ); NLS Eto (6 mgml <sup>-1</sup> ); Eto - fármaco livre (1,2 mgml <sup>-1</sup> ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio (10 mgml <sup>-1</sup> ); Meio - meio de cultura das células (Média±SD; n=9; **p<0,05 vs meio).	97
<b>Figura 3.17.</b>	Viabilidade da linha celular HaCaT em resazurina após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu (3 mgml <sup>-1</sup> ); NLS Eto (6 mgml <sup>-1</sup> ); Eto - fármaco livre (1,2 mgml <sup>-1</sup> ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio (10 mgml <sup>-1</sup> ); Meio - meio de cultura das células (Média±SD; n=9; **p<0,05 vs meio).	97
<b>Figura 3.18.</b>	Viabilidade da línea celular DF em resazurina após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu (3 mgml <sup>-1</sup> ); NLS Eto (6 mgml <sup>-1</sup> ); Eto - fármaco livre (1,2 mgml <sup>-1</sup> ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio (10 mgml <sup>-1</sup> ); Meio - meio de cultura das células (Média±SD; n=9; **p<0,05 vs meio).	98
<b>Figura 3.19.</b>	Micrografias fluorescentes das NLS: (a) NLS Vaz, (b,c) NLS Ibu (d,e) NLS Eto em células HaCaT (100X).	98
<b>Figura 3.20.</b>	Diâmetro médio das partículas e PI das formulações NLS-1 e NLS-2 armazenadas a 5±3°C (Média±DP; n=3).	99
<b>Figura 3.21.</b>	Diâmetro médio das partículas e PI das formulações NLS-3 e NLS-4 armazenadas a 5±3°C (Média±DP; n=3; * p< 0,05).	99
<b>Figura 3.22.</b>	Diâmetro médio das partículas e PI das formulações de Compritol <sup>®</sup> NLS-5 e NLS-6, contendo etofenamato, armazenadas a 5±3°C (Média±DP; n=3).	101
<b>Figura 3.23.</b>	Diâmetro da partícula e PI das formulações NLS-7 e NLS-8, contendo ibuprofeno, armazenadas a 5±3°C (Média±DP; n=3).	101
<b>Figura 3.24.</b>	Diâmetro médio das partículas e PI das NLS após a transposição de escala de 10 ml para 1000 ml (Média±DP; n=3; * p< 0,05).	102
<b>Figura 4.1.</b>	Representação esquemática da preparação de 1000 g de gel de HPMC contendo NLS.	112
<b>Figura 4.2.</b>	Perfil reológico dos geles preparados com os dois polímeros	114

	HEC e HPMC a 2% m/m.	
<b>Figura 4.3.</b>	Perfil reológico dos geles de HPMC após introdução de glicerina a 5% e 10%.	115
<b>Figura 4.4.</b>	Perfil reológico dos geles de HPMC após introdução de propilenoglicol (ppg) a 5% e 10%.	115
<b>Figura 4.5.</b>	Perfil reológico dos geles de HPMC contendo glicerina. Gel 1: HPMC 2%/glicerina 5%, inicial; Gel 2: HPMC 2%/glicerina 10%, inicial; Gel 1 T30: Gel 1 após 30 dias a 25±2°C/60±5% HR; Gel 2 T30: Gel 2 após 30 dias a 25±2°C/60±5% HR.	116
<b>Figura 4.6.</b>	Perfil reológico dos geles de HPMC contendo propilenoglicol: Gel 3: HPMC 2%/propilenoglicol 5%, inicial; Gel 4: HPMC 2%/propilenoglicol 10%, inicial. Gel 3 T30: Gel 4 após 30 dias a 25±2°C/60±5% HR; Gel 4 T30: Gel 2 após 30 dias a 25±2°C/60±5% HR.	117
<b>Figura 4.7.</b>	Aspecto do gel após preparação.	122
<b>Figura 4.8.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas do gel determinadas por DLS imediatamente após a preparação. Gel sem NLS (linha verde); gel com NLS (linha vermelha), dispersão das NLS (linha azul).	123
<b>Figura 4.9.</b>	Distribuição dos diâmetros médio das partículas do gel final contendo NLS determinadas por DLS. Gel no início do ensaio de estabilidade (linha vermelha); Gel após um 1 mês a 25±2°C (linha verde); Gel após 1 mês a 40±2°C (linha azul).	123
<b>Figura 4.10.</b>	Resultados da PTEA de água durante 14 dias (Média±DP; n=20). Controlo – região anatômica sem produto.	126
<b>Figura 4.11.</b>	Resultados da capacitância epidérmica (Média±DP; n=20). Controlo – região anatômica sem produto. Controlo – região anatômica sem produto.	127
<b>Figura 4.12.</b>	Valores de Uf medidos ao longo do estudo (Média±DP; n=20). Controlo – região anatômica sem produto.	127
<b>Figura 5.1.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de etofenamato, determinadas por DLS após preparação.	139

	Suspensão de NLS (linha vermelho); GNLS com Eto (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III, linha verde).	
<b>Figura 5.2.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de ibuprofeno, determinadas por DLS após preparação. Suspensão de NLS (linha vermelha); GNLS Ibu (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III, linha verde).	139
<b>Figura 5.3.</b>	Perfil reológico dos geles de NLS com etofenamato, após preparação.	140
<b>Figura 5.4.</b>	Perfil reológico dos geles de NLS com ibuprofeno, após preparação.	140
<b>Figura 5.5.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de etofenamato, determinadas por DLS após 30 dias de armazenamento. a) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\text{HR}$ ; b) $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\text{HR}$ e c) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{HR}$ . Suspensão de NLS (linha vermelho); gel contendo NLS com etofenamato (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III, linha verde).	144
<b>Figura 5.6.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de ibuprofeno, determinadas por DLS após 30 dias de armazenamento. a) $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\text{HR}$ ; b) $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\text{HR}$ e c) $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{HR}$ . Suspensão de NLS (linha vermelha); gel contendo NLS com ibuprofeno (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III, linha verde).	145
<b>Figura 5.7.</b>	Percentagem de recuperação do etofenamato nas formulações armazenadas a $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR}$ (Média $\pm$ DP; n=3).	149
<b>Figura 5.8.</b>	Percentagem de recuperação do etofenamato nas formulações armazenadas a $30^{\circ}\text{C}/65\% \text{HR}$ (Média $\pm$ DP; n=3).	149
<b>Figura 5.9.</b>	Percentagem de recuperação do etofenamato nas formulações armazenadas a $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{HR}$ (Média $\pm$ DP; n=3).	150
<b>Figura 5.10.</b>	Percentagem de recuperação do ibuprofeno nas formulações armazenadas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{HR}$ (Média $\pm$ DP; n=3).	150
<b>Figura 5.11.</b>	Percentagem de recuperação do ibuprofeno nas formulações	151

	armazenadas a $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\%\text{HR}$ (Média $\pm$ DP; n=3).	
<b>Figura 5.12.</b>	Percentagem de recuperação do ibuprofeno nas formulações armazenadas a $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\%\text{HR}$ .	151
<b>Figura 5.13.</b>	Perfis de libertação do GNLS Eto ( $\blacklozenge$ ) e do gel de referência ( $\bullet$ ) através da membrana Tuffryn <sup>®</sup> (Média $\pm$ DP; n=6).	152
<b>Figura 5.14.</b>	Perfis de libertação do GNLS Ibu ( $\blacktriangle$ ) e do gel de referência ( $\blacklozenge$ ) através da membrana Tuffryn <sup>®</sup> (Média $\pm$ DP; n=6)	153
<b>Figura 5.15.</b>	Perfis de permeação das GNLS Eto ( $\blacklozenge$ ) e do gel de referência ( $\blacksquare$ ) através do estrato córneo: a) percentagem cumulativa do fármaco permeado; b) concentração cumulativa do fármaco permeado (Média $\pm$ DP, n=6)	154
<b>Figura 5.16.</b>	Perfis de permeação das GNLS Ibu ( $\bullet$ ) e do gel de referência ( $\blacklozenge$ ) através do estrato córneo: a) percentagem cumulativa do fármaco permeado; b) concentração cumulativa do fármaco permeado (Média $\pm$ DP; n=6).	154
<b>Figura 5.17.</b>	Viabilidade da línea celular DF em MTT após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do medicamento de referência do etofenamato (MR Eto) (Média $\pm$ DP; n=9; ** p<0,05 vs meio).	157
<b>Figura 5.18.</b>	Viabilidade da línea celular HaCaT em MTT após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do MR Eto (Média $\pm$ DP; n=9; ** p<0,05 vs meio).	157
<b>Figura 5.19.</b>	Viabilidade da línea celular DF em resazurina após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do MR Eto (Média $\pm$ DP; n=9; ** p<0,05 vs meio).	158
<b>Figura 5.20.</b>	Viabilidade da línea celular HaCaT em resazurina após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do MR eto. (Média $\pm$ DP, n = 9; ** p<0,05 vs meio).	158
<b>Figura 6.1.</b>	Percentagem de edema após aplicação tópica do formulações	167

	contendo etofenamato (Média±DP, n=6).	
<b>Figura 6.2.</b>	Percentagem de edema após aplicação tópica do formulações contendo ibuprofeno (Média±DP, n=6).	168
<b>Figura 6.3.</b>	Efeito do etofenamato na inflamação da pata do rato induzida por carragenano: (a) pata sem carragenano, (b) pata de um rato com carragenano na ausência de qualquer tratamento, (c) pata de um rato tratado com gel de referência, (d) pata de um rato tratado com GNLS Eto. Ampliação: 100x.	169
<b>Figura 6.4.</b>	O efeito do ibuprofeno na inflamação da pata do rato induzida por carragenano: (a) pata de um rato tratado com gel de referência, (b) pata de um rato tratado com GNLS Ibu. Ampliação: 100x.	170

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b>	Formas farmacêuticas presentes no mercado português para aplicação tópica dos AINE.	10
<b>Tabela 2.1.</b>	Composição das NLS preparadas (% m/v) num total de 30ml de formulação.	47
<b>Tabela 2.2.</b>	Efeito da presença de parabenos no potencial zeta das formulações de NLS (Média±DP; n=3).	57
<b>Tabela 2.3.</b>	Estabilidade das formulações ao longo do tempo (Média±DP; n=3; *p<0,05).	60
<b>Tabela 2.4.</b>	Estabilidade física das formulações de NLS armazenadas a 5±3°C após esterilização em autoclave a 121°C/20 min e 105°C/20 min (Média±DP; n=3; *p<0,05).	63
<b>Tabela 2.5.</b>	Estabilidade física das formulações de NLS armazenadas a 5±3°C numa suspensão de NLS após esterilização fraccionada em autoclave a 80°C/10 min e 60°C/30 min, por 3 dias consecutivos (Média±DP; n=3; *p<0,05).	64
<b>Tabela 3.1.</b>	Variáveis avaliadas no estudo de transposição de escala em laboratório de 10 ml para 1000 ml, utilizando Silverson SL5M.	81
<b>Tabela 3.2.</b>	Diâmetro médio das NLS preparadas com diferentes lípidos (Média±DP; n=3).	82
<b>Tabela 3.3.</b>	Efeito do tempo de emulsificação no diâmetro médio das partículas e PI das NLS preparadas em lotes de 10 ml, com velocidade de agitação 12500 rpm (Média±DP; n=3).	83
<b>Tabela 3.4.</b>	Valores calculados de Kp, fluxo e lag time do etofenamato e ibuprofeno através da pele (Media±DP, n=6).	95
<b>Tabela 4.1.</b>	Composição final do gel com NLS.	111
<b>Tabela 4.2.</b>	Ensaio da eficácia dos conservantes em formulações com 0%, 10%, 15% e 20% de AI e AE. pelo método de espalhamento directo.	119
<b>Tabela 4.3.</b>	Ensaio da eficácia dos conservantes em formulações com 0%, 10%, 15% e 20% de AI e AE pelo método de filtração (diluição 1:100).	120

<b>Tabela 4.4.</b>	Ensaio da eficácia dos conservantes em formulações com 0%, 10%, 15% e 20% de AI e AE pelo método de filtração (diluição 1:100000).	121
<b>Tabela 4.5.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas ao longo do ensaio de estabilidade determinada com três lotes do gel final com NLS (Média±DP; n=3).	124
<b>Tabela 4.6.</b>	Valores de pH e de viscosidade aparente ao longo do ensaio de estabilidade determinados em três lotes do gel final com NLS (Média±DP; n=3).	125
<b>Tabela 4.7.</b>	Valores de R medidos ao longo do estudo (Média±DP; n=20)	128
<b>Tabela 5.1.</b>	Composição final do geles em estudo.	135
<b>Tabela 5.2.</b>	Solubilidade do etofenamato e do ibuprofeno nos agentes humectantes.	138
<b>Tabela 5.3.</b>	Ensaio da eficácia do conservante nas formulações em estudo, com 0%, 10% e 15% de álcool etílico, pelo método de espalhamento directo.	141
<b>Tabela 5.4.</b>	Ensaio da eficácia do conservante nas formulações em estudo, com 0%, 10% e 15% de álcool etílico com 0%, 10% e 15% de álcool etílico, pelo método de filtração diluição 1:100).	142
<b>Tabela 5.5.</b>	Ensaio da eficácia do conservante nas formulações em estudo, com 0%, 10% e 15% de álcool etílico com 0%, 10% e 15% de álcool etílico, pelo método de filtração (diluição 1:100000).	143
<b>Tabela 5.6.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas ao longo do estudo para os GNLS Eto (Média±DP; n=3).	146
<b>Tabela 5.7.</b>	Distribuição do diâmetro médio das partículas ao longo do estudo para os GNLS Ibu (Média±DP; n=3).	143
<b>Tabela 5.8.</b>	Estabilidade de GNLS Eto durante 12 meses de armazenamento (Média±DP; n=3).	146
<b>Tabela 5.9.</b>	Estabilidade GNLS Ibu durante 12 meses de armazenamento (Média±DP; n=3).	148
<b>Tabela 5.10.</b>	Valores de Kp, fluxo e lag time do etofenamato e ibuprofeno através da pele (Média±DP; n=6).	155

## OBJECTIVOS

Os trabalhos conducentes ao grau de doutor, descritos nesta dissertação, tiveram como objectivo principal a aplicação de nanotecnologia em formulações tópicas de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINE).

A dissertação está organizada em seis capítulos. A introdução, correspondente ao capítulo 1, inclui uma revisão bibliográfica dos sistemas de partículas para administração tópica de fármacos e respectivos métodos de preparação e uma revisão sobre a pele e os mecanismos de absorção cutânea, abordando-se as formas galénicas contendo AINE actualmente mais utilizadas para a administração tópica. Os capítulos seguintes incluem o trabalho experimental desenvolvido.

No Capítulo 2, descreve-se o estudo da influência de diferentes processos de esterilização, por calor húmido, nas propriedades físicas das formulações de NLS e a sua evolução ao longo de um período de armazenamento de 6 meses. Concomitantemente, foram estudados os efeitos da inclusão de parabenos nas formulações de NLS, nos parâmetros relevantes, designadamente o diâmetro médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. Foi ainda avaliado o efeito do processo de liofilização em formulações de NLS esterilizadas por calor húmido. Estes estudos constituíram a primeira abordagem à produção de NLS, tendo sido descontinuados pela dificuldade de aplicação industrial.

No Capítulo 3 inclui-se a produção de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo fármacos anti-inflamatórios não esteróides, para aplicação tópica, utilizando um processo de produção transponível para a escala industrial (método de fusão-emulsificação), capaz de permitir a obtenção de formulações com estabilidade físico-química e um perfil de libertação do fármaco adequado ao efeito terapêutico pretendido, após aplicação tópica na pele.

No Capítulo 4, descreve-se o desenvolvimento e a caracterização de formulações na forma de gel contendo NLS, bem como os estudos *in vivo* efectuados para avaliação dos efeitos biológicos desta preparação, designadamente o teste *Human Repeated Insult Patch*

(HRIPT), a perda transepidermica de água (PTEA), capacitância epidérmica e viscoelasticidade, utilizando como comparadores uma suspensão líquida de NLS e um gel placebo sem NLS.

O Capítulo 5 inclui a descrição dos trabalhos de formulação das NLS, contendo etofenamato ou ibuprofeno, num gel para aplicação tópica constituído por HPMC a 2% e a sua caracterização. Avalia-se neste capítulo a capacidade deste sistema promover a permeação cutânea dos fármacos em estudo, quando comparados com medicamentos de referência existentes no mercado português.

O Capítulo 6 inclui os estudos da actividade anti-inflamatória *in vivo* das formulações anteriormente desenvolvidas. Nestes estudos, foi utilizado o modelo animal de inflamação do rato induzida pelo carragenano. Concretamente, foi avaliada a percentagem de inibição do edema da pata dos animais tratados com gel contendo etofenamato (0,6%) ou ibuprofeno (0,3%), relativamente aos animais-controlo não tratados, e aos geles de referência, disponíveis comercialmente.

As metodologias de análise utilizadas para a quantificação dos fármacos em estudo encontram-se descritas no anexo da presente dissertação.

#

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Administração Tópica de Anti-inflamatórios não Esteróides.

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINE) são conhecidos há mais de 100 anos, constituindo uma das classes terapêuticas de medicamentos mais prescritas em todo o mundo, principalmente na Europa e nos Estados Unidos. O mecanismo de acção dos AINE ocorre pela inibição das isoenzimas ciclooxigenase (COX) que degradam o ácido araquidónico, conduzindo à produção dos eucosanóides. Em doses terapêuticas, os AINE inibem de forma variável as duas isoformas da COX. Assim, os efeitos terapêuticos dos AINE resultam principalmente da inibição da enzima COX-2, verificando-se a redução da síntese das prostaglandinas (PG) e diminuição da intensidade do processo inflamatório. Por outro lado, estes fármacos também antagonizam os receptores das PG, reduzindo a permeabilidade capilar, o edema e o rubor (Feldman e McMahon, 2000).

As principais limitações associadas ao uso de AINE orais são os efeitos gastrointestinais, que resultam da inibição do isoenzima COX-1 (Meyer-Kirchrath e Schrör, 2000; Gabriel *et al.*, 1991). A COX-1 apresenta-se como uma enzima fisiologicamente constitutiva, de ampla distribuição, que sintetiza PG reguladoras dos processos fisiológicos. Encontra-se presente na maioria dos tecidos, sendo expressa a nível gastrointestinal (GI), renal, nas plaquetas e no endotélio vascular. Entre outras funções, a COX-1 encontra-se relacionada com a homeostase tecidual e citoprotecção gástrica (Simmons *et al.*, 2004). Para além de complicações a nível gastrointestinal, estão também descritas alterações electrolíticas e hídricas, das quais resultam edemas e retenção de água e de sódio. Uma alternativa terapêutica frequente nos últimos anos tem sido a utilização de AINE por via tópica, o que apresenta inúmeras vantagens em relação a outras vias de administração, nomeadamente: evitar as barreiras que afectam a absorção no tracto GI; reduzir a metabolização hepática do fármaco (efeito de primeira passagem); diminuir o risco de sobre dosagem; aumentar o grau de adesão à terapêutica (Solignac, 2004). Nas últimas décadas muitos autores estudaram a utilização dos AINE para aplicação tópica em alternativa aos AINE por via oral. Rhee *et al.* (2008) estudaram formulações tópicas de ibuprofeno, obtendo um efeito anti-inflamatório *in*

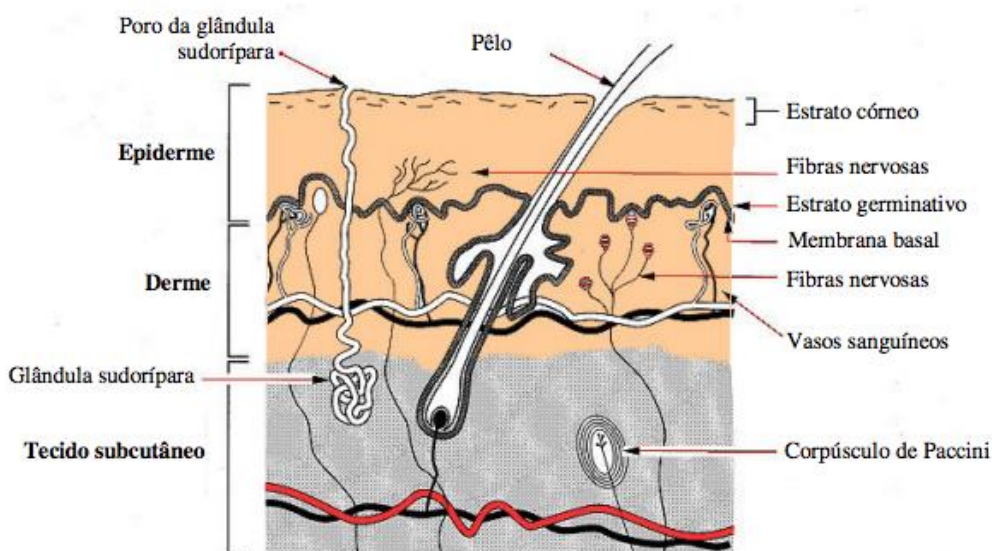
*vivo* em ratos no modelo da redução do edema induzido pelo carragenano (Rhee *et al.*, 2008; Marto *et al.*, 2014).

No entanto, para compreender melhor a importância da aplicação tópica dos AINE é necessário compreender a estrutura da pele.

## 1.2. Estrutura da Pele

A pele constitui o maior órgão do corpo humano, sendo que recobre toda a superfície corporal agindo como agente protector das exposições externas (Figura 1.1). Recebe aproximadamente um terço da circulação sanguínea e caracteriza-se por apresentar uma espessura variável, consoante a região do corpo (Kielhorn *et al.*, 2006).

A pele é formada por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, da mais externa para a mais interna, respectivamente (Kielhorn *et al.*, 2006; Degim, 2006).



**Figura 1.1.** Estrutura da pele (adaptada de Kielhorn *et al.*, 2006)

A epiderme é um tecido epitelial, pavimentoso, estratificado, queratinizado e avascular, constituída principalmente por queratinócitos que se transformam em corneócitos. Em menor percentagem por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Possui diversas camadas ou estratos que se organizam da parte externa para a mais profunda em estrato córneo, granuloso, espinhoso e estrato basal ou germinativo. Nas zonas onde a epiderme é mais espessa (palma das mãos ou planta dos pés) é visível o estrato lúcido, situado logo a seguir ao estrato córneo (Kielhorn *et al.*, 2006).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, essencialmente formada por células mortas ou em vias de degenerescência, muito ricas em queratina. A sua natureza, praticamente impermeável, desempenha um papel essencial na barreira da pele e na regulação da hidratação da pele (Carneiro *et al.*, 2011). A função de barreira da pele é facilitada pela renovação contínua do estrato córneo (Degim, 2006).

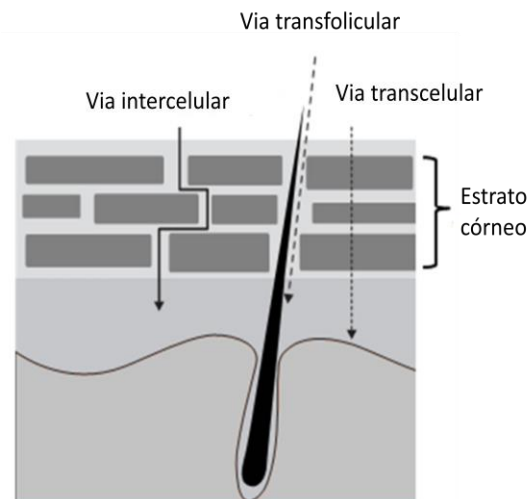
A derme é constituída por tecido conjuntivo que compreende células, fibras, substância fundamental amorfa, vasos e nervos (Cordero, 1997). Entre as células da derme encontram-se os fibroblastos, os fagócitos, os necrófagos e os leucócitos. As fibras da derme incluem fibras elásticas e de colagénio. A substância fundamental amorfa inclui água, electrólitos, proteínas plasmáticas e glicosaminoglicanos. A substância fundamental desempenha um papel importante no equilíbrio homeopático de electrólitos e água e actua também como humectante e lubrificante nas redes de fibras de colagénio e elásticas durante os movimentos da pele.

A hipoderme, também designada de tecido subcutâneo, é a camada mais profunda da pele. A sua espessura difere de pessoa para pessoa e consoante a região do corpo. Os principais constituintes da hipoderme são os adipócitos, células especializadas na síntese e acumulação de lípidos. Estas células constituem a principal reserva de energia do organismo. Encontram-se agrupadas em pequenos lóbulos separados entre si por finos septos de tecido conjuntivo através dos quais circulam os vasos sanguíneos e as fibras nervosas (Kielhorn *et al.*, 2006).

A importância da pele é indiscutível como via de administração de fármacos, devido à sua grande superfície e fácil acesso. A principal vantagem da terapêutica tópica relativamente à terapêutica sistémica reside no facto de estar indicada para situações localizadas, permitindo maior concentração local e menores efeitos sistémicos. O principal obstáculo das preparações por uso tópico é a absorção de substâncias através da pele. Esta absorção percutânea depende não só das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também do veículo e integridade deste órgão.

A absorção percutânea de fármacos é definida como a forma como as substâncias atravessam as camadas da pele até à corrente sanguínea e linfática (Kielhorn *et al.*, 2006; Guideline OECD, 2004). Pode ser dividida em 3 etapas: Penetração, a entrada de uma substância numa determinada camada; Permeação, a permeação de uma substância através de várias camadas com determinadas características funcionais e estruturais; e,

Absorção, a entrada de uma substância na circulação sanguínea. A absorção cutânea de substâncias pode ocorrer de acordo com 3 mecanismos possíveis (Degim, 2006; Kielhorn *et al.*, 2006) (Figura 1.2):



**Figura 1.2.** Mecanismos de absorção percutânea (adaptado de Rahimpour e Hamishehkar, 2012).

- Via transcelular: através das células do estrato córneo; ocorre geralmente para fármacos apolares;
- Via intercelular: entre as células do estrato córneo; é comum para fármacos polares e de baixo peso molecular;
- Via transfolicular: através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas.

As características físico-químicas do fármaco, do veículo, as condições de aplicação, as condições da pele, e o metabolismo cutâneo afetam a absorção percutânea (OECD, 2004, OECD, 2011, WHO, 2006).

Os líquidos e substâncias em solução são mais facilmente absorvidos do que as substâncias no estado sólido. Estas últimas antes de serem absorvidas têm que se dissolver à superfície da pele. A absorção de líquidos voláteis através da pele pode ser limitada pela velocidade a que o líquido se evapora da superfície cutânea (Kielhorn *et al.*, 2006).

A absorção percutânea diminui significativamente quando o peso molecular é superior a 500 Dalton e é favorecida quando o peso molecular é menor do que 100 Da (Kielhorn *et al.*, 2006; Pellanda *et al.*, 2006).

O coeficiente de partilha octanol/água  $K_{(O/A)}$  ou  $\log P_{(O/A)}$  é uma medida que traduz a partilha da substância entre a fase orgânica ou lipídica e a fase aquosa. Para as substâncias com valores de  $\log P$  inferiores a 0, significa que apresentam uma baixa lipofilia o que irá limitar a sua penetração no estrato córneo e, conseqüentemente, a sua absorção cutânea. Para substâncias que apresentam valores de  $\log P$  entre 1 e 4 a absorção percutânea está favorecida, particularmente se a solubilidade em água for elevada. Quando o  $\log P$  superiores a 4, a velocidade de penetração pode ser limitada pela velocidade de transferência entre o estrato córneo e a epiderme, mas a penetração no estrato córneo é elevada.

O veículo pode influenciar tanto a libertação do fármaco como ainda alterar a estrutura do estrato córneo. A libertação do fármaco é afectada pela viscosidade do veículo (alteração do coeficiente de difusão) e pela solubilidade do composto no veículo. O pH do veículo, o estado em que se encontra o fármaco no veículo (dissolvido ou suspenso), a sua concentração, bem como a presença de co-solventes (por exemplo, propilenoglicol), a presença de promotores cutâneos são factores que influenciam a absorção percutânea. A partilha do fármaco entre o veículo e o estrato córneo, e a conseqüente penetração na camada córnea, é diferente para cada componente da formulação. Além disso, pode ocorrer a evaporação dos excipientes voláteis do veículo (por exemplo, o álcool etílico), o que aumenta a concentração e grau de saturação do fármaco, alterando a força motriz da difusão (altera a actividade termodinâmica). Quando a solubilidade no veículo é elevada, a absorção está comprometida porque a substância tem tendência para permanecer no veículo. O valor máximo de penetração de um fármaco na pele ocorre normalmente quando este se encontra num estado saturado. Em certos casos, pode ocorrer sobressaturação, acentuando a penetração percutânea (Pellanda, 2006).

A absorção percutânea é diferenciada consoante o local do corpo uma vez que também a espessura da pele, varia significativamente (Kielhorn *et al.*, 2006; Hadgraft e Lane, 2005).

A oclusão também aumenta a absorção percutânea. No caso das substâncias voláteis a oclusão permite a manutenção da substância à superfície da pele contribuindo para o aumento da absorção, podendo também alterar a absorção percutânea devido ao aumento da hidratação (Poet e McDougal, 2002; Pellanda, 2006).

A condição de pele pode ter um impacto significativo na velocidade de penetração de substâncias químicas especialmente quando a função barreira está alterada. A permeabilidade da pele pode ser aumentada por factores físicos (tempo, luz solar, oclusão), substâncias químicas (detergentes, ácidos e bases) e factores patológicos (dano mecânico).

Na absorção percutânea, o metabolismo cutâneo é crítico quando o composto sofre biotransformação durante a sua passagem através do estrato córneo e se transforma num composto que é mais extensamente absorvido (OECD, 2011).

O metabolismo cutâneo pode conduzir à activação de compostos inertes a substâncias toxicologicamente activas, à destoxificação de substâncias toxicologicamente activas em metabolitos inactivos e à conversão de substâncias activas em metabolitos activos (Kielhorn *et al.*, 2006).

Nas preparações dermatológicas de acção local, embora seja importante que o fármaco penetre através epiderme, não é desejável que alcance a circulação sistémica.

### **1.3. Formas Farmacêuticas para Administração Tópica de AINE**

As preparações contendo AINE, disponíveis no mercado português para administração tópica, promovem o alívio rápido da dor e redução do processo inflamatório. Este é considerado um dos principais benefícios terapêuticos dos AINE de aplicação tópica.

Entre as formulações tópicas contendo AINE destacam-se, entre os mais utilizados, os geles, cremes, loções e emplastros.

Os geles são constituídos por líquidos gelificados com o auxílio de agentes gelificantes apropriados (Barry, 2007). Estes apresentam um efeito emoliente e refrescante, e secam rapidamente em contacto com o ar (Prista *et al.*, 2003). Em geral, a permeação em profundidade é difícil, uma vez que os seus excipientes, formados por grandes moléculas coloidais, não atravessam a epiderme intacta. No entanto, alguns geles são dotados de boa absorção cutânea (Barry, 2007; Chadha *et al.*, 2011).

Os cremes constituem preparações multifásicas constituídas por uma fase oleosa e outra aquosa (FP9, 2008). São preparadas a partir de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis que formam uma dispersão homogênea devido à adição de um agente emulsificante (Prista *et al.*, 2003). Estas preparações obtidas por emulsão, em especial as do tipo óleo em água (O/A), apresentam maior facilidade de aplicação e espalhabilidade sobre a pele (Barry, 2007). A sua natureza anfifílica e semelhança com a epiderme humana permitem elevada eficiência na veiculação de fármacos. Os cremes apresentam consistência mais fluida do que as pomadas e são hidratantes, pelo que não retêm secreções cutâneas, ao contrário das pastas (Prista *et al.*, 2003). Os cremes O/A são os que permeiam mais profundamente a pele. Pela sua composição conseguem permear a pele pela via intercelular. Quanto mais fina a divisão das gotículas emulsionadas, mais fácil se torna a sua passagem entre as células do tecido cutâneo (Prista *et al.*, 2003). Uma das principais vantagens dos cremes de O/A é o facto de serem cosmeticamente mais aceitáveis (têm acção refrescante, não gordurosa, são facilmente removidos da pele e da roupa). A principal desvantagem é o facto de serem mais difíceis de conservar, quer devido a invasão por microrganismos, quer por evaporação da fase aquosa (FP9, 2008). Os cremes A/O são menos penetrantes do que os cremes O/A. Em geral são bem tolerados pela epiderme, principalmente pelas suas propriedades emolientes e adesivas. A principal vantagem dos cremes A/O é a sua facilidade de conservação (Prista *et al.*, 2003). Não são facilmente contaminados por microrganismos e a água da sua fase interna não está demasiado acessível à evaporação. Por outro lado, pelo facto de apresentarem maior percentagem de lípidos na sua composição, apresentam maior susceptibilidade de sofrer oxidação.

As loções constituem a forma farmacêutica em que há dissolução de pós num líquido normalmente aquoso (FP9, 2008). Estas apresentam aspecto mais fluido que os cremes e podem ser aplicadas numa área extensa da pele, formando uma camada fina sobre a mesma. Têm a vantagem de serem utilizáveis em todas as zonas anatómicas, inclusive aquelas com pêlos. Estas preparações caracterizam-se pelas suas propriedades hidratantes e refrescantes nas irritações da pele (Prista *et al.*, 2003).

Os emplastros medicamentosos são preparações maleáveis contendo uma ou várias substâncias activas (FP9, 2008). Destinam-se a serem aplicados sobre a pele de forma a permitirem um contacto estreito entre a pele e os fármacos, de modo a que estes possam

exercer o seu efeito local, lentamente, ou funcionar como agentes protectores ou queratolíticos (Barry, 2007). Estes adaptam-se facilmente à superfície da pele, devendo permitir a respiração cutânea, de forma a prevenir o aumento da humidade que poderá originar infecções fúngicas. Aderem firmemente à pele por simples pressão e podem ser retirados facilmente sem causar danos notáveis na pele nem separação da preparação do suporte (FP9, 2008).

Na tabela 1.1 estão indicados os AINE por uso tópico presentes no mercado português (Infomed, 2014).

As desvantagens da aplicação tópica de AINE, que limitam a sua utilização, são diversas e incluem irritações cutâneas, razão pela qual não podem ser utilizados em tratamentos prolongados (Hadgraft e Lane, 2005). Foram relatados alguns casos de dermatite de contacto em alguns pacientes tratados com geles de etofenamato (Villar *et al.*, 2008). Mais recentemente, foram relatadas reacções de fotosensibilidade ao diclofenac (Akat, 2013). São ainda menos eficazes quando comparados com a utilização de AINE por via oral ou sistémica, devido à reduzida permeação cutânea. De modo a promover a permeação cutânea, obtendo-se uma eficácia terapêutica local elevada, têm sido utilizados diversos sistemas inovadores.

**Tabela 1.1.** Formas farmacêuticas presentes no mercado português para aplicação tópica dos AINE (Infomed, 2014)

<b>Forma Farmacêutica</b>	<b>Substância ativa e dosagens</b>
Geles	Aceclofenac, 15 mg/g Cetoprofeno, 25mg/g Diclofenac, 10mg/g e 23,2mg/g Etofenamato, 50 mg/g, 100 mg/g Ibuprofeno, 50 mg/g Naproxeno, 100 mg/g Nimesulida, 30 mg/g Piroxicam, 5 mg/g Salicilato de dietilamina, 30 mg/g, 50 mg/g e 100 mg/g Heparina sódica + Salicilato de dietilamina + Mentol, 50 U.I./g + 100 mg/g + 2 mg/g Escina + Heparinasódica + Salicilato de glicol, 10 mg/g + 400 UI/g + 20 mg/g Heparina sódica + Salicilato de glicol + Mentol, 50 mg/g + 50 mg/g + 5 mg/g Salicilato de dietilamina + Mirtecaína, 1 g + 10 g
Creμες	Etofenamato, 100 mg/ml Picetoprofeno, 18 mg/g Piroxicam, 10 mg/g Salicilato de dietilamina, 28,57 mg/g e 100 mg/g Salicilato de dietilamina + Mirtecaína, 100 mg/g + 10 mg/g Ácidosalicílico + Heparinóide + Mentol + Nicotinato de benzilo, 65 mg/g + 5 mg/g + 10 mg/g Salicilato de glicol + Mentol, 90 mg/g + 10 mg/g
Loções	Diclofenac, 16 mg/ml e 40mg/g Etofenamato, 100 mg/ml Indometacina, 10 mg/ml Picetoprofeno, 20 mg/ml
Emplastro	Cetoprofeno, 20 mg Diclofenac, 140 mg

#### 1.4. Sistemas de partículas para administração tópica

O desenvolvimento das nanopartículas teve início em meados dos anos 70. Speiser e seus colaboradores, em 1976, publicaram os primeiros trabalhos sobre nanopartículas. Concentraram-se no desenvolvimento de nanopartículas para vacinação, utilizando as

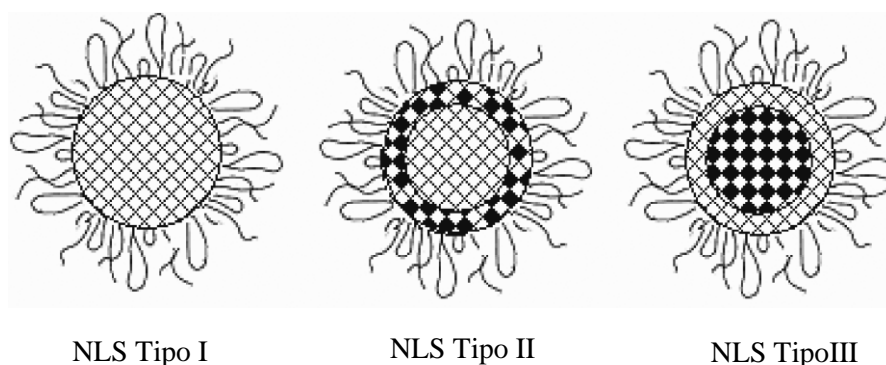
vantagens das nanopartículas para a obtenção de perfis de libertação controlada do antígeno que proporcionam uma melhor resposta imune (revisto por Couvreur, 2013). Até ao final da década de 1980 a investigação incidiu sobre a utilização de materiais poliméricos biocompatíveis para a produção de nanopartículas, como o polimetilmetacrilato (PMMA) e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Birrenbach e Speiser, 1976; Couvreur *et al.*, 1977). Somente no início dos anos 90 surgem as primeiras publicações sobre a preparação de nanopartículas utilizando materiais lipídicos sólidos à temperatura ambiente (nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), normalmente triacil-gliceróis (ou triglicéridos), de origem natural e constituintes normais dos alimentos. Em 1993 surgem dois pedidos de patente referentes a dois métodos distintos para a sua produção (Gasco, 1993; Lucks e Müller, 1993). MR Gasco em Turim (Gasco, 1993) desenvolveu o método de preparação baseado na solidificação de microemulsões, enquanto em Berlim foi desenvolvido o método de homogeneização a alta pressão (HPH) por RH Müller e JS Lucks (Luckx e Müller, 1993).

As NLS são constituídas por uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, formada por lípidos fisiológicos e revestida por agentes tensoactivos (Wissing *et al.*, 2004). As dimensões médias das NLS oscilam entre 50 e 1000nm (Silva *et al.*, 2011). As principais vantagens apresentadas pelas NLS são, designadamente: a elevada estabilidade físico-química, sem o recurso a processos de liofilização ou secagem por atomização; a ausência de problemas associados à esterilização; a versatilidade dos métodos de preparação; a produção em larga escala com linhas de produção e tecnologias disponíveis; a baixa ou ausente toxicidade aguda ou crónica, uma vez que as substâncias utilizadas são GRAS (“*generally regarded as safe*”) (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2006); a libertação modificada do fármaco; a protecção do fármaco incorporado; um baixo custo de produção; o direccionamento específico de fármacos e a possibilidade de produção sem recurso a solventes orgânicos (Müller e Runge, 1998; Mehnert e Mäder, 2001; Silva *et al.*, 2011).

As NLS podem ser classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas, tal como as nanopartículas poliméricas diferindo, contudo, na composição e organização estrutural. As nanoesferas apresentam uma matriz homogénea na qual o fármaco se encontra disperso ou dissolvido, enquanto nas nanocápsulas o fármaco encontra-se no interior de

uma ou mais cavidades aquosas ou oleosas circundadas por uma membrana (Battaglia *et al.*, 2012).

A estrutura e a morfologia das NLS são afectadas por diversos factores, como a natureza do lípido, as características do fármaco que se pretende encapsular, o agente tensoactivo utilizado e, ainda, o método de produção aplicado e suas variáveis. A morfologia é principalmente condicionada pelo grau de cristalinidade do lípido utilizado, sendo que a esfericidade das partículas diminui quando se utilizam lípidos com elevado grau de cristalinidade, obtendo-se partículas mais esféricas quando se recorre a misturas de lípidos sólidos (Souto *et al.*, 2007). Por outro lado a organização nanoestrutural das matrizes lipídicas das NLS depende não só da composição qualitativa e quantitativa das formulações mas também da metodologia aplicada na sua preparação. Para as NLS existem três modelos estruturais propostos (Figura 1.3), diferindo na localização e distribuição do fármaco na matriz lipídica (Müller *et al.*, 2000).



**Figura 1.3.** Modelos teóricos para a estrutura das NLS. Os quadrados pretos representam as moléculas de fármaco (adaptado de Souto *et al.*, 2007).

As NLS tipo I são definidas como o *modelo de matriz homogénea*, pois o fármaco encontra-se disperso no núcleo lipídico da partícula ou apresenta-se sob a forma de aglomerados amorfos. Este modelo é obtido quando os pontos de fusão do lípido e do fármaco têm valores aproximados. Devido à sua estrutura, as NLS tipo I podem ser utilizadas para modificar o perfil de libertação do fármaco (Müller *et al.*, 2000).

As NLS tipo II constituem o *modelo de parede de fármaco* apresentando uma parede externa rica em fármaco que cobre um núcleo lipídico (Souto *et al.*, 2007; Lukowski e Werner, 1998). Este modelo é conseguido quando o ponto de fusão do fármaco é inferior ao do lípido. Durante o arrefecimento da nanoemulsão, o lípido fundido

solidifica primeiro, a concentração de fármaco no lípido fundido remanescente aumenta contínua e proporcionalmente, em função da formação do núcleo sólido. O resultado é um núcleo lipídico desprovido de fármaco, envolvido por uma parede externa constituída por fármaco e lípido, que se forma quando o fármaco atinge o seu nível de saturação no lípido e precipita. Este modelo pode ser utilizado para um perfil de libertação imediata do fármaco (Souto *et al.*, 2007) ou ainda para preparar NLS para aplicação tópica, quando se pretende aumentar a biodisponibilidade do fármaco, quer promovendo a penetração cutânea através da libertação imediata, quer através do efeito oclusivo proporcionado pelo núcleo lipídico (Wissing e Müller, 2002).

As NLS tipo III, que representam o *modelo de núcleo de fármaco*, são formadas quando o ponto de fusão do fármaco é superior ao ponto de fusão do lípido. Aquando do arrefecimento da nanoemulsão, a solubilidade do fármaco no lípido vai diminuindo. Quando o ponto de saturação é ultrapassado ocorre precipitação do fármaco, formando-se em volta uma parede de lípido. Este modelo é útil quando se pretende uma libertação prolongada e controlada do fármaco (Westesen *et al.*, 1997; Souto *et al.*, 2007).

É importante referir que estes modelos de incorporação representam tipologias ideais, podendo existir modelos mistos (Wissing e Müller, 2002). Segundo Ahlin *et al.* (2000) os fármacos também podem ligar-se à camada externa das NLS, quando esta é composta por fosfolípidos e outros agentes tensioactivos.

Importante referir que a distribuição das moléculas de fármaco no meio das partículas depende não só da constituição da matriz lipídica mas também das características físico-químicas da substância activa sendo a solubilidade e o coeficiente de partilha os factores mais relevantes (Pegi *et al.*, 2003).

Para ultrapassar as desvantagens das NLS, designadamente a capacidade limitada de carga dos fármacos, expulsão dos mesmos e problemas de instabilidade das NLS, foram introduzidos os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC) (Radtke, 2005). Deste modo, as NLC resultam da mistura de lípidos sólidos e líquidos, sendo esta mistura sólida à temperatura corporal. O resultado é uma matriz mais amorfa, com mais espaços, o que permite armazenar maior quantidade de fármaco. A adição de lípidos líquidos previne ainda as recristalizações do lípido sólido, tornando a partícula mais estável e prevenindo a expulsão durante o período de armazenamento (Wissing *et al.*, 2004; Jennings *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2000).

#### **1.4.1 Administração tópica de AINE utilizando partículas lipídicas**

De entre as estratégias que têm sido estudadas para a administração tópica de AINE, destaca-se a utilização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Nos últimos anos, muitos autores estudaram a utilização de NLS para aumentar a permeação dos AINE através do EC. Segundo Wissing e Müller (2003) as NLS têm um efeito oclusivo, formando uma película na pele, diminuindo assim a perda de água e aumentando a hidratação; o efeito oclusivo das NLS depende do seu tamanho, do estado cristalino e da concentração lipídica. Igualmente, como resultado da sua dimensão reduzida, as NLS aumentam a superfície de contacto dos fármacos com a pele melhorando assim a permeação dos mesmos. Autores como Bhaskar *et al.* (2009) estudaram a influência das NLS numa formulação transdérmica de flurbiprofeno. Estas, quando comparadas com o gel tradicional, aumentaram a permeação do fármaco assim como a semi-vida do mesmo, tendo sido obtida uma libertação prolongada do fármaco nas 24 horas do estudo. Resultados semelhantes foram encontrados também por Khurana *et al.* (2013), cujo estudo com NLS de meloxicam, preparadas numa microemulsão, demonstrou uma elevada taxa de permeação *in vitro* do fármaco ( $0,0057 \text{ cmh}^{-1}$ ) e uma acção anti-inflamatória *in vivo* de 70% após 24 horas. Neste caso verificou-se também uma libertação prolongada do fármaco.

Manconi *et al.* (2011) estudaram a utilização de partículas lipídicas deformáveis (PEV) com diclofenac obtendo uma penetração transdérmica. Mira *et al.* (2011) obtiveram uma permeação cutânea melhorada com a incorporação do flurbiprofeno em NLS, concluindo que a permeação é influenciada pelo diâmetro da partícula e pelas transições polimórficas da matriz lipídica. Joshi e Petravale (2008) desenvolveram e prepararam um gel de celecoxib com NLS obtidas por microemulsão. Os resultados obtidos em estudos de permeação cutânea mostram que o gel de NLS teve um início de libertação rápido e uma actividade mais prolongada, até às 24 horas, quando comparado com o gel micelar.

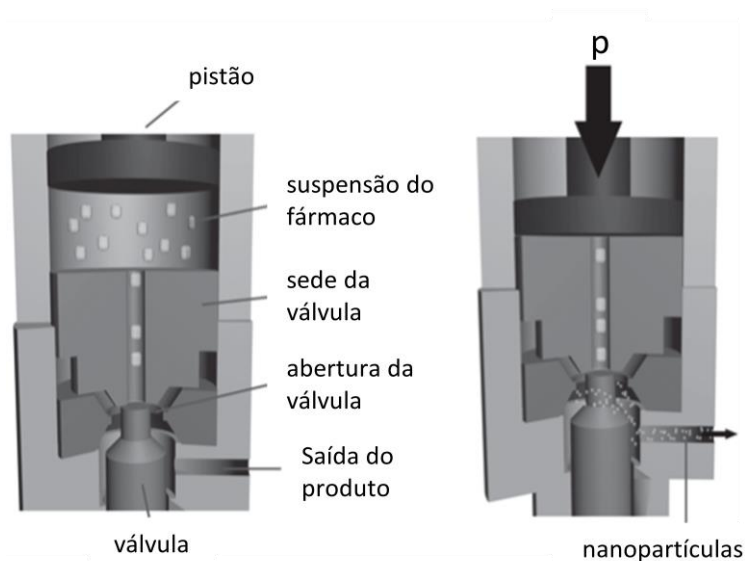
#### **1.5. Métodos de preparação de NLS transponíveis para a escala industrial**

Existem vários métodos descritos na literatura para a produção de NLS. No entanto, um dos pré-requisitos para a sua introdução no mercado é a transponibilidade de escala do

método de produção. O próprio método, para além da necessidade de ser qualificado e validado, deve ainda apresentar vantagens de custo-efectividade (Müller *et al.*, 2011; Muchow *et al.*, 2007). Nem todos os métodos são transponíveis para a escala industrial. Por exemplo, o método de evaporação do solvente não pode ser utilizado em larga escala, face à toxicidade potencial, associada aos resíduos de solventes orgânicos utilizados, geralmente diclorometano, acetato de etilo, acetona ou isopropanol (Battaglia *et al.*, 2012).

### 1.5.1. Produção por homogeneização a alta pressão (HPH)

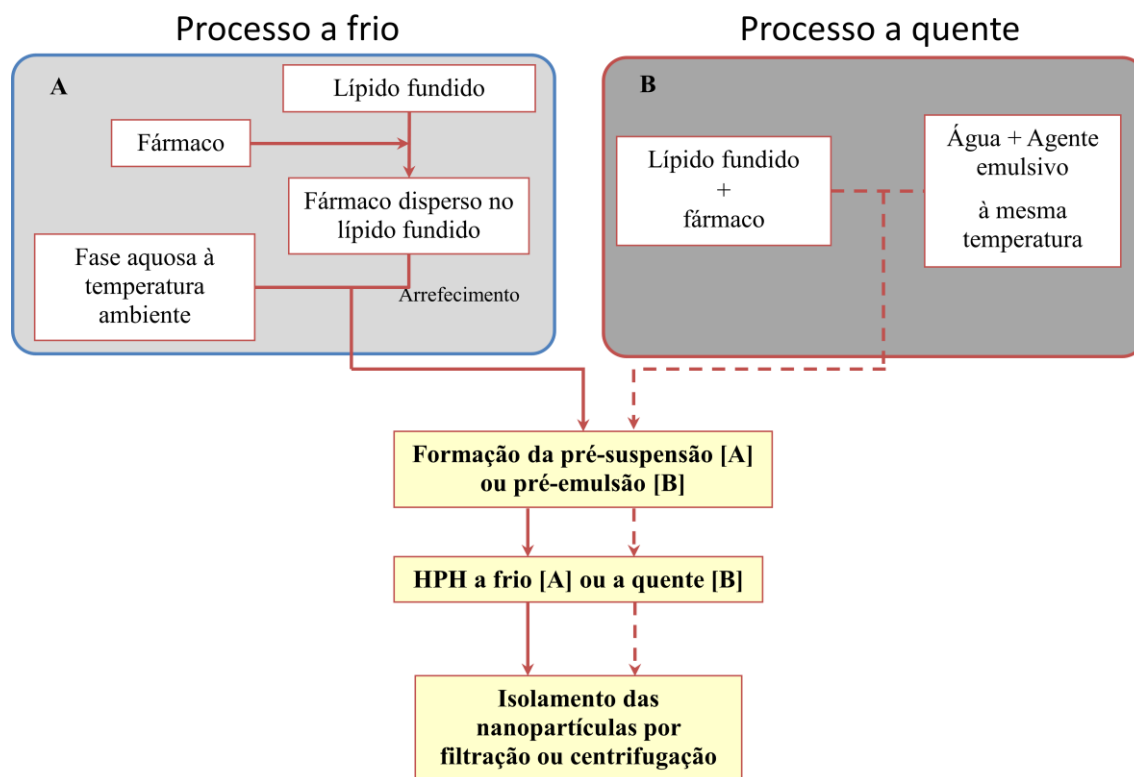
A base do processo de HPH consiste em forçar a passagem de uma suspensão aquosa de fármaco por um pequeno orifício de homogeneização, através da utilização de um pistão (Figura 1.4). O diferencial de pressões provoca um fluxo turbulento e ondas de choque, sendo que as colisões levam à quebra e conseqüente diminuição do tamanho das partículas (Junghanns e Müller, 2008).



**Figura 1.4.** Representação simplificada do processo de HPH (adaptado de Junghanns e Müller, 2008).

O processo de HPH pode ser realizado a quente ou a frio (Lucks e Müller, 1993) (Figura 1.5). Em ambos os casos, o fármaco é previamente dissolvido ou disperso no líquido fundido (Müller *et al.*, 2000). A técnica de HPH permite fazer uso de concentrações de

lípidos superiores a 40% e, geralmente, gera partículas bastante homogêneas, com um índice de polidispersão inferior a 0,2 (Lippacher *et al.*, 2001; 2002).



**Figura 1.5.** Esquema representativo do processo de HPH (adaptado de Cruz *et al.*, 2003).

A HPH a quente é realizada a temperatura superior ao ponto de fusão do lípido (Silva *et al.*, 2011). O fármaco começa por ser disperso ou dissolvido no lípido fundido, sendo depois a mistura dispersa numa solução aquosa de tensoactivo aquecida à mesma temperatura. Esta dispersão pode ser feita através de ultra-sons (Ahlin, 1998) ou de agitação mecânica (Mühlen *et al.*, 1998). A pré-emulsão obtida é sujeita a HPH, sendo esta efectuada a uma temperatura cerca de 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lípido. As temperaturas elevadas, devido ao facto de diminuírem a viscosidade da fase interna, originam partículas de menores dimensões (Ravikant *et al.*, 2013). Após a HPH, obtemos uma nanoemulsão que é arrefecida à temperatura ambiente, na qual o lípido solidifica obtendo-se uma solução aquosa de nanopartículas lipídicas (Müller *et al.*, 2011).

Esta técnica pode ser aplicada a compostos que apresentem alguma termo-sensibilidade, uma vez que o tempo de exposição a altas temperaturas é relativamente curto. No

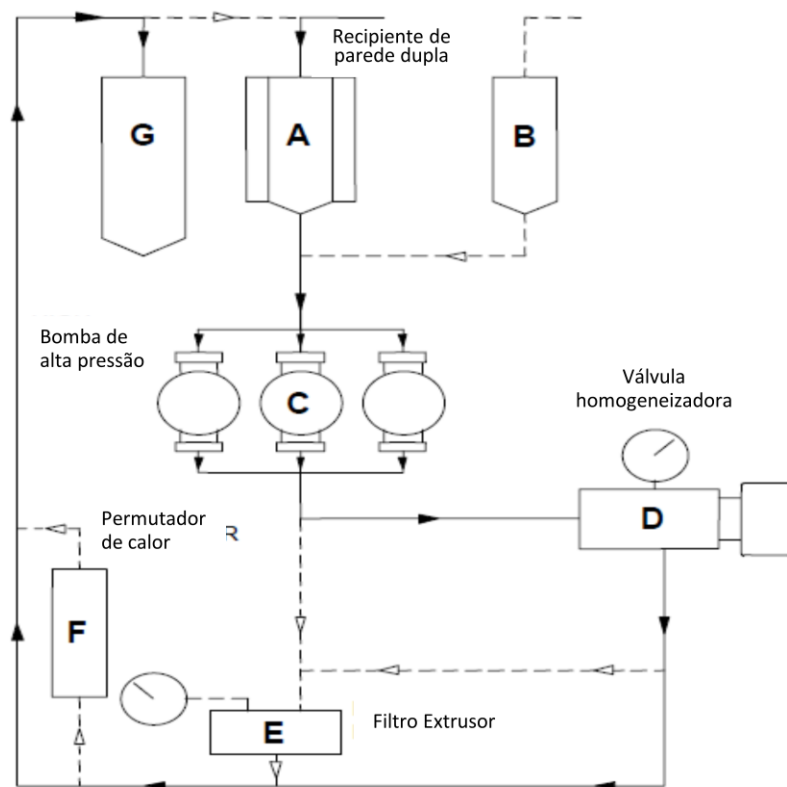
entanto, se o composto for lábil será mais aconselhado utilizar o processo a frio, sendo esta a principal limitação da HPH a quente (Müller *et al.*, 2000). Apesar de ser a técnica mais frequentemente aplicada, também não deve ser utilizada no caso de fármacos hidrófilos, pois durante a homogeneização da fase lipídica, estes deslocam-se facilmente para a fase aquosa, o que conduz a eficácias de encapsulação muito reduzidas (Müller *et al.*, 2000).

Na técnica de HPH a frio, o fármaco é incorporado no lípido previamente fundido, seguido de arrefecimento em gelo seco ou azoto líquido (Wissing *et al.*, 2004). A mistura lipídica sólida é pulverizada, originando micropartículas ( $\approx 50-100 \mu\text{m}$ ) que serão dispersas numa solução aquosa arrefecida de tensoactivo, gerando-se uma pré-suspensão. Esta pré-suspensão é homogeneizada à temperatura ambiente ou abaixo desta, sendo as forças de cavitação suficientemente fortes para quebrar as micropartículas em nanopartículas lipídicas sólidas (Müller *et al.*, 2000).

O processo a frio permite ultrapassar problemas inerentes ao processo a quente. A exposição térmica da amostra é minimizada, evita-se o deslocamento dos fármacos hidrófilos da fase lipídica para a aquosa durante a homogeneização e facilita a solidificação das nanopartículas à temperatura ambiente, sobretudo quando há dificuldades no processo de recristalização do lípido (Mehnert *et al.*, 2001). No entanto, para a mesma pressão aplicada, a HPH a frio exige normalmente um maior número de ciclos de homogeneização do que o processo de HPH a quente (Wissing *et al.*, 2004).

O processo de HPH está bem implementado a nível industrial em diversas áreas e o equipamento industrial difere do equipamento laboratorial apenas na dimensão, o que facilita os estudos de transposição de escala. Equipamentos com capacidades de  $100 \text{ lh}^{-1}$  até alguns milhares de litros por hora encontram-se disponíveis (por exemplo, o APV Rannie Homogeneizer 132T com cerca de  $11000 \text{ lh}^{-1}$  e uma pressão máxima de 1000 bar). Os equipamentos de produção a nível industrial possuem normalmente duas ou mais válvulas em sequência para aumentar a eficiência do processo (Müller *et al.*, 2002).

De um modo geral, os equipamentos funcionam da seguinte forma (Figura 1.6): uma bomba (C) impele as matérias-primas dos diferentes contentores (A, B) obrigando-as a passar pela válvula homogeneizadora (D) sendo depois o produto recolhido num contentor final (G) podendo passar ou não por um permutador de calor (F).



**Figura 1.6.** Esquema representativo de um homogeneizador de alta pressão de AVESTIN (<http://www.avestin.com/English/products.html>).

A primeira linha de produção em larga escala foi conseguida com o homogeneizador APV Gaulin 5.5 (Figura 1.7) (APV Deutschland GmbH, Unna, Alemanha) (Gasco *et al.*, 2009). Este aparelho possui 3 pistões e duas válvulas de homogeneização, sendo a capacidade de produção máxima de  $160 \text{ lh}^{-1}$ . Os lípidos, a substância activa e os tensoactivos são adicionados ao contentor de abastecimento de temperatura controlada, fundidos e adicionados de água estéril aquecida a cerca de  $80^\circ\text{C}$  (proveniente de um outro contentor). A pré-emulsão é produzida por meio de um disco dispersor, ou hélice dispersora (Figura 1.7 b). Após alguns minutos de agitação, a emulsão passa pelo homogeneizador sendo recolhida num contentor final. Aqui, o produto final é arrefecido de forma controlada, seguindo depois para contentores primários de transporte. Todos os tubos de ligação são independentes, o que permite o controlo da temperatura da pré-emulsão e do produto. Esta unidade de produção assegura condições assépticas pois o homogeneizador bem como os contentores de produto e de matéria-prima podem ser esterilizados por um jacto de vapor. Para além disto, todos os contentores são

alimentados com ar filtrado ou gases protectores como o N<sub>2</sub> e todas as superfícies são polidas electronicamente (Shegokar *et al.*, 2011).



**Figura 1.7.** a) Homogeneizador Gaulin 5.5; b) Pormenor do disco dispersor (adaptado de Shegokar *et al.*, 2011).

Importa referir que o processo pode ser efectuado de modo contínuo, como contentor das matérias-primas a ser realimentado pelo produto, ou descontínuo (Dingler e Gohla, 2002).

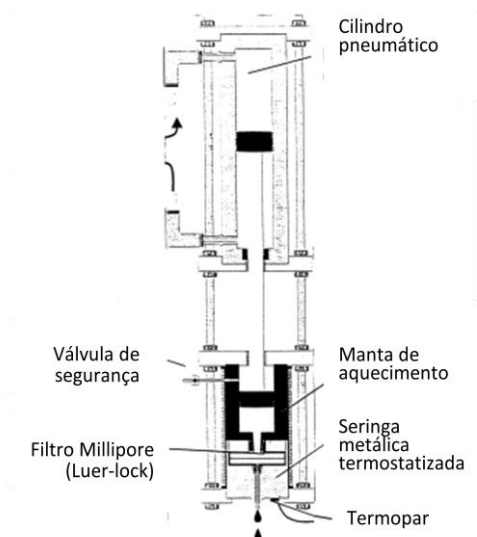
O homogeneizador de alta pressão contribui para a redução do índice de polidispersão, (PI) uma vez que as forças de dispersão se distribuem de forma mais homogénea durante o processo, proporcionando um aumento da estabilidade física das nanopartículas (Silva *et al.*, 2011). A pressão de homogeneização e a largura do orifício de saída do homogeneizador são factores-chave no perfil de distribuição de tamanho das nanopartículas. Os homogeneizadores de alta pressão originam partículas com menor índice de polidispersão devido ao menor diâmetro do orifício de saída e à distribuição mais uniforme da energia de homogeneização, o que facilita a rotura das gotículas oleosas da fase interna (Mehnert *et al.*, 2001; Ahlin, 1998). O método de HPH é bastante vantajoso pois evita o uso de solventes orgânicos, o tempo de produção é curto e a transposição de escala é efectuada de forma relativamente fácil. Desde a década de 50 que esta técnica é utilizada para produzir nanoemulsões para nutrição parentérica, designadamente Intralipid®, Fresenius Kabi Pharma, Lda e Lipofundina®, B. Braun Medical, Lda (Schwarz *et al.*, 1994). Deste modo, os homogeneizadores de alta pressão são amplamente utilizados em farmácia industrial, estando este processo de preparação bem estabelecido, o que do ponto de vista regulamentar facilita a autorização de

introdução no mercado dos medicamentos produzidos por esta metodologia (Pardeike *et al.*, 2009).

### 1.5.2. Produção por microemulsão

Segundo a técnica original desenvolvida por Gasco, os lípidos são fundidos e, simultaneamente, é aquecida, à mesma temperatura (60-70°C), uma fase aquosa com tensoactivo e co-tensoactivos. As duas fases são emulsificadas por agitação mecânica e originam uma microemulsão O/A. Também podem ser preparadas microemulsões múltiplas A/O/A. A microemulsão é depois diluída em água fria (2-10°C) para provocar a precipitação de nanopartículas lipídicas com tamanho reduzido e uniforme (Gasco 1998; Battaglia *et al.*, 2012).

Marengo *et al.* (2000) desenvolveram um equipamento que permite a produção de partículas em larga escala por este método (Figura 1.8). O princípio base é o mesmo, ou seja, a dispersão de uma microemulsão O/A quente em água fria. O equipamento é composto por uma câmara de alumínio termostaticada, um pistão pneumático que permite dispersar, através de uma agulha, até 100 ml de microemulsão. Variáveis como a temperatura, a velocidade de dispersão e o tamanho da gotícula da microemulsão são controláveis.



**Figura 1.8.** Aparelho de microemulsificação.  
(adaptado de Marengo *et al.*, 2000).

Vários parâmetros como a temperatura da câmara, pressão do pistão, calibre da agulha e o volume de água dispersante foram avaliados, sendo que maior temperatura e maior pressão juntamente com uma agulha de menor calibre originam partículas de menores dimensões (Marengo *et al.*, 2000).

Koziara *et al.* (2005) adaptaram este método para que pudesse ser executado num único passo e num único contentor. Os investigadores partiram de uma microemulsão O/A, na qual a fase lipídica era constituída por cera emulsificante (E. Wax, Spectrum Chemicals, New Brunswick, EUA) e a fase aquosa por uma solução aquosa de tensoactivo (Brij<sup>®</sup>78). Esta microemulsão foi mantida a 37-55°C, de acordo com o ponto de fusão da cera. As nanopartículas são obtidas pelo arrefecimento da microemulsão, não diluída, à temperatura ambiente e sob agitação.

A obtenção de partículas por microemulsão é relativamente simples e utiliza temperaturas moderadas. No entanto, uma das grandes desvantagens associadas a este método é a necessidade de um passo de diluição em água, o que leva à redução da concentração das partículas lipídicas na suspensão final. Geralmente, a concentração final de partículas é inferior a 1% (m/v), o que na preparação de uma forma farmacêutica final, exige a remoção subsequente do excesso de água (Silva *et al.*, 2011).

### **1.5.3. Produção por coacervação**

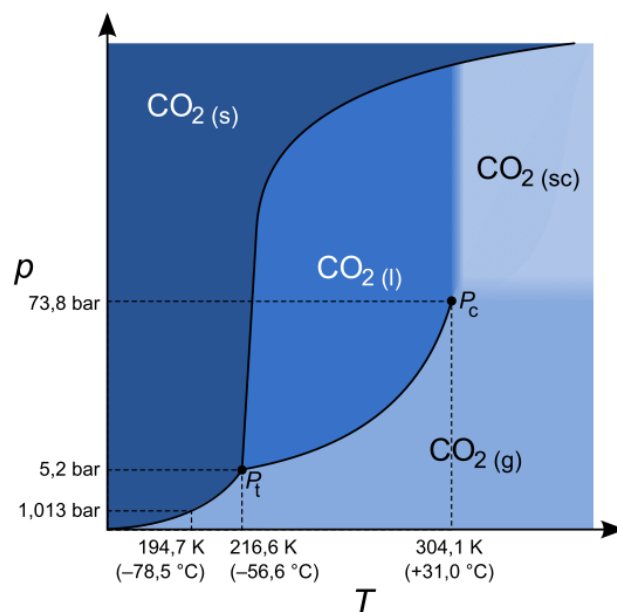
Nesta técnica a produção das nanopartículas é conseguida pela diminuição do pH de uma pseudo-solução ou dispersão coloidal, de sais de ácidos gordos. Na presença de um estabilizante apropriado, o ácido gordo precipita devido à troca de protões entre a solução acídica e o detergente (Gallarate *et al.*, 2011).

Battaglia *et al.* (2010) utilizaram, pela primeira vez, esta técnica para produzir NLS. O sal de sódio do ácido gordo é disperso na solução de polímero estabilizador e aquecida sob agitação até ligeiramente acima do ponto de Krafft do sal do ácido gordo. O ponto de Krafft é definido como sendo a temperatura abaixo da qual a solubilidade diminui drasticamente e ocorre precipitação (Shinoda, 1967). Em seguida, o sistema é rapidamente arrefecido ocorrendo precipitação. Os agentes emulsivos utilizados (álcool polivinílico (PVA) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) são não-iónicos, uma vez que a ausência de grupos iónicos os torna mais sensíveis a alterações de pH e de força iónica. A presença do polímero é essencial para evitar a agregação das partículas por

estabilização estereoquímica. Para a obtenção de partículas esféricas, um pH próximo de quatro deve ser atingido antes do arrefecimento, caso contrário obtêm-se partículas cristalinas de forma acicular. Os factores que influenciam o tamanho de partícula são a temperatura, o tamanho da cadeia do ácido gordo utilizado e a concentração do polímero. Relativamente aos polímeros utilizados, o tamanho da partícula aumenta com o aumento do peso molecular. O PVA com baixo grau de hidrólise permitiu produzir partículas mais pequenas ( $285\pm 11$  nm) enquanto a HPMC de elevado peso molecular originou partículas de  $1448\pm 80$  nm. Este efeito deve-se à diminuição de HPMC disponível na interface O/A uma vez que o polímero estabelece fortes ligações intracadeia, o que se expressa num aumento da viscosidade e, conseqüentemente, num aumento do tamanho da partícula. Com este estudo concluiu-se ainda que esta técnica permite a encapsulação de substâncias lipofílicas de forma eficaz, apresentando-se assim como um método promissor para formulação de fármacos. As vantagens inerentes ao método relacionam-se com o facto de não necessitar de maquinaria complexa nem de temperaturas elevadas, necessárias para fundir a matriz lipídica, permitindo a produção de NLS sem o recurso a solventes potencialmente tóxicos (Battaglia *et al.*, 2010). Contudo, a coacervação é uma técnica dispendiosa e complexa (Tiwari e Takhistar, 2012).

#### **1.5.4. Produção pela tecnologia de fluidos supercríticos**

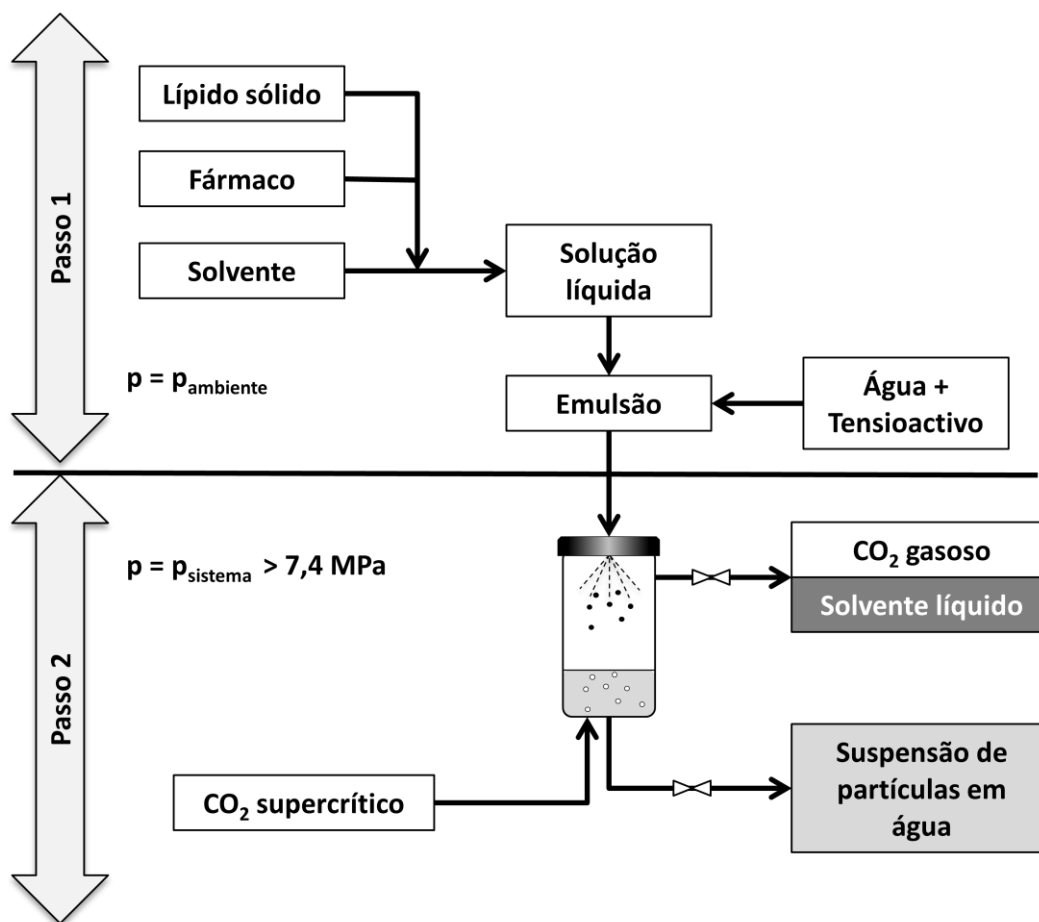
Os fluidos supercríticos (SCF) formam-se quando a temperatura e a pressão de determinada substância ultrapassam os seus valores críticos, o que leva a substância a apresentar simultaneamente propriedades de gás e líquido. Esta versatilidade permite diversas aplicações, como por exemplo em processos de extracção, solubilização de fármacos, plasticização de polímeros (propriedades de líquido), selectividade em reacções e facilitação de processos de transferência de massa (propriedades de gás) (Deshpande *et al.*, 2011). A Figura 1.9, inclui um diagrama de fases do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que têm sido a substância mais utilizada no processamento de fármacos pela tecnologia de SCF, pois apresenta baixa toxicidade, baixo ponto crítico ( $31^\circ\text{C}$  e 74 bar), baixo custo e fácil recuperação (Sellers *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2004).



**Figura 1.9.** Diagrama de fases do CO<sub>2</sub> (adaptado de Chattopadhyay *et al.*, 2005).

Esta tecnologia possui diversas variantes do processo de produção de partículas, cuja aplicabilidade depende maioritariamente da solubilidade do fármaco no SCF (Almeida e Souto, 2007). São exemplos os processos: *Static Supercritical Fluid Process*- SSF; *Particles from Gas Saturated Solutions*- PGSS; *Rapid Expansion of Supercritical Solutions*- RESS; *Gas/Supercritical Antisolvent Process* - GAS/SAS; *Precipitation from Compressed Antisolvent*- PCA; *Supercritical Fluid Extraction Emulsions* - SFEE, entre outras (Silva *et al.*, 2011), sendo os mais utilizados os processos SFEE e GAMA- *Gas Assisted Melting Atomization* (variante do processo PGSS) (Battaglia *et al.*, 2012).

A técnica SFEE baseia-se na extração do solvente orgânico de emulsões O/A (Chattopadhyay *et al.*, 2005). A emulsão O/A e o CO<sub>2</sub> supercrítico são introduzidos simultaneamente num recipiente onde vai ocorrer o contacto entre a fase orgânica da emulsão e o fluido supercrítico, resultando na extração do solvente, o que leva à supersaturação do soluto e conseqüente precipitação das partículas. Eventuais resíduos de solvente são retirados com CO<sub>2</sub> supercrítico. A posterior despressurização do recipiente permite a recolha da suspensão aquosa das partículas (Chattopadhyay *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2012) (Figura 1.10).

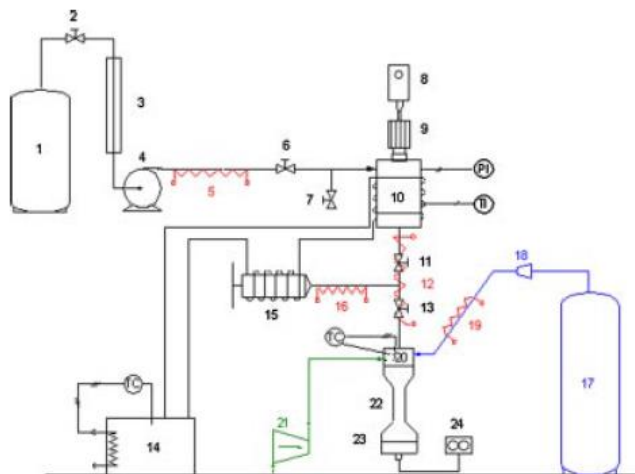


**Figura 1.10.** Esquema representativo do processo SFEE (adaptado de Luther e Braeuer, 2012).

A grande desvantagem do método reside no facto do produto final ser uma suspensão, o que pressupõe passos adicionais para obter um pó seco. Estes passos podem conduzir a um aumento do tamanho da partícula devido a aglomeração (Gomes *et al.*, 2012).

O processo GAMA constitui um melhoramento do processo PGSS, nomeadamente do passo de atomização. Através do GAMA obtêm-se pós finos, secos, de baixa densidade e não aglomerados. A Figura 1.11 representa esquematicamente um aparelho para obtenção de nanopartículas pelo processo GAMA. Resumidamente, o lípido ou a mistura lípido/fármaco são introduzidos num recipiente, onde são fundidas e colocadas em contacto com  $\text{CO}_2$  supercrítico sob condições de pressão e temperatura controladas e agitação contínua. Após cerca de 30 minutos de agitação, a válvula que liga a câmara misturadora ao recipiente colector abre e, simultaneamente há uma injeção co-axial de ar pressurizado. As partículas precipitam e a corrente de  $\text{CO}_2$  é mantida durante 15 min

para uma remoção eficiente do solvente orgânico. O produto proveniente das paredes do bocal e do recipiente colector é recolhido, obtendo-se, por norma, elevados rendimentos e uma quantidade de solvente negligenciável (Salmaso e Elvassore, 2009).



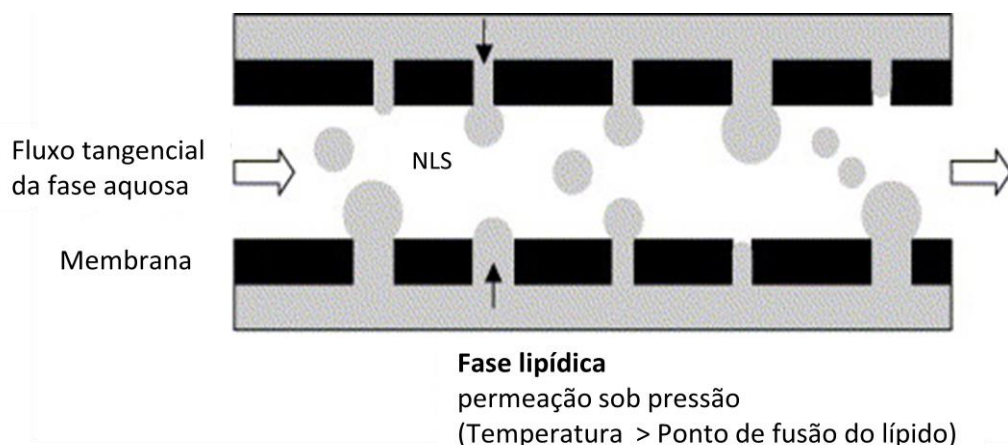
**Figura 1.11.** Aparelho para obtenção de micro e nanopartículas pelo processo GAMA. Reservatório de CO<sub>2</sub> (1); válvulas on-off (2,6,7,11,13); permutador de calor (3); bomba (4); resistências eléctricas (5,12,16,19); indicador de pressão (PI); indicador de temperatura (TI); misturador (8); câmara de fusão (10); sistema de aquecimento (14); bomba de *spraying* (15); entrada de ar (17); redutor de pressão (18); bocal (20); compressor para o fluxo de ar (21); vaso de precipitação (22); filtro (23); medidor de fluxo (24). Adaptado de Salmaso *et al.* (2009).

A produção de nanopartículas recorrendo aos fluidos supercríticos apresenta diversas vantagens, nomeadamente, condições de produção moderadas, possível esterilização através do SCF utilizado, fácil transposição de escala e a possibilidade de produzir partículas sob a forma de pós secos (Rodrigues *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007; Tiago *et al.*, 2013).

### 1.5.5. Produção por contactores de membrana

Charcosset *et al.* (2005) aplicaram o processo de contactor de membrana à produção de nanopartículas. O método consiste em fazer passar a fase lipídica, sob pressão e aquecida acima do seu ponto de fusão, por uma membrana (Figura 1.12). Esta

membrana é porosa, o que leva à formação de pequenas gotículas de lípido que são arrastadas pelo fluxo de água circulante no interior da membrana (no sentido tangencial à sua superfície). As nanopartículas formam-se pelo arrefecimento das gotículas abaixo do ponto de fusão do lípido (Charcosset *et al.*, 2005).



**Figura 1.12.** Esquema representativo do método de produção de nanopartículas lipídicas por contacto de membrana (Charcosset *et al.*, 2005).

O tamanho de partícula depende de vários parâmetros como a quantidade de fase lipídica, temperaturas das fases aquosa e lipídica, pressão da fase lipídica, velocidade do fluxo da fase aquosa e diâmetro do poro da membrana. Assim, partículas com tamanhos mais reduzidos são obtidas com altas pressões da fase lipídica e elevadas velocidades de fluxo da fase aquosa, temperatura da fase aquosa inferior ao ponto de fusão e temperatura da fase lipídica superior ao ponto de fusão (Charcosset *et al.*, 2005).

O contacto de membrana apresenta vantagens como a facilidade de utilização e de transposição de escala e ainda a possibilidade de controlar o tamanho de partícula variando diversos parâmetros do processo (El-Harati *et al.*, 2006). Para além disso, o método encontra-se presentemente desenvolvido para a produção de micropartículas poliméricas à escala industrial pela empresa *Nanomi* (*Nanomi Monosphere Technology*) que desenvolveu uma tecnologia baseada na utilização de uma membrana, *Microsieve<sup>TM</sup>*. Esta tem poros de forma e dimensão uniforme, obtendo-se assim partículas com as mesmas dimensões. Mais precisamente, as partículas são obtidas por dispersão do fluido num outro fluido imiscível e feito passar através da membrana *Microsieve<sup>TM</sup>*.

### 1.5.6. Produção pelo método da temperatura de inversão de fases (PIT)

O conceito de PIT (*Phase Inversion Temperature*) refere-se à temperatura ou intervalo de temperaturas às quais as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um tensoactivo não-iónico estão em equilíbrio (Friberg *et al.*, 1976). Neste conceito utiliza-se a capacidade que alguns tensoactivos polietoxilados têm para modificar a sua afinidade para a água ou óleo consoante a temperatura (Corrias e Lai, 2011).

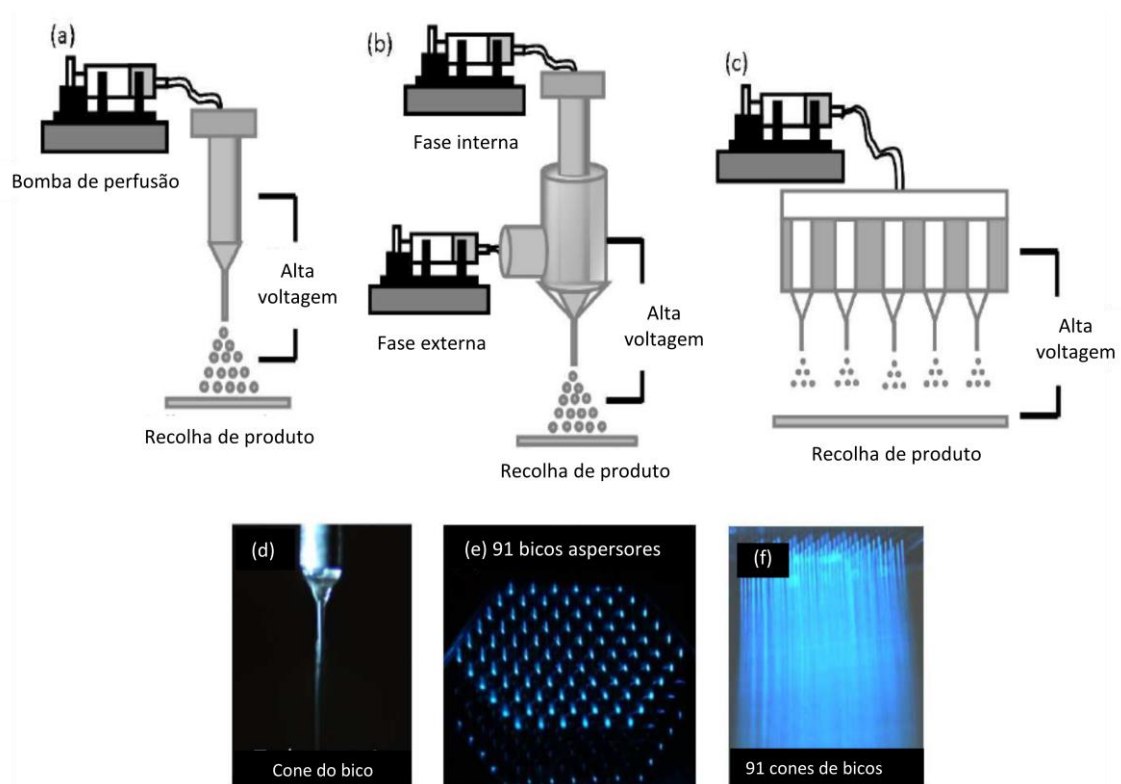
Heurtault *et al.* (2003) patentearam um método de PIT para a produção de nanocápsulas lipídicas (constituídas por uma camada externa de lípido sólido à temperatura ambiente preenchida por lípido líquido ou semi-sólido). Para a preparação recorreu-se a triglicéridos de ácidos capríco e caprílico (Labrafac<sup>®</sup>) para a fase lipídica, hidroxiestearato de polietilenoglicol 15 (Solutol<sup>®</sup> HS 15) como tensoactivo não iónico e uma solução de cloreto de sódio como fase aquosa. Pequenas quantidades de lecitina (Lipoid<sup>®</sup>) foram utilizadas como co-tensoactivo para aumentar a estabilidade das nanocápsulas (Heurtault *et al.*, 2003).

De acordo com esta patente, as nanocápsulas são obtidas em duas etapas. Na primeira etapa, os componentes são misturados sob agitação magnética e aquecidos até a uma determinada temperatura  $T_2$  ( $T_2 > \text{PIT}$ ), para obter uma emulsão A/O. De seguida, procede-se ao arrefecimento até à temperatura  $T_1$  ( $T_1 < \text{PIT}$ ), o que conduz à formação de uma emulsão O/A. Este processo é repetido várias vezes para diminuir o tamanho de partícula da emulsão obtida. Normalmente 3 a 4 ciclos de aquecimento/arrefecimento a cerca de 4°C/minuto entre 60°C e 85°C são suficientes. A segunda etapa consiste na diluição da emulsão em água fria, o que vai quebrar a microemulsão, originando as nanocápsulas. O tamanho de partícula obtido pode ser controlado, sendo que diminuí com o aumento do número de ciclos aquecimento/arrefecimento (em cada ciclo, o tensoactivo migra para a interface, onde se acumula gradualmente conferindo grande estabilidade) e com o aumento da proporção hidrofílica do tensoactivo não-iónico (Anton *et al.*, 2007; Heurtault *et al.*, 2003). O método PIT não faz uso de solventes orgânicos e é relativamente simples, tornando-se desta forma vantajoso e apelativo para uma potencial transposição de escala.

### 1.5.7. Produção por *electrospray*

No processo de *electrospray*, o líquido é desintegrado sob a influência de forças eléctricas, em gotículas de tamanho uniforme. O método é suave e permite um controlo rigoroso do tamanho da partícula. As variantes do método de *electrospray* dependem da voltagem aplicada, sendo a mais utilizada o “*Taylor cone-jetmode*”. Como mostra a Figura 1.13, o líquido condutor é injectado lentamente através de uma agulha (Figura 1.13a), à qual é aplicado um potencial eléctrico. Este potencial induz uma carga superficial no menisco crescente na agulha. Devido a esta carga e ao campo eléctrico, gera-se um *stress* eléctrico na interface líquido-ar, que provoca a saída do líquido da agulha. Quando o potencial eléctrico é bastante elevado, o menisco no orifício da agulha assume uma forma cónica, mais conhecido por “*Taylor cone*” ou cone do bico (Figura 13 d). No ápex do cone surge um jacto de líquido, que se quebra em finas partículas (Yurteri *et al.*, 2010).

Também é possível produzir nanopartículas estruturadas, recorrendo ao uso de uma configuração axial (Figura 1.13b), na qual dois líquidos distintos são introduzidos em agulhas interna e externa. Como o fluxo de líquido nestes dispositivos é sempre reduzido ( $\mu\text{lh}^{-1}$  ou  $\text{mlh}^{-1}$ ), é possível associar várias seringas num único dispositivo (Figura 1.13 c, e, f), o que traz claras vantagens em produção de larga escala.



**Figura 1.13.** Representação do método de *electrospray* (adaptado de Wu *et al.*, 2012).

O tamanho de partícula pode ser teoricamente determinado com base na seguinte equação (Jaworek, 2007):

$$d_D = \alpha \left( \frac{Q^3 \epsilon_0 \rho}{\pi^4 \sigma \gamma} \right)^{1/6} \quad (\alpha = 2.9)$$

na qual Q representa o fluxo do líquido,  $\epsilon_0$  a permissividade do vácuo,  $\rho$  a densidade do líquido,  $\sigma$  a tensão superficial e  $\gamma$  a condutividade. Estes parâmetros podem ser ajustados de forma a obter o tamanho de partícula desejado (Wu *et al.*, 2012).

O método de *electrospray* apresenta ainda algumas limitações à implementação industrial, uma vez que as taxas de produção são baixas. Para obter partículas de tamanhos reduzidos, é necessário utilizar fluxos lentos. Assim, a solução mais simples passa por aumentar o número de capilares, sendo necessário assegurar que a distribuição de líquido e a intensidade do campo elétrico é uniforme em todos os pontos do dispositivo (Deng *et al.*, 2009).

## **1.6. Preparação de NLS por métodos de produção não transponíveis para a escala industrial**

Entre os métodos não transponíveis para a escala industrial, como citado anteriormente, encontram-se os métodos que utilizam solventes cujos resíduos poderão apresentar toxicidade. No entanto, foram propostos para encapsular moléculas com problemas de estabilidade e biodisponibilidade. Esta técnica foi recentemente utilizada por Nabi-Meibodi *et al.* (2013) para produzir NLS de cloridrato de raloxifeno, tendo este uma baixa biodisponibilidade, pela sua baixa solubilidade e pelo metabolismo hepático. Foram produzidas NLS pelo método de evaporação do solvente com uma boa eficiência de encapsulação e uma maior biodisponibilidade (Nabi-Meibodi *et al.*, 2013). Para além de relativamente fácil execução, as temperaturas utilizadas são moderadas, o que permite a sua utilização caso o fármaco seja termosensível (Battaglia *et al.*, 2012).

### **1.6.1. Produção por emulsificação-evaporação de solvente**

A técnica de evaporação de solvente parte de uma emulsão O/A. O lípido é previamente dissolvido num solvente orgânico imiscível com água (por exemplo: diclorometano ou acetato de etilo), ao que se segue a dissolução do fármaco na solução orgânica. Esta solução é emulsificada por agitação numa solução aquosa e o solvente orgânico é evaporado sob pressão reduzida ou por agitação (Hoa *et al.*, 2009), ocorrendo a precipitação das nanopartículas lipídicas.

### **1.6.2 Produção por emulsificação-substituição de solvente**

A técnica de substituição de solvente descrita por Fessi *et al.* (1992) começou por ser utilizada para a obtenção de nanopartículas poliméricas. O lípido é previamente dissolvido num solvente orgânico semi-polar miscível com a água (por exemplo acetona, acetato de etilo ou metanol) (Dora *et al.*, 2010), sendo depois o fármaco dissolvido nesta solução. Segue-se a injeção da solução numa solução aquosa com tensoactivo O/A sob agitação magnética, formando-se as nanopartículas por precipitação do lípido.

### 1.6.3 Produção por emulsificação-difusão de solvente

Para a preparação de nanopartículas lipídicas pelo método de difusão do solvente é necessário saturar previamente com água um solvente parcialmente solúvel em água. Em seguida, o lípido e o fármaco são sequencialmente dissolvidos nesse mesmo solvente, formando-se a fase orgânica que será emulsificada por agitação mecânica numa solução aquosa com tensoactivo. Esta emulsão O/A é depois diluída num excesso de água de modo a provocar a difusão do solvente da fase interna para a fase externa, formando-se as nanopartículas devido à precipitação do lípido (Quintanar-Guerrero *et al.*, 2005). Apesar dos problemas de segurança relacionados com o emprego de solventes orgânicos, este método encontra-se comercialmente desenvolvido sendo oferecido à indústria farmacêutica para encapsulação de fármacos em micropartículas de PLGA (Medisorb® Microspheres Technology; Herbert e Hazrati, 1997).

### BIBLIOGRAFIA

Ahlin GP. Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions. *Acta Pharm* 1998; 48:259-267.

Ahlin P, Sentjurc M, Strancar J, Kristl J. Location of lipophilic substances and ageing of solid lipid nanoparticles studied by EPR. *STP Pharma Sci* 2000; 10:125–32.

Akat PB. Severe photosensitivity reaction induced by topical diclofenac. *Indian J Pharmacol* 2013; 45:408–409.

Almeida AJ, Souto EB. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:478–490.

Anton N, Gayet P, Benoit J-P, Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int J Pharm* 2007; 344:44–52.

AVESTIN - High Pressure Homogenizers EmulsiFlex and LiposoFast Products [em linha]. Disponível em <http://www.avestin.com/English/products.html> (acedido em 22-07-2013).

Barry B. Transdermal drug delivery. In: Aulton ME (ed.), *Pharmaceutics: Design and Manufacture of Medicines*, Churchill Livingstone – Elsevier, Edinburgh, 2007. p. 499-533.

Battaglia L, Gallarate M, Cavalli R, Trotta M. Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. *J Microencapsul* 2010; 27:78–85.

Battaglia L, Gallarate M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2012; 9:497–508.

Bhaskar K, Anbu J, Ravichandiran V, Venkateswarlu V, Rao Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Lipids Health Dis* 2009; 8:6-21.

Birrenbach G, Speiser PP. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci* 1976; 65:1763–1766.

Carneiro R, Salgado A, Raposo S, Marto J, Simões S, Urbano M, Ribeiro HM. Topical emulsions containing ceramides: effects on the skin barrier function and anti-inflammatory properties. *Eur J Lipid Sci Technol* 2011; 133:961–6.

Chadha G, Sathigari S, Parsons DL, Babu RJ. In vitro percutaneous absorption of genistein from topical gels through human skin. *Drug Develop Ind Pharma* 2011; 37:498-505.

Charcosset C, El-Harati A, Fessi H. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J Control Release* 2005;108:112–120.

Chattopadhyay P, Shekunov B, Seitzinger J, Robe H, inventores. Particles From Supercritical Fluid Extraction of Emulsion. Patente n.º EP 1551523 A4 2005.

Cordero JA, Alarcon L, Escribano E, Obach R, Domenech J. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Pharma Sci* 1997; 86:503-508.

Corrias F, Lai F. New methods for lipid nanoparticles preparation. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2011; 5:201–213.

Couvreur P, Tulkens P, Roland M, Trouet A, Speiser P. Nanocapsules a new type of lysosomotropic carrier. *FEBS Lett* 1977; 84:323–326.

Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65:21–23.

Cruz ME, Almeida AJ, Corvo ML. Sistemas de libertação controlada de fármacos. Biotecnologia fundamentos e aplicações. In: Lima N, Mota M (eds.), *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*, Lidel - Edições Técnicas, Lisboa, 2003. p. 359-376.

Degim IT. New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discov Today* 2006; 11: 517-523.

Deng W, Waits CM, Morgan B, Gomez A. Compact multiplexing of monodisperse electrosprays. *J Aerosol Sci* 2009; 40:907–918.

Deshpande PB, Kumar GA, Kumar AR, Shavi GV, Karthik A, Reddy MS, Udupa N. Supercritical fluid technology: concepts and pharmaceutical applications. *PDA J Pharm Sci Technol* 2011; 65:333–344.

Dingler A, Gohla S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J Microencapsul* 2002; 19:11–16.

El-Harati A, Charcosset C, Fessi H. Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles prepared with a membrane contactor. *Pharm Dev Technol* 2006;11:153–157.

Farmacopeia Portuguesa 9 (FP9). [versão CD-Rom] Lisboa: INFARMED – Ministério da Saúde. 2008.

FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2006 sections 201(s) and 409 of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act .

Feldman M, McMahon AT. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? *Ann Intern Med* 2000; 132:134-143.

Fessi C, Devissaguet J, Puisieux F, Thies C, inventores. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. Patente n.º US 5118525. 1992.

Friberg S, Lapczynska I, Gillberg G. Microemulsions containing nonionic surfactants — The importance of the pit value. *J Colloid Interf Sci* 1976; 56:19–32.

Gabriel SE, Jaakkimainen L, Bombardier C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Intern Med* 1991; 115:787-796.

Gallarate M, Battaglia L, Peira E, Trotta M. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles prepared through coacervation technique. *Int J Chem Eng* 2011; 2011:1–6.

Gasco M, inventor. Solid lipid microspheres having a narrow size distribution and method for producing them. Patente n.º EP 526666 A1. 1993.

Gasco MR, Priano L, Zara GP. Solid lipid nanoparticles and microemulsions for drug delivery to the CNS. In: Sharma H, editor. *Progr Brain Res* 2009; 180:181–192.

Gomes T, Santos D, Meireles A. Trends in particle formation of bioactive compounds using supercritical fluids and nanoemulsions. *Food Public Health* 2012; 2:142–152.

Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. *Int J Pharm* 2005; 305:2-12.

Herbert PF, Hazrati AM. Preparation of biodegradable microparticles containing a biologically active agent. Patent nº 5654008 A5 1997.

Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne M-C, Proust J-E, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003;18:55–61.

Heurtault B, Saulnier P, Benoit J, Proust J, Pech B, Joel R, inventores. Lipid nanocapsules, preparation process and use as medicine. Patente n.º US 2003152635 A1. 2003.

Hoa LTM, Chi NT, Triet NM, Nhan LNT, Chien DM. Preparation of drug nanoparticles by emulsion evaporation method. *J Phys: Conf Ser* 2009; 187:012047.

Infomed, pesquisa de medicamentos. [em linha] Disponível em <http://www.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php> (acedido em 09-07-2014).

Jaworek A. Micro and nanoparticle production by electrospraying. *Powder Technol* 2007;176:18–35.

Jenning V, Thünemann AF, Gohla SH. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* 2000; 199:167–77.

Joshi M, Patravale V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int J Pharm* 2008; 346:124–132.

Junghanns J, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomed* 2008; 3:295–309.

Khurana S, Bedi PMS, Jain NK. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chem Phys Lipids* 2013; 175-176:65–72.

Kielhorn J, Melching-Kollmuß S, Mangelsdorf I. Environmental health criteria (EHC) 235: Dermal absorption. Geneva: World Health Organization (WHO) 2006; 6-36.

Koziara JM, Oh JJ, Akers WS, Ferraris SP, Mumper RJ. Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles. *Pharm Res* 2005; 22:1821–1828.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2001; 214:9–12.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Semisolid SLN<sup>TM</sup> dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53:155–160.

Lucks J, Müller RH. Medication vehicles made of solid lipid nanoparticles (Solid Lipid Nanospheres - SLN). Patente n.º EP 605497 B2. 1993.

Lukowski G, Werner U. Investigation of surface and drug release of solid lipid nanoparticles loaded with acyclovir. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 1998; 25:425–428.

Luther SK, Braeuer A. High-pressure microfluidics for the investigation into multi-phase systems using the supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE). *J Supercrit Fluids* 2012; 65:78–86.

Manconi M, Caddeo C, Sinico C, Valenti D, Mostallino MC, Biggio G, Fadda AM. Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle–skin interaction. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 78:27–35.

Marengo E, Cavalli R, Caputo O, Rodriguez L, Gasco MR. Scale-up of the preparation process of solid lipid nanospheres. Part I. *Int J Pharm* 2000; 205:3–13.

Marto J, Baltazar D, Militão M, Duarte A, Salgado A, Gouveia L, Simões S, Fernandes A, Oliveira E, Ribeiro H. Topical gels of etofenamate: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Pharma Develop Techn* 2014; 5:1-6.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47:165–196.

Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 inhibition and side-effects of non-steroidal antiinflammatory drugs in the gastrointestinal tract. *Curr Med Chem* 2000; 7:1121-1129.

Muchow M, Maincent P, Müller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2008; 34:1394–1405.

Mühlen A, Schwarz C, Mehnert C. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45:149–155.

Müller RH, Runge S. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. In: Benita S, editor. *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery* Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1998. p. 219–234.

Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50:161–177.

Müller RH, Radtke M, Wissing S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 131–55.

Müller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol* 2011; 8:207–227.

Nabi-Meibodi M, Vatanara A, Najafabadi AR, Rouini MR, Ramezani V, Gilani K, Etemadzadeh SMH, Azadmanesh K. The effective encapsulation of a hydrophobic lipid-insoluble drug in solid lipid nanoparticles using a modified double emulsion solvent evaporation method. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2013; 112:408–414.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guidance Notes for the estimation of Dermal Absorption Values, Series on Testing and Assessment, no. 156, 2011.*

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Test Guideline 427: Skin Absorption: in vivo Method. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development. 2004a

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Test Guideline 428: Skin Absorption: in vitro Method. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development. 2004b

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD Series on Testing. 2004c

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366:170–184.

Pegi A, Julijana K, Slavko P, Janez S, Marjeta S. The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. *J Pharm Sci* 2003; 92:58–66.

Pellanda CL. Topical bioavailability of glucocorticosteroids. Dermatopharmacokinetic and dermatopharmacodynamic of topically applied triamcinolone acetonide in humans. Universidade Basel 2006. Tese de Doutorado.

Pellanda C, Ottiker E, Strub C, Figueiredo V, Rufli T, Imanidis G Topical bioavailability of triamcinolone acetonide: effect of dose and application frequency. *Archives of dermatological* 2006; 298:221-30.

Poet TS, McDougal JN. Skin absorption and human risk assessment. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 140:19-34.

Prista LN, Alves AC, Morgado R, Lobo JS. *Tecnologia Farmacêutica – Volume I*. 6<sup>a</sup> ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian 2003; 42-45; 91-111; 597-614.

Quintanar-Guerrero D, Tamayo-Esquivel D, Ganem-Quintanar A, Allémann E, Doelker E. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26:211–218.

Rahimpour Y, Hamishehkar H. Niosomes as carrier in dermal drug Delivery. In: Sezer AD, editor. Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems. InTech 2012.p. 141-164.

Radtke M. Nanostructured lipid carriers : a novel generation of solid lipid drug carriers. Pharm Tech Europe 2005; 17:45–50.

Ravikant G, Kumar YS, Priyanka GP. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drug delivery system. IJPSR 2013;2:21–25.

Rhee YS, Chang SY, Park CW, Chi SC, Park ES. Optimization of ibuprofen gel formulations using experimental design technique for enhanced transdermal penetration. Int J Pharm 2008; 364:14-20.

Rodrigues M, Peiriço N, Matos H, Gomes de Azevedo E, Lobato M., Almeida A. Microcomposites theophylline/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems. J Supercrit Fluids 2004; 29:175–184.

Salmaso S, Elvassore N. Production of solid lipid submicron particles for protein delivery using a novel supercritical gas assisted melting atomization process. J Pharm Sci 2009; 98:640–650.

Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. J Control Release 1994; 30:83–96.

Sellers SP, Clark GS, Sievers RE, Carpenter JF. Dry powders of stable protein formulations from aqueous solutions prepared using supercritical CO<sub>2</sub>-assisted aerosolization. J Pharm Sci 2001; 90:785–797.

Shegokar R, Singh KK, Müller RH. Production and stability of stavudine solid lipid nanoparticles-from lab to industrial scale. Int J Pharm 2011; 416:461–470.

Shinoda K. Solvent Properties of Surfactant Solutions. New York: Dekker; 1967 [em linha]. Disponível em <http://books.google.pt/books/about/> (acedido em 09-07-2013).

Silva A, Martins S, Santos D, Ferreira D, Souto EB. Nanopartículas lipídicas. In: Souto EB, Lopes CM (eds.), *Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos*. Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011; 297–334.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56:387-437.

Solignac M. [Abstract] Assessment of topical NSAIDs in the treatment of pain and inflammation. The example of Flector Plaster, a local bioadhesive plaster containing diclofenac epolamine. *Presse Med* 2004; 33(3S):10-13.

Souto EB, Wissing S, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* 2004; 278:71–77.

Souto EB, Almeida AJ, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *J Biomed Nanotechnol* 2007; 3:317–331.

Tiago JM, Padrela L, Rodrigues MA, Matos HA, Almeida AJ, Azevedo EG. Single-step co-crystallization and lipid dispersion by supercritical enhanced atomization. *Cryst Growth Des* 2013, 13:4940–4947.

Tiwari R, Takhistar P. Nanotechnology-enabled delivery system for food functionalization and fortification. In: Padua GW, Wang Q (eds.), *Nanotechnology Research Methods for Food and Bioproducts*. John Wiley & Sons; 2012. P. 81–83. [em linha]. Disponível em <http://books.google.com/books?id=esN25TQ-ZEIC&pgis=1> (acedido em 03-06-2014).

Villar MA, Pagan JA, Palacios L, Quiralte J, Ramirez M. Allergic contact dermatitis to etofenamate. Cross-reaction to other non steroid anti-inflammatory drugs. *Contact Dermatitis* 2008; 58:118–119.

Westesen K, Bunjes H, Koch MH. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Control Release* 1997; 48:223–236.

Wissing SA, Müller RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int J Pharm* 2002; 242:377–379.

Wissing SA, Müller RH. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56:67–72.

Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:1257–1272.

WHO (World Health Organisation). Dermal Absorption. *Environmental Health Criteria* 235. ISBN 92-4-157235. World Health Organisation, Geneva, 2006.

Wu Y, Duong A, Lee L, Wyslouzil B. Electrospray production of nanoparticles for drug/nucleic acid delivery. In: Hashim A (ed.), *The Delivery of Nanoparticles*. InTech, 2012; 10:242-243.

Yurteri C, Hartman R, Marijnissen J. Producing pharmaceutical particles via electrospraying with an emphasis on nano and nano structured particles. A review. *KONA Powder Part J* 2010; 28:91–115.

## CAPÍTULO 2

### PRODUÇÃO DE NLS POR MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

**Submetido para publicação:**

**Effect of type of surfactant and sterilization process on physical stability of tripalmitin solid lipid nanoparticles**

*G. Mancini<sup>1,2</sup>, R. Lopes<sup>1</sup>, P.Clemente<sup>1</sup>, S. Raposo<sup>1</sup>, L.M.D.Gonçalves<sup>1</sup>, A. Bica, <sup>2</sup>H.M. Ribeiro<sup>1</sup>, A.J. Almeida<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF), Rua das Ferrarias del Rei 6, 2730-269 Barcarena, Portugal

## 1. INTRODUÇÃO

No decurso dos últimos anos tornou-se ainda mais evidente que o desenvolvimento de novas substâncias activas não é suficiente para assegurar um progresso nas terapias farmacológicas. Várias foram as investigações que procuram encontrar uma resposta a esta incessante procura de novos e mais eficientes fármacos. Uma estratégia promissora consiste no desenvolvimento concomitante de sistemas de transporte adequados para os fármacos (Mehnert e Mäder 2001). No início da década de 1990 os investigadores começaram a dedicar-se ao estudo de transportadores alternativos constituídos por lípidos sólidos estabilizados por agentes emulsivos, as chamadas nanopartículas lipídicas sólidas ou SLN (aqui designadas NLS descritas na introdução da tese). Uma das limitações apontadas para estes sistemas é a baixa eficiência de encapsulação dos fármacos resultante da transformação polimórfica da matriz lipídica, o qual pode provocar a expulsão de moléculas do fármaco. De modo a prevenir esta desvantagem foram introduzidas modificações na composição lipídica, designadamente a adição de pequenas quantidades de lípidos líquidos à temperatura ambiente (Jenning *et al.*, 2000). Estava assim criada uma segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas, designadas transportadores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers*; NLC), constituídas por misturas de lípidos sólidos e líquidos em proporções que resultem em matrizes sólidas à temperatura ambiente e possibilitem a modulação da libertação dos fármacos incorporados (Radtke e Müller, 2001; Souto *et al.*, 2007).

No entanto, um dos maiores obstáculos ao uso generalizado das NLS prende-se com a instabilidade física das mesmas, devida principalmente à agregação e fusão de partículas, e/ou à instabilidade química ao nível de reacções de hidrólise e oxidação de excipientes, libertação do fármaco e a reactividade do mesmo durante o armazenamento. Estes factos estão amplamente relatados na literatura em processos de armazenamento de suspensões aquosas de NLS por longos períodos (Freitas e Müller, 1998, 1999; Radomska-Soukharev, 2007). A liofilização constitui uma abordagem razoável para melhorar a estabilidade física e química com a eliminação da água que constitui a fase dispersante das suspensões de NLS, sendo um dos métodos mais fiáveis. Trata-se de um processo de aplicação generalizada para estabilizar e facilitar o manuseamento de sistemas coloidais como lipossomas (Miyajima *et al.*, 1997) e nanopartículas poliméricas (Abdelwahed *et al.*, 2006), assegurando ainda a sua estabilidade a longo-termo, mesmo durante períodos de

armazenamento como os do presente estudo. Este processo inclui normalmente o uso de aditivos (crioprotectores/lioprotectores) de forma a assegurar níveis de tonicidade e reconstituição adequados, e a prevenir a agregação das partículas, inibindo a degradação das substâncias activas durante o processo de sublimação do gelo, como descrito para lipossomas (Carvalho *et al.*, 2009) ou nanopartículas poliméricas. Não obstante, as nanopartículas liofilizadas devem manter inalteradas as principais características físicas e químicas do produto, como o teor em humidade e a estabilidade físico-química a longo prazo (Abdelwahed *et al.*, 2006).

A esterilização é também um passo importante de produção, especialmente no caso de administração parentérica ou pulmonar, que não deve alterar as propriedades da formulação. Cavalli *et al.* (1997) estudaram a influência da esterilização por calor húmido no diâmetro médio das partículas e potencial zeta de NLS produzidas por microemulsificação e observaram um aumento no diâmetro médio das partículas após um ano, em todas as formulações estudadas. No entanto, não ocorreram variações no diâmetro médio das partículas nem no potencial zeta. Uma preocupação frequente são as alterações induzidas pela temperatura. Neste contexto, a escolha correcta do agente emulsivo é de significativa importância para a estabilidade física a temperaturas elevadas. O aumento da temperatura afecta a mobilidade e a hidrofília do agente emulsivo, tendo sido provado que alguns tensoactivos naturais (ex. lecitina) são óptimas escolhas para esterilização pelo calor húmido (Schwarz *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2012).

Para além da estabilização físico-química, certas preparações líquidas e semi-sólidas carecem também de conservação antimicrobiana de forma a manter a sua condição asséptica durante os períodos de armazenamento e utilização. A falta de estudos sobre a eficácia dos agentes antimicrobianos nos modernos sistemas dispersos contendo lecitina (emulsões submicrométricas ou lipossomas) é uma das razões pelas quais estas formulações não estão a ser utilizadas em grande escala. Sznitowska *et al.* (2002) e, mais recentemente, Han e Washington (2005) monitorizaram diversos agentes antimicrobianos, estudando a sua compatibilidade em emulsões, e descobriram que os conservantes mais promissores são os da classe dos parabenos, que não apresentaram incompatibilidade nestes sistemas de veiculação.

Considerando os estudos já publicados, vários são os aspectos relacionados com as dispersões de NLS e a sua estabilidade que necessitam de uma maior caracterização.

Assim sendo, o objectivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes processos de esterilização pelo calor húmido nas propriedades físicas das formulações de NLS e a sua evolução ao longo de um período de armazenamento de 6 meses. Concomitantemente foram estudados os efeitos da inclusão de parabenos nas formulações de NLS, ao nível dos parâmetros mais relevantes como o diâmetro médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. Finalmente foi também avaliado o efeito do processo de liofilização em formulações de NLS esterilizadas por calor húmido.

Estes estudos constituíram a primeira abordagem à produção de NLS, tendo sido descontinuados pela dificuldade de aplicação industrial do método de emulsificação-evaporação de solvente, o qual foi posteriormente substituído pelo método de fusão-emulsificação (Capítulo 3).

## **2. MATERIAIS**

Foram utilizados tripalmitato de glicerilo (tripalmitina) e álcool polivinílico (PVA, 87-89% hidrolisado, Mw 13000-23000), adquiridos à Sigma-Aldrich (Alemanha); lecitina de soja (Lipoid<sup>®</sup> S100, Lipoid, Alemanha); polisorbato 20 (Tween<sup>®</sup> 20, Panreac, Espanha); desoxicolato de sódio (DCS, Merck, Alemanha); dietilenoglycol monoetil éter (Transcutol<sup>®</sup> CG, Gattefossé, Portugal). O metilparabeno (Nipagin<sup>®</sup> M) e propilparabeno (Nipazol<sup>®</sup> M) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Edol (Portugal). Foi utilizada água purificada de qualidade Milli-Q (Millipore, França).

## **3. MÉTODOS**

### **3.1. Preparação das formulações de NLS**

As NLS foram preparadas por emulsificação-evaporação de solvente (Lopes *et al.*, 2012) utilizando tripalmitina e Transcutol<sup>®</sup> CG como lípido sólido e DCS, Tween<sup>®</sup> 20, lecitina de soja e PVA como agentes emulsivo. Resumidamente, o lípido e a lecitina foram dissolvidos em diclorometano e em seguida adicionados à solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20, DCS e PVA, nas proporções descritas na Tabela 2.1. A emulsificação foi realizada durante 3 min com o auxílio de uma sonda de ultra-sons (BransonSonifier 250, Danbury, EUA). Em seguida esta dispersão foi homogeneizada durante 3min e 50s, a 12500 rpm, utilizando um homogeneizador a alta velocidade Silverson (Silverson Machines,

Chesham, Reino Unido). A dispersão de nanopartículas foi então mantida sob agitação durante cerca de 4h à temperatura ambiente até completa evaporação do diclorometano.

**Tabela 2.1.** Composição das NLS preparadas (% m/v) num total de 30 ml de formulação.

<i>Formulação</i>	<i>Lípidos</i>	<i>Agentes emulsivos (fase interna)</i>	<i>Agentes emulsivos (fase externa)</i>
<b>F1</b>	Tripalmitina (1%)	-	PVA (1%)
<b>F2</b>	Tripalmitina (1%), Transcutol® (1%)	-	PVA (1%)
<b>F3</b>	Tripalmitina (1%)	-	DCS (0,6%); Tween®20 (0,5%)
<b>F4</b>	Tripalmitina (1%)	Lecitina (2,4%)	DCS (0,6%); Tween®20 (0,5%)

### 3.2. Preparação de NLS contendo agentes conservantes.

As nanopartículas foram preparadas como descrito no ponto 3.1 (acima), com a exceção da adição de metilparabeno e propilparabeno. Foram utilizadas as concentrações habituais em preparações farmacêuticas, ou seja, metilparabeno 0,18% (m/v) e propilparabeno 0,029% (m/v). Foram ainda testados dois métodos de adição dos conservantes; antes da emulsificação, dissolvendo as quantidades necessárias de parabenos na fase aquosa, ou após a preparação, usando o concentrado de parabenos, segundo o Formulário Galénico Português (FGP II.B-8). Neste caso foram adicionados 10 µl de concentrado de parabenos (solução de parabenos a 10% em propilenoglicol) em 1 ml de NLS.

### 3.3. Esterilização por calor húmido

Após preparação das suspensões de NLS, estas foram divididas em cinco alíquotas de igual volume. Uma alíquota foi mantida a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , como referência para a avaliação comparativa das características físico-químicas. As restantes quatro alíquotas foram esterilizadas por calor húmido em autoclave (AJC Lda., Portugal) usando um dos seguintes procedimentos: I) tratamento em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}/20$  min; II) tratamento em autoclave a  $105^{\circ}\text{C}/20$  min; III) esterilização fraccionada a  $80^{\circ}\text{C}/10$  min, durante 3 dias

consecutivos, IV) esterilização fraccionada, a 60°C/30 min, durante 3 dias consecutivos. Os processos de esterilização fraccionada foram realizados em autoclave com vapor fluente. Após a esterilização, todas as formulações foram armazenadas a 5±3°C durante pelo menos 6 meses e as suas propriedades físico-químicas devidamente avaliadas.

### **3.4. Liofilização**

O efeito do processo de liofilização foi avaliado nas NLS preparadas após a esterilização em autoclave (121°C/15 min). As formulações foram congeladas e liofilizadas durante 24 h (liofilizador Christ Alfa 1-4, Osterode am Harz, Alemanha). Uma alíquota foi mantida a 5±3°C, como referência para a avaliação comparativa das propriedades físico-químicas. Antes da liofilização foi adicionada trealose (10% m/v) a todas as formulações, como crioprotetor. Após liofilização, as NLS foram reconstituídas com água purificada, com agitação manual e subsequente sonicação, quando necessário. De modo a avaliar o efeito da etapa de congelação sobre as propriedades físico-químicas de NLS, uma alíquota de cada formulação foi congelada a uma temperatura de -20°C e em seguida descongelada à temperatura ambiente (25°C).

### **3.5. Caracterização físico-química das NLS**

#### **3.5.1. Diâmetro médio das partículas**

A determinação do diâmetro médio das partículas ( $\phi$ ) e do índice de polidispersão (PI) foi efectuada por Dynamic Light Scattering (DLS) (Zetasizer Nano S, Malvern Instruments, Reino Unido). As amostras foram previamente diluídas 1:100 em água purificada. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (Média $\pm$ DP) de três experiências independentes efectuadas no decurso deste estudo.

#### **3.5.2. Carga Eléctrica Superficial**

A determinação da carga eléctrica superficial (expressa em potencial zeta) foi efectuada através da medição da mobilidade electroforética das NLS (Malvern Instruments 2000, Reino Unido). Para a determinação as amostras foram diluídas 1:100 em água purificada. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado, à temperatura ambiente. Os

resultados foram expressos como Média±DP de três experiências independentes realizadas no decurso do estudo.

### **3.5.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)**

A análise calorimétrica foi realizada num calorímetro DSC Q200 (TA Instruments, EUA). Cerca de 3 mg das dispersões de NLS e dos respectivos constituintes (tripalmitina, DCS, lecitina, PVA e Tween<sup>®</sup> 20) foram rigorosamente pesados em painéis de alumínio que foram posteriormente fechadas hermeticamente. As determinações foram efectuadas contra a panela de referência vazia, em intervalos de aquecimento de 10°C a 125°C, e de arrefecimento de 125°C a 10°C, com uma velocidade de aquecimento/arrefecimento de 5°C/min.

### **3.5.4. Dispersão dinâmica da luz (DLS)**

A análise térmica por DLS (*Light scattering* ou dispersão dinâmica da luz) foi realizada num aparelho Zetasizer Nano S (Malvern Instrument, Reino Unido), equipado com uma unidade de controlo de temperatura de precisão de Peltier (precisão de 0,1°C). Como fonte de luz foi utilizado um laser de He-Ne com  $\lambda = 633$  nm. O estudo da influência da variação da temperatura no diâmetro médio das partículas foi efectuado entre 25°C e 90°C (fase de aquecimento) e entre 90°C e 25°C (fase de arrefecimento), com uma velocidade de aquecimento/arrefecimento de 0,5°C/min. Foram medidos o diâmetro médio das partículas, o PI e a intensidade de dispersão total. As amostras foram previamente diluídas 1:100 em água purificada como anteriormente descrito.

### **3.5.5. Microscopia de electrónica transmissão (TEM)**

A análise da morfologia das nanopartículas foi feita por microscopia electrónica de transmissão (TEM) de acordo com o método descrito por Colaço *etal.* (2013) utilizando um microscópio Hitachi H-8100 (Japão) equipado com um sistema de microanálise por espectrometria de dispersão de energia de raios-X (EDS), com detector de elementos leves da marca ThermoNoran (EUA). Uma alíquota da suspensão de nanopartículas foi aplicada numa grelha de cobre e seca à temperatura ambiente. As análises de TEM foram realizadas no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

### **3.6. Estudos de estabilidade**

Após preparação as suspensões de NLS foram acondicionadas em frascos de vidro de Tipo I (Ph. Eur.) e armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses. O diâmetro médio das partículas, o PI e o potencial zeta foram determinados em amostras colhidas aos 30, 60, 90, 150 dias deste estudo.

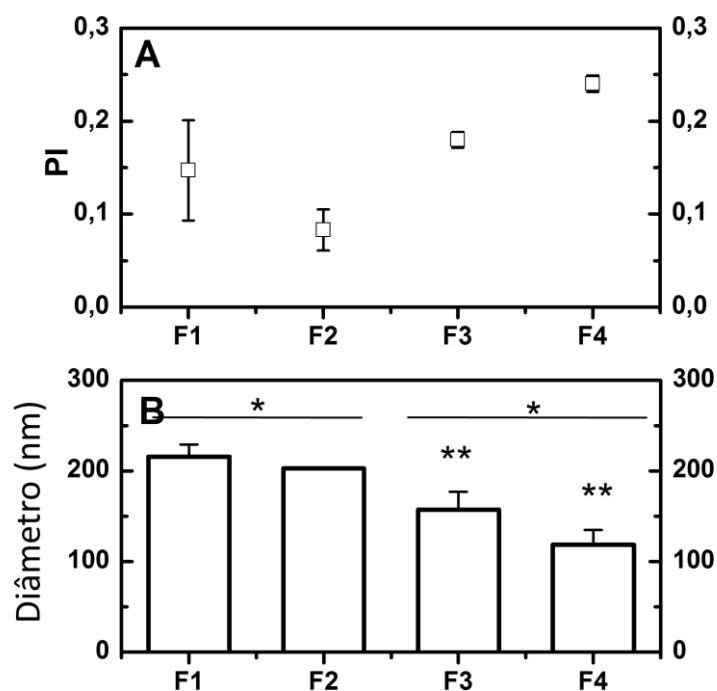
### **3.7. Análise estatística**

Os dados foram expressos como Média $\pm$ DP de experiências independentes (n=3). A avaliação estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma entrada. O valor de  $p < 0,05$  foi aceite como significativo.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Preparação das NLS**

De modo a avaliar a influência do tipo de agente emulsivo sobre o diâmetro médio das partículas e PI das NLS, foram preparadas emulsões contendo 1% m/v de tripalmitina, utilizando diferentes combinações de agentes emulsivos (Tabela 1). Todos os agentes emulsivos utilizados, ou seja, lecitina, PVA, DCS e Tween<sup>®</sup> 20, são normalmente usados na preparação das NLS utilizando técnicas baseadas em emulsão (Vitorino *et al.*, 2012). A selecção de agentes emulsivos para uma matriz lipídica, em particular, é baseada nas propriedades físico-químicas pois estes ingredientes são cruciais para a estabilização das suspensões de NLS, afectando as características das nanopartículas, como o potencial zeta e a hidrofobicidade (Xu *et al.*, 2009). A Figura 2.1 mostra os resultados obtidos relativamente ao diâmetro médio das partículas e PI das NLS preparadas no presente estudo.



**Figura 2.1.** Influência do agente emulsivo no diâmetro médio das partículas e PI (Média±DP; n=3;\*p<0,05 F1 e F2 -F3; \*\*p<0,05 F3-F4).

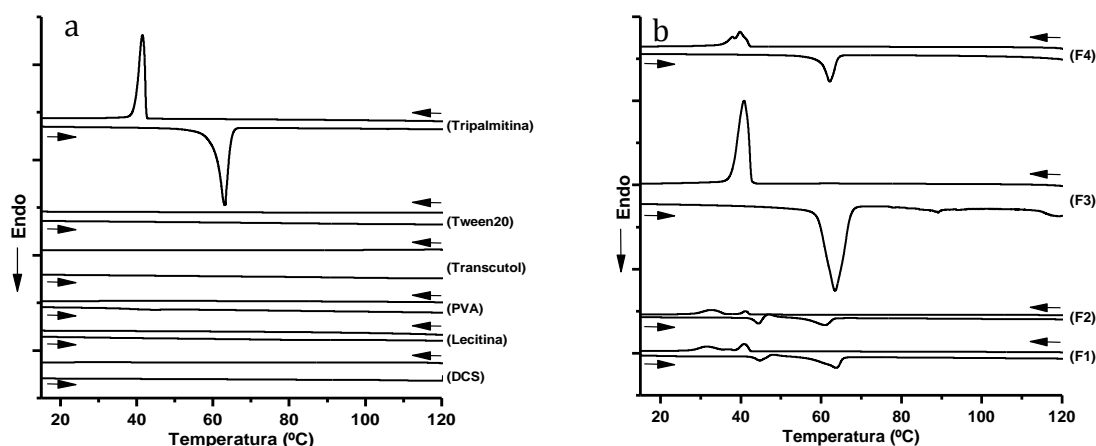
A utilização de PVA como agente emulsivo nas formulações F1 e F2 resultou em NLS com maior diâmetro médio das partículas, mas menor PI quando comparadas com F3 e F4, nas quais foram utilizados agentes emulsivos não poliméricos (lecitina, Tween<sup>®</sup> 20 e DCS). As diferenças obtidas podem estar relacionadas com as características do agente emulsivo, mas também com a sua concentração. Na realidade, através da comparação dos resultados para F3 e F4, a inclusão de lecitina (F4), conduziu a uma redução de diâmetro médio das partículas e significativo aumento de PI (p<0,05), embora ambos os parâmetros permaneçam dentro dos valores aceitáveis para formulações de nanopartículas ( $\varnothing < 200\text{nm}$  e  $\text{PI} < 0,25$ ). Estas observações estão relacionadas com uma concentração mais elevada de agentes emulsivos (3,5% m/v) em F4, devido à presença de lecitina (2,4% m/v), a qual facilita a formação das nanopartículas durante a homogeneização. Desta forma, em conformidade com a literatura (Freitas e Müller, 1998) é possível afirmar que o diâmetro das nanopartículas é determinado pela quantidade de agente emulsivo e de lípidos usados, com uma redução clara do diâmetro médio das partículas, com concentrações entre 0,5% e 2,5% m/v de agente emulsivo, seguido por um efeito

menor em concentrações elevadas. Altas concentrações de lípidos resultam em partículas maiores, principalmente quando são utilizadas baixas concentrações de agentes emulsivos (Freitas e Müller, 1998). A inclusão de um lípido líquido (Transcutol<sup>®</sup> CG) no núcleo lipídico das NLS, não causou variações significativas no diâmetro médio das partículas e PI entre F1 e F2, confirmando os dados publicados por Borgia *et al.* (2005).

Independentemente do agente emulsivo escolhido, todas as formulações apresentaram cargas superficiais negativas e valores de potencial zeta correspondentes aos descritos por Freitas e Müller, (1998) como suficientes para a estabilização das dispersões de NLS (Tabela 2, formulações sem conservantes).

#### **4.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)**

Foram traçados os termogramas das formulações e dos compostos puros entre 10°C e 125°C (Figura 2.2) No termograma da tripalmitina (Figura 2a) podem ser observados dois picos, um endotérmico (63,93°C, curva de aquecimento) e outro exotérmico (41,53°C, curva de arrefecimento). No que respeita aos termogramas das formulações F1 e F2 (Figura 2b) estes dois picos são também observados, juntamente com um novo pico que pode ser visualizado a 44,99°C (curva de aquecimento) e 31,20°C (curva de arrefecimento) para a F1, e 41,21°C (curva de aquecimento) e 32,24°C (curva de arrefecimento) para F2. A presença dos novos picos pode ser atribuída a um segundo polimorfo, menos estável, como descrito por zu Mühlen *et al.* (1998). No entanto, esta análise não descarta a possibilidade da presença do PVA poder causar uma imobilização das moléculas de triglicéridos na região interface, evitando a sua reorientação estrutural como demonstrado por Vitorino *et al.* (2012) podendo ser a origem dos picos agora observados. Na verdade este fenómeno não se verificou nas formulações sem PVA (F3 e F4).



**Figura 2.2.** Termogramas das matérias primas (a) e das formulações (b).

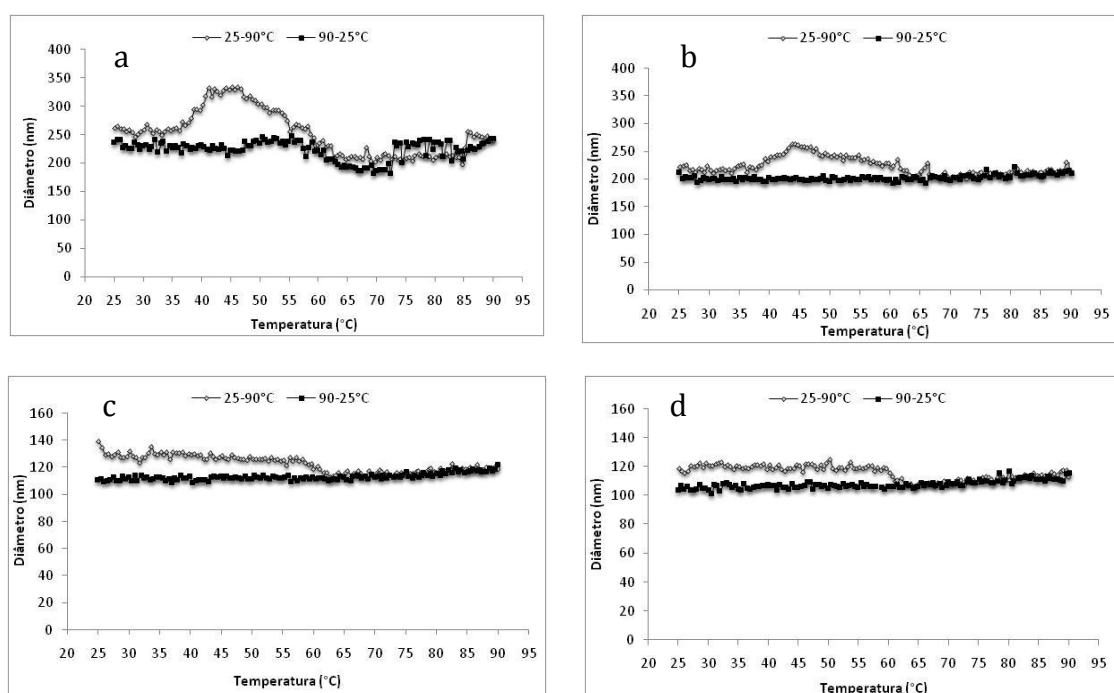
O ponto de fusão de tripalmitina pura permanece inalterado nas formulações F1 (63,65°C) e F3 (64,47°C), as quais são constituídas somente por tripalmitina. Como esperado o ponto de fusão da matriz lipídica diminuiu após adição do lípido líquido (F2) e do fosfolípido (F4) à formulação (60,54°C e 62,12°C, respectivamente). Esta diminuição resulta da formação de cristais menos ordenados ou de sólidos amorfos tal como descrito por Lopes *et al.* (2012). O uso de lecitina para estabilizar as NLS em combinação com um sal biliar (F4) resultou num combinação fisiologicamente aceitável de agentes emulsivos, a qual exerceu um efeito sobre a cristalização da matriz lipídica das NLS confirmado o comportamento já descrito por Bunjes e Koch (2005) e Schubert e Schicke (2005).

### 4.3. Estudos de dispersão dinâmica de luz (DLS)

O efeito da temperatura sobre o diâmetro médio das partículas foi avaliado por DLS (Figura 2.3). O termograma da formulação F1 (Figura 2.3a) mostra que a cerca de 40°C, o diâmetro médio das partículas aumentou com a temperatura atingindo o valor máximo (334 nm) a 45°C. Posteriormente, o diâmetro médio das partículas tendeu a diminuir com o aumento da temperatura (197 nm a 55°C). Na fase de arrefecimento, o diâmetro médio das partículas de F1 não registou alterações.

Embora a formulação F2 tenha apresentado um comportamento térmico semelhante, com um aumento do diâmetro médio das partículas até aos 40°C, esta formulação apresentou melhor estabilidade térmica, pois o diâmetro médio de partícula manteve-se constante a

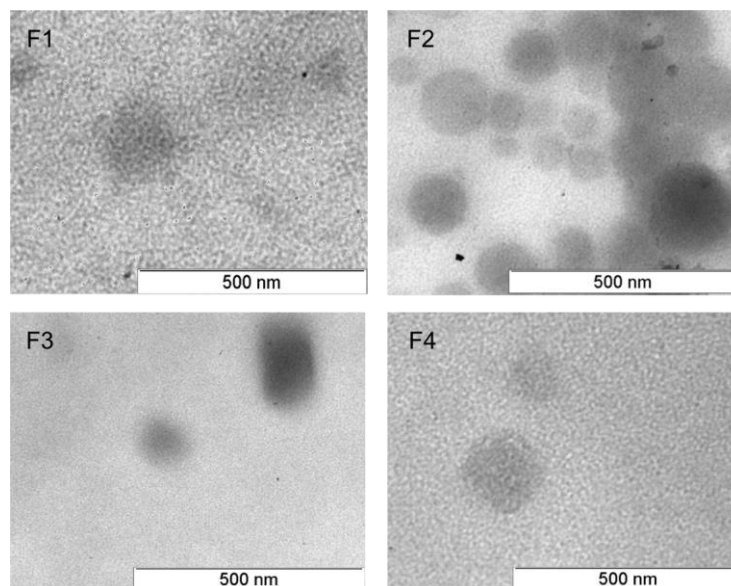
partir dos 65°C não sofrendo alterações na fase de arrefecimento (Figura 2.3b). Este comportamento pode estar relacionado com a presença de Transcutol® CG que pode estabilizar o diâmetro das partículas quando sujeitas a ciclos de temperatura. Manconi *et al.* (2011) observaram que a presença de Transcutol® CG diminui a temperatura de transição de fase das formulações lipossomais, podendo também explicar a maior estabilidade térmica da formulação F2. No caso da F3 (Figura 2.3c) a formulação manteve o diâmetro médio das partículas até aos 59°C, mas o aumento da temperatura fez decrescer o diâmetro médio das partículas para 112nm aos 62°C, valor este que permaneceu constante ao longo do aquecimento e arrefecimento da formulação. A mesma tendência foi observada para a formulação F3, como se pode visualizar pela Figura 4b. Deste modo, relativamente à estabilidade térmica, as formulações podem ser ordenadas do seguinte modo: F3 e F4 > F2 > F1. Esta ordenação é consistente com o facto de o PVA isoladamente não conferir estabilidade térmica durante o aquecimento, embora a inclusão de um lípido líquido (Transcutol® CG) possa melhorar a estabilidade térmica destas formulações.



**Figura 2.3.** Variação do diâmetro médio das formulações de NLS determinada por DLS: F1 (a), F2 (b), F3 (c) e F4 (d).

#### 4.4. Microscopia electrónica de transmissão (TEM)

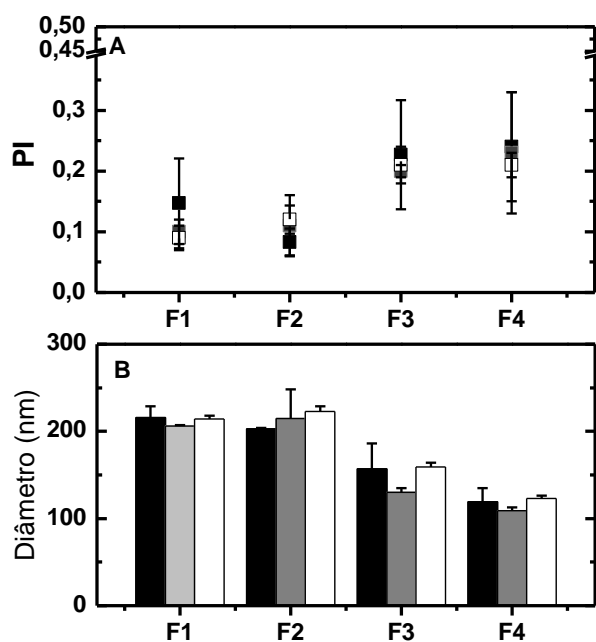
A fim de fornecer informação sobre a estrutura das nanopartículas, estas foram analisadas por TEM (Figura 2.4). As imagens mostram que as NLS têm forma esférica e o diâmetro médio das partículas confirma os resultados obtidos por DLS.



**Figura 2.4.** Fotografias obtidas por TEM das formulações de NLS.

#### 4.5. Conservação antimicrobiana das NLS

As NLS constituem um sistema de libertação de fármacos altamente versátil, podendo ser administradas por diferentes vias, como por exemplo, a via oral (Severino *et al.*, 2012), pulmonar (Videira *et al.*, 2006), parentérica (Lopes *et al.*, 2013), ocular (Cavalli *et al.*, 2002), tópica (Raposo *et al.*, 2013), ou ainda transdérmica (Vitorino *et al.*, 2014). Um desafio comum é a sua conservação, de modo a impedir o crescimento microbiano, em particular para formulações acondicionadas em recipientes multi-dose. Os conservantes, porém, são conhecidos por causar instabilidade física nos sistemas dispersos e, conseqüentemente, podem também prejudicar a estabilidade das dispersões das NLS (Obeidat *et al.*, 2010). Entre estes conservantes, os parabenos são largamente utilizados no sector farmacêutico e cosmético. Deste modo foi estudada a influência dos parabenos (metil e propilparabeno) nas principais características físicas das formulações de NLS, ou seja, o diâmetro médio das partículas, a PI e potencial zeta (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Influência da adição de parabenos no diâmetro médio das partículas e PI. Formulações sem parabenos (■); formulações com parabenos (■); formulações com concentrado de parabenos (■) (Média±DP; n=3).

Independentemente do método utilizado para a adição de parabenos, não foram observadas variações significativas no diâmetro médio das partículas e no PI, comparativamente a formulações sem conservante ( $p > 0,05$ ). Uma observação semelhante foi descrita por Obeidat *et al.* (2010) para NLS contendo Q10. A presença de parabenos, no entanto, provoca um grande aumento de negatividade do potencial zeta (Tabela 2.2). Este pode estar relacionado com a adsorção de parabenos ou de propilenoglicol (para a solução concentrada de parabenos) à superfície da partícula e da respectiva interação com a camada estabilizadora (Watrobska-Swietlikowska e Sznitowska, 2006).

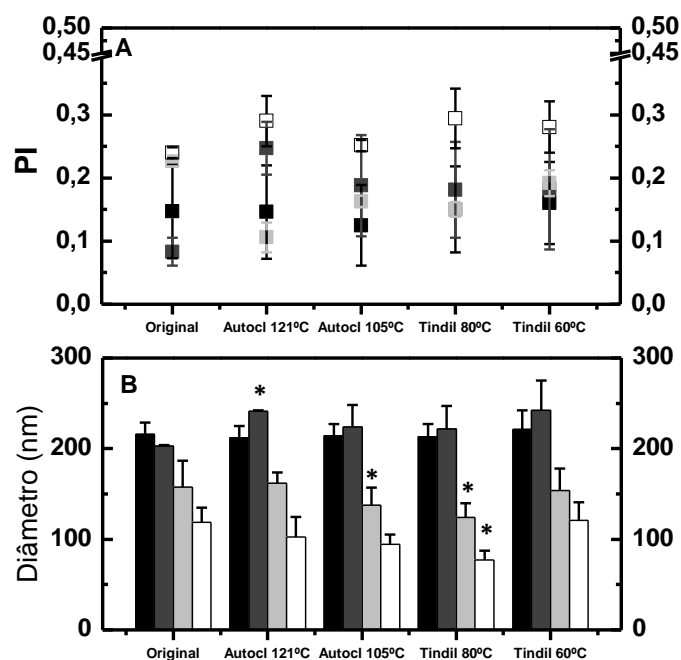
**Tabela 2.2.** Efeito da presença de parabenos no potencial zeta das formulações de NLS (Média±DP; n=3).

Formulação	Potencial Zeta (mV)		
	Sem Conservantes	Com parabenos durante a preparação	Com parabenos após a preparação
<b>F1</b>	-20 ± 1	-43 ± 2	-41 ± 2
<b>F2</b>	-23 ± 1	-43 ± 8	-46 ± 5
<b>F3</b>	-28 ± 6	-53 ± 4	-39 ± 1
<b>F4</b>	-27 ± 2	-40 ± 3	-41 ± 6

Por outro lado, este aumento não é surpreendente, pois a adição de parabenos origina um aumento do valor de pH da fase externa das dispersões de NLS. Em qualquer dos casos, os valores obtidos estão de acordo com o valor de pH óptimo (pH 4-8) descrito para a sua actividade antimicrobiana (Sandler, 2014a, b).

#### **4.6. Esterilização das NLS**

De acordo com a Ph.Eur., e sempre que possível, é conveniente escolher um processo que permita a esterilização do produto na embalagem definitiva. A esterilização final, particularmente a esterilização pelo calor húmido sob pressão é um procedimento fiável e normalmente utilizado como método de eleição (ICH Q6A; ICH Q9). Outros processos podem ocasionalmente ser aplicados, como a esterilização fraccionada (tindalização). O efeito da esterilização, através destes dois métodos, sobre o diâmetro médio das partículas e o PI, foi avaliado para as formulações em estudo e está ilustrado na Figura 2.6.



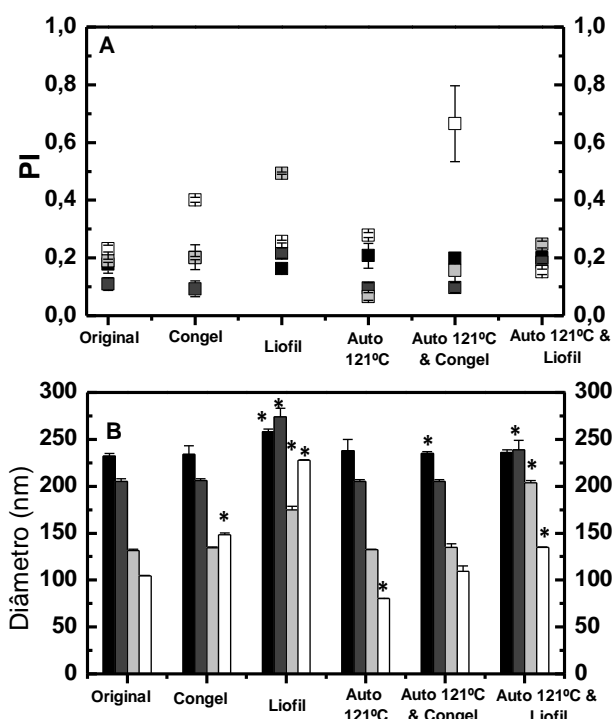
**Figura 2.6.** Efeito dos diferentes processos de esterilização no diâmetro das NLS e no PI: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3;\*p<0,05).

A formulação F1 demonstrou ser a mais estável após tratamento, indicando ser suficientemente robusta para suportar um passo de esterilização pelo vapor segundo as recomendações da Ph. Eur.. Estes resultados confirmam o comportamento térmico obtido por DLS em que o diâmetro médio das partículas é recuperado após arrefecimento. No entanto, a mesma tendência não foi observada na formulação F2, após esterilização por calor húmido a 121°C. Este processo induziu um aumento significativo do diâmetro médio das partículas ( $p < 0,05$ ) de  $203 \pm 1$  nm para  $241 \pm 1$  nm, o que pode resultar de um efeito desestabilizador, a temperatura elevada, do lípido líquido sobre o núcleo sólido de tripalmitina, mas também na camada do agente emulsivo onde o Transcutol® CG pode estar presente entre as moléculas de PVA. Quando utilizadas temperaturas mais baixas, em autoclave a 105°C e esterilização fraccionada a 80°C e 60°C, não foram observadas variações significativas de diâmetro médio das partículas ou PI, ou que é consistente com os resultados obtidos por DLS onde a temperatura máxima foi de 90°C. De igual modo o diâmetro médio das partículas da formulação F3 diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) após esterilização em autoclave a 105°C e esterilização fraccionada a 80°C, enquanto a formulação F4 foi apenas afectada pela esterilização fraccionada a 80°C. Em relação à

carga eléctrica superficial não houve alteração dos valores após esterilização, o que indica a manutenção das características físicas das NLS. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  e foi avaliada a sua estabilidade física.

#### 4.7. Liofilização das NLS na presença de crioprotector

A influência do processo de liofilização sobre a estabilidade física das formulações foi avaliada antes e após esterilização em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$  (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Efeito da liofilização sobre o diâmetro médio das partículas e PI das formulações antes e após esterilização em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ : (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média $\pm$ DP; n=3; \* p<0,05).

A formulação F4 permanece estável após o processo de liofilização na presença de trealose, embora tenha sido observado um aumento significativo do diâmetro médio das partículas e PI em comparação com a formulação não liofilizada. A reconstituição da amostra após o processo de liofilização foi facilmente conseguida. Pelo contrário, as formulações F1, F2 e F3 apresentaram agregados na amostra reconstituída. Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, em que foi

observada a importância da lecitina na protecção das NLS quando submetidas a liofilização (Lopes *et al.*, 2012).Relativamente ao potencial zeta não se observaram quaisquer alterações no seu valor após liofilização.

#### 4.8. Estabilidade das NLS

A estabilidade das suspensões de NLS foi avaliada após armazenamento a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses(Tabela 2.3).

**Tabela 2.3.** Estabilidade das formulações ao longo do tempo (Média $\pm$ DP; n=3;\* p<0,05).

Tempo (dias)		Formulações NLS			
		F1	F2	F3	F4
1	Ø (nm)	216 $\pm$ 13	203 $\pm$ 10	157 $\pm$ 29	119 $\pm$ 16
	PI	0,15 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,09	0,24 $\pm$ 0,09
	Zeta (mV)	-20 $\pm$ 1	-23 $\pm$ 1	-28 $\pm$ 2	-27 $\pm$ 2
30	Ø (nm)	213 $\pm$ 9	220 $\pm$ 16	159 $\pm$ 34	121 $\pm$ 14
	PI	0,12 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,04
	Zeta (mV)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60	Ø (nm)	215 $\pm$ 9	226 $\pm$ 18	162 $\pm$ 30	151 $\pm$ 16
	PI	0,12 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,04
	Zeta (mV)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
90	Ø (nm)	215 $\pm$ 9	229 $\pm$ 20	164 $\pm$ 34	146 $\pm$ 15
	PI	0,13 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,08
	Zeta (mV)	-25 $\pm$ 7	-29 $\pm$ 2	-38 $\pm$ 1	-34 $\pm$ 1
120	Ø (nm)	207 $\pm$ 3	210 $\pm$ 8	138 $\pm$ 13	175 $\pm$ 6*
	PI	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03
	Zeta (mV)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
150	Ø (nm)	206 $\pm$ 3	212 $\pm$ 5	139 $\pm$ 10	185 $\pm$ 3*
	PI	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,02*
	Zeta (mV)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	Ø (nm)	208 $\pm$ 7	212 $\pm$ 8	139 $\pm$ 11	197 $\pm$ 1*
	PI	0,08 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,05
	Zeta (mV)	-26 $\pm$ 1	-23 $\pm$ 1	-30 $\pm$ 3	-16 $\pm$ 1

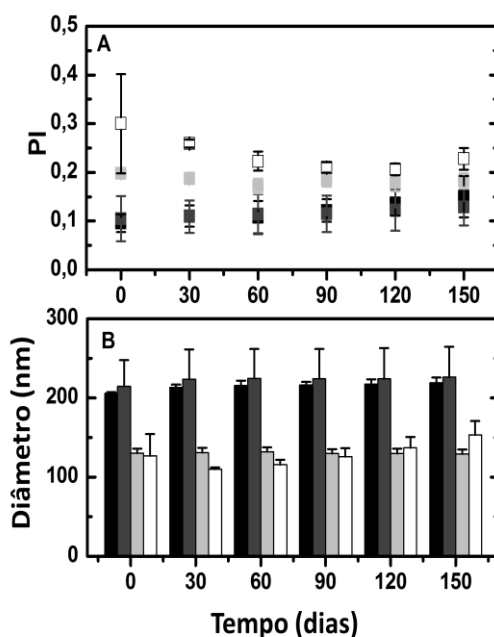
n.d.= não determinado

As formulações F1,F2 e F3apresentaram-se estáveis ao longo de 180 dias de estudo, sem alterações significativas ( $p\geq 0,05$ ), em termos do diâmetro médio das partículas, do PI e da carga superficial. A formulação F4 sofreu um aumento significativo ( $p<0,05$ ) no diâmetro médio das partículas, no PI e na carga eléctrica superficial após 90 dias de armazenamento devido a agregação das partículas. Ao fim de 180 dias o valor do potencial zeta atingiu -16 mV, valor insuficiente para garantir a estabilidade física da dispersão (Freitas e Müller, 1999).

Fenómenos de oxidação e/ou hidrólise da lecitina e outros fosfolípidos têm sido apontados como responsáveis por estes resultados podendo ocorrer em dispersões aquosas de partículas lipídicas, tais como lipossomas e NLS (Toh e Chiu, 2013). Conforme descrito por Schubert e Muller-Goymann, (2005) o aumento da concentração de lecitina conduz a um aumento do diâmetro médio das partículas e PI das formulações de NLS preparadas com as concentrações mais elevadas deste fosfolípido, o qual tende a acumular-se na interface.

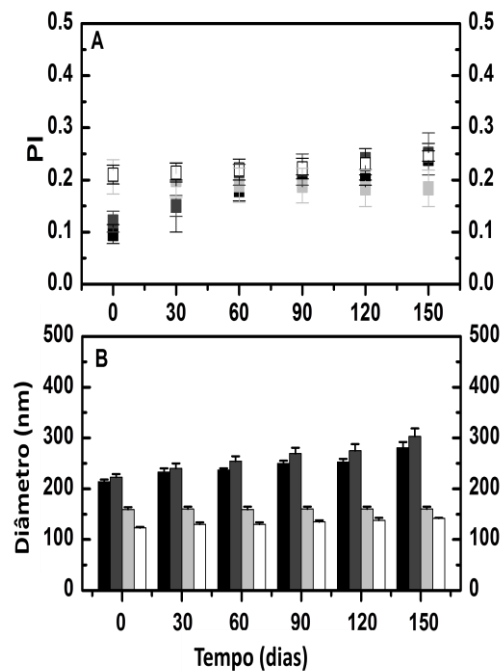
#### 4.8.1. Estabilidade das NLS contendo parabenos

Ao longo dos 150 dias de armazenamento, não se observaram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) em todas as formulações estudadas. Surpreendentemente, a formulação F4 contendo parabenos, não apresentou aumento significativo no diâmetro médio das partículas, o que contrasta com a formulação sem conservantes (Figura 2.8) e reforça a importância da função da carga superficial na estabilidade física das NLS.



**Figura 2.8.** Estabilidade das NLS contendo parabenos adicionados durante a preparação: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3).

Os resultados relativos à estabilidade das NLS para todas as formulações contendo concentrado de parabenos encontram-se na Figura 2.9.



**Figura 2.9.** Estabilidade das NLS contendo concentrado de parabenos adicionados durante a preparação: (■) F1; (■) F2; (■) F3 e (□) F4 (Média±DP; n=3).

O efeito da adição extemporânea do concentrado de parabenos resultou num aumento gradual do diâmetro médio das partículas e do PI nas formulações F1 e F2. Este aumento pode estar relacionado com a agregação das partículas, devido ao efeito desestabilizador da adsorção do conservante na superfície das mesmas. Este efeito pode ser reforçado pelo facto do propilenoglicol poder ser igualmente adsorvido à superfície de partículas como relatado por Spiegeleer *et al.* (2006). Efectivamente, o efeito do propilenoglicol parece ser um factor relevante no diâmetro médio das partículas e do PI, pois estas variações não foram observadas quando os parabenos foram dissolvidos na fase aquosa. Embora a lecitina e polisorbatos (Tween<sup>®</sup> 20) sejam referidos como inibidores da actividade antimicrobianos parabenos, as formulações F3 e F4 mantiveram-se estáveis durante o armazenamento, o que sugere que a adição extemporânea de parabenos diminui a sua absorção na interface, o que é também benéfico para a protecção antimicrobiana. A utilização do propilenoglicol como co-solvente também foi importante para reforçar a acção antimicrobiana, não só pelas suas propriedades antimicrobianas intrínsecas, mas

também porque aumenta a solubilização dos parabenos, elevando as suas concentrações aquosas acima do valor de saturação em água que, por sua vez, limita a sua disponibilidade dentro do sistema (Darwish e Bloomfield,1995; 1997).

#### 4.8.2. Estabilidade das NLS após esterilização

Após 180 dias, o diâmetro médio das partículas, o PI e a carga eléctrica superficial das formulações (F1, F2 e F3), autoclavadas a 121°C e 105°C mantiveram-se constantes. ( $p \geq 0,05$ ) (Tabela 2.4). De igual modo, o aspecto destas formulações não se alterou visivelmente durante todo o estudo. Na formulação F4 observou-se um aumento no diâmetro médio das partículas após 90 dias, seguido de uma estabilização do tamanho até ao dia 180. Relativamente ao potencial zeta não se observaram variações ao longo do estudo.

**Tabela 2.4.** Estabilidade física das formulações de NLS armazenadas a 5±3°C após esterilização em autoclave a 121°C/20 min e 105°C/ 20 min (Média±DP; n=3; \*p<0,05).

Formulação		Dia 1		Dia 90		Dia 180	
		Ø (nm)	PI	Ø (nm)	PI	Ø (nm)	PI
F1	Ster121	212±13	0,15±0,07	218±15	0,13±0,08	208±6	0,11±0,02
	Ster105	214±14	0,13±0,06	218±10	0,11±0,05	208±5	0,08±0,02
F2	Ster121	241±1	0,25±0,04	227±24	0,14±0,05	211±9	0,10±0,03
	Ster105	224±24	0,19±0,08	227±21	0,15±0,07	212±8	0,13±0,03
F3	Ster121	162±12	0,11±0,02	158±12	0,11±0,03	173±32	0,10±0,03
	Ster105	138±19	0,16±0,01	139±18	0,16±0,03	125±11	0,16±0,02
F4	Ster121	102±23	0,29±0,04	261±59*	0,33±0,05	284±72*	0,39±0,04*
	Ster105	95±10	0,12±0,01	134±45*	0,23±0,05	149±55*	0,28±0,12

O mesmo comportamento foi observado para as formulações F1, F2, F3 e F4 quando submetidas a esterilização fraccionada a 80°C e 60°C (Tabela 2.5).

**Tabela 2.5.** Estabilidade física das formulações de NLS armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  numa suspensão de NLS após esterilização fraccionada em autoclave a  $80^{\circ}\text{C}/10$  min e  $60^{\circ}\text{C}/30$  min, por 3 dias consecutivos (Média $\pm$ DP; n=3; \*p<0,05).

Formulação		Dia 1		Dia 90		Dia 180	
		$\text{Ø}$ (nm)	PI	$\text{Ø}$ (nm)	PI	$\text{Ø}$ (nm)	PI
F1	Tind80	213 $\pm$ 14	0,15 $\pm$ 0,07	217 $\pm$ 11	0,13 $\pm$ 0,05	208 $\pm$ 6	0,09 $\pm$ 0,02
	Tind60	227 $\pm$ 21	0,16 $\pm$ 0,06	229 $\pm$ 14	0,14 $\pm$ 0,05	218 $\pm$ 5	0,01 $\pm$ 0,01*
F2	Tind80	222 $\pm$ 25	0,18 $\pm$ 0,08	224 $\pm$ 14	0,14 $\pm$ 0,06	211 $\pm$ 8	0,11 $\pm$ 0,02
	Tind60	242 $\pm$ 33	0,18 $\pm$ 0,09	224 $\pm$ 14	0,14 $\pm$ 0,06	220 $\pm$ 9	0,12 $\pm$ 0,02
F3	Tind80	124 $\pm$ 16	0,15 $\pm$ 0,01	124 $\pm$ 11	0,14 $\pm$ 0,02	116 $\pm$ 5	0,15 $\pm$ 0,01
	Tind60	154 $\pm$ 25	0,19 $\pm$ 0,02	124 $\pm$ 11	0,14 $\pm$ 0,02	140 $\pm$ 10	0,19 $\pm$ 0,01*
F4	Tind80	77 $\pm$ 11	0,29 $\pm$ 0,05	164 $\pm$ 10*	0,30 $\pm$ 0,07	170 $\pm$ 5*	0,40 $\pm$ 0,06*
	Tind60	121 $\pm$ 20	0,28 $\pm$ 0,04	264 $\pm$ 10*	0,30 $\pm$ 0,07	233 $\pm$ 10*	0,31 $\pm$ 0,11

## 5. CONCLUSÕES

Os dois agentes emulsivos seleccionados permitiram produzir NLS com uma boa estabilidade ao longo do tempo em estudo.

A F1 é suficientemente robusta para ser submetida a processo de esterilização por calor húmido. Esta, após este tratamento, manteve as suas características iniciais relativamente ao diâmetro médio das partículas, PI e potencial zeta. Estas características mantiveram-se estáveis também ao longo do tempo de estudo. A introdução de parabenos à formulação não influencia as suas características iniciais, nem a sua estabilidade. O processo de liofilização aumentou significativamente o diâmetro médio das partículas.

A introdução do Transcutol<sup>®</sup> CG não interferiu nas características químico-físicas da formulação, com excepção da esterilização por calor húmido a  $121^{\circ}\text{C}$ , que resultou num aumento significativo do diâmetro médio da partícula. Este aumento pode estar associado a um efeito desestabilizador, a temperatura elevada, do lípido líquido sobre o núcleo sólido de tripalmitina, mas também na camada do agente emulsivo onde o Transcutol<sup>®</sup> CG pode estar presente entre as moléculas de PVA. Deste modo, a utilização de dois lípidos não justifica os custos mais elevados na produção das NLS.

A F3 é suficientemente robusta para ser submetida a processo de esterilização por calor húmido, esta após este tratamento manteve as suas características iniciais relativamente ao diâmetro médio das partículas, PI e potencial zeta. Após 90 dias verificou-se um

aumento do diâmetro médio da partícula. A introdução de parabenos na formulação não influencia na suas características iniciais e melhora a sua estabilidade ao longo do tempo de estudo. As características físico-químicas da F4 mantiveram-se estáveis após liofilização das mesmas.

## **BIBLIOGRAFIA**

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 63:87-94.

Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58:1688-1713.

Borgia SL, Regehly M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting HC, Danker K, Roder B, Kramer KD, Schafer-Korting M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement - correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *J Control Rel* 2005; 110:151–163.

Bunjes H, Koch MHJ. Saturated phospholipids promote crystallization but low down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *J Control Rel* 2005; 107:229–243.

Cavalli R, Caputo O, Carlotti ME, Trotta M, Scarnecchia C, Gasco MR. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 1997; 148:47–54.

Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S, Sattone MF. Solid lipid nanoparticles as ocular delivery system for tobramycin. *Int J. Pharm* 2002; 238:241–245.

Carvalho M, Jorge J, Eleutério C, Pinhal AF, Sousa AC, Morais JG, Cruz MEM. Trifluralin liposomal formulations active against *Leishmania donovani* infections. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71:292–296.

Colaço R, Gonçalves MC, Fortes LM, Gonçalves LMD, Almeida AJ, Martins BF. Preparation and chemical characterization of eco-friendly ORMOSIL nanoparticles of potential application in DNA gene therapy. *Curr Nanosci* 2013; 9:168-172.

Darwish RM, Bloomfield SF. The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben preservatives. *Int J Pharm* 1995; 119:183-192.

Darwish RM, Bloomfield SF. Effect of ethanol, propyleneglycol and glycerol on the interaction of methyl and propyl p-hydroxybenzoate with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Pharm* 1997; 147:51-60.

European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 8th Ed.). Council of Europe, Strasbourg, 2014.

Formulário Galénico Português. Monografia II B-8. Ed. Associação Nacional das Farmácias, Lisboa, 2001.

Freitas C, Muller RH. Effect of Light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN<sup>TM</sup>) dispersions. *Int J Pharm* 1998; 168:221-229.

Freitas C, Muller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Sci* 1999; 47:125-132.

Han J, Washington C. Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. *Int J Pharm* 2005; 288:263-271.

International Conference on Harmonization (ICH): Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A, 1999.

International Conference on Harmonization (ICH): Quality risk management Q9, 2005.

Jenning V, Mäder K, Gohla SH: Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a <sup>1</sup>H-NMR study. *Int J Pharma* 2000; 205:15–21.

Lopes R, Eleutério CV, Gonçalves LMD, Cruz MEM, Almeida AJ. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45:442-450.

Lopes RM, Gaspar MM, Pereira J, Eleutério CV, Carvalheiro M, Almeida AJ, Cruz MEM. Liposomes versus lipid nanoparticles: comparative study of lipid-based systems as

oryzalin carriers for the treatment of leishmaniasis. *J Biomed Nanotechnol* 2014; 10:3647-3657.

Manconi M, Caddeo C, Sinico C, Valenti D, Mostallino MC, Biggio G, Fadda AM. *Ex vivo* skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 78:27–35.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles-production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 47:165–196.

Miyajima K. Role of saccharides for the freeze-thawing and freeze-drying of liposomes. *Adv Drug Del Rev* 1997; 24:151-159.

Obeidat WM, Schwabe K, Müller RH, Keck CM. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 76:56-67.

Radomska-Soukharev A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:411-418.

Radtke M, Müller RH. NLC<sup>TM</sup> - nanostructured lipid carriers: the new generation of lipid drug carriers. *New Drugs* 2001; 2:48–52.

Raposo S, Simões S, Almeida AJ, Ribeiro H. Advanced vehicles for topical delivery of glucocorticoids. *Exp Opin Drug Deliv* 2013; 10:857-877.

Sandler N. Methylparaben. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Marian E (eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press. [em linha]. Disponível em <https://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/> (acedido em 07-07-2014) 2014a.

Sandler N. Propylparaben. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Marian E (eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press. [em linha]. Disponível em <https://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/> (acedido em 07-07-2014) 2014b.

Schwarz C, Freitas C, Mehnert W, Müller RH. Sterilisation and physical stability of drug-free and etomidate-loaded solid lipid nanoparticles. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater* 1995; 22:766-767.

Schubert MA, Muller-Goymann CC. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and non ionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 61:77–86.

Schubert MA, Schicke BC. Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Int J Pharm* 2005; 298: 242–254.

Severino P, Andreani T, Macedo AS, Fangueiro JF, Santana MHA, Silva AM, Souto EB. Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drugdelivery. *J Drug Deliv* 2012; 10 pages doi:10.1155/2012/750891.

Souto E, Almeida AJ, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *J Biomed Nanotechnol* 2007; 3:317-331.

Spiegeleer B, Wattyn E, Slegers G. The importance of the cosolvent propylene glycol on the antimicrobial preservative efficacy of a pharmaceutical formulation by DOE-ruggedness testing. *Pharm Dev Technol* 2006; 11:275–284.

Sznitowska M, Janicki S, Dabrowska EA, Gajewska M. Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions. *Eur J Pharm Sci* 2002; 15:489-495.

Toh M-R, Chiu GNC. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilization techniques in liposomal manufacturing. *Asian J Pharm Sci* 2013; 8:88–95.

Videira MA, Gano L, Santos C, Neves M, Almeida AJ. Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration. *J Microencapsul* 2006; 23:855-862.

Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. *Colloids Surf B* 2011; 84:117-130.

Vitorino C, Almeida AJ, Sousa JJ, Lamarche I, Gobin P, Marchand S, Couet W, Olivier JC, Pais AAC. Passive and active strategies for transdermal delivery using co-encapsulating nanostructured lipid carriers: *in vitro* vs *in vivo* studies. Eur J Pharm Biopharm 2014; 86:133–144.

Watrobska-Swietlikowska D, M. Sznitowska M. Partitioning of parabéns between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin. Int J Pharm 2006; 312:174-178.

Xu Q, Crossley A, Czernuszka J. Preparation and characterization of negatively charged poly (lactic-co-glycolicacid) microspheres. J Pharm Sci 2009; 98:2377–2389.

zu Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism. Eur J Pharm Biopharm 1998; 45:149–155.



## **CAPÍTULO 3**

### **PRODUÇÃO DE NLS PELO MÉTODO DE FUSÃO-EMULSIFICAÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

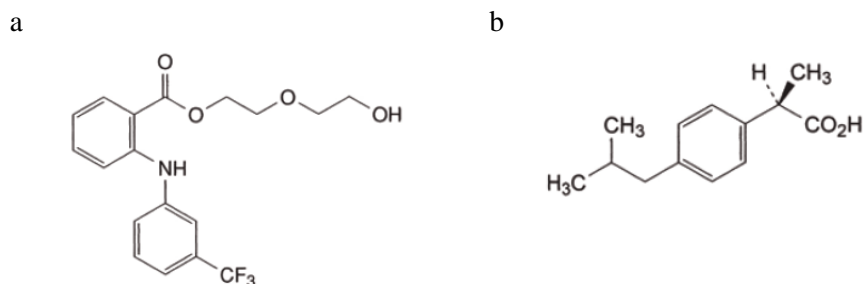
A importância e competitividade do mercado de especialidades farmacêuticas leva frequentemente a indústria a optar pela inovação na formulação de substâncias activas conhecidas, sem descurar todos os aspectos relevantes para a qualidade, a segurança e a eficácia desses medicamentos. No âmbito dos sistemas avançados de veiculação de fármacos, designadamente os nanomedicamentos, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de eleição pois permitem melhorar a biodisponibilidade dos fármacos e são constituídas por excipientes bem tolerados, de utilização corrente em tecnologia farmacêutica e aprovados pelas autoridades reguladoras. Em contraste com as emulsões e com os lipossomas, a matriz das NLS é composta por lípidos sólidos. São produzidas com excipientes de baixo custo, são de fácil produção à escala industrial e apresentam uma grande versatilidade em termos de vias de administração. Entre os métodos de preparação das NLS em larga escala, o método de fusão-emulsificação, por homogeneização a alta velocidade, é um dos métodos mais utilizados, pois permite produzir partículas de diâmetro reduzido contendo fármacos não termolábeis e sem utilizar solventes orgânicos (Pardeike *et al.*, 2009).

O objectivo do presente estudo foi produzir nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo fármacos anti-inflamatórios não esteroides, para aplicação tópica, utilizando um processo de produção transponível para a escala industrial e originando formulações que apresentem boa estabilidade físico-química e farmacotécnica, assim como um perfil de libertação do fármaco adequado ao efeito terapêutico pretendido após aplicação tópica na pele.

## 2. MATERIAIS

As substâncias activas - AINE - utilizadas no presente trabalho são o 2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]benzoato de 2-(2-hidroxi-etoxi)etilo (etofenamato) (DukeChem, Espanha) e o ácido (2RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanóico (ibuprofeno) (BASF, Alemanha), respectivamente derivados do ácido antranílico e do ácido propiónico. Segundo a FP 9, o etofenamato apresenta-se como um líquido viscoso amarelado, praticamente insolúvel em água e miscível com etanol a 96% e com acetato de etilo (Figura 3.1a).

O ibuprofeno apresenta-se, segundo a FP9, como um pó cristalino branco ou quase branco ou cristais incolores, praticamente insolúvel na água, facilmente solúvel na acetona, no metanol e no cloreto de metileno. Dissolve-se nas soluções diluídas dos hidróxidos e dos carbonatos dos metais alcalinos, apresentando um intervalo de fusão (pf) entre 75-78°C (Figura 3.1b).



**Figura 3.1.** Fórmulas de estrutura do AINE estudados: a) etofenamato; b) ibuprofeno.

Foram utilizados três triacilgliceróis sólidos à temperatura ambiente: o tripalmitato de glicerilo (tripalmitina; Sigma-Aldrich, Espanha) com um intervalo de fusão entre 66-68°C; dibehenato de glicerilo (Compritol<sup>®</sup> 888 ATO) com um intervalo de fusão entre 69-74°C; e diestearato de glicerilo (Precirol<sup>®</sup> ATO 5) com um intervalo de fusão entre 53-57°C, ambos generosamente oferecidos por Gattefossé, Portugal. Como agente emulsivo foi utilizado o polisorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80; Panreac, Barcelona, Espanha). Foi ainda utilizada água purificada Ph. Eur..

Todos os reagentes usados neste trabalho, mesmo aqueles não citados no texto, foram de grau de pureza *p.a.* ou equivalente.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Preparação das NLS

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram preparadas pelo um método de fusão-emulsificação a alta velocidade, descrito por Dingler *et al.* (2002). Em resumo, foram pesados 300 mg de lípido (Compritol<sup>®</sup>, Precirol<sup>®</sup> ou tripalmitina), e 60 mg de etofenamato ou 30 mg de ibuprofeno num copo de 50 ml (fase oleosa ou lipídica). A fase aquosa consistiu em 10 ml de solução aquosa de Tween<sup>®</sup>80 em concentrações crescentes de 2%, 3% e 5% (m/m). Quer a fase aquosa quer a fase lipídica foram colocadas em banho de água (Water Bath VWR 6, VWR, Alemanha) a temperatura 10°C acima do ponto de fusão lípido utilizado (cerca de 80-90°C). Após a fusão do

lípido, foi-lhe adicionada a fase aquosa sob forte agitação (Silverson SL5M, Silverson Machines LDT, Reino Unido) a uma velocidade de 12500 rpm, durante 10 min. Após este período, a preparação foi retirada do banho, arrefecida em gelo para solidificação das nanopartículas, acondicionada em frascos de vidro de Tipo I (Ph. Eur.) e armazenada a 4°C até posterior utilização.

### **3.2. Caracterização física das NLS**

A caracterização física das NLS foi efectuada de acordo com o método descrito no Capítulo 2.

#### **3.2.1. Microscopia de força atómica (AFM)**

A análise das NLS por AFM foi realizada no Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Universidade de Lisboa, utilizando um microscópio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemanha) provido de um sistema NanoWizard II (JPK Instruments, Alemanha). O sistema está equipado com um *scanner* piezoeléctrico, com um z-range linear de 15 µm e um laser infravermelho.

As formulações de NLS foram diluídas (1:100) em água purificada e colocadas sobre uma lâmina de vidro tratada com poli-L-lisina. Após cerca de 20 min, a preparação foi lavada com água purificada e seca ao ar, à temperatura ambiente. A análise das NLS foi realizada pelo método intermitente (*tapping*) em que a ponta da sonda toca descontinuamente a superfície da amostra a analisar. Para a obtenção dos resultados foram utilizadas pontas afiadas de óxido silício com um raio de ponta de 6nm, frequência de ressonância de cerca de 60 kHz e uma energia constante de 3 Nm<sup>-1</sup>. Os parâmetros de imagem foram ajustados para minimizar a força aplicada para verificação da topografia das NLS, a qual é particularmente útil para estudar amostras facilmente deformáveis. Os dados resultantes destas imagens foram analisados com o processador de imagem JPK v.3 (JPK Instruments, Alemanha).

#### **3.2.2. Eficiência de encapsulação**

A eficiência de encapsulação (EE%) do etofenamato e do ibuprofeno, que corresponde à quantidade de fármaco que pode ser incorporada nas nanopartículas foi determinada directamente por medição da concentração do fármaco nas nanopartículas. A separação do fármaco livre daquele que foi efectivamente incorporado foi efectuada utilizando

colunas de cromatografia de exclusão por diâmetro PD-10 (Bio-Rad Laboratories, EUA). Em resumo, 2,5 ml de suspensão de NLS foram aplicados no topo da coluna e eluídos com 3,5 ml de água purificada e filtrada. A 500 µl da solução foram adicionados 500 µl de solução aquosa de 1% (v/v) de octil-fenoxi-poliétoxietanol (Triton X100; Appliquem, Alemanha) e 8% de laurilsulfado de sódio (SDS; Sigma-Aldrich, Espanha). A solução resultante foi aquecida a 60°C durante 2 min, arrefecida e posteriormente diluída 1:10 com metanol. Após agitação vigorosa em vórtex durante 5 min, a solução assim preparada foi centrifugada a 4000 rpm, durante 10 min a 4°C. O sedimento lipídico foi rejeitado. A concentração do fármaco encapsulado foi doseada no sobrenadante por cromatografia líquida a alta eficiência (HPLC) utilizando a metodologia descrita na Secção 3.2.3.

A EE% dos fármacos nas nanopartículas foi então calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EE\% = \frac{[\textit{farmaco incorporado}]}{[\textit{farmaco total}]} \times 100$$

### **3.2.3. Determinação do etofenamato e ibuprofeno por HPLC**

A quantificação dos fármacos etofenamato e ibuprofeno foi feita por HPLC, utilizando metodologia cuja descrição completa pode ser consultada no Anexo 1 à presente dissertação. Resumidamente, foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: Coluna Waters Nova-Pack C18, 250x4.6mm, 4 µm; as fases móveis consistiram numa mistura de metanol: acetonitrilo: água contendo 1% de ácido fosfórico concentrado (45:35:20) para o etofenamato e numa mistura de metanol: acetonitrilo: água contendo 1% de ácido fosfórico concentrado (45:30:25) para o ibuprofeno. O caudal utilizado foi de 1mlmin<sup>-1</sup>, com um tempo de corrida de 10 min e o volume de injeção foi de 20µl. A detecção foi efectuada por absorção no UV a 285 nm para o etofenamato e 200 nm para o ibuprofeno. Nestas condições o etofenamato e o ibuprofeno são eluídos aos 5 min 20s e 6 min 54s, respectivamente.

### 3.3. Estudos de absorção percutânea *in vitro*

O objectivo destes estudos foi avaliar a libertação dos fármacos a partir de NLS e a sua permeação nas camadas superiores da pele.

#### 3.3.1. Estudos de libertação *in vitro*

A libertação de etofenamato e ibuprofeno a partir das nanopartículas foi medida em condições de dose infinita usando membranas hidrófilas de polissulfona de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Tuffryn<sup>®</sup>, Pall Corporation, EUA). As membranas foram lavadas equilibradas com etanol / tampão fosfato de pH 7,4 (40:60) durante 30 min e, em seguida, montadas entre os compartimentos dador e receptor em células de difusão de Franz de tipo verticais estáticas (volume da fase receptora: 3 ml; área de difusão: 1  $\text{cm}^2$ ). A solução de etanol / tampão fosfato pH 7,4 (40:60) foi usada como fase receptora que foi agitada constantemente com uma pequena barra magnética (200 rpm) e termostatzada a  $32\pm 0,5^\circ\text{C}$ . As amostras foram então aplicadas (200  $\mu\text{l}$ ) uniformemente sobre a superfície da membrana no compartimento dador, o qual foi imediatamente selado com membrana Parafilm<sup>®</sup> para evitar a evaporação. As amostras foram colhidas intervalos de tempo pré-determinados, às 1, 2, 3, 4, 5 e 6h, sendo o respectivo volume substituído com uma quantidade equivalente (200  $\mu\text{l}$ ) de meio receptor. Foram utilizadas pelo menos seis células para cada formulação e o teor de fármaco nas amostras retiradas foi quantificado por HPLC, de acordo com o método descrito na Secção 3.2.8. A cinética de libertação foi avaliada de acordo com os seguintes modelos matemáticos (Costa e Sousa Lobo, 2001):

1) Modelo de ordem zero:  $Q_t = Q_0 + K_0t$

Em que  $Q_t$  é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo,  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco na solução e  $K_0$  é a constante de libertação de ordem zero.

2) Modelo de Higuchi:  $Q_t = K\sqrt{t}$

Em que  $Q_t$  é a quantidade de fármaco libertado no tempo e  $K$  é a constante de libertação de Higuchi.

### 3.3.2. Estudos de permeação

A permeação do etofenamato e ibuprofeno foi determinada em condições de dose infinita, em pele humana obtida da região abdominal de uma mulher caucasiana saudável de 63 anos após intervenção cirúrgica. A pele foi fornecida pelo LEF - Laboratório de Estudos Farmacêuticos - após a aprovação pela comissão de ética e com consentimento informado. A amostra biológica foi colocada em tampão de fosfato isotónico, pH 7,4 a  $\approx 60^{\circ}\text{C}/30$  segundos, permitindo assim a separação do estrato córneo (EC). Este foi inspeccionado visualmente para detectar possíveis defeitos, e cortado em secções com a dimensão adequada para as células de Franz. As condições de ensaio estão descritas na Secção 3.3.1. As amostras foram recolhidas imediatamente após a aplicação (tempo 0) e em intervalos de tempo pré-determinados, isto é, às 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h.

O coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ , expresso em  $\text{cmh}^{-1}$ ) foi obtido através da divisão do fluxo de permeação (expresso em  $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) pela a concentração inicial do fármaco no compartimento dador (expressa em  $\mu\text{gcm}^{-3}$ ), aplicando a segunda lei de difusão de Fick, e assumiu-se que em condições *sink* a concentração de fármaco no compartimento receptor é insignificante em comparação com a do compartimento dador.

### 3.3.3. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

De modo a prever o potencial irritante das NLS, utilizaram-se dois métodos de avaliação da citotoxicidade *in vitro* com duas linhas celulares humanas de fibroblastos e de queratinócitos, em que a viabilidade celular foi avaliada pela redução da resazurina (“Alamar blue” ou azul de Alamar) e pela redução do azul de formazano – MTT (Raposo *et al.*, 2013).

O reagente Alamar Blue (cor azul) é constituído por resazurina que é reduzida a resorufina (cor de rosa) pela actividade metabólica das células viáveis e pode ser quantificado por colorimetria ou fluorimetria. Foram cultivadas células humanas de fibroblastos da derme (Df; ZenBio, Inc., EUA) e queratinócitos humanos (HaCaT; CLS, Alemanha) em placas de 96 poços com 100  $\mu\text{l}$ /poço de meio RPMI-1640<sup>®</sup> (Gibco, Reino Unido) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS, Life Technologies, Inc., Reino Unido), penicilina (100  $\text{UIml}^{-1}$ ) e estreptomomicina (100  $\mu\text{gml}^{-1}$ ), com uma densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/poço para se obter aproximadamente 50% de confluência após 24 h de incubação (atmosfera húmida 95% e 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^{\circ}\text{C}$ ). Adicionou-se

10 µl de cada amostra a testar a cada poço, com 9 replicados. O meio de cultura foi utilizado como controlo negativo. Como controlo positivo foi utilizada uma solução de SDS (10mg/ml). Após 24 h, foram adicionados a cada poço 20 µl de reagente resazurina, pré-aquecido a 37°C, e incubou-se durante mais 3 h. No final da incubação a fluorescência foi medida em leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha) com excitação de 560 nm e emissão a 590 nm. As células não tratadas foram utilizadas como controlo com 100% de viabilidade. A viabilidade celular relativa (%) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\% \text{ do controlo}) = \frac{[Fluorescência] \text{ amostra}}{[Fluorescência] \text{ controlo}} \times 100$$

Outro método utilizado foi o ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) por redução deste reagente tal como descrito por Cadete *et al.* (2012) e Lopes *et al.* (2012). O método consiste na absorção do sal solúvel pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto insolúvel chamado formazano, que pode ser quantificado por absorvência, após a sua extração. Foram utilizadas as mesmas linhas celulares do método anterior e tratadas do mesmo modo. Foram adicionados 10 µl da solução de corante MTT, pré-aquecido a 37°C a cada poço (5 mgml<sup>-1</sup> em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4). Após 3h de incubação, o meio foi removido cuidadosamente e os cristais intracelulares de formazano foram solubilizados e extraídos com dimetilsulfóxido (DMSO). Após incubação foi medida a absorvência a 570 nm em leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha). As células não tratadas foram utilizados como controlo com 100% de viabilidade. A viabilidade celular relativa (%) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\% \text{ do controlo}) = \frac{[Absorvência] \text{ amostra}}{[Absorvência] \text{ controlo}} \times 100$$

### **3.3.4. Estudos de internalização celular.**

A avaliação da internalização celular foi efectuada de acordo com a metodologia descrita por Vitorino *et al.* (2013). As NLS foram marcadas com vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, Espanha).

A linha celular HaCaT foi cultivada em lâmina de vidro com 4 câmaras (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber slide™ system, Termo Scientific, EUA), em meio RPMI-1640® (Gibco, Reino Unido), contendo 10% de soro fetal bovino (FCS, Life Technologies, Inc., Reino Unido), penicilina (100 IUml<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 µgml<sup>-1</sup>). Seguidamente as células foram expostas às formulações de NLS vazias (NLS Vaz), NLS contendo ibuprofeno (NLS Ibu) e NLS contendo etofemanato (NLS Eto) durante 1h. Após este período de incubação as células foram lavadas com 10 mM de tampão fosfato isotónico (PBS) contendo 10 mM de glicina, fixadas durante 15 min, ao abrigo da luz, com uma solução de 4% (m/v) de para - formaldeído e lavadas três vezes com PBS. As lâminas foram montadas com uma lamela contendo meio de montagem (Prolong Antifade, Invitrogen, Reino Unido), com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI), para a marcação do ADN nuclear. As células foram então observadas e fotografadas num microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 4.0 (Zeiss, Alemanha).

### **3.4. Estudos de estabilidade física**

As suspensões de NLS vazias e formuladas com ambos os fármacos, preparadas em lotes de 10 ml, acondicionadas em frascos de Tipo I (Ph. Eur.), foram guardadas a 5±3°C e analisadas ao longo do tempo. As amostras foram colhidas aos 0, 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 14 meses, tendo sido avaliados em cada tempo o diâmetro médio das partículas e o potencial zeta.

### **3.5. Estudos de transposição de escala em laboratório**

Após selecção da formulação mais estável, e utilizando o método descrito na Secção 3.1., foi realizado um estudo de transposição de escala a nível laboratorial, de modo a aumentar a dimensão do lote de fabrico das NLS de 10 ml para 1000 ml, utilizando o homogeneizador Silverson SL5M (Silverson Machines LDT, Reino Unido). Para que sejam correctamente realizados os estudo de transposição de escala devem ter em consideração todas as possíveis variáveis, como o tipo e velocidade de agitação, o nível de carga, o tempo de mistura e as diferentes geometrias dos agitadores utilizados

(Zlokarnik, 2001). Neste estudo, a relação entre as dimensões das hastes utilizadas e a dos copos de mistura foi mantida constante assim como a velocidade de agitação (Tabela 3.1).

Para calcular o tempo de emulsificação utilizou-se o número adimensional de Froude. Este número é frequentemente usado para descrever processos de mistura (Zlokarnik, 2001). De acordo com a teoria dos modelos adimensionais (Teorema II de Vashy-Buckingham), dois processos podem ser considerados completamente semelhantes se tiverem lugar num espaço geométrico semelhante e se todos os números adimensionais necessários para os descrever têm o mesmo valor numérico (Buckingham, 1914, citado por Zlokarnik, 2001). O número de Froude ( $Fr$ ) é dado pela equação:

$$Fr = \Omega^2 \times R/g$$

em que  $\Omega$  é a velocidade de rotação do agitador (rpm ou  $s^{-1}$ ),  $R$  é o raio do contentor (m) e  $g$  aceleração da gravidade ( $ms^{-2}$ ). O número de Froude descreve a interacção entre a força centrífuga (empurrando as partículas contra a parede do contentor) e a força centrípeta produzida pela parede, criando assim uma zona de compactação. A equação de Froude pode ser usada também para calcular o tempo de emulsificação desde que exista similaridade geométrica entre os recipientes, a mesma velocidade de agitação e um aumento linear da dimensão do lote (Block, 2001). Por isso, considerando que de 10 ml ( $R_0$ ) para 50 ml ( $R_1$ ) há um aumento volumétrico de 5x, o respectivo aumento linear será de  $5^{1/3} = 1,71$ . Então,

$$R_1 = R_0 \times 1,71$$

em que  $R_0$  é o raio do recipiente utilizado no lote de menor dimensão e  $R_1$  é o raio do recipiente utilizado no lote de maior dimensão (Block, 2001). Deste modo, pode-se aplicar a fórmula

$$\Omega_1 = \Omega_0 \times 1,71^{-1/2} = 11,5 \text{ rpm}$$




Em que  $\Omega_1$  é a velocidade de rotação do agitador utilizado para desenvolver o lote de maior dimensão,  $\Omega_0$  é a velocidade de rotação do agitador utilizado para desenvolver o lote de menor dimensão. Deste modo, por exemplo:

Lote de 10 ml:  $12500 \text{ rpm} \times 10 \text{ min} = 125000 \text{ rotações}$

Lote de 50 ml:  $9500 \text{ rpm} \times 13,2 \text{ min} = 125000 \text{ rotações}$

Considerando a equação de Froude, foram calculados os tempos de emulsificação teóricos que constam a Tabela 3.1, os quais correspondem a um número total de 125000 rotações (número do lote original de 10 ml). Ajustes ligeiros resultantes das próprias hastes e das especificações do homogeneizador Silverson existente no laboratório, foram pontualmente introduzidas.

**Tabela 3.1.** Variáveis avaliadas no estudo de transposição de escala em laboratório de 10 ml para 1000 ml, utilizando Silverson SL5M.

Volume do lote (ml)	Haste do agitador*	Capacidade da haste (ml)*	Imagem da haste*	Tempo de emulsificação teórico (min)	Tempo de emulsificação após afinação (min)
10	<i>Tubular 3/4"</i>	20-250		10,0	10,0
50	<i>Tubular 1"</i>	50-500		13,2	16,5
100				14,7	18,4
500				19,2	24,2
500	<i>Standard emulsor screen assembly</i>	500-12000		19,2	24,2
1000				22,0	26,9

\* Designação, capacidade e imagens das hastes do agitador Silverson SL5M, obtidas em <http://www.silverson.com/>. A designação respeita o respectivo nome comercial, que inclui a dimensão em polegadas (").

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Preparação e caracterização das NLS

As dimensões e as propriedades físico-químicas das nanopartículas lipídicas dependem da sua composição qualitativa e quantitativa, assim como do método de preparação utilizado e das diferentes variáveis nele incluídas, como a temperatura, o tipo e velocidade de agitação e o tempo de homogeneização (Vitorino *et al.*, 2011). Para avaliar a influência do tipo de lípido no diâmetro médio das NLS foram preparadas nanopartículas utilizando três triacilgliceróis com diferentes pontos de fusão (pf): Precirol<sup>®</sup> (pf = 55°C), tripalmitina (pf = 67°C) e Compritol<sup>®</sup> (pf = 70°C). Os lípidos que permitiram produzir partículas com os diâmetros pretendidos (<200 nm) foram o Compritol<sup>®</sup> e o Precirol<sup>®</sup> com o agente emulsivo Tween<sup>®</sup> 80 em concentrações de 2 e 3% (Tabela 3.2). O aumento da concentração do agente emulsivo para 5% conduziu, independentemente do lípido utilizado, ao aumento do diâmetro médio das partículas, provavelmente devido a um maior grau de deposição sobre a superfície da partícula e por causa dos efeitos que promovem a sua agregação (Vitorino *et al.*, 2011). Para além disso, as formulações com tripalmitina revelaram-se instáveis, apresentando-se gelificadas após arrefecimento.

**Tabela 3.2.** Diâmetro médio das NLS preparadas com diferentes lípidos (Média±DP; n=3).

Lípido (300 mg)	Tween 80 (%)	Ø (nm)	PI
Tripalmitina	2	Não avaliado instável após arrefecimento	
	3		
	5		
Precirol <sup>®</sup>	2	81±3	0,13±0,01
	3	76±4	0,13±0,01
	5	100±5	0,19±0,08
Compritol <sup>®</sup>	2	82±1	0,14±0,03
	3	72±3	0,12±0,01
	5	106±5	0,21±0,01

Ø – diâmetro médio das NLS

Embora aqueles autores tenham apresentado bons resultados com proporções idênticas de tripalmitina e Tween<sup>®</sup> 80, o método de preparação por eles utilizado foi o de evaporação de solvente, no qual não há apreciável variação de temperatura, ao contrário

do método usado no presente trabalho, onde intervêm variáveis diferentes. Um estudo semelhante abordou a influência da temperatura e da quantidade de agente emulsivo na preparação de NLS de tripalmitina por HPH a 37°C, utilizando o Tween<sup>®</sup>20 como agente emulsivo (Helgason *et al.*, 2008). Estes autores concluíram que este tensoactivo não constitui a melhor escolha para estabilizar suspensões de NLS de tripalmitina pois as preparações apresentavam-se precipitadas ou gelificadas. A estabilização foi conseguida com concentrações elevadas de Tween<sup>®</sup> 20, o que causou um grande aumento do diâmetro médio das partículas. Deste modo, os lípidos seleccionados para prossecução dos estudos foram o Compritol<sup>®</sup> e o Precirol<sup>®</sup>.

Outra variável que pode influenciar as propriedades físico-químicas das NLS produzidas é o tempo de agitação durante o processo de emulsificação. Deste modo, foi avaliado o efeito de diferentes tempos de emulsificação no diâmetro médio das partículas e no PI para NLS constituídas por Compritol<sup>®</sup> e Precirol<sup>®</sup>, preparadas com 2% e 3% de Tween<sup>®</sup>80 como agente emulsivo, conforme descrito na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Efeito do tempo de emulsificação no diâmetro médio das partículas e PI das NLS preparadas em lotes de 10 ml, com velocidade de agitação 12500 rpm (Média±DP; n=3).

Lípido (300mg)	Tween <sup>®</sup> 80 (%)	Período de emulsificação (min)	ø (nm)	PI
Compritol <sup>®</sup>	3	5	78±0	0,18±0,01
		10	71±1	0,13±0,01
		15	72±3	0,12±0,01
	2	5	103±8	0,23±0,04
		10	87±3	0,17±0,02
		15	81±1	0,14±0,01
Precirol <sup>®</sup>	3	5	78±5	0,25±0,03
		10	79±2	0,13±0,02
		15	76±4	0,13±0,01
	2	5	86±7	0,17±0,04
		10	82±1	0,15±0,01
		15	81±3	0,13±0,01

ø – diâmetro médio das NLS

De um modo geral, o diâmetro médio das partículas e o PI diminuíram com o aumento do tempo de emulsificação, o que permitiu uma melhor divisão da fase interna da

emulsão, resultando não só numa diminuição do diâmetro médio das partículas, como também numa distribuição granulométrica mais estreita, isto é com menor PI (Tabela 3.3). Por outro lado, como a análise estatística dos dados demonstrou que as diferenças de diâmetro médio das partículas e PI resultantes dos tempos 10 e 15 min de agitação não são significativas ( $p > 0,05$ ), foi escolhido o menor período (10 min) como tempo de emulsificação em preparações futuras.

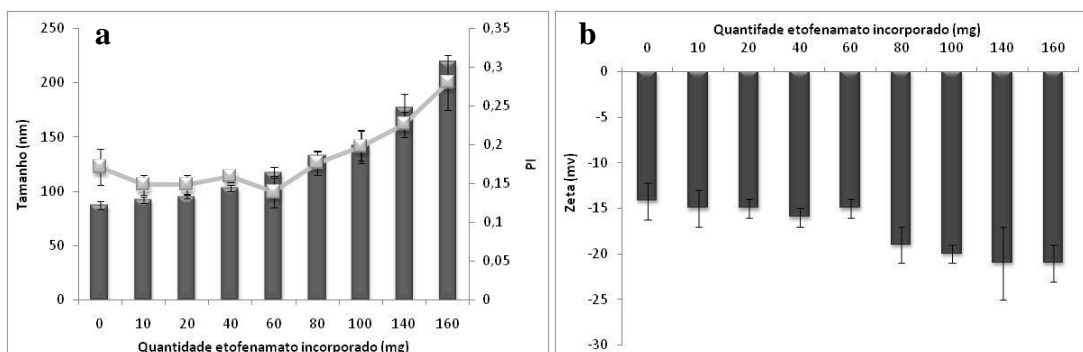
## 4.2. Incorporação dos fármacos nas NLS

Após avaliação da estabilidade das formulações de NLS vazias (Secção 4.9.1) escolheu-se o Compritol<sup>®</sup> como lípido de eleição, pois as NLS preparadas com Precirol<sup>®</sup> apresentaram instabilidade física ao fim de 60 dias, como adiante se discutirá. Assim sendo, de modo a avaliar a influência da presença dos fármacos nas características das NLS, adicionaram-se quantidades crescentes de ibuprofeno e etofenamato às formulações de Compritol<sup>®</sup> e prepararam-se as NLS de acordo com o método acima descrito, usando 2% de Tween<sup>®</sup> 80 como agente emulsivo (designadas NLS Ibu e NLS Eto respectivamente).

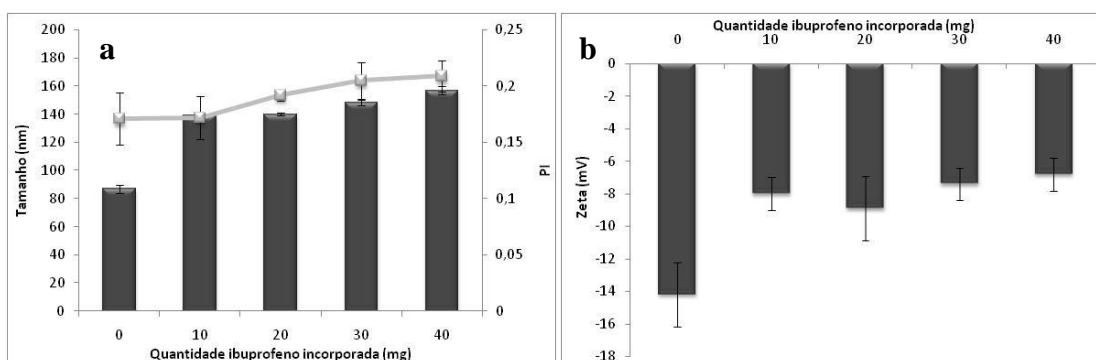
De um modo geral, o aumento da quantidade de fármaco conduziu a um aumento do diâmetro médio das partículas e do PI (Figuras 3.2 e 3.3). Para o etofenamato notou-se a existência de duas regiões distintas no que concerne ao PI, isto é, de 10-60 mg e de 60-160 mg (Figura 3.2a). O aumento do diâmetro médio das partículas e da polidispersão, associado com um aumento (em valor absoluto) do potencial zeta observado na fronteira destas duas regiões (Figura 3.2b), sugere a saturação da matriz levando à acumulação do progressiva fármaco nas camadas mais exteriores da mesma ou mesmo à superfície das partículas. O facto do etofenamato ser uma substância líquida à temperatura ambiente é coerente com a formação de uma estrutura de NLS de Tipo II (modelo de núcleo de lípido ou *drug-enriched shell*), tal como proposto por Müller *et al.* (2000), em que a acumulação progressiva de moléculas do fármaco à superfície das partículas fez variar o potencial zeta para valores mais negativos (Figura 3, Capítulo 1, Secção 1.4).

No caso do ibuprofeno, a inclusão do fármaco causou uma diminuição do valor absoluto do potencial zeta, isto é, de  $-14 \pm 4$  mV para cerca de  $-7 \pm 3$  mV, valor que se manteve praticamente constante independentemente da quantidade de fármaco adicionada (Figura 3.3b). A molécula de ibuprofeno apresenta um intervalo de fusão (75-78°C) ligeiramente superior ao do Compritol<sup>®</sup> (69-74°C), o que poderá justificar a formação de uma estrutura de NLS de Tipo III (modelo de núcleo de fármaco ou *lipid-enriched shell*),

ou mesmo a formação de NLS de Tipo I (matriz homogênea), dada a proximidade dos intervalos de fusão (Müller *et.al.*, 2000). Em ambas as estruturas teóricas o valor de potencial zeta não depende em grande medida da quantidade fármaco presente na formulação, tal como se pode verificar na Figura 3.3b.

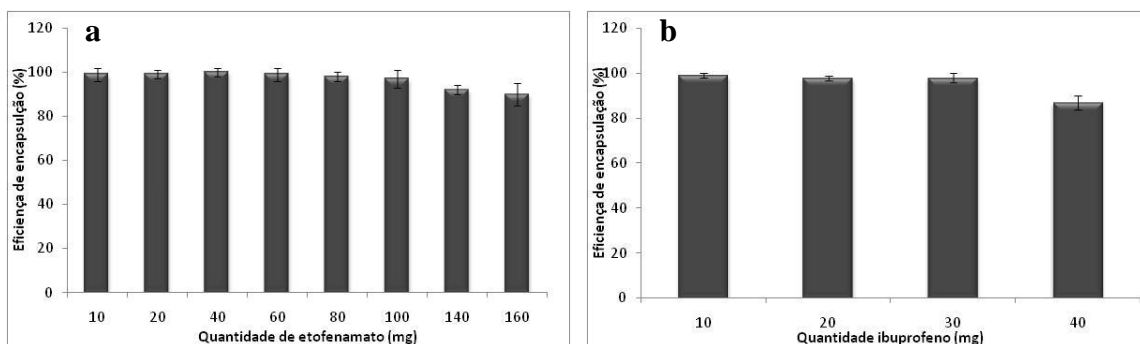


**Figura 3.2.** Influência da incorporação do etofenamato nas características NLS de Compritol®; a) Diâmetro médio das partículas e PI; b) Potencial zeta (Média±DP; n=3).



**Figura 3.3.** Influência da incorporação do ibuprofeno nas características NLS de Compritol®; a) Diâmetro médio das partículas e PI; b) Potencial zeta (Média±DP; n=3).

A eficiência de encapsulação (EE%) dos fármacos nas NLS foi determinada por HPLC. Os fármacos foram encapsulados nas partículas em doses crescentes, sendo que a EE% observada foi sempre superior a 90% para o etofenamato e a 97% para o ibuprofeno. No caso do etofenamato, a EE% aumentou com a quantidade inicial de fármaco adicionado à formulação até aos 60 mg, atingindo os 94±5%, valor a partir do qual a eficiência de encapsulação diminuiu gradualmente (Figura 3.4a). No caso do ibuprofeno, o mesmo fenómeno ocorreu até à quantidade inicial de 30 mg de fármaco adicionados à formulação, atingindo os 98±5% e, de igual modo, a partir deste limite a eficiência de encapsulação diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.4b).

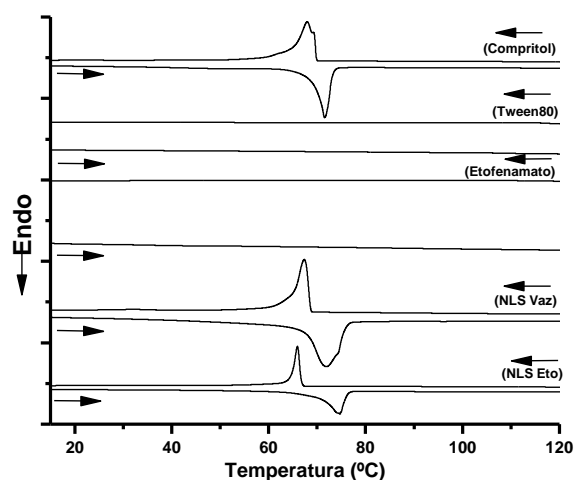


**Figura 3.4.** Eficiência de encapsulação do etofenamato (a) e ibuprofeno (b) nas NLS (Média±DP; n=3).

Face aos resultados obtidos, as NLS seleccionadas foram as NLS Eto a 60 mg e NLS Ibu a 30 mg, que também revelaram os melhores resultados de diâmetro médio das partículas e PI.

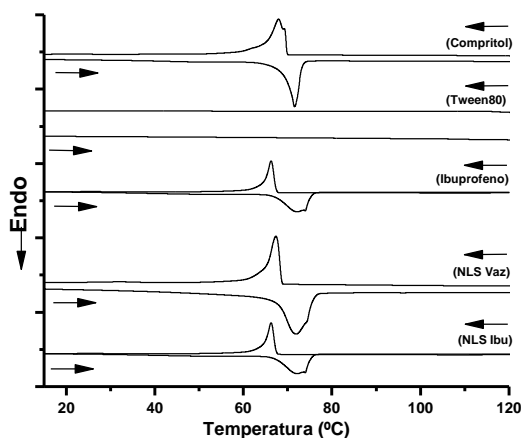
#### 4.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A Figura 3.5 mostra os termogramas do etofenamato, dos excipientes e das NLS preparadas com Compritol<sup>®</sup>. Os termogramas do fármaco e do Tween<sup>®</sup> 80 não apresentaram qualquer fenómeno térmico no intervalo de temperaturas estudado, enquanto o termograma do lípido sólido apresentou um intervalo de fusão ( $72\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) que corresponde ao descrito na literatura (Ph. Eur.). Este valor manteve-se inalterado nos termogramas das NLS vazias e das NLS que contêm etofenamato. Deste modo, a nanoencapsulação do etofenamato não influenciou o intervalo de fusão do lípido, não se detectando qualquer variação pela sua presença, o que novamente corrobora a formação da estrutura de NLS de Tipo II.



**Figura 3.5.** Termogramas do fármaco, excipientes e NLS de Comprimido<sup>®</sup> preparadas com etofenamato (NLS Vaz = NLS sem fármaco).

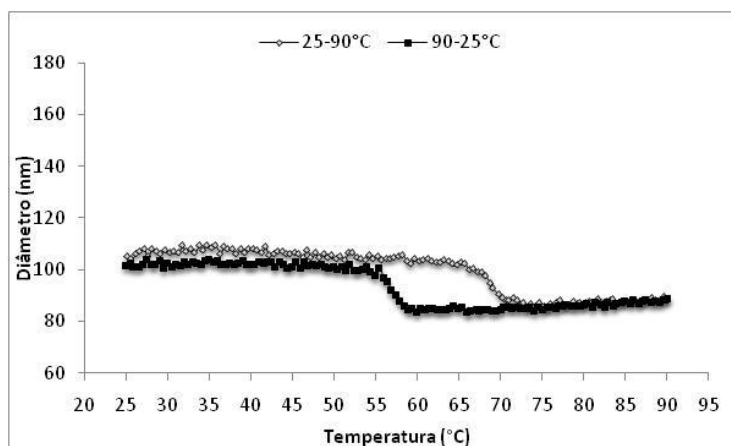
Análise idêntica foi efectuada para as NLS formuladas com ibuprofeno (Figura 3.6). Após encapsulação do fármaco nas NLS o ponto de fusão da matriz aumenta ligeiramente passando de 70°C para 72°C; outros autores observaram igualmente que a nanoencapsulação de ibuprofeno em NLS de Precirol<sup>®</sup> origina um ligeiro aumento do ponto de fusão devido à interação entre a fase lipídica e o fármaco, que está, pelo menos em parte, encapsulado nas NLS (Casadei *et al.*, 2006). Este fenómeno foi confirmado por outros autores, que o atribuíram à reorganização da matriz lipídica decorrente da encapsulação do fármaco (Potta *et al.*, 2011).



**Figura 3.6.** Termogramas do fármaco, excipientes e NLS de Comprimido<sup>®</sup> preparadas com ibuprofeno (NLS Vaz = NLS sem fármaco).

#### 4.4. Dispersão dinâmica de luz (DLS)

Na análise térmica por DLS, as curvas de aquecimento e arrefecimento indicam-nos o comportamento físico das suspensões de NLS durante processos que incluem variações de temperatura, fornecendo informação útil acerca da estabilidade física das formulações. Como se constata na Figura 3.7, no intervalo de temperaturas que corresponde ao intervalo de fusão do lípido (69-74°C), registou-se uma mudança do diâmetro médio das partículas com uma descida repentina no seu valor de 102 nm a 66°C para 88 nm a 77°C. Este valor de diâmetro médio das partículas permaneceu estável até ao fim da fase de aquecimento. Na fase de arrefecimento, o diâmetro médio das partículas manteve-se entre 80 nm e 90 nm até aos 60°C, temperatura à qual se verificou um aumento até ao seu valor inicial (102 nm aos 55°C), que se manteve constante até ao fim do ciclo. O valor do PI ao longo do estudo não sofreu variações significativas ( $p < 0,05$ ).

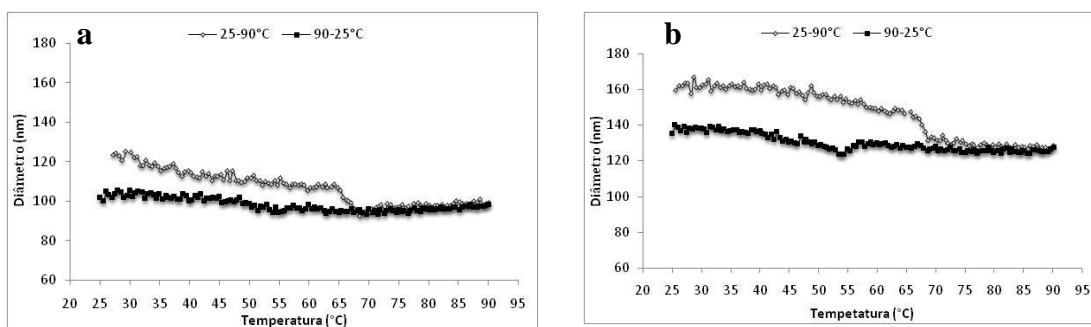


**Figura 3.7.** Influência da temperatura no diâmetro médio das NLS de Compritol<sup>®</sup>, determinada por DLS.

Nas NLS contendo os fármacos em estudo, a curva de aquecimento teve o mesmo comportamento das NLS vazias, isto é, aos 62°C verificou-se uma diminuição do diâmetro médio das partículas de 106 nm para 94 nm para as NLS Eto (Figura 3.8a) e de 147 nm para 131 nm para as NLS Ibu (Figura 3.8b). No entanto, na fase de arrefecimento o comportamento das NLS contendo os fármacos foi diferente relativamente às NLS Vaz, pois aquelas não recuperaram o seu diâmetro inicial. Para além disto, no final do ciclo de aquecimento/arrefecimento ambas as preparações de NLS contendo os fármacos apresentaram um precipitado que se verificou corresponder aos fármacos incorporados. Deste modo, ocorreu a perda de pelo menos parte da massa

de fármaco inicialmente incorporado, que se reflectiu na perda de massa da formulação total. Esta perda permitiu a reorganização da matriz lipídica formando partículas de menores dimensões. Por outro lado, este fenómeno é indicativo da instabilidade destas formulações face a temperaturas elevadas e pode ser explicado pela análise estrutural das NLS durante ciclos de aquecimento/arrefecimento, segundo o modelo proposto por Müller *et al.* (2002). De acordo com estes autores, o aquecimento da dispersão de NLS em água faz aumentar a hidrossolubilidade dos fármacos, os quais difundem da matriz lipídica fundida para a fase aquosa. Durante o arrefecimento, a matriz começa a cristalizar quando ainda existem quantidades relativamente elevadas de fármaco na fase aquosa. A continuação do processo de arrefecimento leva à sobressaturação do fármaco na fase aquosa, o qual tende a difundir novamente para a fase lipídica onde já se formou um núcleo sólido restando apenas a camada mais externa líquida para acomodar o fármaco.

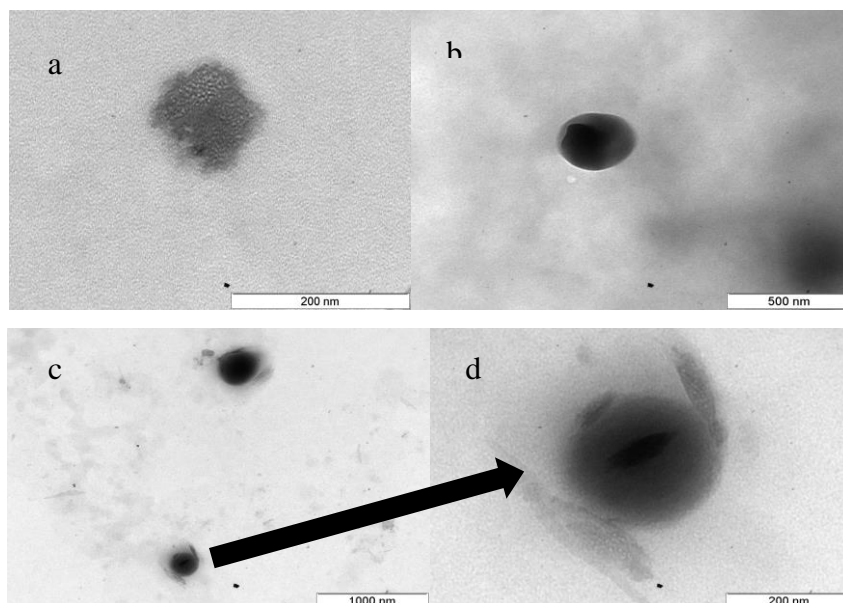
Para além disso, verificou-se também uma diminuição dos valores de PI no fim do ciclo de aquecimento/arrefecimento, os quais variaram de 0,176 para a 0,083 para o etofenamato e de 0,183 a 0,088 para o ibuprofeno. Este fenómeno reforça a explicação anterior sendo que, partículas mais pequenas têm valores de PI mais baixos.



**Figura 3.8.** Influência da temperatura no diâmetro médio das NLS Eto (a) e das NLS Ibu (b) determinada por DLS.

#### 4.5. Microscopia de transmissão electrónica (TEM)

A análise por TEM mostra que as NLS Vaz apresentam forma irregular e as NLS contendo os fármacos (NLS Eto e NLS Ibu) se apresentam com forma esférica, com o diâmetro médio das partículas entre 80 nm e 90 nm para as partículas vazias (NLS Vaz), e entre 100 nm e 220 nm para as partículas contendo os fármacos em estudo (Figura 3.9).

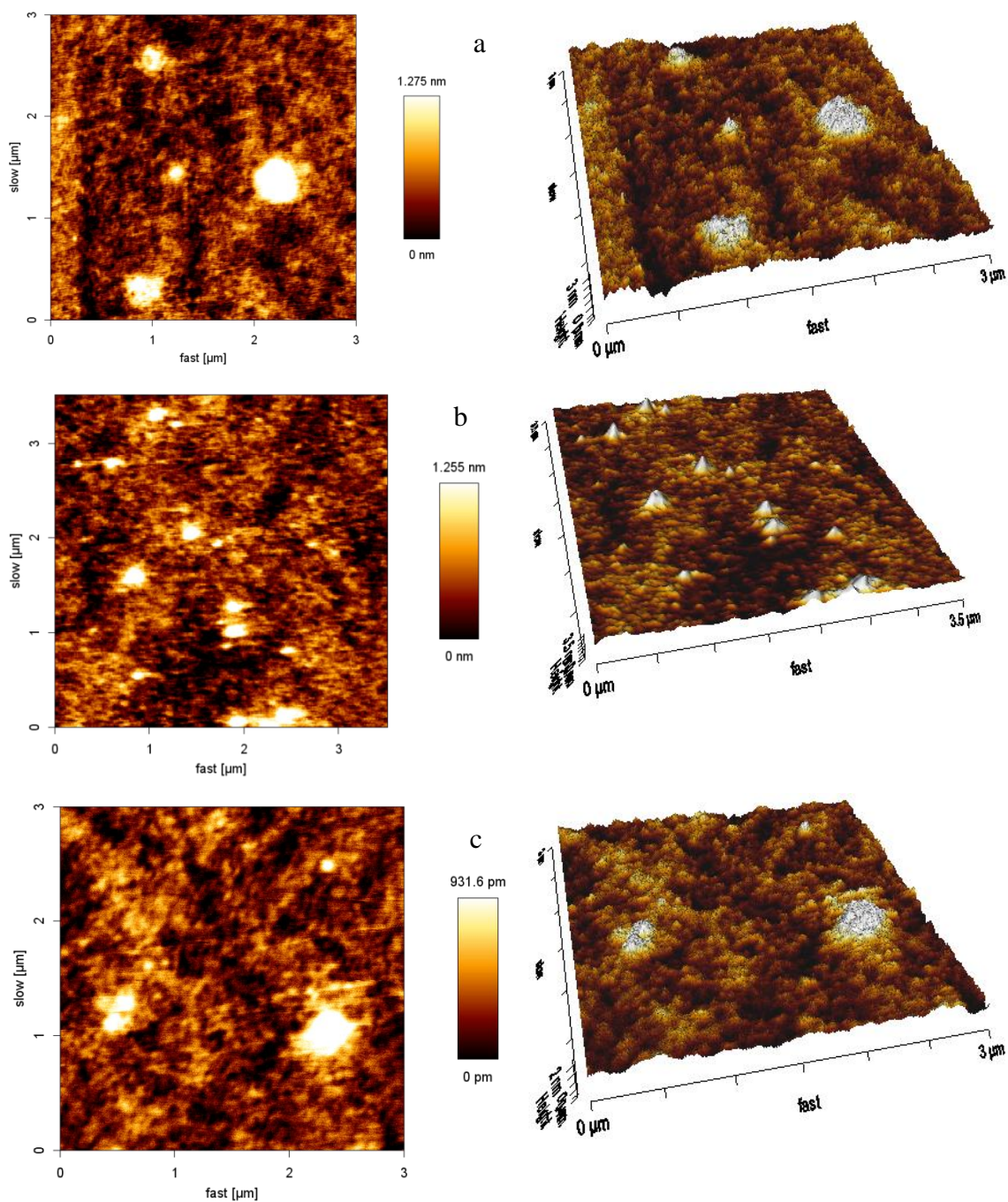


**Figura 3.9.** Micrografias obtidas por TEM das NLS de Compritol<sup>®</sup>: a) NLS Vaz; b) NLS Eto; c e d) NLS Ibu.

Verifica-se ainda nas NLS Ibu (Figura 3.9d) o aparecimento de cristais à superfície das partículas, o que pode ser devido a uma eventual precipitação do fármaco como consequência da reorganização cristalina da matriz lipídica. Os lípidos sólidos apresentam polimorfismo sendo frequentes as transições polimórficas entre as 3 estruturas cristalinas:  $\alpha$  hexagonal, instável;  $\beta'$  ortorrômbica, metastável;  $\beta$  triclinica, estável (Souto *et al.*, 2007). Após preparação das NLS, parte do lípido cristaliza na formas  $\alpha$  ou  $\beta'$ , de elevada energia. Durante o armazenamento estas formas instáveis tendem a transformar-se na forma  $\beta$  de menor energia livre e, por isso, termodinamicamente mais estável. Como esta forma apresenta uma estrutura cristalina mais ordenada, com menos imperfeições, tem menor capacidade para acomodar moléculas de fármaco no seu interior. Deste modo, as transições polimórficas das matrizes lipídicas sólidas conduzem geralmente à expulsão do fármaco e à instabilidade das NLS (Souto *et al.*, 2007).

#### 4.6. Microscopia de força atômica (AFM)

A AFM é uma técnica rápida e potente que permite obter informações sobre a morfologia, diâmetro e a distribuição granulométrica dos sistemas coloidais (Ruozi *et al.*, 2005). A Figura 3.10 mostra os perfis transversais a partir da altura e as imagens 3D das NLS Vaz, NLS Ibu e NLS Eto.



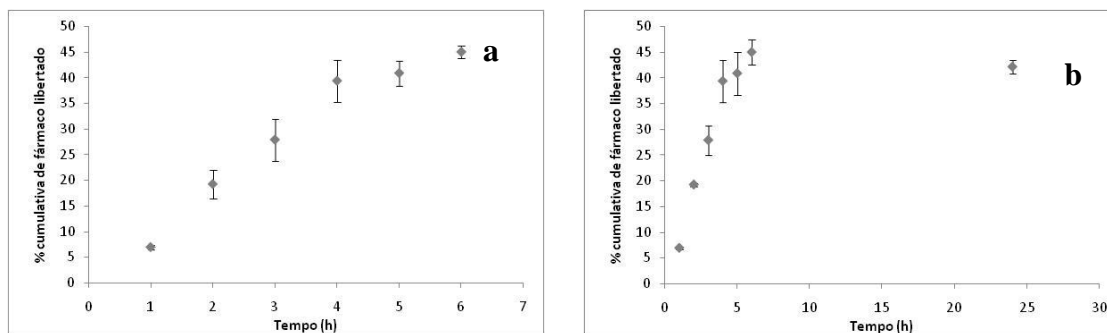
**Figura 3.10.** Micrografias obtidas por AFM do alto e em secção transversal: a) NLS Vaz; b) NLS Ibu; c) NLS Eto.

Os diâmetros médios das partículas obtidas são semelhantes aos estabelecidos a partir das análises por DLS e TEM. Uma inspeção minuciosa aos perfis de secção transversal e de imagem 3D, indica que as partículas apresentam uma forma irregular e superfície rugosa, mais coerente com a imagem de TEM obtida para as nanopartículas vazias (Figura 3.9a).

## 4.7. Estudos *in vitro* de absorção cutânea

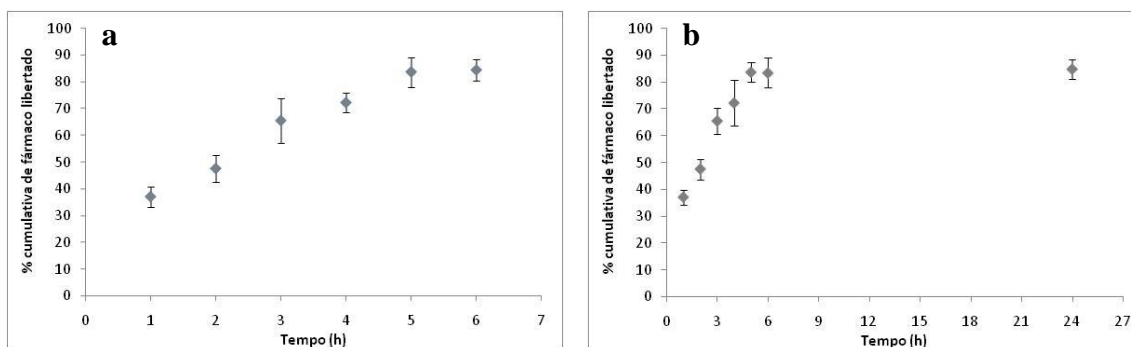
### 4.7.1. Ensaio de liberação dos fármacos

Os perfis de liberação do etofenamato e do ibuprofeno incorporados nas NLS de Compritol<sup>®</sup> são mostrados nas Figuras 3.11 e 3.12, respectivamente.



**Figura 3.11.** Perfil de liberação do etofenamato incorporado em NLS de Compritol<sup>®</sup>, através da membrana Tuffryn<sup>®</sup>; a) após 6 horas, b) após 24 horas (Média±DP; n = 6).

Após 6h, verificou-se uma liberação do etofenamato de cerca de  $43\pm 3\%$  do total de fármaco contido na formulação, o que corresponde a  $534\pm 6 \mu\text{gcm}^{-2}$ . Como se pode verificar, a liberação do fármaco foi quase constante ao longo do tempo, embora mais rápida nas primeiras 2 h, resultado também confirmado pelo modelo matemático de ordem zero, que melhor descreve este perfil de liberação, onde obteve-se um valor de  $r^2$  de 0,992. Como se pode ver na Figura 3.11b, o fármaco presente na formulação não foi completamente libertado após 24 h. Esta liberação incompleta do fármaco das NLS pode ser devida a uma afinidade química do etofenamato para matriz lipídica das NLS, o que provoca a retenção de parte do fármaco pelo veículo, reduzindo assim a quantidade disponível para a difusão. Esta observação corrobora os estudos calorimétricos publicados por Castelli *et al.* (2005) sobre a interação entre os lípidos e os fármacos num sistema de NLC, usando indometacina como fármaco modelo, que demonstraram a existência de uma interação entre a matriz das NLC e a indometacina, quer quando o fármaco foi encapsulado, quer quando foi suspenso numa dispersão aquosa de nanopartículas. Em ambos os casos esta interação tem grande influência na liberação da indometacina que, tal como o etofenamato é praticamente insolúvel em água.



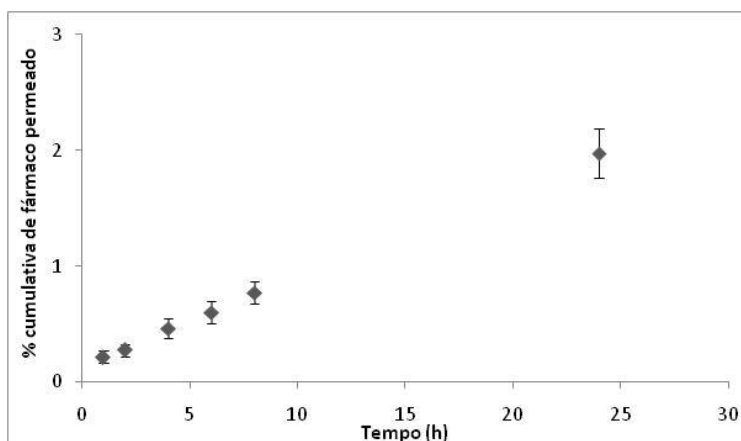
**Figura 3.12.** Perfil de libertação do ibuprofeno incorporado em NLS de Compritol<sup>®</sup>, através da membrana Tuffryn<sup>®</sup>; a) após 6 horas, b) após 24 horas (Média±DP; n=6).

Para o ibuprofeno, pelo contrário, obteve-se uma libertação quase completa do fármaco atingindo  $85 \pm 3,9\%$  às 6 h, o que corresponde a  $480 \pm 8 \mu\text{gcm}^{-2}$  (Figura 3.12a). Notou-se também uma libertação inicial bastante rápida do fármaco ( $37 \pm 3,8\%$  após 1 h) consistente com a acumulação de cristais à superfície das nanopartículas revelada, por TEM (Figura 9d). Neste caso, o perfil de libertação obedece ao modelo de Higuchi, com uma difusão maior nas primeiras horas seguida duma difusão constante obtendo um valor de  $r^2$  de 0,989. Este tipo de cinética de libertação coincide com a grande maioria dos dados publicados na literatura acerca dos perfis de cedência de fármacos encapsulados em nanopartículas utilizando células de difusão de Franz (Venkateswarlu e Manjunath, 2004; Vaghasiya *et al.*, 2013).

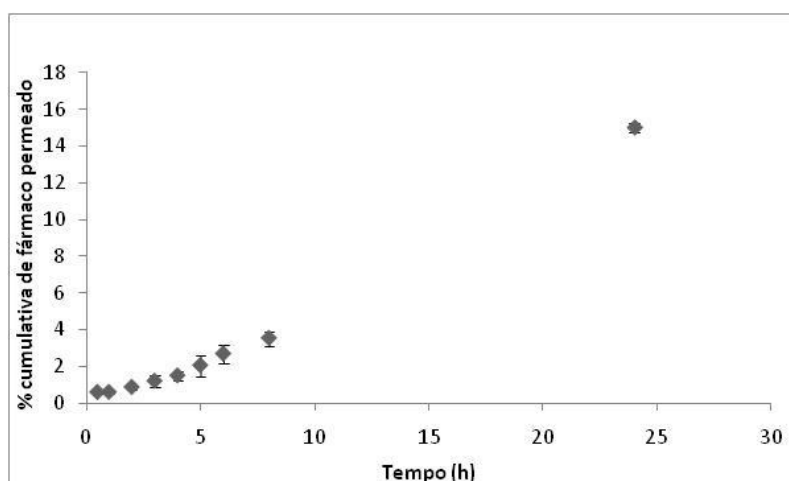
A diferença entre os perfis de libertação do etofenamato e do ibuprofeno pode ser devida não só às suas diferentes solubilidades em água mas também à estrutura das NLS tal como anteriormente discutido. Estas diferenças podem também estar na origem das diferentes eficiências de dissolução após 24h (Khan, 1975) observadas com ambas as formulações, isto é  $40 \pm 5\%$  para NLS Eto e  $77 \pm 3\%$  NLS Ibu. Para além disto, embora ambos os fármacos sejam praticamente insolúveis em água, o etofenamato é ainda menos solúvel ( $0,0012 \text{ mgml}^{-1}$ ), que o ibuprofeno ( $0,041 \text{ mgml}^{-1}$ ) (ChemSpider). As diferenças entre os coeficientes de partilha ( $\text{LogP} = 4,99$  para o etofenamato e  $3,72$  para o ibuprofeno) (Hadgraft *et al.*, 2000) podem também ter um efeito determinante pois, nas condições em que o ensaio foi realizado, as dispersões de NLS encontravam-se em repouso no compartimento dador das células de difusão de Franz. De facto, os fármacos têm de difundir através da fase aquosa externa para atingirem o compartimento receptor. Este mecanismo pode contribuir para as menores velocidade e eficiência de libertação do etofenamato, relativamente ao ibuprofeno (Fang *et al.*, 2008).

#### 4.7.2. Ensaio de permeação dos fármacos

As Figuras 3.13 e 3.14 mostram os perfis de permeação do etofenamato e do ibuprofeno, através do estrato córneo humano durante 24 h.



**Figura 3.13.** Perfil de permeação do etofenamato incorporado em NLS de Compritol®, através do estrato córneo (Média±DP; n=6).



**Figura 3.14.** Perfil de permeação do ibuprofeno incorporado em NLS de Compritol®, através do estrato córneo (Média±DP; n=6).

Tal como sugerido pelos perfis de libertação obtidos com membrana sintética, a permeação dos fármacos através do estrato córneo revelou também diferenças entre os fármacos nanoencapsulados em NLS. As NLS Eto apresentaram uma permeação do fármaco de apenas  $2 \pm 0,22\%$  ao fim de 24 h, em contraste com as NLS Ibu, cuja permeação foi de  $14 \pm 0,24\%$ . Dado que os fenómenos físico-químicos que comandam a libertação destes fármacos nas condições acima estudadas são os mesmo que influenciam a permeação cutânea *in vitro*, a explicação para esta diferença pode ser

encontrada na discussão acima efectuada para os ensaios de libertação. Para além disto, o estrato córneo é uma membrana muito mais selectiva e difícil de atravessar.

Por outro lado, é sabido que o veículo em que a substância activa é incorporada influencia largamente a extensão com que esta penetra e permeia o tecido cutâneo. Como se pode verificar pela análise directa dos perfis obtidos, a capacidade de permeação de ambos os fármacos em estudo é relativamente baixa, sendo estes resultados semelhantes aos perfis de permeação de outras moléculas lipossolúveis encapsuladas em nanopartículas de Compritol® (Almeida *et al.*, 2004). Este facto poderá estar directamente correlacionado com as diferentes características das dispersões lipídicas utilizadas. No entanto, a absorção percutânea não depende exclusivamente das propriedades físico-químicas da substância veiculada, sendo também largamente condicionada pelas propriedades do veículo utilizado, existindo vários estudos que o demonstram (Komatsu e Sakurada, 2012; Santos *et al.*, 2012 ). O Kp, o fluxo de permeação e o *lag time* foram calculados a partir da porção linear das curvas de permeação dos dois fármacos (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4.** Valores calculados de Kp, fluxo e lag time do etofenamato e ibuprofeno através da pele (Media±DP; n=6).

Formulação	Kp (cm <sup>-1</sup> h)	Fluxo (µgcm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Lag time (h)
NLS eto	3,12 X 10 <sup>-3</sup>	3,739	3,05
NLS ibu	5,05 X 10 <sup>-3</sup>	4,83	4,04

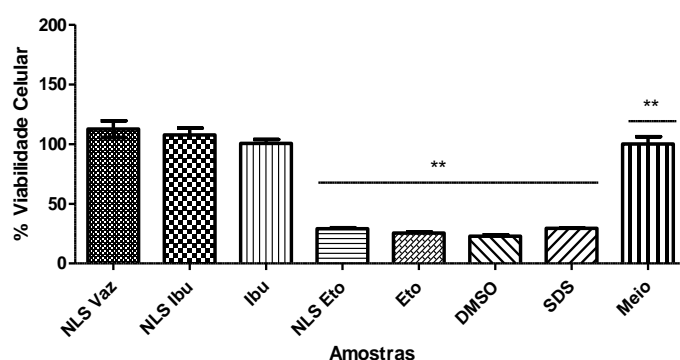
#### 4.8. Estudos de citotoxicidade e de captação celular

Para investigar o potencial irritante das dispersões de NLS, a viabilidade celular foi avaliada utilizando linhas de células Df e HaCaT num ensaio com MTT e resazurina. A formulação de NLS Vaz na concentração testada não reduziu a viabilidade em qualquer linhas celulares (Df e HaCaT) apresentando valores de 112±17% e 113±17% para a linha DF nos testes por MTT e de resazurina respectivamente. Para a linha celular HaCaT os resultados foram de 117±13% e 117±13% nos testes de MTT e de resazurina respectivamente (Figuras 3.15 - 3.18).

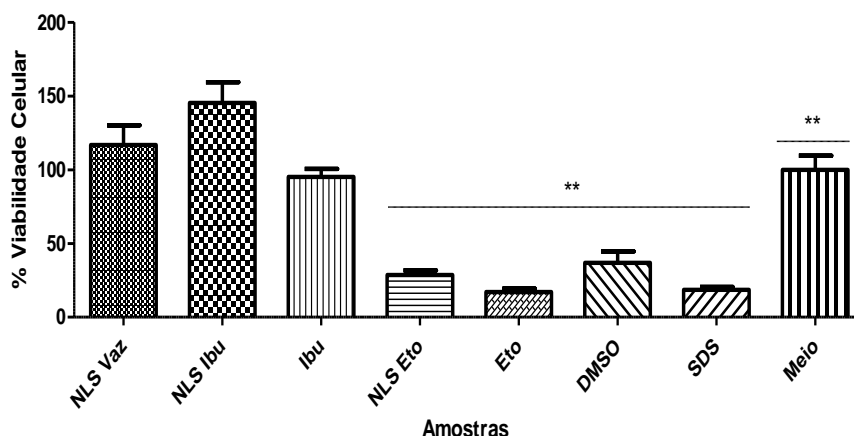
Relativamente as NLS Ibu, este valor não se altera significativamente (p>0,05). Podemos concluir que as NLS Ibu não reduzem a viabilidade de ambas as linhas

celulares (Df e HaCaT) apresentando valores de  $107\pm 14\%$  e  $107\pm 14\%$  para a linha Df nos testes de MTT e de resazurina respectivamente. Para as linhas celulares HaCaT os resultados foram de  $145\pm 14\%$  e  $145\pm 14\%$  nos testes de MTT e de resazurina respectivamente (Figuras 3.15-3.18).

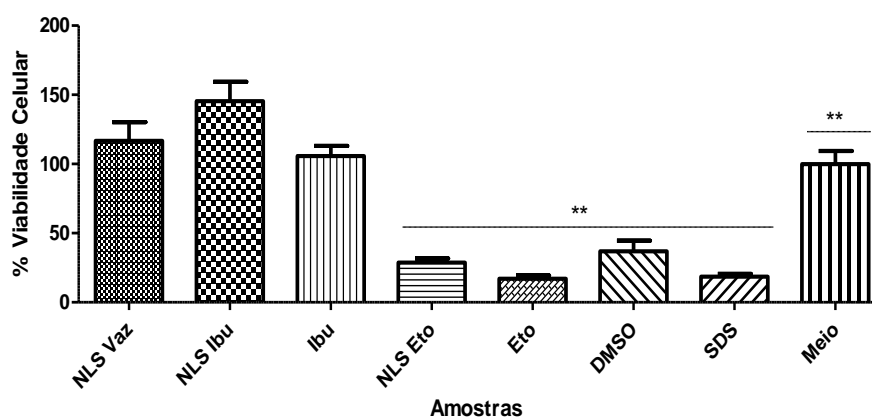
Por seu lado, o etofenamato livre e encapsulado reduz a viabilidade em ambas as linha celulares (Df e HaCaT) apresentando um valor de  $29\pm 2\%$  e  $29\pm 2\%$  para a linha Df nos testes de MTT e de resazurina respectivamente. Para as linhas celulares HaCaT os resultados foram de  $28\pm 1\%$  e  $29\pm 3\%$  para os testes de MTT e de resazurina respectivamente (Figuras 3.15-3.18). Foram ocasionalmente observadas lesões eritematosas em algum pacientes após a utilização de etofenamato (Park *et al.*, 2014). De acordo com a norma orientadora *Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment* (OECD, 2004), uma substância é definida como irritante se a viabilidade celular for inferior a 50% para um tempo de exposição 15-60 min. No presente ensaio, as células foram expostas às amostras durante 24 h, apresentando valores de viabilidade celular superiores a 50%, tanto para a NLS como para as NLS Ibu. Assim, a aplicação destes critérios permite que esta formulação possa ser considerada não irritante. No caso das NLS Eto a formulação pode ser considerada irritante de acordo com a mesma norma, embora este ensaio deva ser repetido em células que mimetizam a organização da pele para se poderem tirar conclusões mais seguras.



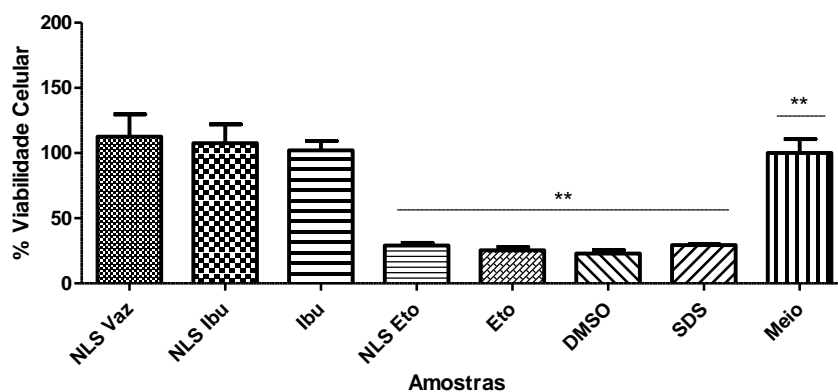
**Figura 3.15.** Viabilidade da linha celular Df determinada pelo teste do MTT, após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu (3 mg/ml); NLS Eto (6 mgml<sup>-1</sup>); Eto - fármaco livre (1,2 mgml<sup>-1</sup>); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsulfato de sódio (10 mgml<sup>-1</sup>); Meio - meio de cultura das células (Média±SD; n = 9;\*\* p<0,05 vs meio).



**Figura 3.16.** Viabilidade da linha celular HaCaT em MTT após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu ( $3 \text{ mgml}^{-1}$ ); NLS Eto ( $6 \text{ mgml}^{-1}$ ); Eto - fármaco livre ( $1,2 \text{ mgml}^{-1}$ ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio ( $10 \text{ mgml}^{-1}$ ); Meio - meio de cultura das células (Média $\pm$ SD; n = 9; \*\* p<0,05 vs meio).

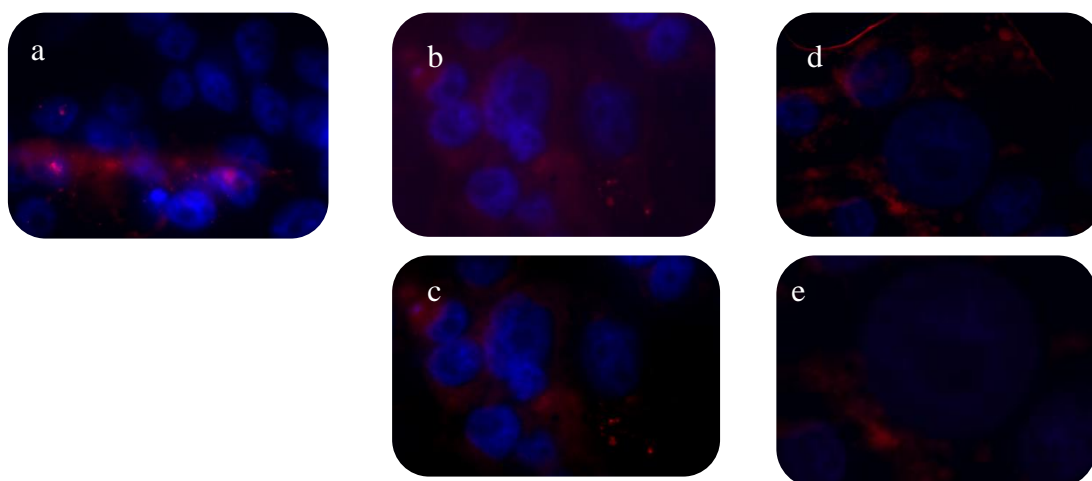


**Figura 3.17.** Viabilidade da línea celular HaCaT em resazurina após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu ( $3 \text{ mgml}^{-1}$ ); NLS Eto ( $6 \text{ mgml}^{-1}$ ); Eto - fármaco livre ( $1,2 \text{ mgml}^{-1}$ ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio ( $10 \text{ mgml}^{-1}$ ); Meio - meio de cultura das células (Média $\pm$ SD; n = 9; \*\* p<0,05 vs meio).



**Figura 3.18.** Viabilidade da linha celular DF em resazurina após 24 h de incubação. NLS Vaz; NLS Ibu ( $3 \text{ mgml}^{-1}$ ); NLS Eto ( $6 \text{ mgml}^{-1}$ ); Eto - fármaco livre ( $1,2 \text{ mgml}^{-1}$ ); DMSO - dimetilsulfóxido; SDS - laurilsufato de sódio ( $10 \text{ mgml}^{-1}$ ); Meio - meio de cultura das células (Média $\pm$ SD;  $n = 9$ ; \*\*  $p < 0,05$  vs meio).

A internalização das NLS marcadas com um fluorocromo (vermelho de Nilo) foi estudada em células HaCaT e avaliada por microscopia de fluorescência (Figura 3.19).



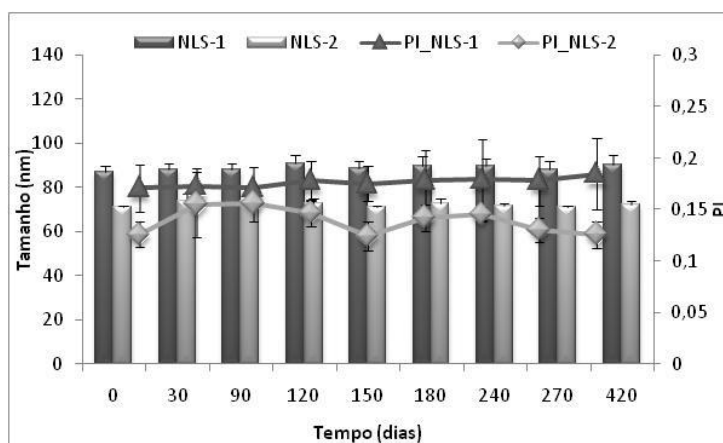
**Figura 3.19.** Micrografias fluorescentes das NLS em células HaCaT: (a) NLS Vaz; (b,c) NLS Ibu; (d,e) NLS Eto. Ampliação 100X.

Após 1 h de incubação as partículas de NLS Eto e NLS Ibu podiam ser observadas no interior da célula. Küchler *et al.*, (2009) demonstraram que após 0,5 horas de incubação quase 50% das NLS preparadas com Compritol<sup>®</sup> e marcadas com fluorocromo

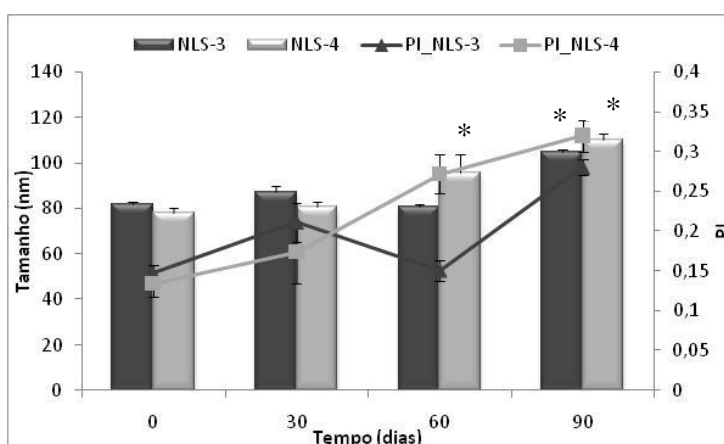
(vermelho de Nilo) são encontradas no interior da das HaCaT. Estes autores concluíram que a coloração no interior da célula era devida à presença das NLS e não ao corante libertado pelas NLS, indicando que a absorção das NLS sobre a pele danificada pode tornar-se clinicamente relevante.

#### 4.9. Estudos de estabilidade física das NLS

Os resultados preliminares de estabilidade física das NLS Vaz, foram obtidos durante 420 dias com as preparações, compostas por Compritol<sup>®</sup> e Tween<sup>®</sup> 80 a 2% (NLS-1) e a 3% (NLS-2) e durante 60 dias com preparações compostas por Precirol<sup>®</sup> e Tween<sup>®</sup> 80 a 2% (NLS-3) e 3% (NLS-4).



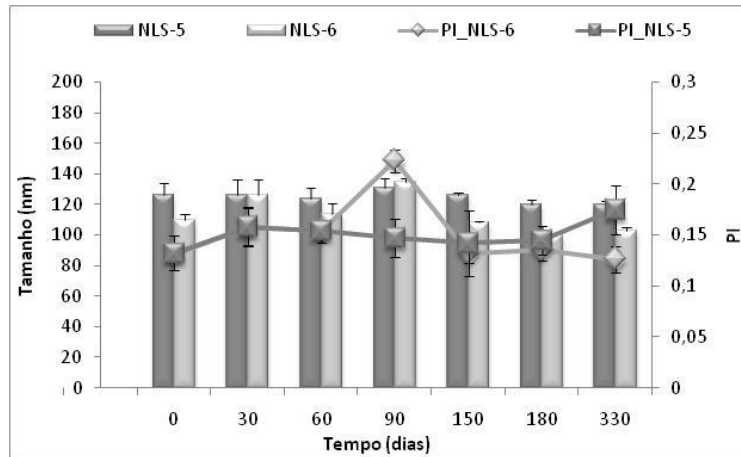
**Figura 3.20.** Diâmetro médio das partículas e PI das formulações NLS-1 e NLS-2 armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (Média $\pm$ DP; n=3).



**Figura 3.21.** Diâmetro médio das partículas e PI das formulações NLS-3 e NLS-4 armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (Média $\pm$ DP; n=3; \*  $p < 0,05$ ).

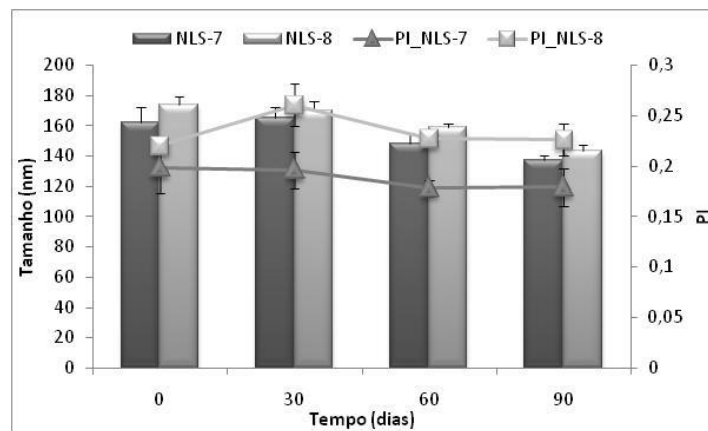
As suspensões de NLS preparadas com Compritol<sup>®</sup> e Tween 80<sup>®</sup> a 2% e a 3% mantiveram-se fisicamente estáveis ao longo do estudo (420 dias) independentemente da quantidade de agente emulsivo utilizada (Figura 3.20). Igualmente importante é o facto de o PI se ter mantido relativamente constante e sempre abaixo de 0,2, sugerindo a ausência de fenómenos detectáveis de agregação de partículas ou mesmo de precipitação. Contudo, as formulações de NLS preparadas com Precirol<sup>®</sup> apresentaram uma variação significativa do diâmetro médio das partículas após 60 dias (Figura 3.21). Note-se que estes dados aparentemente contradizem os resultados descritos por Liu *et al.* (2007) para NLS de Precirol<sup>®</sup> contendo isotretinoína, usando diferentes concentrações de Tween<sup>®</sup> 80, as quais se mantiveram estáveis durante 3 meses. No entanto os dados publicados são controversos porquanto um aumento do diâmetro médio das partículas foi também observado durante 120 dias em estudos efectuados por Vivek *et al.* (2007) sobre o efeito dos lípidos na produção e estabilidade de NLS contendo olanzapina. Assim sendo, não é possível extrair conclusões claras a partir dos dados publicados pois não só são utilizados diferentes agentes emulsivos, em várias proporções, como também as formulações descritas contêm fármacos diferentes cuja presença pode influenciar decisivamente a estabilidade física das dispersões de NLS. Tendo em vista estes resultados, as formulações preparadas com Compritol<sup>®</sup> e Tween<sup>®</sup> 80 a 2% e 3% foram escolhidas para prosseguir os estudos de desenvolvimento. Deste modo, a estabilidade física das formulações de NLS contendo os fármacos foi também estudada a 5±3°C. Os resultados preliminares, obtidos durante 330 dias, das suspensões de NLS Eto em Tween<sup>®</sup> 80 a 2% (NLS-5) e a 3% (NLS-6) e durante 90 dias das suspensões contendo NLS Ibu em Tween<sup>®</sup> 80 a 2% (NLS-7) e a 3% (NLS-8) são apresentados nas Figuras 3.22 e 3.23, respectivamente.

Como se pode ver na Figura 3.22 as NLS Eto mantiveram-se estáveis durante 330 dias, independentemente da quantidade de Tween<sup>®</sup> 80 utilizada na sua preparação. No entanto, durante o estudo ocorreram variações significativas ( $p < 0,05$ ) dos parâmetros avaliados, designadamente aos 90 dias para a formulação NLS-6, mais atribuíveis a eventuais erros experimentais que propriamente a fenómenos de instabilidade.



**Figura 3.22.** Diâmetro médio das partículas e PI das formulações de Compritol<sup>®</sup> NLS-5 e NLS-6 contendo etofenamato, armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (Média $\pm$ DP; n=3).

De qualquer modo, quando comparadas com os respectivos placebos (Figura 3.20), não se pode eliminar possibilidade da inclusão do etofenamato nas formulações ter causado este aumento de variação.

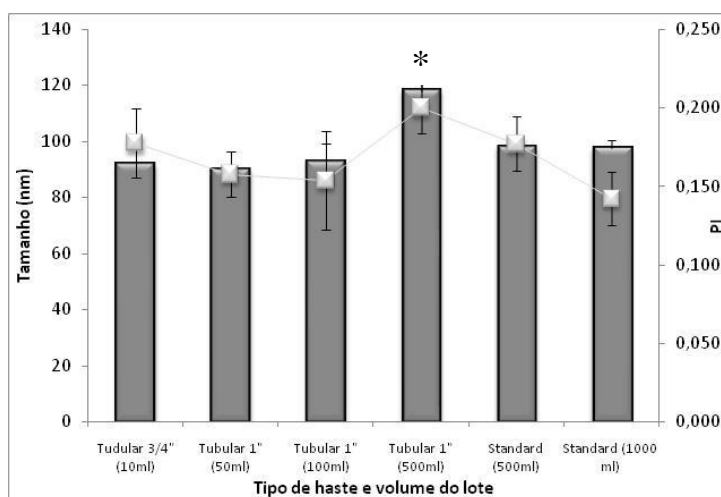


**Figura 3.23.** Diâmetro da partícula e PI das formulações NLS-7 e NLS-8, contendo ibuprofeno, armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (Média $\pm$ DP; n=3).

No que diz respeito às NLS Ibu (Figura 3.23) houve uma ligeira diminuição do diâmetro médio das partículas a partir de 60 dias. Esta diminuição pode resultar da já referida reorganização cristalina da matriz lipídica, com a consequente expulsão do fármaco, a qual era claramente visível através da formação de um precipitado no fundo do recipiente, constituído por cristais de ibuprofeno.

#### 4.10. Transposição de escala em laboratório de 10 ml para 1000 ml

Este estudo preliminar, realizado a nível laboratorial foi levado a cabo com a formulação que se apresentou mais estável durante os ensaios descritos na secção anterior. De modo a aumentar a dimensão do lote de fabrico das NLS de 10 ml para 1000 ml foi aplicado o método descrito na Secção 3.1., baseado na utilização do misturador de alta velocidade Silverson SL5M, estando as variáveis estudadas descritas na Tabela 3.1. As NLS resultantes (lotes de 50, 100, 500 e 1000 ml) foram caracterizadas através da determinação do diâmetro médio das partículas, PI e potencial zeta, e comparadas com as nanopartículas produzidas e optimizadas em lotes de 10 ml.



**Figura 3.24.** Diâmetro médio das partículas e PI das NLS após a transposição de escala de 10 ml para 1000 ml (Média±DP; n=3;\* p< 0,05).

Os resultados obtidos sugerem que o método de preparação de NLS aqui estudado pode ser transposto para uma escala de produção consideravelmente superior, originando, de modo consistente nanopartículas com as características pretendidas (Figura 3.24). No entanto, nas condições testadas a haste do homogeneizador constitui um parâmetro crucial no aumento de escala, pois o diâmetro médio das partículas e o PI aumentaram significativamente quando a dimensão do lote coincidiu com a capacidade máxima da haste Tubular 1" (500 ml, de acordo com o fabricante). Nestas condições, a agitação foi menos eficiente, tendo sido necessário recorrer a uma haste de capacidade superior ("standard assembly"). Esta permitiu não só melhorar as características das NLS do lote de 500 ml, como também produzir um lote de dimensão 100 vezes superior ao

inicial mantendo o diâmetro médio de partícula e o PI dentro dos valores pré-estabelecidos para as formulações em estudo.

## **5. CONCLUSÕES**

Este estudo demonstrou que é possível produzir nanopartículas lipídicas sólidas estáveis com o método de fusão-emulsificação por homogeneização a alta velocidade.

Os fármacos foram libertados das NLS com uma boa percentagem, e os estudos de permeação são promissores, sendo que o objectivo é a subsequente incorporação das NLS num veículo semi-sólido para aplicação tópica.

As NLS Vaz e NLS Ibu não apresentaram citotoxicidade sendo que se pode concluir que as formulações não são irritantes. Embora os resultados dos ensaios *in vitro* tenham demonstrado um elevado grau de citotoxicidade para as NLS Eto, há que ter em consideração que este resultado foi obtido com uma concentração de fármaco muito superior à concentração que efectivamente permeia através do estrato córneo.

Finalmente, os ensaios preliminares de transposição de escala demonstraram que o método de produção das NLS utilizado é transponível a nível laboratorial para uma escala 100 vezes superior, desde que seja mantida constante a relação entre o diâmetro do recipiente e o da haste do agitador, sugerindo claramente a possibilidade da transposição para uma escala industrial.

## **BIBLIOGRAFIA**

Park H-M, Kowalski ML, Sanchez-Borges M. Hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Adkinson NF, Bochner BS, Burks AW, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, O'Hehir RE (eds.), Middleton's Allergy Principles and Practice. 8th Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2014, pp. 1296-1309.

Almeida AJ, Toscano C, Videira M. Therapeutic applications of lipid nanoparticles administered by alternative routes. In: Pedraz JL, Orive G, Poncelet D (eds), Proc. XII International Workshop on Bioencapsulation. Vitória, Espanha. 2004, pp. 69-72.

Block LH. Nonparenteral liquids and semisolids. In: Levin M (ed), Pharmaceutical Process Scale-Up. 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc. 2001, pp. 57-94.

Buckingham E. On physically similar systems: illustrations of the use of dimensional equations. *Phys Rev NY* 1914; 4:345–376

Cadete A, Figueiredo L, Lopes R, Calado CCR, Almeida AJ, Gonçalves LMD. Development and characterization of a new plasmid delivery system based on chitosan-sodium deoxycholate nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45:451–458.

Casadei MA, Cerreto F, Cesa S, Giannuzzo M, Feeney M, Marianecchi C, P Paolicelli. Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: A new drug delivery system for oral formulations. *Int J Pharm* 2006; 325:140–146.

Castelli F, Puglia C, Sanpietro MG, Rizza L, Bonina F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm* 2005; 304:231–238.

ChemSpider - Search and share chemistry [em linha]. Disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure> (acedido em 24-04-2014), 2014.

Dingler A, Gohla S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J Microencapsul* 2002; 19:11-16.

European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 8th Ed.). Council of Europe, Strasbourg, 2014.

Fang JY, Fang C, Liu C, Su Y. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70:633–40.

Hadgraft J, Plesis J. Goosen, C. The selection of non-steroidal anti-inflammatory agents for dermal delivery. *Int J Pharm* 2000; 207:31-37.

Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, McClements DJ, Weiss J. Influence of polymorphic transformations on gelation of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions. *J Am Oil Chem Soc* 2008; 85:501–511.

Khan A K. The concept of dissolution efficiency. *J Pharm Pharmacol* 1975; 27:48-49.

Komatsu T, Sakurada T. Comparison of the efficacy and skin permeability of topical NSAID preparations used in Europe. *Eur J Pharm Sci* 2012; 47:890–895.

Küchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M, Kramer KD. Nanoparticles for skin penetration enhancement - a comparison of adendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71:243–250.

Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm* 2007; 328:191–195.

Lopes R, Eleutério CV, Gonçalves LMD, Cruz MEM, Almeida AJ. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45:442–450.

Müller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 161-177.

Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:131–155.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 28. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Paris, 2004

Pardeike J, Hommoss A, Müller HR. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366:170–184.

Potta SG, Minemi S, Nukala RK, Peinado C, Lamprou DA, Urquhart A, Douroumis D. Preparation and characterization of ibuprofen solid lipid nanoparticles with enhanced solubility. *J Microencapsul* 2011; 28:74–81.

Raposo S, Salgado A, Gonçalves L, Pinto PC, Urbano M, Ribeiro HM. Safety Assessment and biological effects of a new cold processed sil emulsion for dermatological purpose. *BioMed Res Int* 2013, Article ID 181634, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/181634>.

Ruozi B, Tosi G, Forni F, Fresta M, Vandelli MA. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25:81-89.

Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Influence of penetration enhancer on drug permeation from volatile formulations. *Int J Pharma* 2012; 439:260– 268.

Souto E, Almeida AJ, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *J Biomed Nanotechnol* 2007; 3:317-331.

Vaghasiya H, Kumar A, Sawant K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Eur J Pharma Sci* 2013; 49:311–322.

Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J Control Release* 2004; 95:627–638.

Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. *Colloids Surf B* 2011; 84:117-130.

Vitorino C, Almeida J, Gonçalves LMD, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: from experimental design to the molecular detail. *J Control Release* 2013; 167:301–314.

Vivek K, Reddy H, Murthy RSR. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, *in vitro* release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8:E83. doi: 10.1208/pt0804083.

Zlokarnik M. Dimensional analysis and scale-up in theory and industrial application. In: Levin M (ed.), *Pharmaceutical Process Scale-Up*. 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc. 2001, pp. 1-41.

## **CAPÍTULO 4**

### **ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DE UM GEL PARA APLICAÇÃO TÓPICA**

## 1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, o tratamento da pele seca foi baseado na hidratação da epiderme, através do uso de emolientes e/ou emulsões oclusivas (Kang *et al.*, 2013). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram primeiramente introduzidas no mercado como sistemas de veiculação de cosméticos e medicamentos de aplicação tópica. Trata-se de uma área que tem vindo a ser desenvolvida com sucesso desde o final da década de 1990, com produção científica regular e muito significativa (Wissing e Muller, 2002; Pardeike *et al.*, 2009), de que resultaram os primeiros produtos comercializados contendo nanopartículas lipídicas. De entre estes produtos podemos citar: Cutanova Cream Nano Repair Q10, Intensive Serum NanoRepair Q10, Cutanova Cream NanoVital Q10, IOPE SuperVita e SURMER Creme Contour Des Yeux Nano-Remodelante (Pardeike *et al.*, 2009).

Vários autores afirmam que quando aplicadas sobre a pele, as NLS apresentam propriedades oclusivas, que dependem do diâmetro da partícula, da concentração dos lípidos e do seu estado cristalino (Leveque e De Rigal, 1985; Wissing e Muller 2002; Souto *et al.*, 2004), atribuindo este efeito ao facto de as NLS formarem uma película superficial contínua sobre a pele intacta, que diminui a perda transepidérmica de água (PTEA) (Yilmaz e Borchert, 2006). Por outro lado, as NLS convencionais são preparações que normalmente contêm cerca de 10-20% (v/v) de matriz de lípido e de 80-90% (v/v) de água. Como resultado, estas dispersões possuem uma viscosidade baixa (cerca de 100 mPa.s) e com um valor de cedência praticamente nulo (Souto *et al.*, 2004). As formulações de NLS, normalmente têm de ser incorporados em formas farmacêuticas de aplicação tópica, tais como loções, hidro geles e cremes, com a consistência desejada (Lippacher *et al.*, 2000; 2001).

Deste modo, o presente estudo teve como objectivo o desenvolvimento, a caracterização físico-química e estabilidade dum gel contendo NLS, bem como os estudos *in vivo* para avaliação dos efeitos biológicos desta preparação, incluindo *Human Repeated Insult Patch Test* (HRIPT), perda transepidérmica de água (PTEA), capacitância epidérmica e viscoelasticidade, utilizando como comparadores uma suspensão líquida de NLS e um gel placebo sem NLS.

## 2. MATERIAIS

Hidroxietilcelulose USP (HEC; 2450 mPa.s; Natrosol<sup>®</sup>; Pharm HHX 250 Aqualon, Division of Hercules, Inc. Reino Unido), hidroxipropilmetilcelulose USP (HPMC) (15000 mPa.s, 2% em água a 20°C) (FLUKA Biochemika, Suíça), água purificada (Millipore, Elix 3, Millipore S.A.S 67120, França), propilenoglicol USP (Fluka, Espanha), glicerina USP (Merk KgaA, Alemanha), mentol em cristais Ph. Eur. (Fagron, Reino Unido), álcool etílico e álcool isopropílico (ambos de Merk KgaA, Alemanha).

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Preparação das NLS**

As NLS foram preparadas pelo método de fusão-emulsificação a alta velocidade, a quente, descrito no Capítulo 3, Secção 3.1.

#### **3.2. Estudos de pré-formulação do gel**

##### **3.2.1. Escolha do polímero e dos agentes humectantes**

Os geles foram preparados por dispersão dos agentes gelificantes (HPMC ou HEC, 2% m/m) e dos agentes humectantes (5% e 10% de glicerina ou propilenoglicol) em água purificada q.b. para 100 g. Após preparação as formulações foram acondicionadas em bisnagas de alumínio revestidas internamente com verniz epoxifenólico valspar DF-6172, externamente com esmalte poliéster branco e uma tampa de polietileno de alta densidade pigmentado a branco modelo 16.D (Sociedade Artística – Manufacturas Químicas e Metálicas Lda., Portugal) e armazenadas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com  $60\pm 5\%$  de humidade relativa (HR). As características físico-químicas dos geles supracitados foram avaliadas imediatamente após a preparação e ao fim de 30 dias.

##### **3.2.2. Seleção do método de preparação**

Dois métodos de preparação foram objecto de estudo:

Método 1. O polímero e o agente humectante foram adicionados à água sob agitação magnética (400 rpm durante 12 h), originando um gel concentrado com 4% de HPMC e 20% de propilenoglicol, ao qual foi adicionada uma suspensão de NLS numa proporção de 1:1.

Método 2. O polímero e o agente humectante foram adicionados à suspensão de NLS previamente preparada, sob agitação magnética (400 rpm durante 12 h) até à formação do gel.

#### **3.3. Caracterização físico-química**

O aspecto macroscópico de cada uma das formulações foi avaliada através das características organolépticas e utilizada como primeiro indicador de estabilidade visual. Foi também avaliado o comportamento das formulações sob centrifugação durante 5 min a 12000 rpm (Sigma 112 Microcentrifuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Alemanha).

### 3.3.1. Determinação do pH

O pH dos geles foi medido por potenciometria (medidor de pH 744, Metrohm<sup>®</sup>, EUA), utilizando um eléctrodo de vidro combinados.

### 3.3.2. Determinação das propriedades reológicas

Foi determinada a viscosidade aparente utilizando um viscosímetro rotativo coaxial (Brookfield<sup>®</sup> rotativo RV DV-II, SSA (*small sample adapter*), com agulha SC27, à velocidade de corte de 12,24 s<sup>-1</sup>. Foram traçados reogramas (tensão de corte *versus* velocidade de corte) efectuando uma rampa de varrimento de 0,61 s<sup>-1</sup> a 24,47 s<sup>-1</sup> durante 3,5 min.

### 3.3.3. Distribuição do diâmetro médio das partículas

A distribuição do diâmetro das gotículas foi medido por dispersão de luz utilizando um Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), juntamente com um acessório Hidro S. Para obter uma turbidez correcta, cerca de 0,5 g de cada formulação, correspondente a uma obscuração entre os 10% e 20%, foi adicionada à câmara da amostra contendo 150 ml de água, com o auxílio de um agitador a 1750 rpm e ultra-sonicação. Os dados obtidos foram expressos em termos de distribuição relativa de volume de partículas na gama de classes de tamanho (resultados apresentados como Média±DP; n=3).

### 3.3.4. Eficácia microbiológica dos conservantes

A escolha do conservante adequado é fundamental para garantir a integridade microbiológica das preparações. O estudo da eficácia microbiológica foi realizado segundo a Ph. Eur. (5.1.3. *Efficacy of antimicrobial preservation*). O ensaio consiste na contaminação artificial da preparação, através da inoculação de microrganismos apropriados (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9026, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), conservando a preparação inoculada a uma temperatura adequada, colhendo amostras do recipiente em determinados intervalos de tempo e efectuando nelas uma contagem dos microrganismos. Os critérios de aceitação, em termos de diminuição do número de microrganismos em função do tempo, variam para as diversas categorias de preparação de acordo com o grau de protecção pretendido.

No entanto, para nos certificarmos que os conservantes (álcoois) e o método escolhido não interferiam no crescimento microbiano este método foi validado. Assim, a inactivação do conservante foi realizada com 3 lavagens consecutivas em água purificada estéril, e o gel foi devidamente inoculado com as estirpes de

referência acima citadas, seguida de incubação em caixa de Petri durante 48 h para verificação do crescimento bacteriano em cada um dos meios de cultura. Os conservantes testados foram o álcool isopropílico e o álcool etílico nas concentrações de 10%, 15% e 20%. Este ensaio foi realizado na formulação final do gel com NLS descrita em 3.4 deste capítulo.

### 3.3.5. Controlo microbiológico

Foi efectuado o controlo microbiológico de acordo com a Ph. Eur. (2.6.13. *Microbiological examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms*), com os seguintes critérios de qualidade microbiológica definidos em unidades formadoras de colónias (UFC):

- I. quantidade de bactérias aeróbias viáveis:  $<10^2$  UFCml<sup>-1</sup>;
- II. quantidades de fungos e leveduras:  $<10^2$  UFCml<sup>-1</sup>;
- III. *Escherichia coli*: ausente.

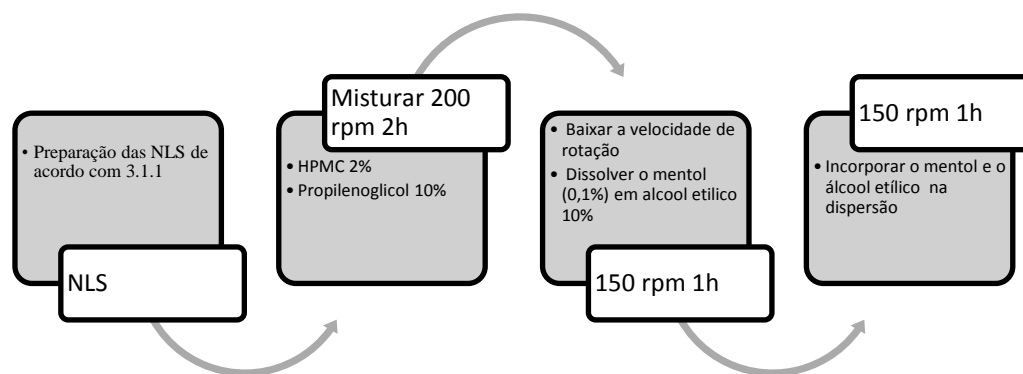
### 3.4. Formulação e preparação da formulação final

Procedeu-se à produção de três lotes (Tabela 4.1) de gel, de acordo com o método 2 acima descrito, com a dimensão de 1 kg, com e sem NLS, de modo a verificar a reprodutibilidade dos dados obtidos seguindo o fluxograma apresentado na Figura 4.1.

**Tabela 4.1.** Composição final do gel com NLS.

	<i>Excipientes</i>	<i>Quantidade (%)</i>
Gel	HPMC	2,0
	Propilenoglicol	10
	Álcool etílico	10
	Mentol	0,1
NLS	Tween <sup>®</sup> 80	2,0
	Compritol <sup>®</sup> ATO	0,6
	Água purificada	75,3

Cada lote produzido foi embalado em bisnagas de alumínio de 100 g e armazenado em estufas a diferentes temperaturas, para efeitos de estudo de estabilidade.



**Figura 4.1.** Representação esquemática da preparação de 1000 g de gel de HPMC contendo NLS.

### 3.5. Estudos de estabilidade

A estabilidade dos geles contendo NLS foi avaliada de acordo com a norma ICH Q1A(R2), tendo sido realizados estudos em tempo real, em que os lotes foram armazenados a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{HR}$  durante 12 meses, e estudos acelerados, em que os lotes foram armazenados a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\%\text{HR}$  durante 6 meses. O plano de amostragem seguiu as recomendações da norma e os parâmetros avaliados foram: características organolépticas, diâmetro médio das partículas, pH, propriedades reológicas e viscosidade e controlo microbiológico.

### 3.6. Estudos *in vivo*

#### 3.6.1. Human Repeated Insult Patch Test (HRIPT)

O estudo de avaliação de segurança foi realizada no gel com NLS, utilizando o protocolo de Marzulli e Maibach (1976). Em resumo, o produto foi aplicado nas costas de 50 voluntários saudáveis que deram o seu consentimento informado por escrito. Durante o período de indução, as amostras (gel com NLS e gel sem NLS) foram avaliadas ao longo de um período de 3 semanas. No local do produto, um penso oclusivo contendo 20 mg da formulação foi aplicada no lado esquerdo da parte posterior do tronco dos voluntários, onde permaneceu 48 h, 72 h e 96 h. As reacções após a exposição aos geles foram discriminadas individualmente, de acordo com as recomendações do International Contact Dermatitis Research Group (Fregert e Bandmann, 1975).

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética Local e respeitada a Declaração de Helsínquia, assim como os regulamentos da Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), para HRIPT em estudos realizados em produtos cosméticos. O presente estudo efectuado em colaboração com a empresa PhD Trials (Lisboa, Portugal), na observância das regras de Boas Práticas Clínicas (BPC) e dos procedimentos da própria empresa.

### **3.6.2. Efeitos biológicos**

Para este estudo foi seleccionado um painel uniforme de 20 voluntários (mulheres jovens saudáveis, entre os 22-40 anos, com a mesma actividade profissional), após o consentimento escrito e informado. As formulações foram aplicadas na parte interna do antebraço e os resultados foram comparados com uma área de controlo definida (anatomicamente equivalente e sem produto) no mesmo braço. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética Local. As medições foram realizadas sob condições padronizadas e à temperatura ambiente, de acordo com as normas de BPC. Os resultados foram expressos como Média±DP.

A perda transepidérmica de água (PTEA), a capacitância epidérmica da pele e a viscoelasticidade para as formulações em estudo (suspensão de NLS, gel com NLS e gel sem NLS) foram avaliadas durante 14 dias.

A PTEA foi determinada com um medidor de evaporação (Tewameter TM 210, CK Electronics GmbH, Alemanha). A sonda foi aplicada na pele do antebraço, parte interna, durante 3 minutos. Os dados estão expressos em  $\text{gm}^{-2}\text{h}^{-1}$ .

A capacitância epidérmica foi avaliada pelo Corneometer CM 820 (CK Electronics GmbH, Alemanha) A sonda foi aplicada na pele durante 1 s e foram feitas 3 medições na parte interna do antebraço. O grau de capacitância da pele é indicado em unidades arbitrárias (UA). Uma unidade arbitrária é específica do sistema e representa um conteúdo de água de  $0,02 \text{ mgcm}^{-2}$  a uma profundidade de medição de 20 nm.

A viscoelasticidade da pele foi determinada pelo método de sucção/alongamento utilizando o Cutometer 575 SEM (CK Electronics GmbH, Alemanha). O modo de tempo/esforço foi aplicado utilizando um ciclo de carga elementar de 400 mBar de tensão e deformação instantânea. Estas condições foram mantidas durante 1,30 s, seguidas por um período de relaxação, também este de 1,30 s. As curvas dos valores de deformação/recuperação da pele obtidas foram analisadas usando o Software Cutometer MPA 580.

### 3.7. Análise estatística

Os dados foram expressos como Média±DP de experiências independentes (n=3). A avaliação estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma entrada. O valor de  $p < 0,05$  foi aceite como significativo.

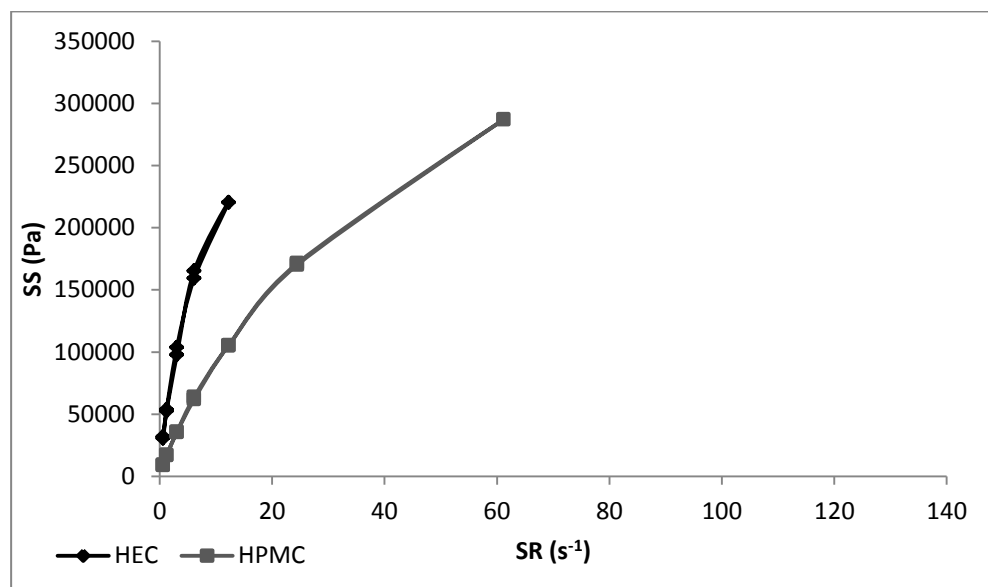
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudos de pré-formulação

#### 4.1.1. Seleção do polímero e do agente humectante

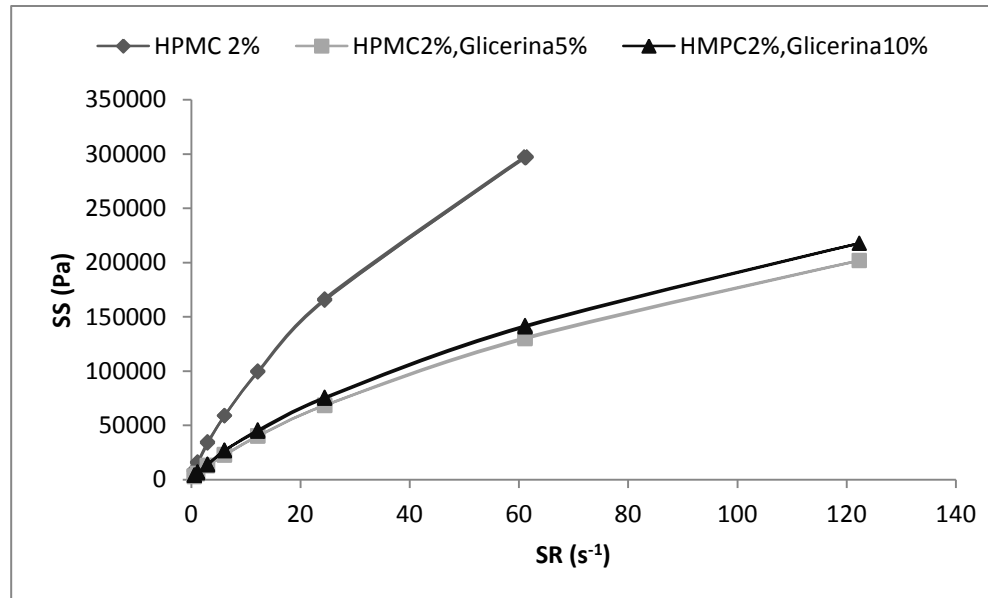
Em termos reológicos, as formulações de HEC apresentam comportamento não Newtoniano, pseudoplástico (*shear thinning*), com valor de cedência, como podemos ver na Figura 4.2. À medida que aumenta a velocidade de corte, a viscosidade diminui, mas o polímero recupera facilmente a sua estrutura após remoção da força aplicada, não havendo histerese em ambos os geles. Por outro lado, os geles de HPMC apresentam menor valor de cedência e menor valor de viscosidade quando comparadas com as formulações de HEC às mesmas velocidades de corte.

O polímero seleccionado para estudos subsequentes foi a HPMC porque originou uma melhor formulação do ponto de vista organoléptico e reológico, pois os geles preparados com HEC perderam a estrutura, tornando-se líquidos três dias após preparação.

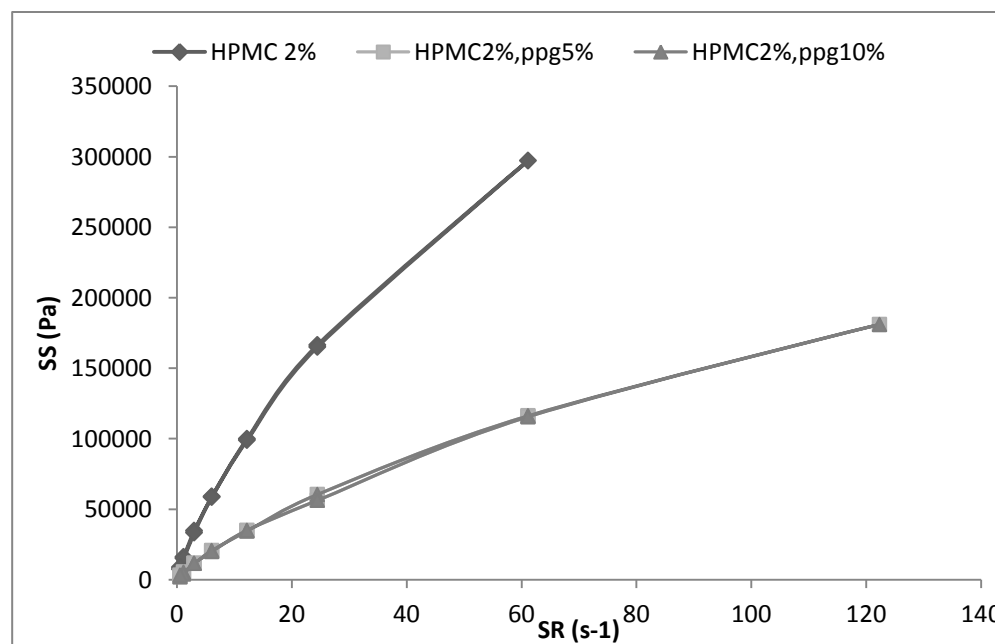


**Figura 4.2.** Perfil reológico dos geles preparados com os dois polímeros HEC e HPMC a 2% m/m.

Após incorporação de 5% e 10% de glicerina ou de propilenoglicol, como agentes humectantes no gel de HPMC, a viscosidade aparente no apex da curva diminui (Figuras 4.3 e 4.4). No entanto, independentemente do agente humectante utilizado, não houve variação da viscosidade quando a respectiva quantidade foi aumentada de 5% para 10%.



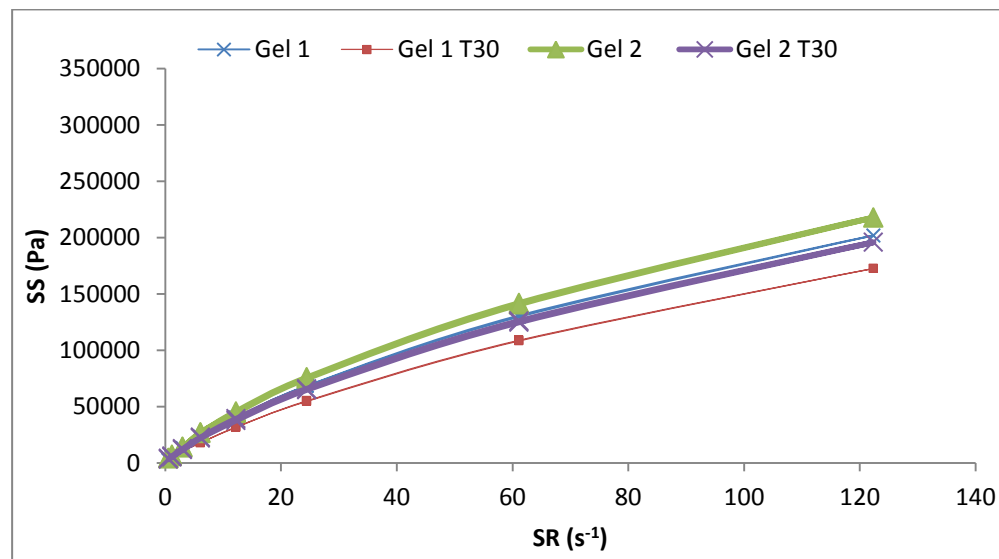
**Figura 4.3.** Perfil reológico dos gels de HPMC após introdução de glicerina a 5% e 10%.



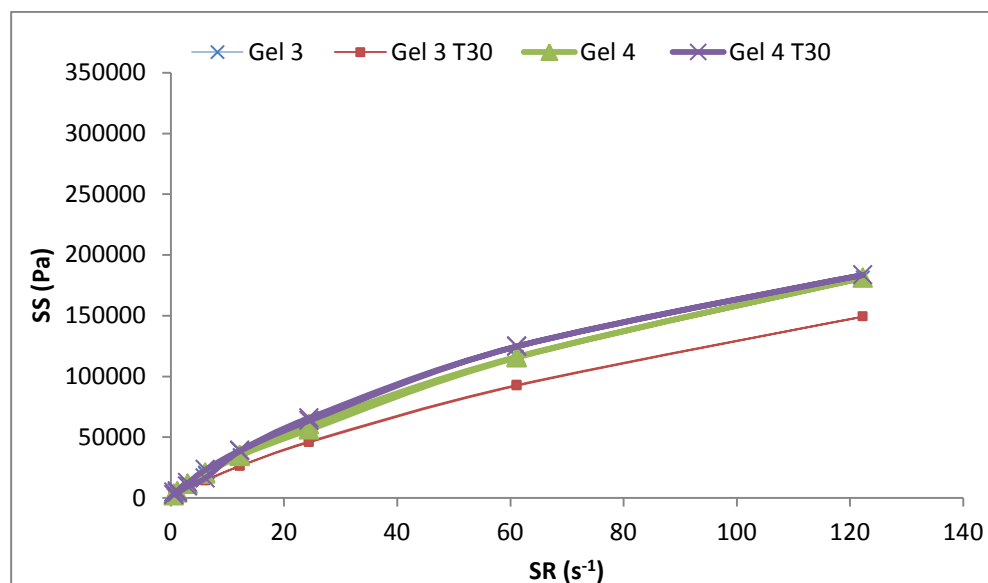
**Figura 4.4.** Perfil reológico dos gels de HPMC após introdução de propilenoglicol (ppg) a 5% e 10%.

Esta diminuição deve-se ao facto das ligações entre as cadeias do polímero (pontes de hidrogénio, entre outras) serem mais coesas e robustas quando o polímero se encontra disperso apenas em água (Sekiguchi *et al.*, 2003).

Após 30 dias de armazenamento a  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  HR, o perfil reológico dos geles foi novamente analisado tendo sido verificado que os geles contendo 2% de HPMC mantêm o mesmo perfil reológico (Figuras 4.5 e 4.6).



**Figura 4.5.** Perfil reológico dos geles de HPMC contendo glicerina. Gel 1: HPMC 2%/glicerina 5%, inicial; Gel 2: HPMC 2%/glicerina 10%, inicial; Gel 1 T30: Gel 1 após 30 dias a  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  HR; Gel 2 T30: Gel 2 após 30 dias a  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  HR.



**Figura 4.6.** Perfil reológico dos gels de HPMC contendo propilenoglicol: Gel 3: HPMC 2%/propilenoglicol 5%, inicial; Gel 4: HPMC 2%/propilenoglicol 10%, inicial. Gel 3 T30: Gel 4 após 30 dias a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$  HR; Gel 4 T30: Gel 2 após 30 dias a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$  HR.

A viscosidade do gel preparado com 5% de propilenoglicol (Gel 3) diminuiu ligeiramente ao fim de 30 dias não sendo esta diferença relevante em termos reológicos (Figura 4.6). Baseados neste resultados e nos estudos de solubilidade dos fármacos em glicerina e propilenoglicol (Capítulo 5, Secção 4.1.1), este último foi o agente humectante seleccionado, na concentração de 10%, para prossecução dos estudos.

#### 4.1.2. Selecção do método de preparação

A selecção de um método de preparação do hidrogel contendo NLS depende de vários parâmetros, de entre os quais se destacam a facilidade de execução do mesmo tendo em vista uma eventual aplicação industrial, assim como a estabilidade das próprias nanopartículas após incorporação na rede polimérica que constitui o gel. Este último aspecto foi abordado por alguns autores, incluindo o nosso grupo de investigação (Souto *et al.*, 2004; Pardeike *et al.*, 2009; Vitorino *et al.*, 2013a; 2013b). A maioria dos investigadores concorda quanto a vantagem da gelificação directa da fase aquosa das dispersões de NLS comparativamente à adição das mesmas a um gel pré-formado que pode resultar na diluição, por vezes excessiva das substâncias activas incorporadas nas nanopartículas.

Os estudos realizados no presente trabalho confirmaram estas observações, pois no método de adição da dispersão de NLS a um gel pré-formado (Método 1, Secção 3.2.2.) os tempos de repouso e de intumescência do gel foram demasiado longos (>12 h) sendo considerados a nível industrial como não

aceitáveis. Por outro lado, o método de gelificação directa da dispersão de NLS por adição do polímero (Método 2, Secção 3.2.2.) originou formulações com as características reológicas previamente estabelecidas e dentro dos tempos industrialmente aceitáveis (<3 h). Os valores de viscosidade dos geles contendo NLS preparados pelos métodos 1 e 2 foram de 7,35 e 11,70 mPa.s, respectivamente. Estes resultados podem ser explicados pelas diferentes interacções entre as redes poliméricas e as NLS formadas nos dois processos: no método 1 as NLS deverão destabilizar a rede polimérica pré-formada (diluição do gel concentrado) enquanto no método 2 essa rede irá formar-se com as próprias NLS. Esta interacção HPMC/NLS é demonstrada pelo aumento do diâmetro médio das partículas após formação do gel (ver Figura 4.10 e Tabela 4.8).

#### **4.2. Eficácia microbiológica dos conservantes**

Para que um determinado conservante seja considerado eficaz é necessário que cumpra os critérios de avaliação da actividade antimicrobiana descritos na Ph. Eur. para produtos não obrigatoriamente estéreis. Nas Tabelas 4.2 a 4.4, estão indicados os resultados obtidos com a adição de álcool isopropílico (AI) a 10%, 15% e 20% e de álcool etílico (AE) a 10%, 15% e 20% ao gel descrito da Tabela 4.1. Os dois ensaios foram efectuados nas mesmas condições. Devido à viscosidade das preparações foi necessário avaliar a eficácia dos conservantes por dois métodos: espalhamento (Tabela 4.2) e filtração com várias diluições (Tabelas 4.3 e 4.4).

**Tabela 4.2.** Ensaio da eficácia dos conservantes em formulações com 0%, 10%, 15% e 20% de AI e AE. pelo método de espalhamento directo.

Veículo	Estirpes	UFC/ ml					
		Inóculo	0 h	48 h	7 dias	14 dias	28 dias
Água (controlo negativo)			0	0	0	0	0
Gel sem conservante (n=2) AI	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	150	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	> 300	> 300	> 300
Gel sem conservante (n=2) AE	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	> 300	> 300	9	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	> 300	200	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	150	> 300	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
Gel com 10% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	> 300	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	> 300
Gel com 10% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	17	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	156	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	> 300	200	0	0	0
Gel com 15% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	5	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	15	0	0	0
Gel com 15% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	37	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0
Gel com 20% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	2	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	119	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
Gel com 20% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0

AI - álcool isopropílico; AE - álcool etílico

Após 48 h os gels contendo álcool isopropílico e álcool etílico foram eficazes nas concentrações de 15% e 20%. No entanto o comportamento dos gels contendo 10% de conservante foi diferente, pois após 7 dias apenas os gels contendo AI não foram eficazes contra o *A. niger*. Os resultados foram idênticos quando se utilizou o método de filtração (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Ensaio da eficácia dos conservantes em formulações com 0%, 10%, 15% e 20% de AI e AE pelo método de filtração (diluição 1:100).

Veículo	Estirpes	UFC/ ml					
		Inóculo	0 h	48 h	7 dias	14 dias	28 dias
Água (controlo negativo)			0	0	0	0	0
Gel sem conservante (n=2) AI	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	57	70	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	> 150
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	> 300	> 300	> 150
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	> 300	> 300	20
Gel sem conservante (n=2) AE	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	>300	>300	> 300	> 300	> 300
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	300	250	40	1	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	>300	>300	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	>300	>300	> 300	> 300	> 300
Gel com 10% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	42	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	> 300	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	73	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	> 300
Gel com 10% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	>300	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	222	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	>300	150	0	0	0
Gel com 15% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	23	0	0	0
Gel com 15% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	65	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	2	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	41	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	>300	0	0	0	0
Gel com 20% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	7	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	≥ 3,0 x10 <sup>6</sup>	1	0	0	0
Gel com 20% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0

AI- álcool isopropílico; AE - álcool etílico

No método de diluição (1:100000) após 48 h os todos os gels foram eficazes nas varias concentrações estudadas (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4.** Ensaio da eficácia dos conservantes em formulações com 0%, 10%, 15% e 20% de AI e AE pelo método de filtração (diluição 1:100000).

Veículo	Estirpes	UFC/ ml					
		Inóculo	0 h	48 h	7 dias	14 dias	28 dias
Água (controlo negativo)			0	0	0	0	0
Gel sem conservante (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	> 300	> 300	1	0	52
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	143	0	2	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	26	0	150	152	>300
AI	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	20	17	2	4	1
Gel sem conservante (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	>300	>300	200	200	50
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	>300	750	1	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	96	275	250	260	100
AE	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	>300	100	43	29	235
Gel com 10% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	150	1	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	106	0	0	2	8
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	44	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	18	17	17	12	2
Gel com 10% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	26	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	1	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	5	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	>300	9	0	0	0
Gel com 15% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	150	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	55	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	19	5	0	0	0
Gel com 15% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	>300	0	0	0	0
Gel com 20% AI (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	2,91 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	2,13 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	3,9 x10 <sup>7</sup>	15	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,1 x10 <sup>7</sup>	25	0	0	0	0
Gel com 20% AE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	4,43 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3,18 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,28 x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0

AI- álcool isopropílico; AE- álcool etílico

O álcool etílico foi mais eficaz quando comparado com o álcool isopropílico. Deste modo, o conservante escolhido foi o álcool etílico na concentração de 10% m/m na formulação, pois trata-se da menor concentração com maior eficácia antimicrobiana pelos dois métodos estudados, cumprindo assim as recomendações da norma ICH Q8(R2). Assim as formulações contendo 10%, 15% e 20% de álcool etílico cumprem os critérios A e B da Ph. Eur. pelo que os estudos prosseguiram com as formulações contendo menor quantidade de conservante.

Como promotor de permeação cutânea foi seleccionado mentol com base em dados da literatura (Vitorino *et al.*, 2013b).

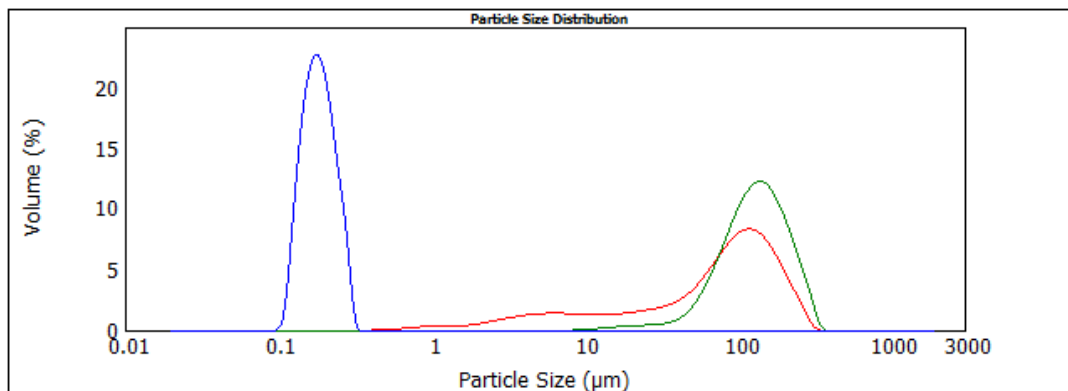
### 4.3. Preparação e caracterização da formulação final

A preparação de 3 lotes de 1kg da formulação final foi realizada de acordo com o esquema da Figura 4.1. Após preparação, o gel apresenta-se com aspecto homogéneo, de cor branco-pérola devido à presença das NLS (Figura 4.7) e com um valor de pH de  $5,5\pm 0,5$ . O produto foi embalado em bisnagas de alumínio de 100 g e submetido a estudos de estabilidade segundo as recomendações ICH Q1A (R2), tal como descrito na Secção 3.5.



**Figura 4.7.** Aspecto do gel após preparação.

Após formação do gel houve um aumento do diâmetro médio das partículas da formulação NLS, o qual pode ser atribuído a uma interacção entre os componentes do gel e as partículas promovendo a agregação das partículas (Figura 4.8). Note-se que a gelificação da HPMC em água (gel sem NLS) origina um sistema que apresenta valores de  $D_{10}=64,34\ \mu\text{m}$ ,  $D_{50}=130,55\ \mu\text{m}$  e de  $D_{90}=231,58\ \mu\text{m}$ . Esta distribuição influencia decisivamente as distribuições granulométricas das formulações contendo nanopartículas, como que mascarando a população de nanopartículas correspondentes aos diâmetros iniciais de NLS. No estudo de Vitorino *et al.* (2013a), este fenómeno resultou num aumento do diâmetro médio das partículas e na diminuição da viscosidade do gel. No entanto, no presente estudo foi observado um aumento desta viscosidade. Estes resultados podem ser devidos às diferenças no tipo e nas quantidades de agentes gelificantes utilizados em ambos os estudos (Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 10 a 0,5%/HPMC a 2%). Para além disto, é importante salientar que a concentração de álcool etílico utilizada por aqueles autores foi muito superior (24% m/m) comparativamente à do presente estudo (10%). Como promotor de permeação cutânea foi utilizado a mentol a 0,1%.



**Figura 4.8.** Distribuição do diâmetro médio das partículas do gel determinadas por DLS imediatamente após a preparação. Gel sem NLS (linha verde); gel com NLS (linha vermelha), dispersão das NLS (linha azul).

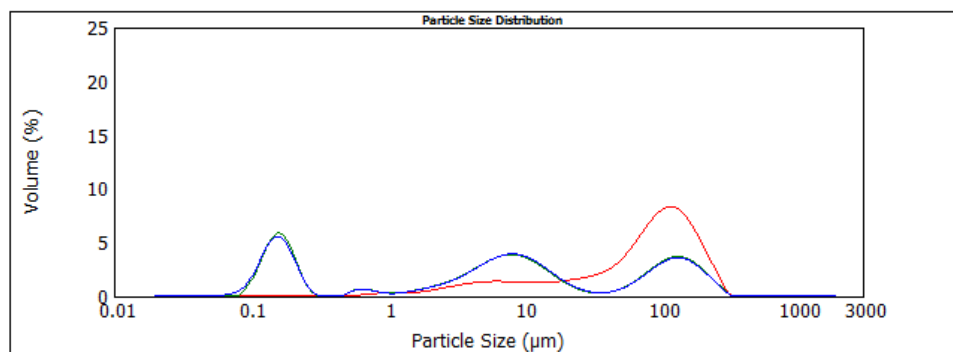
#### 4.4. Estabilidade da formulação final

##### 4.4.1. Características organolépticas

O aspecto das formulações manteve-se inalterado durante o ensaio de estabilidade, permanecendo branco-pérola ao longo de 12 meses.

##### 4.4.2. Distribuição do diâmetro médio das partículas

Após 1 mês a distribuição do diâmetro médio das partículas sofreu uma modificação considerável independentemente da temperatura de armazenamento, tornando-se claramente trimodal (Figura 4.9), aparecendo uma população de partículas correspondente ao diâmetro das NLS. Este facto levanta a hipótese da ocorrência de uma reorganização estrutural do próprio sistema gel-NLS durante este período, a qual decorre da competição pela água entre as cadeias de HPMC e a superfície das NLS estabilizadas por moléculas de agente emulsivo (Tween 80<sup>®</sup>). As cadeias do polímero têm maior capacidade de retenção de moléculas de água do que a superfície das nanopartículas e, ao fim de 1 mês, existirá menos água disponível para envolver as NLS. Deste modo, a estrutura evoluirá de um sistema gel-NLS homogéneo, com as nanopartículas retidas formando “domínios de agregados” com distribuição relativamente uniforme, tal como descrito por Vitorino *et al.* (2013a), para um sistema em que as NLS se encontrarão mais livres e dispersas no seio do gel hidratado, estrutura esta mais próxima das suspensões líquidas.



**Figura 4.9.** Distribuição dos diâmetros médio das partículas do gel final contendo NLS determinadas por DLS. Gel no início do ensaio de estabilidade (linha vermelha); Gel após um 1 mês a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  (linha verde); Gel após 1 mês a  $40\pm 2^\circ\text{C}$  (linha azul).

A modificação da distribuição granulométrica detectada ao fim de um mês manteve-se estável ao longo do restante tempo de estudo, em ambas as temperaturas estudadas, tal como está descrito na Tabela 4.5. Tal como acima descrito, salienta-se a existência de uma população de partículas de diâmetro  $>100 \mu\text{m}$  que tem origem na própria gelificação da HPMC.

**Tabela 4.5.** Distribuição do diâmetro médio das partículas ao longo do ensaio de estabilidade determinada com três lotes do gel final com NLS (Média $\pm$ DP; n=3).

Tempo (meses)	Temperatura	D <sub>10</sub> (µm)	D <sub>50</sub> (µm)	D <sub>90</sub> (µm)
0	--	5,69 $\pm$ 0,07	81,20 $\pm$ 0,08	180,59 $\pm$ 0,26
1	25°C	0,20 $\pm$ 0,14	9,03 $\pm$ 0,04	143,58 $\pm$ 0,04
	40°C	0,12 $\pm$ 0,28	6,85 $\pm$ 0,15	145,32 $\pm$ 0,12
3	25°C	0,11 $\pm$ 0,05	5,33 $\pm$ 0,01	91,40 $\pm$ 0,03
	40°C	0,15 $\pm$ 0,11	6,53 $\pm$ 0,02	84,15 $\pm$ 0,04
6	25°C	0,16 $\pm$ 0,72	7,01 $\pm$ 0,25	140,88 $\pm$ 0,11
	40°C	0,18 $\pm$ 0,63	6,76 $\pm$ 0,29	126,00 $\pm$ 0,15
12	25°C	0,16 $\pm$ 0,19	6,91 $\pm$ 0,24	131,50 $\pm$ 0,12

#### 4.4.3. pH e viscosidade

O pH das formulações manteve-se estável e ácido ( $5,51\pm 0,01$ ) ao longo do tempo do estudo, nas temperaturas estudadas.

Os resultados da viscosidade aparente obtidos sofreram as maiores variações durante o primeiro mês, independentemente das condições de armazenamento. Após este período inicial, apresentaram um

aumento da viscosidade, que se manteve estável ao longo do restante tempo de estudo (Tabela 4.6). Esta observação está relacionada com a diminuição do diâmetro médio das partículas após o primeiro mês. De facto, estudos anteriores demonstraram que quanto menor for o diâmetro médio das partículas maior será a viscosidade da formulação (Lippacher *et al.*, 2002).

**Tabela 4.6.** Valores de pH e de viscosidade aparente ao longo do ensaio de estabilidade determinados em três lotes do gel final com NLS (Média±DP; n=3).

Tempo (meses)	25±2°C/60±5%HR		40±2°C/75±5%HR	
	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)
0	5,51±0,01	11,70±0,20	5,51±0,01	11,70±0,20
1	4,39±0,01	19,70±0,40	4,10±0,02	19,60±0,18
3	4,46±0,01	21,70±0,10	4,39±0,01	18,60±0,15
6	4,62±0,01	23,80±0,22	4,42±0,01	17,80±0,50
12	4,39±0,01	22,60±0,33	n.d.	n.d.

n.d.= não determinado

#### 4.4.4. Controlo microbiológico

Os lotes foram microbiologicamente estáveis ao longo de 12 meses, pois os resultados obtidos estão de acordo com os limites aceites pela Ph. Eur..

#### 4.5. Estudos *in vivo*

##### 4.5.1. Human Repeated Insult Patch Test (HRIPT)

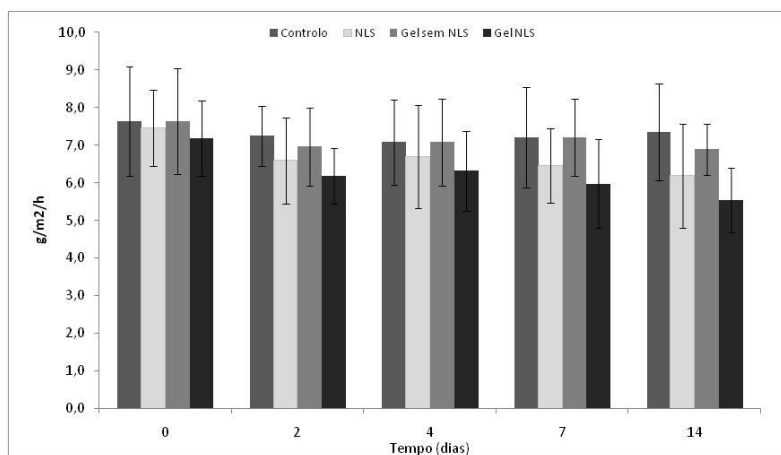
Durante o estudo a percentagem de reacções de indução foi de 0%, isto é, idêntica ao resultado obtido na reacção de provocação. Desta forma a aplicação repetida do produto não induziu qualquer sensibilização sobre a pele com a pele dos voluntários e a formulação apresentou uma boa compatibilidade cutânea.

##### 4.5.2. Efeitos biológicos

A retenção de água pelo estrato córneo é um dos factores cruciais para manter a pele macia e flexível pois esta exerce uma forte influência positiva na permeabilidade da pele às diferentes moléculas (Wissing e

Müller, 2002; Ramalho *et al.*, 2007). A Figura 4.10 mostra os resultados da PTEA obtidos após aplicações em voluntários humanos e durante 14 dias.

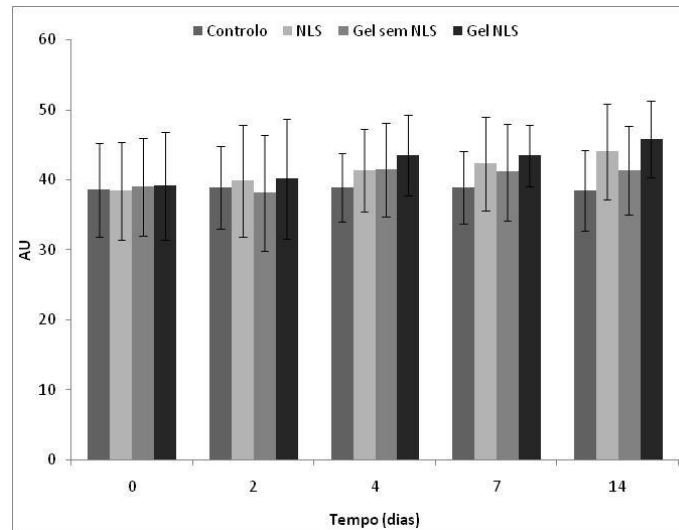
Apesar de não haver diferenças significativas entre as formulações nem entre estas e a zona de controlo os resultados mostram uma tendência na diminuição da PTEA do gel de NLS quando comparado com as restantes formulações o que está de acordo com a literatura (Wissing e Muller, 2002; Pardeike *et al.*, 2009).



**Figura 4.10.** Resultados da PTEA de água durante 14 dias (Média±DP; n=20). Controlo – região anatómica sem produto.

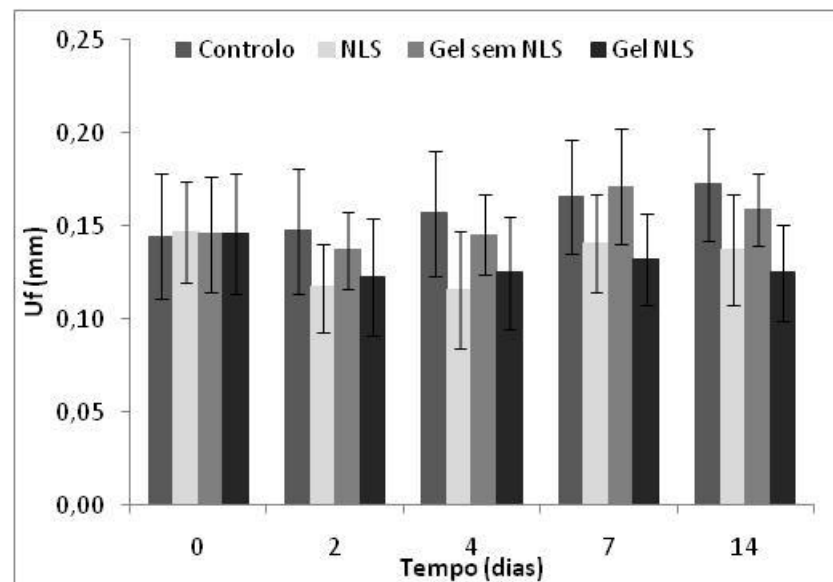
De igual modo, os resultados da capacitância epidérmica (hidratação superficial) não revelaram diferenças significativas, mas a mesma tendência foi observada (Figura 4.11). Os resultados ao fim de 14 de aplicação foram  $44,5 \pm 5,5$  UA para o gel com NLS e  $41,2 \pm 6,3$  UA para o gel sem NLS. Estes valores são superiores ao obtidos no tempo zero, isto é,  $38,5 \pm 6,7$  UA. Todas as formulações aumentaram a hidratação da pele face ao placebo.

A viscoelasticidade da pele foi avaliada pelos parâmetros correspondentes à distensão total da pele (Uf) e à recuperação total da pele (R), (Hyo *et al.*, 2008; Sungyeon *et al.*, 2007).



**Figura 4.11.** Resultados da capacitância epidérmica (Média±DP; n=20). Controlo – região anatómica sem produto. Controlo – região anatómica sem produto.

Durante os 14 dias de estudo, a distensão total diminuiu ligeiramente para o gel contendo NLS e para a suspensão de NLS quando comparados com o controlo não tratado e com os respectivos valores iniciais (Figura 4.12). O valor de Uf está relacionado com a distensão da pele, sendo que a aplicação de formulações tópicas deverá diminuir este parâmetro de modo a tornar a pele mais firme.



**Figura 4.12.** Valores de Uf medidos ao longo do estudo (Média±DP; n=20) Controlo – região anatómica sem produto.

A recuperação total da pele foi traduzida pelo resultados obtidos no parâmetro R (Tabela 4.7). Existe novamente uma melhoria do valor de R para o gel com NLS ( $0,005\pm 0,008$ ) quando comparado com as outras formulações e com o controlo. Todavia estas diferenças não são significativamente diferentes. Valores de R próximos de zero indicam uma pele mais firme e hidratada, pois este valor traduz a recuperação ou seja, a pele volta à sua posição original após aplicação duma força.

**Tabela 4.7.** Valores de R medidos ao longo do estudo (Média±DP; n=20).

	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 14</b>
Controlo	0,024±0,010	0,021±0,012	0,018±0,010	0,033±0,015	0,035±0,017
NLS	0,025±0,010	0,020±0,008	0,017±0,007	0,015±0,010	0,013±0,013
Gel sem NLS	0,024±0,011	0,022±0,010	0,016±0,008	0,036±0,015	0,038±0,012
Gel NLS	0,029±0,011	0,023±0,009	0,021±0,012	0,010±0,07	0,005±0,008

A análise geral dos resultados sugere a existência de um ligeiro efeito hidratante da formulação, que resulta da presença das NLS. Contudo, e contrariamente ao que tem sido publicado nesta área científica (Wissing *et al.*, 2001; 2002; Pardeike *et al.*, 2009), não foi observado um marcado efeito oclusivo das formulações de NLS. Apesar disto, o presente estudo não contraria a teoria que propõe a formação, à superfície da pele, de uma barreira de nanopartículas que impede a PTEA, aumentando a hidratação cutânea. A formação desta barreira depende igualmente de outros factores, tais como o diâmetro médio e a concentração das nanopartículas aplicadas, a cristalinidade e o ponto de fusão dos lípidos constituintes das NLS (Wissing *et al.*, 2001; 2002), factores estes que não foram tidos em consideração neste trabalho. O aumento dos teores em água e em lípidos na pele melhoram o estado geral da mesma, o que pode ser demonstrado pela redução dos valores de PTEA, pelo aumento da capacitância epidérmica e pela diminuição dos parâmetros de viscoelasticidade, sugerindo assim uma melhoria da função barreira do estrato córneo.

## 5. CONCLUSÕES

Foi possível produzir uma forma farmacêutica de aplicação tópica em gel, contendo NLS, tendo sido seleccionada a HPMC como polímero, o propilenoglicol como humectante e o álcool etílico como conservante. O mentol foi adicionado como promotor de permeação cutânea.

A incorporação das NLS num gel para aplicação tópica não interferiu nas características das mesmas, sendo que o gel desenvolvido manteve-se estável ao longo de 12 meses.

O gel com NLS assim produzido, demonstrou compatibilidade cutânea e ausência de potencial sensibilizante após aplicação sobre a pele humana *in vivo* em condições experimentais que envolvem a sua exposição exagerada (patch).

A aplicação da formulação de gel com NLS originou um ligeiro efeito hidratante claramente relacionado com a presença das nanopartículas lipídicas.

## **BIBLIOGRAFIA**

European Pharmacopoeia (Ph. Eur., 8th Ed.). Council of Europe, Strasbourg, 2014.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Stability testing of new drug substances and products step. ICH Topic Q1A (R2). 2003.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Pharmaceutical Development. ICH Topic Q8A (R2). 2009.

Fregert S, Bandmann HJ. International Contact Dermatitis Research Group patch testing. New York: Springer-Verlag 1975; 8-10.

Hyo SR, Young HJ, Sun OK, Kyoung CP, Sang WY. Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer. *Skin Research and Technol* 2008; 14:354–358.

Kang BC, Kim YE, Kim YJ, Chang MJ, Choi HD, Li K, Shin WG. Optimizing EEMCO guidance for the assessment of dry skin (xerosis) for pharmacies. *Skin Res Technol*. 2013 Jul 2.

Leveque JL, De Rigal I. In vivo measurement of the stratum corneum elasticity. *Bioeng. Skin* 1985; 1:13–23.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Investigations on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *Int J Pharm* 2000; 196:227-230.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2001; 214:9-12.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Semisolid SLN<sup>TM</sup> dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53:155–160.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: Rheological characterization. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 561–567.

Marzulli FN, Maibach HI. Contact allergy: predictive testing in man. *Contact Dermatitis* 1976; 2:1-17.

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharma* 2009; 366:170–184.

Ramalho A, Silva CL, Pais AACC, Sousa JJS. In vivo friction study of human skin: Influence of moisturizers on different anatomical sites. *Wear* 2007; 263:1044–1049.

Sekiguchi Y, Sawatari C, Kondo T. A gelation mechanism depending on hydrogen bond formation in regioselectively substituted O-methylcelluloses. *Carbohydr Polym* 2003; 53:145-153.

Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 83–90.

Sungyeon A, Seunghun K, Haekwang L, Seongjoon M, Ihseop C. Correlation between a Cutometers and quantitative evaluation using moire topography in age-related skin elasticity. *Skin Res Technol* 2007; 13:280–284.

Vitorino C, Alves L, Antunes FE, Sousa JJ, Pais AACC. Design of a dual nanostructured lipid carrier formulation based on physicochemical, rheological, and mechanical properties. *J Nanopart Res* 2013a; 15:1993. DOI 10.1007/s11051-013-1993-7.

Vitorino C, Almeida J, Gonçalves LM, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. *J Control Rel.* 2013b; 167:301–314.

Wissing SA, Lippacher A, Muller RH. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci* 2001; 52:313–324.

Wissing SA, Muller RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int J Pharm* 2002; 242:377–379.

Yilmaz E, Borchert H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema-An *in vivo* study. *Int J Pharma* 2006; 307:232–238.



## **CAPÍTULO 5**

### **DESENVOLVIMENTO DE GELES PARA APLICAÇÃO TÓPICA CONTENDO AINE NANOENCAPSULADOS**

## 1. INTRODUÇÃO

As preparações contendo AINE, disponíveis no mercado para administração tópica, promovem o alívio rápido da dor e a redução do processo inflamatório, sendo estes principais benefícios desta terapêutica. Por outro lado, as desvantagens do uso tópico de AINE, que limitam a sua utilização, são diversas, incluindo irritações cutâneas, razão pela qual não podem ser utilizados em tratamentos prolongados (Hadgraft e Lane, 2005). Para além disso, são menos eficazes quando comparados com o uso de AINE por via oral, devido à baixa permeação cutânea proporcionada pelas formulações convencionais que se encontram comercializadas (Pardeike *et al.*, 2009)

Estas desvantagens podem ser ultrapassadas pela associação dos AINE a sistemas transportadores de fármacos, que possibilitem o aumento da permeação cutânea e simultaneamente uma redução da toxicidade do mesmo (Borgia *et al.*, 2005). De entre as estratégias que têm sido estudadas destaca-se a utilização de NLS (nanopartículas lipídicas sólidas), incorporadas em veículos para administração tópica tais como loções, cremes e geles (Pardaike *et al.*, 2009)

As NLS são partículas constituídas por um núcleo lipídico sólido à temperatura ambiente e corporal, estabilizado por um ou mais tensoactivos. Geralmente os núcleos lipídicos são constituídos por triacilglicerois, acilglicerois, ácidos gordos, ceras e os tensoactivos mais utilizados compreendem os polissorbatos, sais biliare, lecitina, entre outros (Saupe e Rades, 2006). Constituem assim um veículo potencial para aplicação tópica cutânea de substâncias com actividade terapêutica e de substâncias utilizadas em produtos cosméticos (Castro *et al.*, 2009, Kumar *et al.*, 2007). As suas vantagens residem principalmente no facto destes sistemas nanoestruturados protegerem quimicamente as substâncias incorporadas. Devido à sua superfície específica elevada, as NLS possuem propriedades adesivas, com formação de um filme que contacta intimamente com a pele após aplicação cutânea (Souto *et al.*, 2007; Pardaike *et al.*, 2009), contribuindo para aumentar a permeação cutânea dos fármacos (Borgia *et al.*, 2005).

O objectivo deste capítulo é a incorporação das NLS contendo os AINE etofenamato e ibuprofeno (descritas no Capítulo 3), num gel para aplicação tópica constituído por HPMC a 2% (descrito no Capítulo 4), de modo a veicular e promover a permeação

cutânea destes fármacos, quando comparados com os medicamentos de referência existentes no mercado português.

## 2. MATERIAS

Os materiais utilizados estão descritos no Capítulo 3, Secção 2 e no Capítulo 4, Secção 2. Foram também utilizados as formulações comerciais Reumon<sup>®</sup> Gel (Bial - Portela & C<sup>a</sup>, S.A.) e Ozonol<sup>®</sup> (Omega Pharma Portuguesa, Unipessoal, Lda.).

## 3. MÉTODOS

### 3.1. Preparação das formulações

As formulações foram preparadas e acondicionadas de acordo com o método descrito no Capítulo 4, Secção 3.4 (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1.** Composição final do geles em estudo.

<i>Designação</i>	<i>Composição</i>	<i>Percentagem de fármaco</i>
GNLS Vaz	Descrita no Capítulo 4, Secção 3.4	--
GNLS Eto	GNLS Vaz + etofenamato	0,6%
GNLS Ibu	GNLS Vaz + ibuprofeno	0,3%

GNLS Vaz: gel contendo NLS vazias; GNLS Eto: gel de NLS contendo etofenamato; GNLS Ibu: gel de NLS contendo ibuprofeno.

#### 3.1.1. Escolha do agente humectante

Para selecção do agente humectante foram estudados a glicerina e o propilenoglicol, tendo sido realizado um estudo semi-quantitativo de solubilidade dos fármacos (ibuprofeno e etofenamato) nestas substâncias. Para tal, quantidades crescentes e rigorosamente pesadas, dos fármacos foram adicionadas a 1 g de cada um dos agentes humectantes. As misturas resultantes foram agitadas em vortex e a dissolução completa dos fármacos foi analisada por inspecção visual.

### **3.2. Caracterização físico-química**

O aspecto macroscópico de cada uma das formulações foi avaliada através das características organolépticas e utilizada como primeiro indicador de estabilidade. Foi também avaliado o comportamento das formulações sob centrifugação durante 5 min a 12000 rpm (Sigma 112 Microcentrifuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Alemanha).

#### **3.2.1. Eficácia microbiológica do conservantes**

O ensaio foi efectuado de forma análoga à descrita, para as formulações placebo, no Capítulo 4, Secção 3.2.4.

#### **3.2.2. Determinação do etofenamato e ibuprofeno por HPLC**

As amostras foram preparadas dissolvendo 1 g de gel em 20 ml de metanol, num balão volumétrico, com agitação em vortex por 3 durante 3 min, seguido de centrifugação a 4500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi doseado por HPLC, como descrito no Capítulo 3, Secção 3.1.8.

### **3.3. Estudos de estabilidade**

A estabilidade dos geles contendo NLS foi avaliada de acordo com a norma ICH Q1A(R2), tendo sido realizados estudos em tempo real, em que os lotes foram armazenados a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$  HR durante 12 meses, estudos em condições intermédias a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\%$  HR durante 6 meses e estudos acelerados, em que os lotes foram armazenados a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\%$  HR durante 6 meses. O plano de amostragem seguiu as recomendações da norma e os parâmetros avaliados foram: características organolépticas, doseamento dos fármacos, diâmetro médio das partículas, pH, propriedades reológicas e viscosidade e controlo microbiológico.

### **3.4. Estudos *in vitro* de absorção percutânea**

O objectivo deste estudo foi avaliar a libertação e a permeação dos fármacos a partir do gel de NLS contendo os dois AINE descritos na Tabela 5.1. Foram utilizados como medicamentos de referência o Reumon<sup>®</sup> Gel a 5% (Gel referência Eto) e Ozonol<sup>®</sup> a 5% (Gel referência Ibu).

### **3.4.1. Estudos de libertação**

A libertação de etofenamato e do ibuprofeno a partir dos geles de NLS foi estudada utilizando células de difusão de Franz, conforme descrito no Capítulo 3, Secção 3.3.1. e comparada com as formulações de referência. A quantidade de amostra aplicada no compartimento dador foi de 200 mg.

### **3.4.2. Estudos de permeação cutânea**

A permeação do etofenamato e do ibuprofeno foi estudada utilizando células de difusão de Franz, conforme descrito no Capítulo 3, Secção 3.3.2. e comparada com as formulações de referência. A quantidade de amostra aplicada no compartimento dador foi de 200 mg.

### **3.4.3. Ensaio de viabilidade celular**

O ensaio de viabilidade celular foi efectuado de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 3, Secção 3.3.3., com as formulações descritas na Tabela 5.1 e com as formulações comerciais de referência.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Preparação das formulações e escolha do agente humectante**

Os agentes humectantes são normalmente utilizados em formas farmacêuticas semi-sólidas para aplicação cutânea, com a finalidade de minimizar a evaporação da água da formulação durante a armazenagem e a aplicação. De entre os agentes humectantes mais utilizados destacam-se os poliálcoois como a glicerina, o propilenoglicol e o sorbitol que, pelas suas características físico-químicas podem actuar como promotores de permeação cutânea (Betageri e Prabhus, 2007; Lane, 2013). A sua afinidade para os fármacos em estudo, determinada através de um ensaio de solubilidade semi-quantitativo, foi tida em consideração na selecção do agente humectante para a formulação final (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Solubilidade do etofenamato e do ibuprofeno nos agentes humectantes.

Humectante (1 g)	Fármaco	Quantidade de fármaco adicionada (mg)	Aspecto da mistura
Glicerina	Etofenamato	5	Dissolvido
Propilenoglicol		5	
Glicerina		10	Não dissolvido
Propilenoglicol		10	
		20	
		30	
	60		
Propilenoglicol	80	Dissolvido	
	Glicerina		5
	Propilenoglicol		5
	Glicerina		10
Propilenoglicol	Ibuprofeno	10	Dissolvido
Glicerina		20	
Propilenoglicol		20	Não dissolvido
		30	
		60	
		80	

Dissolvido – mistura límpida sem cristais ou precipitados de fármaco; Não dissolvido – presença de cristais ou precipitado de fármaco.

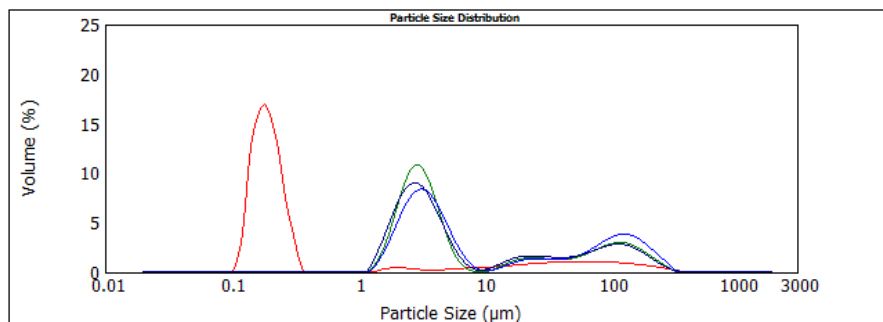
O agente humectante com maior capacidade de solubilização dos fármacos foi o propilenoglicol, tendo este sido seleccionado para a formulação final. Esta escolha é também suportada pelos estudos de actividade do propilenoglicol como co-solvente em formulações tópicas de fármacos lipófilos (Herkenne *et al.*, 2008). Estes autores observaram que a penetração do estrato córneo pelo propilenoglicol é proporcional à sua concentração, o que, por sua vez, afecta a solubilidade dos fármacos lipófilos na barreira cutânea, designadamente o ibuprofeno.

#### 4.2. Características organolépticas

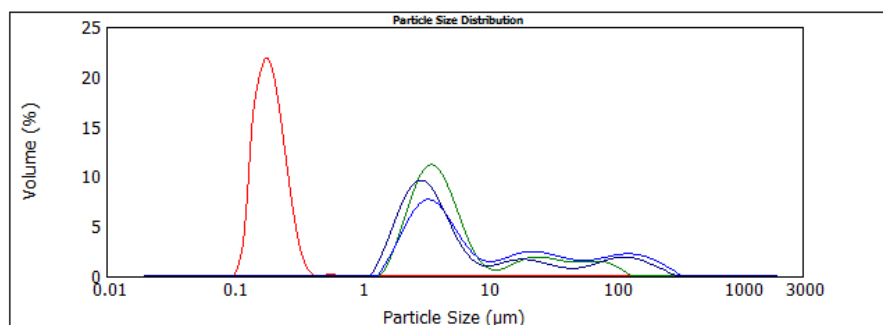
A formulações preparadas, com o sem fármaco, apresentaram coloração branco-pérola, e após centrifugação mantiveram um aspecto de gel, opaco, homogéneo sem separação de fases.

#### 4.2.1. Diâmetro médio das partículas

O diâmetro médio das partículas foi determinado para as várias formulações em estudo e comparado com as correspondentes suspensões de NLS (Figuras 5.1 e 5.2).



**Figura 5.1.** Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de etofenamato, determinadas por DLS após preparação. Suspensão de NLS (linha vermelha); GNLS com Eto (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III linha verde).



**Figura 5.2.** Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de ibuprofeno, determinadas por DLS após preparação. Suspensão de NLS (linha vermelha); GNLS Ibu (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III, linha verde).

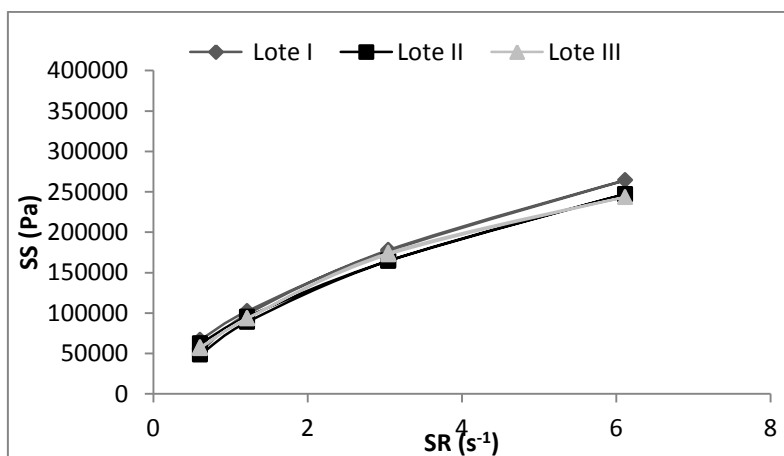
A gelificação da suspensão de NLS origina uma alteração da distribuição granulométrica com o aumento do diâmetro médio das partículas. Após preparação os três lotes de gel apresentam uma distribuição granulométrica reprodutível, com cerca de 80% das partículas <10 µm. Tal como observado nos estudos de desenvolvimento realizados com NLS vazias (Capítulo 4) a população correspondente ao diâmetro inicial das NLS desaparece após gelificação confirmando novamente os resultados de Vitorino

*et al.* (2013a; 2013b) assim como os fenômenos de interação entre o agente gelificante e as nanopartículas descritos por estes autores.

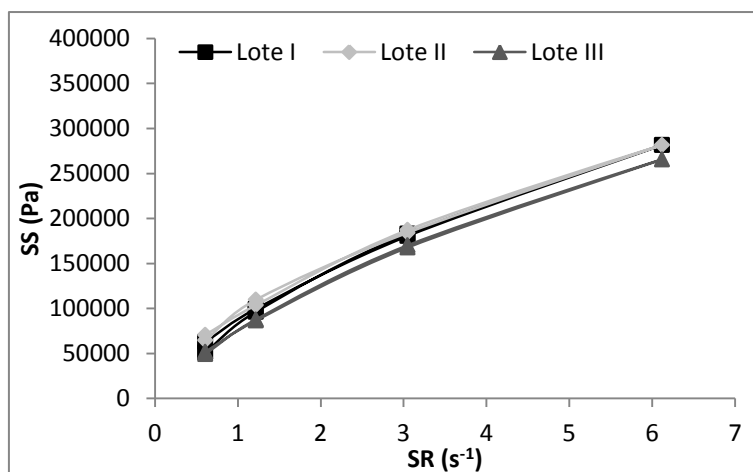
#### 4.2.2. pH e viscosidade

Após preparação as formulações apresentam valores médios de pH de  $4,4 \pm 0,1$  para os lotes de GNLS Ibu e de  $5,6 \pm 0,1$  para os lotes de GNLS Eto.

Os perfis reológicos dos gels após preparação encontram-se as Figuras 5.3 e 5.4.



**Figura 5.3.** Perfil reológico dos gels de NLS com etofenamato, após preparação.



**Figura 5.4.** Perfil reológico dos gels de NLS com ibuprofeno, após preparação.

Os resultados mostram que há reprodutibilidade entre lotes, os dois gels apresentam um comportamento pseudoplástico e que o polímero recupera facilmente a sua estrutura

após remoção da força aplicada não havendo histerese. Este comportamento é o ideal para aplicação tópica pois quando se aplica uma força a viscosidade diminui aumentando a espalhabilidade da formulação.

#### 4.2.3. Eficácia microbiológica do conservante

Tal como acima descrito (Capítulo 4) o agente conservante seleccionado para o GNLS Vaz foi o álcool etílico a 10%. Após incorporação dos fármacos a sua eficácia foi novamente avaliada nesta concentração e também a 15% (Tabelas 5.3 a 5.5).

**Tabela 5.3.** Ensaio da eficácia do conservante nas formulações em estudo, com 0%, 10% e 15% de álcool etílico, pelo método de espalhamento directo.

Veículo	Estirpes	UFC/ ml					
		Inóculo	0 h	48 h	7 dias	14 dias	28 dias
<b>Água</b> (controlo negativo)			0	0	0	0	0
<b>GNLS Eto sem conservante</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	> 300	9	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	> 300	200	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	150	> 300	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>GNLS Ibu sem conservante</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	50	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	> 300	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>GNLS Eto com 10% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	17	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	156	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	200	0	0	0
<b>GNLS Ibu com 10% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	100	0	0	0
<b>GNLS Eto com 15% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	37	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0
<b>GNLS Ibu com 15% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0

Após 48 h os geles contendo álcool etílico foram eficazes em ambas as concentrações testadas. No entanto, às 48 h a eficácia do álcool etílico a 10% foi ligeiramente menor para o *A. niger*. Os resultados foram idênticos quando se utilizou o método de filtração na diluição 1:100 (Tabela 5.4). Na diluição de 1:100000 o conservante apresentou igual eficácia em ambas as concentrações (Tabela 5.5).

**Tabela 5.4.** Ensaio da eficácia do conservante nas formulações em estudo, com 0%, 10% e 15% de álcool etílico com 0%, 10% e 15% de álcool etílico, pelo método de filtração diluição 1:100).

Veículo	Estirpes	UFC/ ml					
		Inóculo	0 h	48 h	7 dias	14 dias	28 dias
<b>Água</b> (controlo negativo)			0	0	0	0	0
<b>GNLS Eto sem conservante</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	300	250	40	1	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>GNLS Ibu sem conservante</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	30	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	> 300	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>GNLS Eto com 10% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	222	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	150	0	0	0
<b>GNLS Ibu com 10% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	1	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	20	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	19	0	0	0
<b>GNLS Eto com 15% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	65	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	2	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	41	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0
<b>GNLS Ibu com 15% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	250	0	0	0	0

Após 48 horas com o método de diluição (1:100) os geles com álcool etílico a 15% foram eficaz nas 4 estirpes testadas.

**Tabela 4.5.** Ensaio da eficácia do conservante nas formulações em estudo, com 0%, 10% e 15% de álcool etílico com 0%, 10% e 15% de álcool etílico, pelo método de filtração (diluição 1:100000).

Veículo	Estirpes	UFC/ ml					
		Inóculo	0 h	48 h	7 dias	14 dias	28 dias
<b>Água</b> (controlo negativo)			0	0	0	0	0
<b>GNLS Eto sem conservante</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	> 300	200	200	50
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	> 300	750	1	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	96	275	250	260	100
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	100	43	29	235
<b>GNLS Ibu sem conservante</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	> 300	2	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	250	2	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	150	100	129	153	150
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	200	40	10	44	200
<b>GNLS Eto com 10% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	26	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	1	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	5	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	9	0	0	0
<b>GNLS Ibu com 10% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	125	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	150	2	0	0	0
<b>GNLS Eto com 15% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	> 300	0	0	0	0
<b>GNLS Ibu com 15% de álcool etílico</b> (n=2)	<i>P. aeruginosa</i>	3,2x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	4,4x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	43	0	0	0	0

As formulações estudadas contendo 10% e 15% de álcool etílico cumprem os critérios de aceitação A e B da Ph. Eur. (5.1.3.), para preparações tópicas e locais, pelo que os estudos prosseguiram com as formulações contendo menor quantidade de conservante.

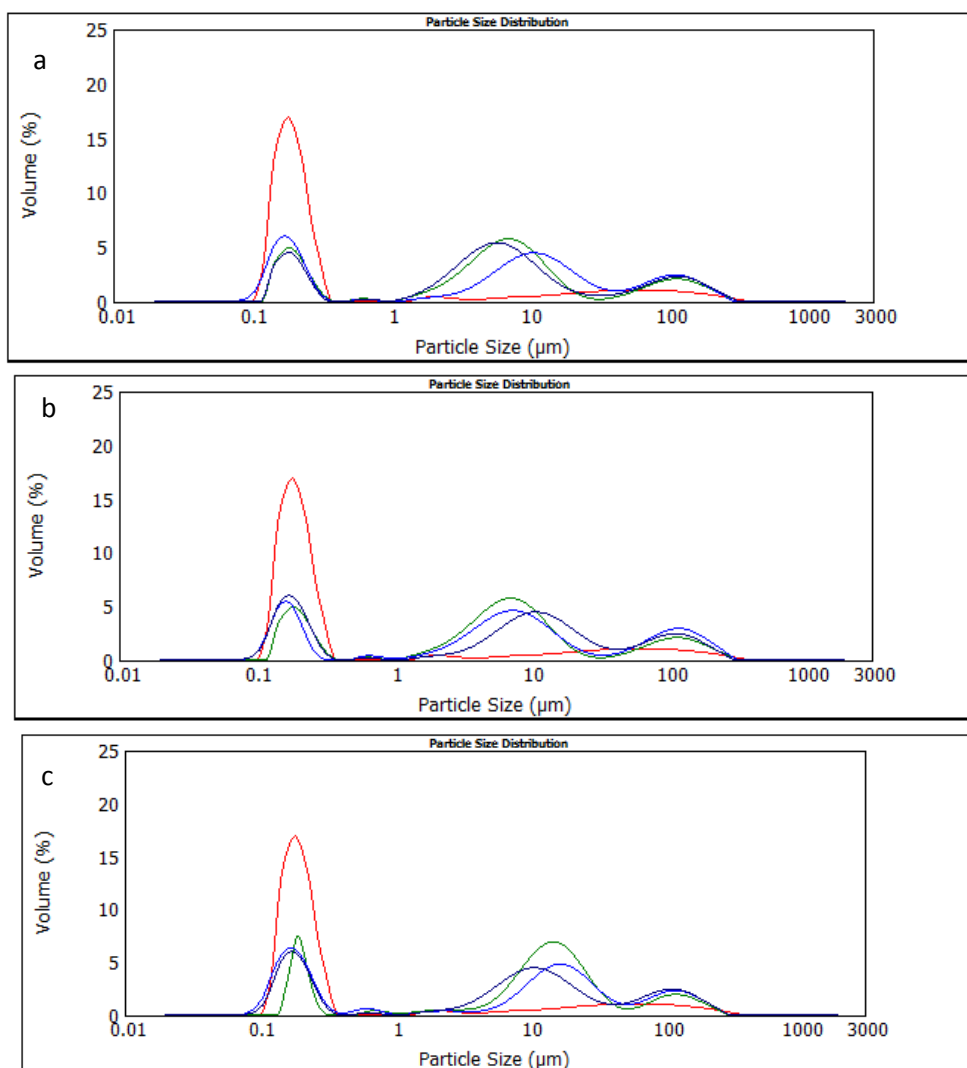
### 4.3. Estudos de estabilidade

#### 4.3.1. Características organolépticas

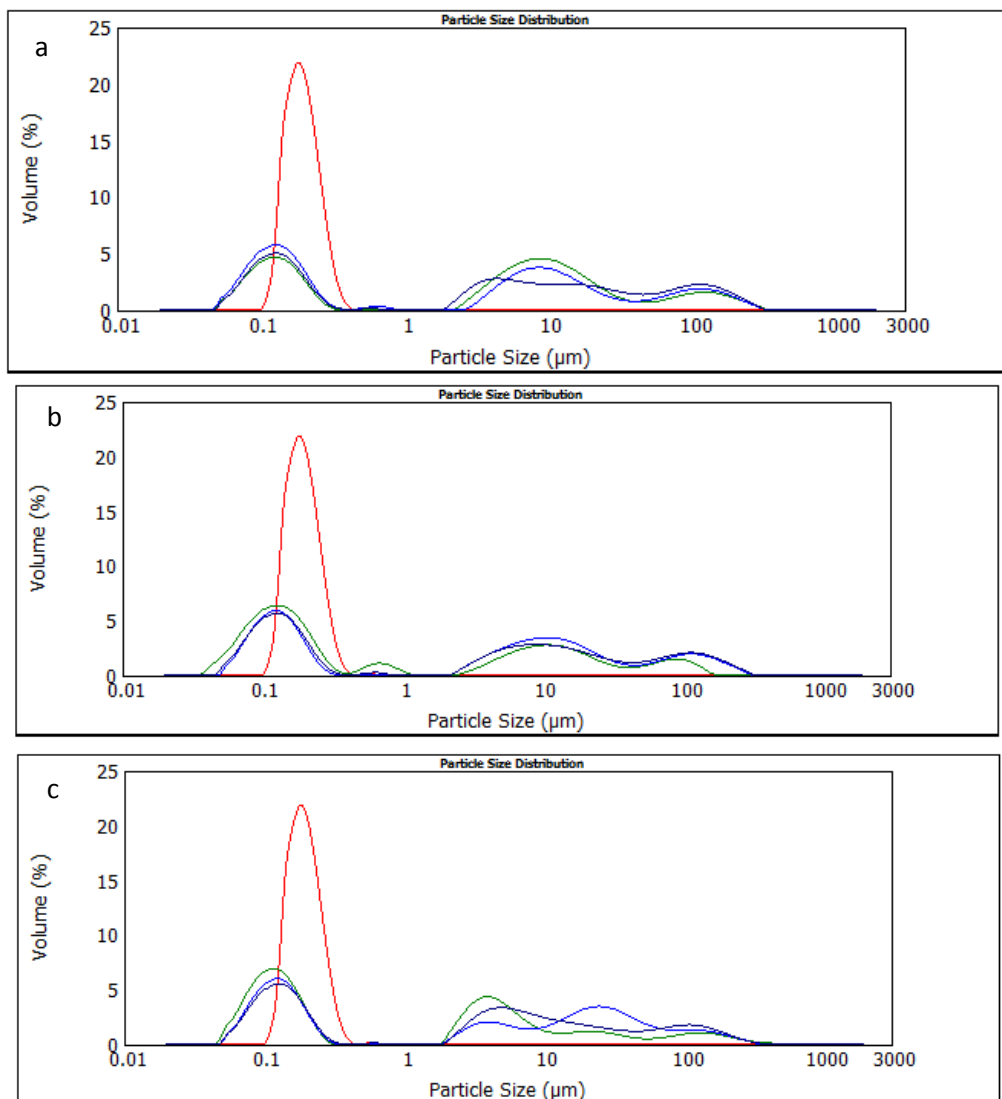
O aspecto das formulações manteve-se constante, gel, opaco, homogéneo de cor branco-pérola ao longo de toda a duração do estudo.

### 4.3.2. Diâmetro médio das partículas e distribuição granulométrica

De um modo geral os geles contendo ambos os fármacos manifestaram um comportamento idêntico ao anteriormente observado com o GNLS Vaz (Capítulo 4). De igual modo, após 1 mês a distribuição do diâmetro médio das partículas sofreu uma modificação aparecendo uma população de nanopartículas correspondente ao diâmetro inicial das NLS não incorporadas no gel (Figura 5.5 e 5.6). Estes resultados indicam que a incorporação dos fármacos não interferiu na estabilidade física do sistema.



**Figura 5.5.** Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de etofenamate, determinadas por DLS após 30 dias de armazenamento. a)  $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\text{HR}$ ; b)  $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\text{HR}$  e c)  $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{HR}$ . Suspensão de NLS (linha vermelha); gel contendo NLS com etofenamate (Lote I, linha azul clara; Lote II, linha azul escura; Lote III, linha verde).



**Figura 5.6.** Distribuição do diâmetro médio das partículas das formulações de ibuprofeno, determinadas por DLS após 30 dias de armazenamento. a)  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\text{HR}$ ; b)  $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\text{HR}$  e c)  $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{HR}$ . Suspensão de NLS (linha vermelho); gel contendo NLS com ibuprofeno (Lote I, linha azul clara; Lote II linha azul escura; Lote III, linha verde).

Nas Tabelas 5.6 e 5.7 estão indicados os valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  para as formulações ao longo dos 12 meses de armazenamento. Os resultados obtidos confirmam as tendências observadas nos histogramas das Figuras 5.5 e 5.6. Após um mês, a formulação GNLS Eto mostrou uma diminuição de  $D_{10}$ , que se manteve estável no restante período estudo e independentemente da temperatura, provavelmente relacionada com a alteração estrutural do gel discutida no Capítulo 4. Relativamente aos valores de  $D_{50}$  registaram-se apenas variações nas amostras armazenadas em condições

intermédias ou aceleradas, com aumento do diâmetro médio das partículas aos 6 meses. Esta variação foi mais acentuada nas amostras mantidas a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\%\text{HR}$ . Finalmente para todas as temperaturas, os valores de  $D_{90}$  sofreram um aumento até aos três meses tempo a partir do qual não se registou um aumento significativo. É importante recordar que nestas formulações o valor de  $D_{90}$  esta associado à própria gelificação da HPMC.

**Tabela 5.6.** Distribuição do diâmetro médio das partículas ao longo do estudo para os GNLS Eto (Média±DP; n=3).

Tempo (meses)	Temperatura	$D_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
0	--	$2,25\pm 0,39$	$4,22\pm 0,32$	$118,47\pm 16,46$
1	$25^{\circ}\text{C}$	$0,18\pm 0,02$	$7,08\pm 1,69$	$108,23\pm 4,30$
	$30^{\circ}\text{C}$	$0,17\pm 0,02$	$7,14\pm 0,86$	$113,72\pm 12,23$
	$40^{\circ}\text{C}$	$1,01\pm 0,03$	$13,39\pm 1,94$	$126,45\pm 11,87$
3	$25^{\circ}\text{C}$	$0,20\pm 0,04$	$7,88\pm 0,91$	$150,77\pm 1,83$
	$30^{\circ}\text{C}$	$0,22\pm 0,02$	$2,33\pm 2,79$	$147,12\pm 4,46$
	$40^{\circ}\text{C}$	$7,74\pm 1,06$	$24,99\pm 3,10$	$133,19\pm 10,59$
6	$25^{\circ}\text{C}$	$0,19\pm 0,03$	$7,94\pm 0,94$	$149,47\pm 6,16$
	$30^{\circ}\text{C}$	$0,24\pm 0,07$	$10,69\pm 2,42$	$132,34\pm 16,43$
	$40^{\circ}\text{C}$	$4,45\pm 1,47$	$30,15\pm 2,29$	$140,30\pm 15,05$
12	$25^{\circ}\text{C}$	$0,50\pm 0,03$	$6,71\pm 0,20$	$141,50 \pm 0,12$

No que diz respeito às formulações de GNLS Ibu o seu comportamento foi idêntico ao observado com a formulação de etofenamato (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7.** Distribuição do diâmetro médio das partículas ao longo do estudo para os GNLS Ibu (Média±DP; n=3).

Tempo (meses)	Temperatura	$D_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )
0	--	$2,25\pm 0,22$	$4,80\pm 0,11$	$106,12\pm 13,71$
1	$25^{\circ}\text{C}$	$0,10\pm 0,01$	$5,88\pm 0,66$	$97,56\pm 12,09$
	$30^{\circ}\text{C}$	$0,10\pm 0,02$	$7,09\pm 2,54$	$96,84\pm 8,02$
	$40^{\circ}\text{C}$	$0,20\pm 0,01$	$4,02\pm 1,43$	$71,99\pm 19,41$
3	$25^{\circ}\text{C}$	$0,16\pm 0,03$	$7,46\pm 0,93$	$147,76\pm 9,70$
	$30^{\circ}\text{C}$	$0,24\pm 0,07$	$12,23\pm 2,34$	$142,12\pm 10,92$
	$40^{\circ}\text{C}$	$0,24\pm 0,31$	$11,80\pm 5,44$	$140,12\pm 4,04$
6	$25^{\circ}\text{C}$	$0,19\pm 0,03$	$8,52\pm 2,02$	$145,78\pm 9,32$
	$30^{\circ}\text{C}$	$0,19\pm 0,03$	$10,67\pm 3,16$	$131,95\pm 7,29$
	$40^{\circ}\text{C}$	$0,20\pm 0,05$	$17,93\pm 6,01$	$141,92\pm 7,82$
12	$25^{\circ}\text{C}$	$0,18\pm 0,03$	$9,90\pm 1,30$	$141,50\pm 0,12$

### 4.3.3. pH e Viscosidade

Na Tabela 5.8 são apresentados os valores de pH e viscosidade de GNL Eto ao longo do tempo, pelos quais se constata que o pH se mantém estável nos 12 meses de armazenamento. No que respeita à viscosidade aparente, as formulações mantidas a  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{HR}$  e a  $30\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{HR}$  apresentaram um ligeiro aumento após 1 mês o que está de acordo com as alterações verificadas no diâmetro médio das partículas neste período e corrobora os dados descritos na literatura (Lippacher *et al.*, 2002). Ao fim de 12 meses, a  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{HR}$ , ocorreu uma diminuição da viscosidade aparente que pode estar relacionada com um aumento simultâneo no valor de  $D_{10}$ . No que respeita à viscosidade dos lotes armazenados a  $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%\text{HR}$ , esta manteve-se inalterada durante o ensaio de estabilidade.

**Tabela 5.8.** Estabilidade de GNLS Eto durante 12 meses de armazenamento (Média±DP; n=3).

Tempo (meses)	25±2°C/60±5% HR		30±2°C/65±5%HR		40±2°C/75±5%HR	
	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)
0	5,6±0,1	41,13±1,8	5,6±0,1	41,13±1,8	5,6±0,1	41,13±1,8
1	5,6±0,1	46,86±3,2	5,4±0,1	46,13±4,3	5,4±0,1	38,60±4,4
3	5,6±0,1	43,13±5,8	5,5±0,8	40,46±8,4	5,5±0,1	38,03±2,4
6	5,4±0,1	42,40±6,5	5,5±0,1	43,46±7,8	5,4±0,1	38,73±11,1
12	5,1±0,2	36,96±2,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.= não determinado

Na Tabela 5.9 é possível observar que o pH e a viscosidade aparente das formulações GNLS Ibu não sofreram alterações ao longo do tempo em estudo, nas várias temperaturas estudadas. As diferenças numéricas observadas nos caracteres organolépticos, designadamente o aspecto (Tabela 5.8), não são significativas. As formulações mantiveram-se com aspecto de gel homogéneas de cor branco-pérola.

**Tabela 5.9.** Estabilidade GNLS Ibu durante 12 meses de armazenamento (Média±DP; n=3).

Tempo (meses)	25±2°C/60±5%HR		30±2°C/65±5%HR		40±2°C/75±5%HR	
	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)	pH	Viscosidade aparente (Pa.s)
0	4,4±0,1	42,13±2,3	4,4±0,1	42,13±2,3	4,4±0,1	42,13±2,3
1	4,5±0,1	46,00±7,2	4,4±0,1	45,13±3,9	4,4±0,1	47,20±4,2
3	4,4±0,1	45,93±12,5	4,3±0,1	41,23±4,1	4,1±0,6	37,86±8,2
6	4,4±0,1	38,60±3,7	4,4±0,1	34,46±2,9	4,4±0,1	34,20±2,0
12	4,4±0,1	30,60±24,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.= não determinado

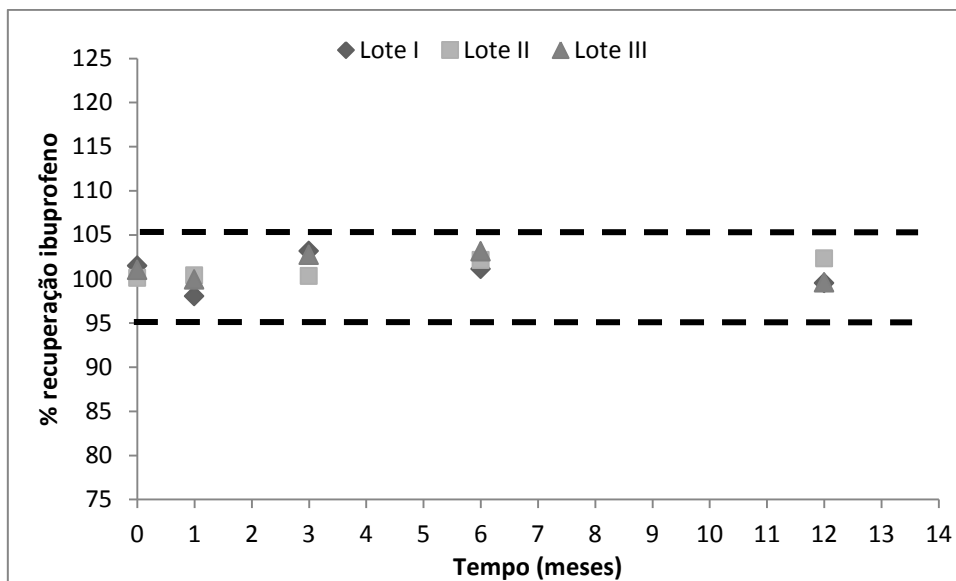
#### 4.3.4. Controlo microbiológico

Os lotes foram microbiologicamente estáveis ao longo de 12 meses, pois os resultados obtidos estão de acordo com os limites aceites pela Ph. Eur.

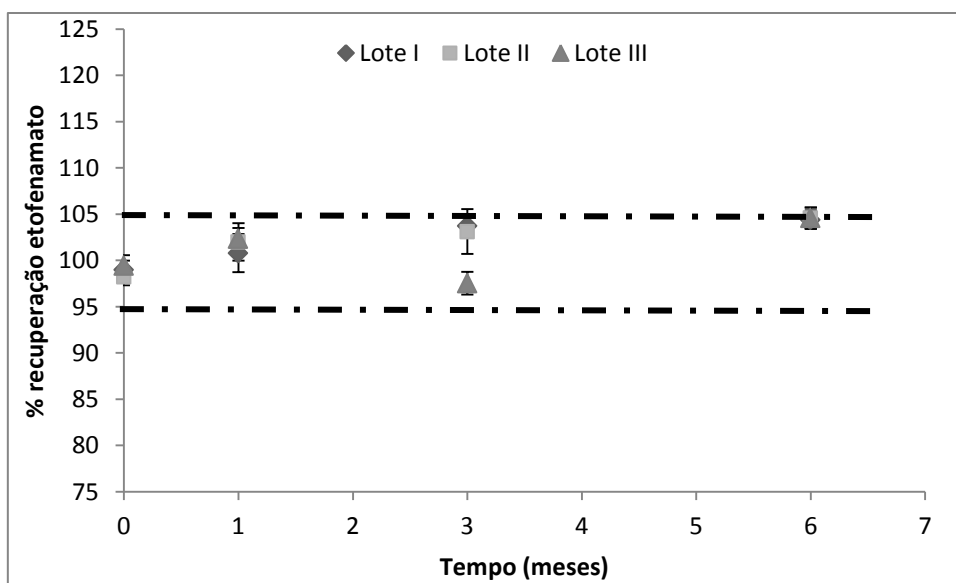
#### 4.3.5. Quantificação dos fármacos

Nas Figuras 5.7 a 5.12 estão apresentadas as percentagens de recuperação ao longo dos 12 meses de armazenamento nas 3 temperaturas do ensaio, do etofenamato e do ibuprofeno nas formulações em estudo.

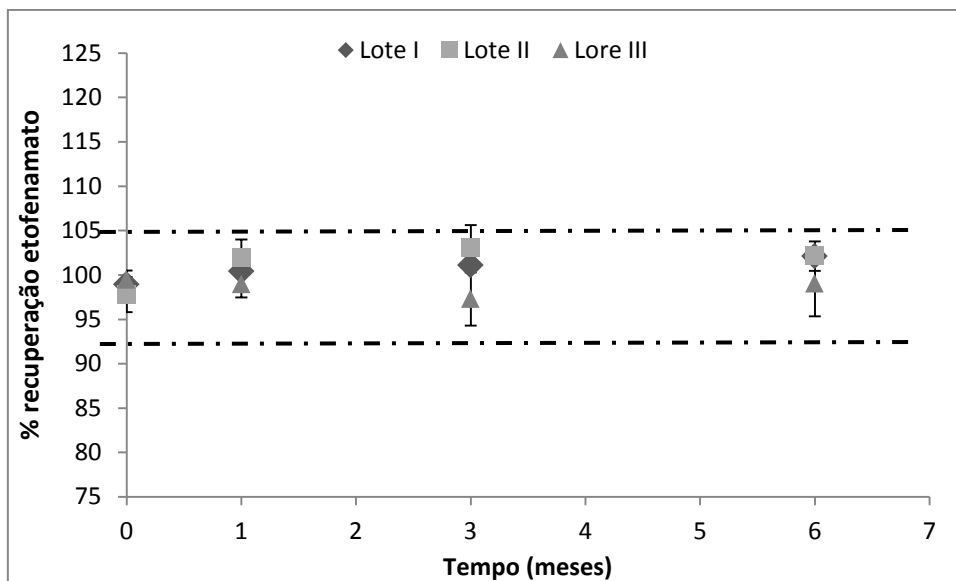
As percentagens de etofenamato e ibuprofeno nas formulações armazenadas mantiveram-se estáveis ao longo dos 12 meses de estudo.



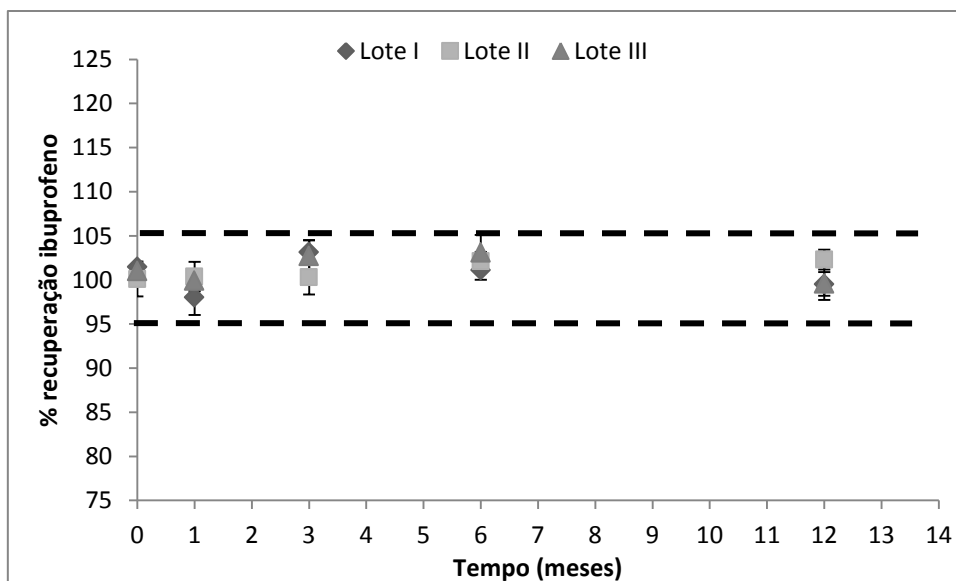
**Figura 5.7.** Percentagem de recuperação do etofenamato nas formulações armazenadas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{HR}$  (Média $\pm$ DP; n=3).



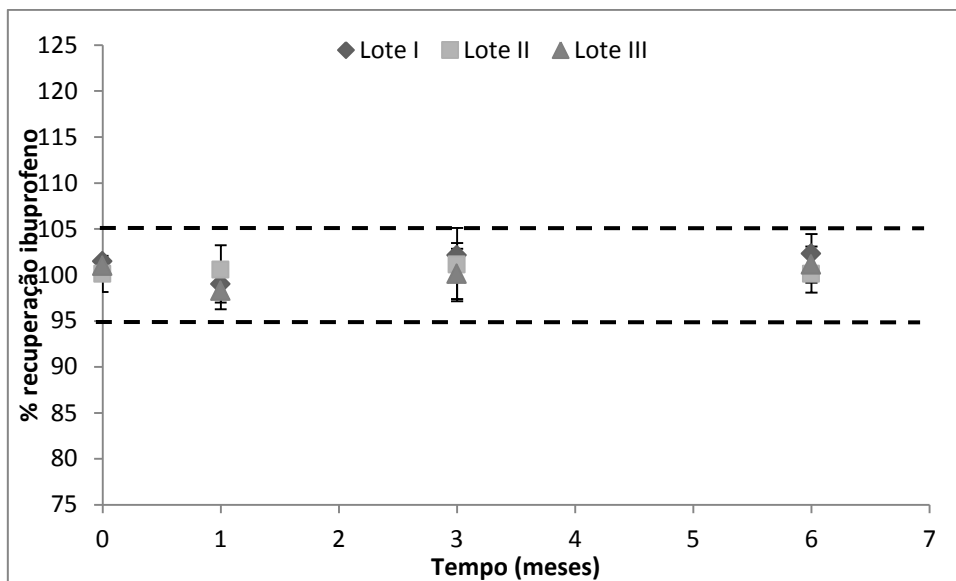
**Figura 5.8.** Percentagem de recuperação do etofenamato nas formulações armazenadas a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{HR}$  (Média $\pm$ DP; n=3).



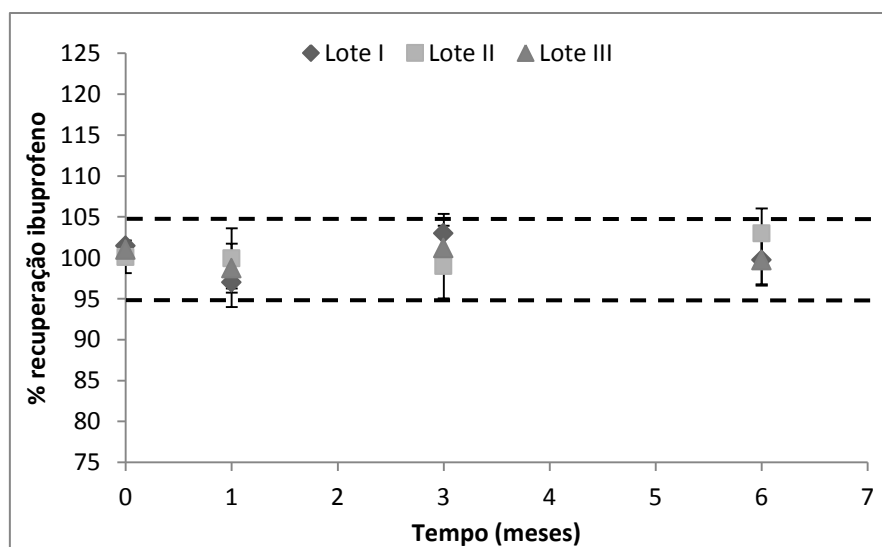
**Figura 5.9.** Percentagem de recuperação do etofenamato nas formulações armazenadas a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\%$  HR (Média $\pm$ DP; n=3).



**Figura 5.10.** Percentagem de recuperação do ibuprofeno nas formulações armazenadas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ HR (Média $\pm$ DP; n=3).



**Figura 5.11.** Percentagem de recuperação do ibuprofeno nas formulações armazenadas a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{HR}$  (Média $\pm$ DP; n=3).



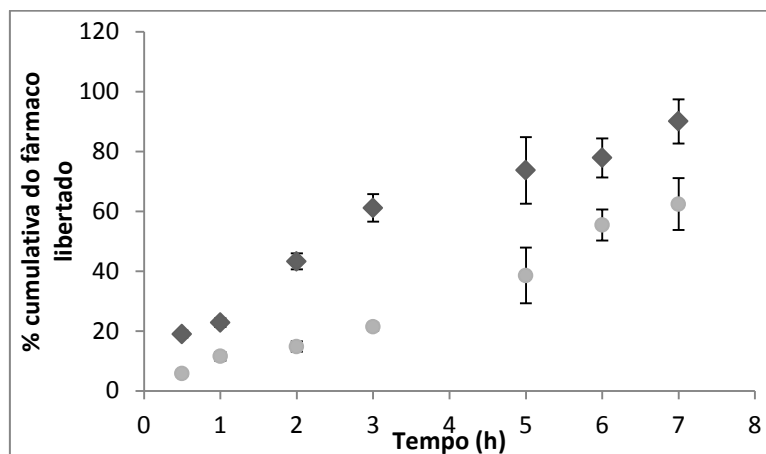
**Figura 5.12.** Percentagem de recuperação do ibuprofeno nas formulações armazenadas a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{HR}$  (Média $\pm$ DP; n=3).

#### 4.4. Estudos *in vitro* de absorção cutânea

Os estudos *in vitro* de absorção cutânea foram efectuados comparando os geles de NLS contendo AINE com os geles de referência.

#### 4.4.1. Liberação dos fármacos

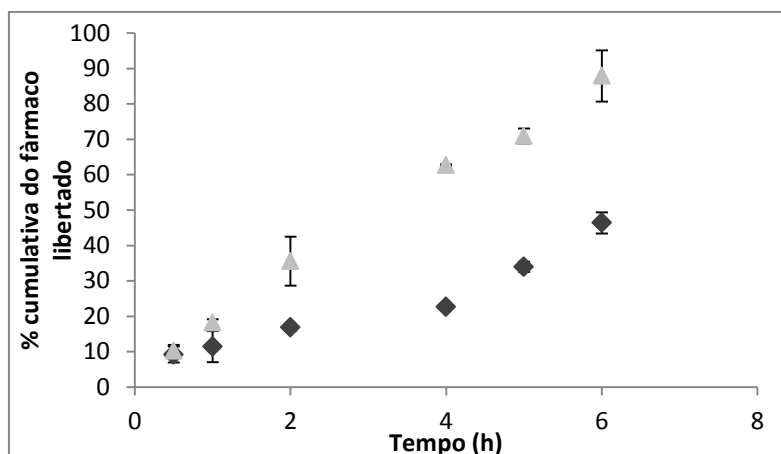
As Figuras 5.13 e 5.14 mostram a percentagem de etofenamato e de ibuprofeno cedida ao longo do ensaio de libertação dos geles de NLS através da membrana Tuffryn<sup>®</sup>.



**Figura 5.13.** Perfis de libertação do GNLS Eto (◆) e do gel de referência (●) através da membrana Tuffryn<sup>®</sup> (Média±DP; n=6).

Após 6h a libertação do etofenamato das duas formulações foi de 90% para o GNLS Eto e de 62% para o gel de referência. A análise dos resultados mostra que os dois geles têm perfis de libertação de ordem zero, com diferenças significativa entre eles ( $p < 0,05$ ).

A diferença na libertação do fármaco entre as duas formulações é devida ao facto dos geles terem características diferentes. O gel com NLS tem uma viscosidade inferior relativamente ao gel de referência, facilitando a migração do fármaco através da formulação (Kogan e Gart, 2006, Trotta *et al.*, 2003). Por outro lado, os excipientes do próprio gel poderão influenciar nos perfis de libertação. No gel de NLS a presença de proprilenoglicol e de álcool etílico, por terem grande afinidade para a fase receptora (etanol:água; 40:60), poderão ter aumentado a difusão a partir deste sistema (Dias *et al.*, 2007a, 2007b).

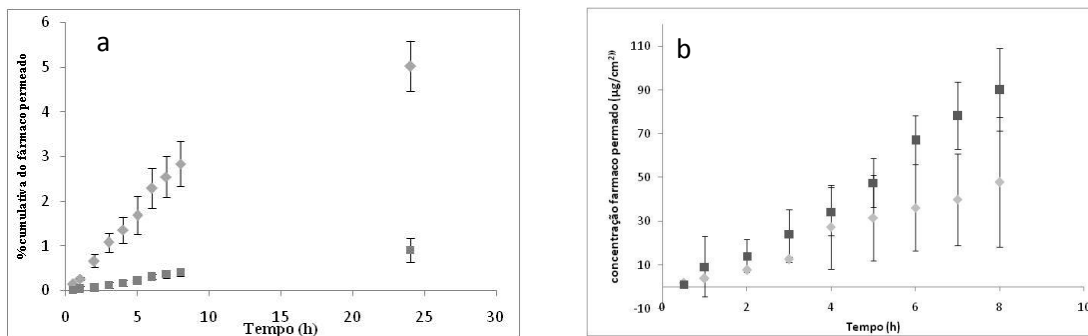


**Figura 5.14.** Perfis de liberação do GNLS Ibu (▲) e do gel de referência (◆) através da membrana Tuffryn<sup>®</sup> (Média±DP; n=6).

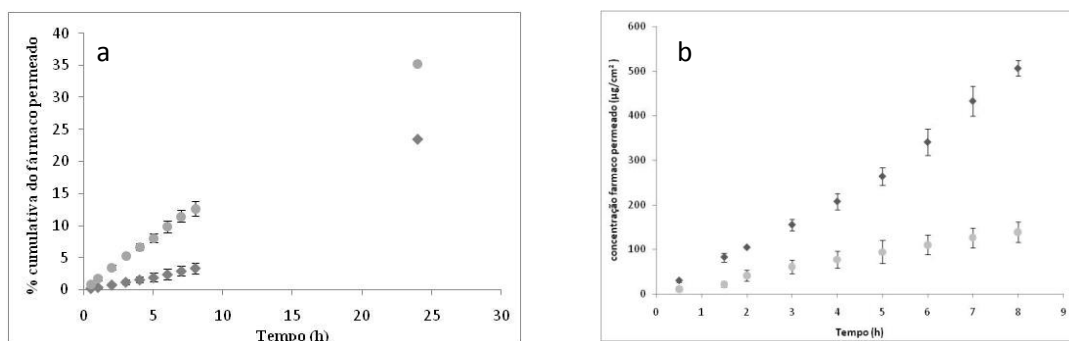
A liberação do ibuprofeno após 6h foi de 88% e de 46% para o GNLS Ibu e para o gel de referência, respectivamente. A análise dos resultados mostra que o modelo matemático que melhor se adequa a estes valores é novamente o modelo de ordem zero. A aplicação deste modelo mostra diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os dois geles a partir de 2 h. Tal como no ensaio anterior esta diferença pode ser devida à viscosidade e aos próprios excipientes das formulações. Para além disto, é possível ter ocorrido alguma cristalização do ibuprofeno no gel de referência dificultando a difusão deste através das membranas (Santos *et al.*, 2011, 2012).

#### 4.4.2. Permeação dos fármacos

As Figuras 5.15 e 5.16 mostram respectivamente os perfis de permeação do etofenamato e ibuprofeno a partir de geles de NLS, através da epiderme humana, com os respectivos geles de referência.



**Figura 5.15.** Perfis de permeação das GNLS Eto (◆) e do gel de referência (■) através do estrato córneo: a) percentagem cumulativa do fármaco permeado; b) concentração cumulativa do fármaco permeado (Média±DP; n=6)



**Figura 5.16.** Perfis de permeação das GNLS Ibu (●) e do gel de referência (◆) através do estrato córneo: a) percentagem cumulativa do fármaco permeado; b) concentração cumulativa do fármaco permeado (Média±DP; n=6).

O  $K_p$ , o fluxo de permeação e o lag time foram calculados para os dois fármacos ao fim de 8h, de acordo com a lei de Fick (Tabela 5.10). No caso dos géis contendo etofenamato houve diferenças significativas entre os géis, onde o GNLS Eto tem um  $K_p$  maior quando comparado com o gel de referência. Relativamente ao fluxo os géis de referência apresentam um fluxo maior, provavelmente devido à maior concentração de fármaco.

Na permeação do ibuprofeno, o gel de referência apresenta permeação cutânea aumentada e maior fluxo, assim como maior lag time. Esta diferença pode ser devida à maior concentração de ibuprofeno relativamente ao GNLS Ibu.

**Tabela 5.10.** Valores de Kp, fluxo e lag time do etofenamato e ibuprofeno através da pele (Média±DP; n=6).

Formulação	Kp (cmh <sup>-1</sup> )	Fluxo (µgcm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Lag time
<b>GNLS Eto</b>	5,12x10 <sup>-3</sup>	6,149	1,23
<b>G referência Eto</b>	2,35x10 <sup>-3</sup>	11,97	0,65
<b>GNLS Ibu</b>	1,16x10 <sup>-2</sup>	17,55	0,20
<b>G referência Ibu</b>	2,98x10 <sup>-2</sup>	22,85	0,36

Os geles de NLS contendo ibuprofeno e etofenamato apresentam maior capacidade de permeação quando comparados com os respectivos medicamentos de referência. Deste modo, a discussão efectuada para os ensaios de libertação dos fármacos pode ser aplicada no caso da permeação. Por outro lado, estudos efectuados por Herkenne *et al.* (2006) mostraram que a permeação do propilenoglicol através do estrato córneo é proporcional à sua concentração final na formulação, o que faz aumentar a solubilização do fármaco (no caso específico ibuprofeno). No entanto, este fenómeno não afecta a permeação do fármaco através do estrato córneo. Outros estudos (Watkinson *et al.*, 2009) demonstraram que a presença de álcool etílico aumentou em 10% a permeação de ibuprofeno através de membrana de silicone e através do estrato córneo; Morimoto *et al.*, (2000) estudaram a influência do álcool etílico e do mentol na permeação de flurbiprofeno em coelhos, e demonstraram uma elevada taxa de absorção quando comparada com geles sem a presença destes promotores de absorção. Outros estudos mostraram também que a adição de terpenos nas formulações contendo álcool etílico, aumentam a permeação quando comparados somente com o álcool etílico, que já por si próprio é um promotor de permeação (Vitorino *et al.*, 2013a; 2013b).

#### 4.5. Estudos de viabilidade celular

Para investigar o potencial irritante das dispersões de NLS, a viabilidade celular foi avaliada utilizando linhas de células Df e HaCaT num ensaio com MTT e resazurina. A formulação de GNLS Vaz na concentração testada não reduziu a viabilidade em qualquer das linhas celulares (Df e HaCaT) apresentando valores de 97±8% e 111±6% para a linha DF nos testes de MTT e de resazurina respectivamente. Para a linha celular

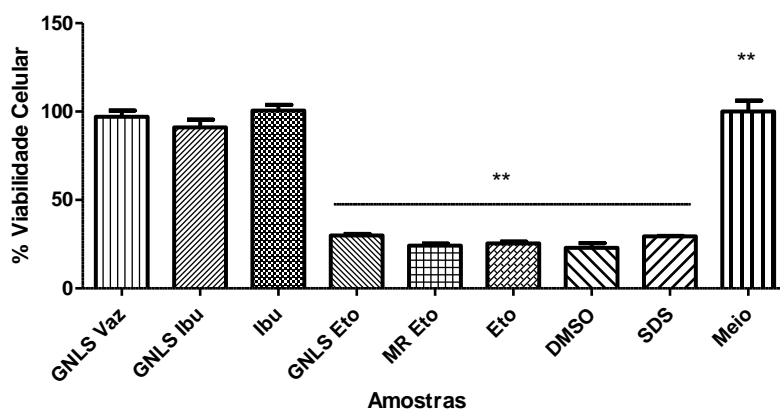
HaCaT os resultados foram de  $111\pm 7\%$  e  $97\pm 8\%$  nos testes de HaCaT em MTT e de resazurina respectivamente (Figuras 5.17-5.20).

Relativamente ao GNLS Ibu, este valor não se altera significativamente ( $p>0,05$ ). Podemos concluir que GNLS Ibu não reduziu a viabilidade celular de ambas as linhas celulares (Df e HaCaT) apresentando valores de  $139\pm 17\%$  e  $91\pm 11\%$  para as DF em teste de MTT e de resazurina respectivamente e de  $91\pm 10\%$  e  $139\pm 17\%$  para a linha HaCaT no ensaio de MTT e de resazurina respectivamente (Figuras 5.17-5.20).

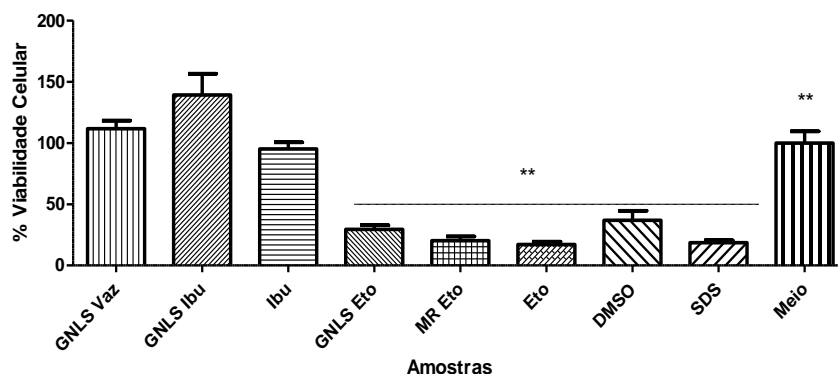
O GNLS Eto apresentou um comportamento diferente. As formulações contendo etofenamato não melhoraram a viabilidade das linhas celular testadas relativamente ao fármaco não formulado o qual revelou efeito citotóxico. A formulação de referência apresentou um resultado idêntico ao GNLS Eto (Figura 5.17-5.20).

A norma orientadora *Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment* (OECD, 2004) classifica como irritante uma substância se a viabilidade celular for inferior a 50% para um tempo de exposição 15-60 min. No presente ensaio, as células foram expostas às amostras durante 24 h, apresentando valores de viabilidade celular superiores a 50%, tanto para o gel contendo NLS vazias, como para o gel contendo NLS com ibuprofeno. Assim, estas formulações podem ser consideradas não irritantes.

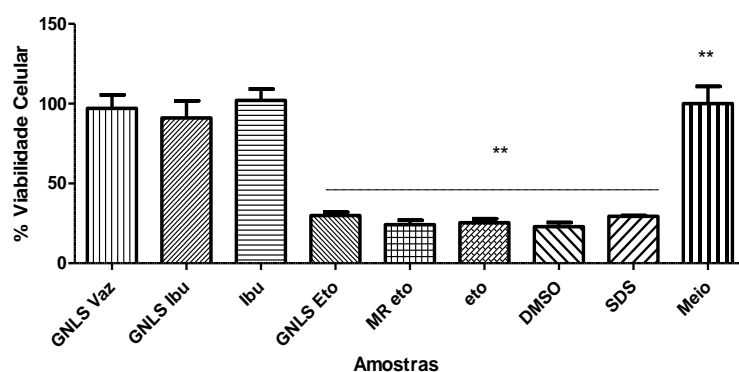
No caso dos geles de etofenamato as formulações poderão ser consideradas irritantes de acordo com a norma. No entanto para se poderem tirar conclusões definitivas, este ensaio deverá ser repetido em linha celular que mimetize a organização da pele.



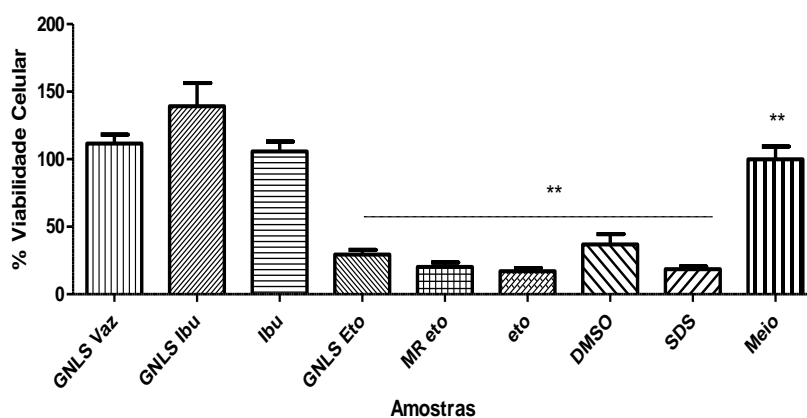
**Figura 5.17.** Viabilidade da linha celular DF em MTT após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do medicamento de referencia do etofenamato (MR Eto) (Média±DP, n=9; \*\* p<0,05 vs meio).



**Figura 5.18.** Viabilidade da linha celular HaCaT em MTT após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do MR Eto (Média±DP, n=9; \*\* p<0,05 vs meio).



**Figura 5.19.** Viabilidade da linha celular DF em resazurina após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do MR Eto (Média±DP, n=9; \*\* p<0,05 vs meio).



**Figura 5.20.** Viabilidade da linha celular HaCaT em resazurina após 24 h de incubação tanto no fármaco da forma livre ou incorporada nos geles de NLS e do MR Eto (Média±DP, n=9; \*\* p<0,05 vs meio).

## 5. CONCLUSÕES

Da análise do presente estudo torna-se evidente que o melhor agente humectante a seleccionar para produzir geles com boas características físico-químicas será o propilenoglicol a 10%, originando geles com NLS de etofenamato e ibuprofeno com

uma reologia caracteristicamente pseudoplástica e estáveis físico-quimicamente ao longo dos 12 meses de estudo.

Os fármacos em estudo são desta forma libertados e permeiam com maior facilidade o estrato córneo quando comparados com os perfis de absorção cutânea obtido com os medicamentos de referência.

Em relação à citotoxicidade das formulações produzidas o GNLS Vaz e o GNLS Ibu apresentaram níveis de citotoxicidade quase nulos, sendo por isso considerados formulações não irritantes. As formulações testadas contendo etofenamato apresentam um certo grau de citotoxicidade nos ensaios *in vitro*, resultados estes de certa forma extrapolados por um ensaio *in vitro* que não pode ser conclusivo para a classificação deste geles como irritantes, dado que a concentração de etofenamato presente nas linhas celulares foi superior àquela que na realidade atravessa o estrato córneo.

## **BIBLIOGRAFIA**

Borgia SL, Regehly M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting HC, Danker K. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and preelectric spectroscopy. *J Control Release* 2005; 110:151-163.

Castro G, Coelho AL, Oliveira C, Mahecha G, Oréfica R, Ferreira L. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2009; 381:77-83.

Costa P, Lobo GMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13:123–133.

Dias M, Hadgraft J, Lane ME. Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. *Int J Pharm* 2007a; 336:108-114.

Dias M, Hadgraft J, Lane ME. Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in skin. *Int J Pharm* 2007b; 340:65-70.

Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. *Int J Pharm* 2005; 305:2-12.

Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin *in vivo*. *J Pharm Sci* 2008; 97:185–197.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Stability testing of new drug substances and products step. ICH Topic Q1A (R2). 2003.

Kogan A, Gart N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interf Sci* 2006; 123–126:369–385.

Kumar AS, Abhijit AD, Medha DJ, Vandana BP. Solid lipid nanoparticles (NLS) of tretinoin: potential in topical delivery. *Int J Pharm* 2007; 345:163-171.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Semisolid SLN<sup>TM</sup> dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53:155–160.

Morimoto Y, Hayashi T, Kawabata S, Seki T, Sugibayashi K. Effect of 1- menthol-ethanol-water system on the systemic absorption of flurbiprofen after repeated dermal applications in rabbits. *Biol Pharm Bull* 2000; 23:1254-1257.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 28. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Paris, 2004.

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366:170–184.

Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Enhanced permeation of fentanyl from supersaturated solutions in a model membrane. *Int J Pharm* 2011; 407:72–77.

Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Influence of penetration enhancer on drug permeation from volatile formulations. *Int J Pharm* 2012; 439:260– 268.

Saupe A, Rades TS. Solid lipid nanoparticles. In: Mozafari MR (ed.), *Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotechnology*, Springer, 2006. p. 41-50.

Souto EB, Müller RH, Almeida AJ. Topical delivery of oily actives using solid lipid particles. *Pharma Techn Eur* (2007); 19:28-32.

Trotta M, Ugazio E, Peira E, Pulitano C. Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions. *J Control Release* 2003; 86:315–321.

Vitorino C, Almeida J, Gonçalves LMD, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. *J Control Release* 2013a; 167:301–314.

Vitorino C, Alves L, Antunes FE, Sousa JJ, Pais AACC. Design of a dual nanostructured lipid carrier formulation based on physicochemical, rheological, and mechanical properties. *J Nanopart Res* 2013b; 15:1993. DOI 10.1007/s11051-013-1993-7.

Watkinson RM, Herkenne C, Guy RH, Hadgraft J, Oliveira G, Lane ME. Influence of ethanol on the solubility, ionization and permeation characteristics of ibuprofen in silicone and human skin. *Skin Pharmacol Physiol* 2009, 22:15-21.



## **CAPÍTULO 6**

### **ESTUDOS *IN VIVO* DOS GELES DE NLS CONTENDO ETOFENAMATO E IBUPROFENO**

## 1. INTRODUÇÃO

O etofenamato e o ibuprofeno são dois potentes fármacos anti-inflamatórios não esteróides, eficazes no tratamento da dor e inflamação. Ambos actuam na inibição da síntese das COX impedindo a síntese das prostraglandinas (Mitchell *et al.*, 1999, Vane *et al.*, 2000).

As formas farmacêuticas orais de ibuprofeno têm sido largamente usadas na prática clínica. No entanto, o uso de ibuprofeno por via oral pode provocar efeitos secundários a nível gastrointestinal (Zacher *et al.*, 2008). A utilização de AINE por via tópica tem sido utilizada como uma alternativa terapêutica para reduzir os efeitos secundários a nível sistémico.

A actividade anti-inflamatória *in vivo* das formulações anteriormente desenvolvidas constituem o objectivo deste capítulo. Para isto, foi utilizado o modelo animal de inflamação da pata do rato induzida pelo carragenano (Vinegar *et al.*, 1969; Salvemini *et al.*, 1996). Trata-se de um modelo clássico de formação de edema e hiperalgisia muito utilizado no desenvolvimento de AINE, incluindo os inibidores selectivos da COX-2 (Guay *et al.*, 2004). Concretamente, no presente estudo foi avaliada a percentagem de inibição do edema da pata dos animais tratados com gel com NLS contendo etofenamato (0,6%) e contendo ibuprofeno (0,3%), relativamente aos animais-controlo não tratados, e aos medicamentos de referência em gel, de acordo com a metodologia descrita por Naito *et al.* (2007).

## 2. MATERIAIS

GNLS Eto 0,6% (preparado segundo o capítulo 4 paragrafo 4.3), GNLS Ibu 0,3% (preparado segundo o Capítulo 4, Secção 4.3), os medicamentos de referência comerciais de etofenamato (Reumon Gel, Bial – Portela e C<sup>a</sup>., SA, contendo 5% m/m de etofenamato) e de ibuprofeno (Ozonol, Omega Pharma Portuguesa, Unipessoal, Lda., contendo 5% m/m de ibuprofeno), foram adquiridos numa farmácia local, o carragenano (Sigma, EUA), a cetamina (Imalgene 1000, França) e a medetomidina (Medetor<sup>®</sup>, 1 mgml<sup>-1</sup>, CP-Pharma Handelsges, Alemanha).

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Actividade anti-inflamatória *in vivo*

O modelo de inflamação utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório dos geles desenvolvidos foi o do edema da pata do rato induzido pelo carragenano, tal como descrito por Naito *et al.* (2007). Para o efeito, foram utilizados ratos Wistar machos de 8 semanas de idade (Charles River, França), após uma semana de aclimação no biotério. O protocolo experimental foi realizado com a permissão da Comissão de Ética Animal da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, em conformidade com a Directiva da UE (2010/63/UE), DR 129/92 e Portaria 1005/92, e foi aprovado pela Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, Portugal). No biotério os animais foram tratados em estrita conformidade com boas práticas animal, de acordo a Directiva CEE (86/609/CEE) e o Decreto-Lei nº 113/2013. As experiências foram realizadas por investigadoras certificadas para a realização da experimentação animal.

Todos os animais foram anestesiados por injeção intra-peritoneal com uma mistura de cetamina (75 mgkg<sup>-1</sup>) e medetomidina (0,50 mgkg<sup>-1</sup>). Os ratos foram divididos em sete grupos de 6 animais: um grupo de animais não induzidos e não tratados (controlo negativo), um grupo de animais não tratados e induzidos com carragenano (controlo positivo), um grupo de animais tratados com o gel NLS com etofenamato a 0,6% (GNLS Eto) e induzidos com carragenano (grupo 1), um grupo de animais tratados com o gel comercial de referência de etofenamato e induzidos com carragenano (grupo 2), um grupo de animais tratados com o gel NLS com ibuprofeno a 0,3% (GNLS Ibu) e induzidos com carragenano (grupo 3), um grupo de animais tratados com o gel comercial de referência do ibuprofeno e induzidos com carragenano (grupo 4). Os geles (0,2 g) foram aplicados topicamente na pata traseira direita. Trinta minutos após a aplicação, 0,1 ml de solução salina de carragenano a 1% (m/v) foi injectada na área subplantar da pata traseira direita de todos os animais (Santos *et al.*, 2013). A avaliação do edema da pata foi monitorizada por alterações do volume de ambas as patas por um método de deslocamento de água, utilizando um pletismómetro (Ugo Basile Srl, Gemonio, Itália), imediatamente antes da aplicação do gel e 5 h após a injeção de carragenano. A percentagem do edema (% Edema) e a percentagem de inibição (% Inibição) foram calculadas como se segue (Naito *et al.*, 2007):

$$\% \text{ Edema} = (V_5 - V_0) / V_0 \times 100$$

onde  $V_0$  e  $V_5$  são os volumes das patas traseiras antes do tratamento e 5h depois da injeção de carragenano, respectivamente;

$$\% \text{ Inibição} = [\text{controle positivo} - \text{grupo } n] / \text{controle positivo} \times 100$$

Onde “*controle positivo*” e “*grupo n*” são a média da percentagem de edema no grupo controle positivo e nos vários grupos tratados e induzidos.

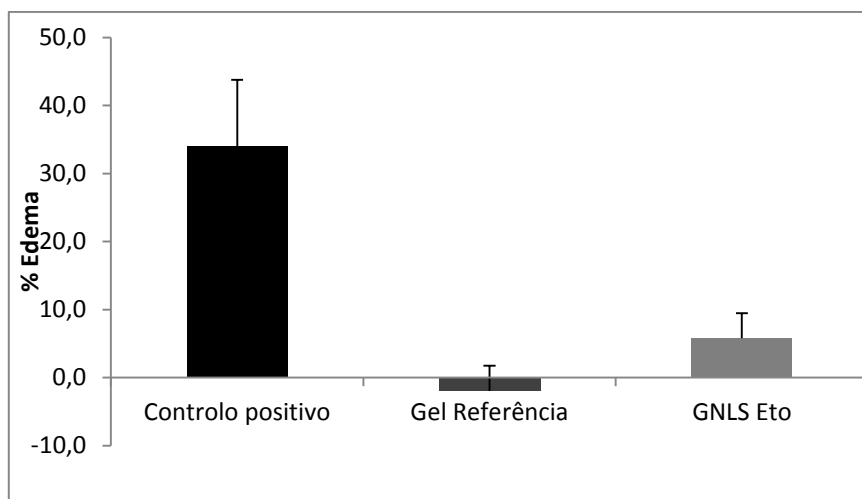
### **3.2. Histologia da pata**

Para avaliar as patas histologicamente os animais foram sacrificados. Como descrito anteriormente (Fischer *et al.*, 2008), as patas foram cortadas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% v/v. As amostras de tecido foram processadas por inclusão em parafina como protocolo de rotina. Os cortes foram corados com hematoxililina e eosina (H&E). As lâminas foram examinadas microscopicamente (Leica, Axioscope camera Software Leica Imagem Gerenciar IM50, Alemanha) e as imagens de ampliação 100x foram adquiridas usando o editor de imagem do Microsoft Composite. A aparência histopatológica dos tecidos foi comparada por alterações de estrutura, pelo edema e pela infiltração de células inflamatórias (células mononucleares e/ou polimorfonucleares) na fase de inflamação da derme.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Actividade anti-inflamatória *in vivo***

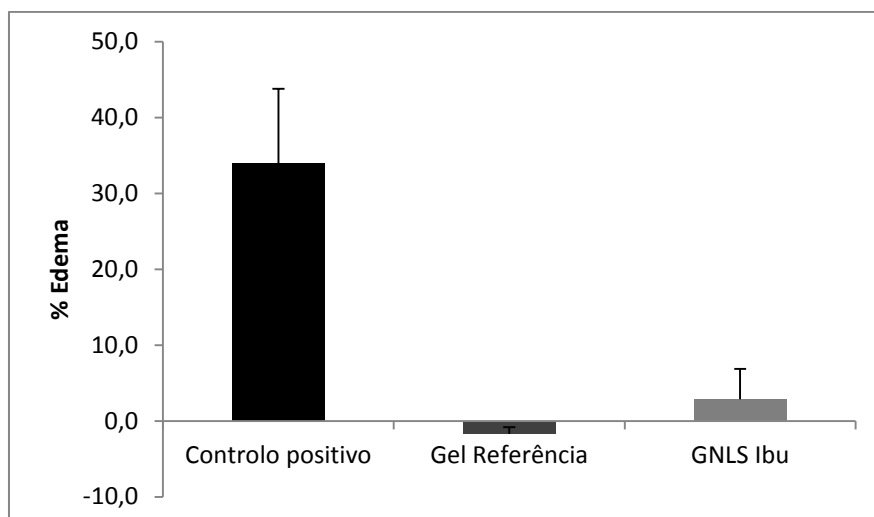
A inflamação e o edema na pata de rato induzida por uma solução de carragenano produziu um aumento do volume de 34% relativamente ao controle positivo, que foi notavelmente atenuado pela aplicação local da formulação de GNLS Eto, assim como na formulação de referência (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Percentagem de edema após aplicação tópica do formulações contendo etofenamato (Média±DP; n=6).

A Figura 6.1 mostra claramente que as formulações testadas inibiram significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema da pata induzido pelo carragenano. Os animais tratados apresentaram  $-2,0 \pm 3,7\%$  e  $5,8 \pm 3,7\%$  de edema para o gel comercial de referência e para o GNLS Eto respectivamente. Estes resultados mostraram que houve uma diferença significativa entre os animais tratados com os geles testados e o controle ( $p < 0,05$ ). A percentagem de inibição foi de 106% e de 83%, respectivamente. No entanto, a diferença nestes resultados foi expectável pois o gel de referência têm um teor em fármaco (5%) superior ao do GNLS Eto (0,6%). Tendo sido constante a quantidade de gel aplicado nos grupos de tratamento (0,2g), esta diferença de teor resultou numa dose de 1,2 mg de etofenamato aplicada ao grupo tratado com GNLS Eto (grupo 1) e de 10 mg de etofenamato no grupo tratado com Reumon Gel (grupo 2). Deste modo, uma dose 8,3x inferior de fármaco nanoencapsulado resultou numa diferença de apenas 23% percentagem de inibição, quando comparada com o gel de referência.

No que diz respeito aos geles de ibuprofeno, houve uma atenuação acentuada do edema, quer no GNLS Ibu quer no gel de referência (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Percentagem de edema após aplicação tópica do formulações contendo ibuprofeno (Média±DP; n=6).

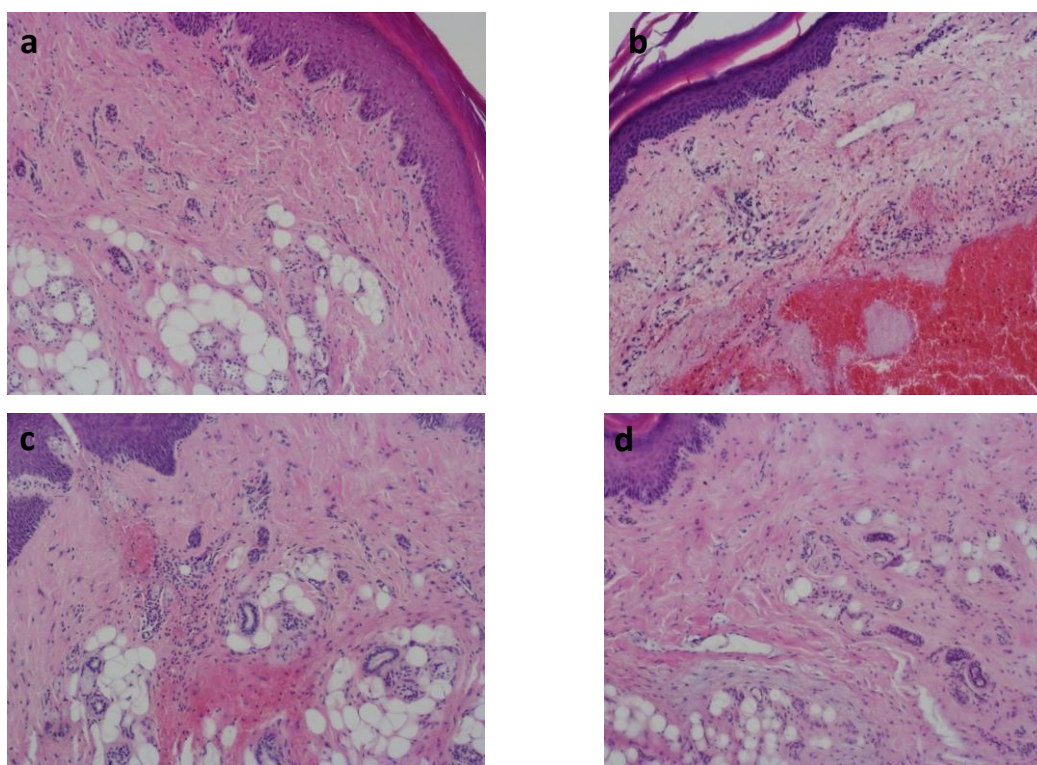
A Figura 6.2 que mostra claramente que as formulações testadas inibiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do edema da pata traseiras dos ratos seleccionados. Os animais tratados apresentaram valores de percentagem do edema de  $-1,7 \pm 0,9\%$  gel de referência e  $2,9 \pm 4\%$  para o GNLS Ibu. Estes resultados mostraram que houve uma diferença significativa entre os animais tratados com as formulações e o controle ( $p < 0,05$ ). A percentagem de inibição do edema foi de 105% e de 92%, respectivamente. Tal como observado para os geles contendo etofenamato, também os geles de referência de ibuprofeno contêm uma concentração maior de fármaco quando comparado com os geles de NLS contendo ibuprofeno, pelo que a inibição do edema deverá ser sempre superior no medicamento de referência. A quantidade de gel aplicado nos grupos de tratamento (0,2g), resultou numa dose de 0,6 mg de ibuprofeno aplicada ao grupo tratado com GNLS Ibu (grupo 3) e de 10 mg de ibuprofeno no grupo tratado com Ozonol (grupo 4). Deste modo, uma dose 16,7x inferior de fármaco nanoencapsulado resultou numa diferença de apenas 13% percentagem de inibição, quando comparada com o gel de referência.

#### 4.2. Histologia da pata

A análise histológica da pata do rato sujeita à indução e a tratamento ou somente à indução mostraram que a injeção intraplantar de 1% de carragenano na pata do rato

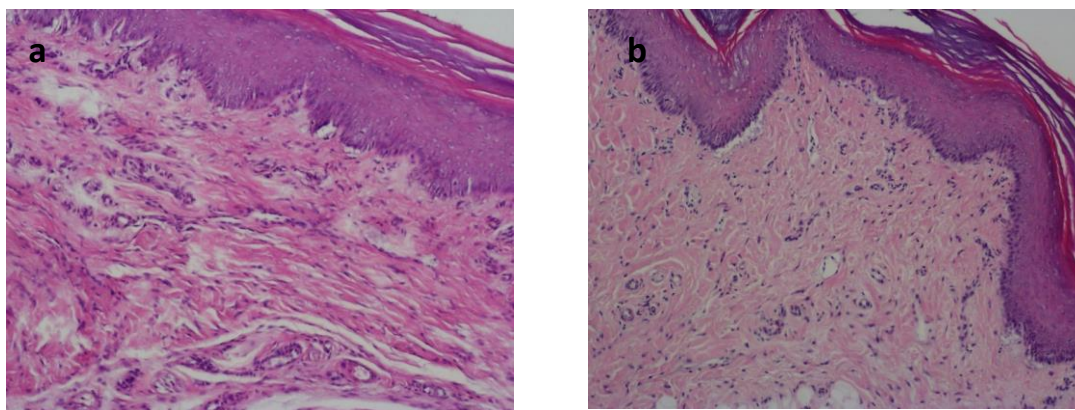
produziu alterações na camada epidérmica, um edema intenso, caracterizado por um aumento de espessura da epiderme, uma hemorragia na periferia da derme na qual havia pequenos focos de infiltração celular, sobretudo neutrófilos e a presença de mastócitos dispersos (Figura 6.3b). Resultados semelhantes foram observados por outros autores e descritos em estudos anteriormente publicados (Lucetti *et al.*, 2010).

No GNL Eto (Figura 6.3d), observou-se ausência de alterações na epiderme, uma diminuição significativa do edema e da infiltração de células inflamatórias. Observou-se na derme um discreto edema do tecido conjuntivo. A utilização deste gel contribuiu para a prevenção da inflamação, uma vez que a aplicação do gel é anterior à indução do edema. Neste modelo agudo, a aplicação da substância-teste é feita meia hora antes da injeção com o carragenano, para que o fármaco possa ser absorvido e esteja disponível nos tecidos da pata no momento em que a inflamação é induzida.



**Figura 6.3.** Efeito do etofenamato na inflamação da pata do rato induzida por carragenano: (a) pata sem carragenano, (b) pata de rato com carragenano na ausência de qualquer tratamento, (c) pata de um rato tratado com gel de referência, (d) pata de um rato tratado com GNLS Eto. Ampliação: 100x.

Para os geles de ibuprofeno os grupos de controlo positivo e negativo são os mesmos que no etofenamato (figura 6.3a e 6.3b). No grupo pré-tratado com GNLS Ibu (Figura 6.4b), foi observado uma ausência de alterações na epiderme, uma diminuição significativa do edema e da infiltração de células inflamatórias. Na derme verificou-se um discreto edema do tecido conjuntivo pelo que podemos afirmar que a administração deste gel melhora o estado inflamatório.



**Figura 6.4.** O efeito de ibuprofeno na inflamação da pata do rato induzida por carragenano: (a) pata de um rato tratado com gel de referência, (b) pata de um rato tratado com GNLS Ibu. Ampliação: 100x.

## 5. CONCLUSÕES

Com este estudo, podemos concluir que os geles de NLS contendo etofenamato e ibuprofeno em concentrações de 0,6% e 0,3%, respectivamente, têm actividade anti-inflamatória *in vivo*, a qual é proporcionalmente superior à das formulações comerciais de referência. Histologicamente, comprovou-se a redução do edema da pata tratada com estas formulações de NLS. Foi, no entanto, ainda observada a presença de edema a nível do tecido conjuntivo, podendo este facto dever-se à baixa concentração de fármaco presente nestas formulações.

## BIBLIOGRAFIA

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. CSH Protoc 2008; 1:2008:pdb.prot4986. DOI: 10.1101/pdb.prot4986.

Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1. J Biol Chem 2004; 279:24866–24872.

Lucetti DL, Lucetti EC, Bandeira M, Veras HN, Silva AH, Leal LK, Lopes AA, Alves VC, Silva GS, Brito GA, Viana GB. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel J Inflamm (Lond) 2010; 7:60. DOI: 10.1186/1476-9255-7-60.

Marto J, Baltazar D, Militão M, Duarte A, Salgado A, Gouveia L, Simões S, Fernandes A, Oliveira E, Ribeiro H. Topical gels of etofenamate: *in vitro* and *in vivo* evaluation. Pharm Dev Technol 2014; 5:1-6.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. Br J Pharmacol 1999; 128:1121-1132.

Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, Ohara N. Anti-inflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. Phytother Res 2007; 21:452–456.

Salvemini D, Wang Z-Q, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Br J Pharmacol 1996; 118:829-838

Santos JM, Bárcia RN, Simões SI, Gaspar MM, Calado S, Agua-Doce A, Almeida SC, Almeida J, Filipe M, Teixeira M, Martins JP, Graça L, Cruz ME, Cruz P, Cruz H. The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX<sup>®</sup>) in the treatment of inflammatory arthritis. J Transl Med 2013; 11:18. DOI: 10.1186/1479-5876-11-18.

Vane J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. Thorax 2000; 55 (Suppl 2):S3-S9.

Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 166: 96-103.

Zacher J, Altman R, Bellamy N, Brühlmann P. Topical diclofenac and its role in pain and inflammation: an evidence-based review. *Curr Med Res Opin* 2008; 24:925-950.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

## CONCLUSÕES GERAIS

Os efeitos adversos, resultantes da terapia oral com AINE, conduziram à investigação e desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e novas formas de administração, designadamente a administração por via tópica, com aplicação sobre a pele. O esforço de formulação destes fármacos tem sido direccionado para tecnologias capazes de aumentar a sua permeação através do estrato córneo, promovendo assim a sua eficácia. Neste contexto, a utilização de nanotecnologias tem merecido um interesse particular, traduzido pela existência de bibliografia vasta acerca da administração de fármacos por via tópica com recurso a formulações de base nanotecnológica.

Esta dissertação aborda essencialmente o desenvolvimento de formulações tópicas contendo AINE encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas, recorrendo a metodologias facilmente transponíveis para a escala industrial.

Resumidamente desenvolveram-se geles contendo os AINE encapsulados em NLS produzidas através do método de fusão-emulsificação. Esta metodologia é claramente aquela que permite a obtenção de melhores resultados, medidos pela estabilidade das formulações e pela facilidade da sua utilização a nível industrial.

Entre os agentes emulsionantes e lipídicos estudados, o Tween<sup>®</sup> 80 e o Compritol<sup>®</sup> ATO888, respectivamente, revelaram-se os mais adequados, permitindo a obtenção de NLS com as características pretendidas, esféricas, com diâmetro médio inferior a 250 nm e através de um método de preparação facilmente transponível para a escala industrial. Os ensaios preliminares de transposição de escala, realizados a nível laboratorial, demonstraram que este método de produção de NLS é efectivamente transponível, para uma escala 100 vezes superior. Os estudos de estabilidade física, química e microbiológica demonstraram que as formulações desenvolvidas são estáveis, pelo menos durante 12 meses.

Os estudos *in vitro* demonstraram um aumento da libertação e permeação do fármaco destes sistemas com NLS, comparativamente com as formulações convencionais de referência.

Os estudos efectuados com o placebo, após aplicação sobre a pele humana em *patch*, demonstraram uma melhoria na hidratação da pele, na perda transepidérmica e na viscoelasticidade da pele, com boa compatibilidade cutânea e ausência de potencial sensibilizante.

Os estudos *in vivo* foram efectuados no modelo de inflamação do edema da pata do rato albino induzido pelo carragenano, demonstrando que as formulações desenvolvidas com a tecnologia de NLS diminuíram a inflamação em 85% face ao controlo positivo. Na análise histológica da pata, para os dois geles, observou-se a ausência de alterações na epiderme e uma diminuição significativa do edema e da infiltração de células inflamatórias. Ao nível da derme verificou-se um edema discreto do tecido conjuntivo podendo este facto relacionar-se com a reduzida concentração de fármaco a este nível da pele.

## **ANEXOS**

## **ANEXO I**

**Desenvolvimento do método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o etofenamato incorporado numa formulação tópica a 0,6%**

## Índice

1. Objectivo .....	3
2. Materiais e Métodos .....	3
2.1 Equipamentos.....	3
2.1.1 Sistema cromatografico .....	3
2.2 Substância de referência .....	3
<b>2.3 Reagentes</b> .....	3
<b>2.4 Identificação das amostras</b> .....	4
<b>2.4.1 Identificação das amostras</b> .....	4
<b>2.4.2 Composição do gel NLS etofenamato</b> .....	4
2.5 Condições analíticas.....	4
2.6 Preparação das soluções .....	5
2.6.1 Selectividade .....	5
2.6.2 Linearidade .....	5
2.6.3 Exactidão .....	6
2.6.4 Precisão .....	6
2.6.5 Estabilidade das soluções .....	7
3. Resultados .....	8
3.1 Selectividade .....	8
3.2 Linearidade.....	8
3.3 Exactidão .....	10
3.4 Repetibilidade .....	11
3.4.1 Repetibilidade do sistema.....	11
3.4.2 Repetibilidade de análise .....	12
3.5 Estabilidade das soluções .....	13
4. Conclusões.....	13

## **1. Objectivo**

O objectivo deste estudo é a validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação do etofenamato incorporado numa formulação tópica contendo 0,6% de etofenamato.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Equipamentos**

#### ***2.1.1 Sistema cromatográfico***

Bomba VWR Hitachi Elite LaChrom L-2130, Injector automático VWR Hitachi Elite LaChrom L-2200, Detector DiodeArray VWR Hitachi Elite LaChrom L-2450, OrganizerMerck Hitachi Elite LaChrom, Coluna Waters Nova-Pack C18, 250x4.6mm; 4 µm.

#### ***Outros equipamentos***

Balança analítica Sartorius R200D, Registador Sartorius YDP03 OCE, Balança Mettler PJ3000, Balança analítica Mettler Toledo AB204-S, Registador Mettler Toledo RS-P42, Balança Mettler Toledo AE240-S, Balança analítica Mettler Toledo MS205DU, Registador Mettler Toledo P25, Medidor de pH Metrohm 713, Eléctrodo de vidro Metrohm, Vortex.

### **2.2 Substância de referência**

Etofenamato EP 7.5 DukeChem (Espanha); teor99,5%. Data de produção 13 Março 2013, data de reanálise 13 Março 2015.

### **2.3 Reagentes**

Metanol e acetonitrilo grau HPLC, Fisher Chemical, ácido fosfórico grau analítico (Fisher Chemical). A água ultrapurificada foi obtida através de um sistema Enkrott Purelab Ultra system.

## 2.4 Identificação das amostras

### 2.4.1 Identificação das amostras

Gel NLS etofenamato (Lote laboratorial de 1 kg)

Gel NLS (Placebo)

### 2.4.2 Composição do gel NLS etofenamato

Componentes	Composição do gel	
	Componentes	Concentração (%)
<b>Excipientes</b>		
Gel	Hidroxipropilmetilcelulose	2
	Propilenoglicol	10
	Álcool etílico	10
	Mentol	0,1
NLS (Solução aquosa)	Compritol <sup>®</sup>	3
	Tween <sup>®</sup> 80	2
	Etofenamato	0,6
NLS Total (ml)		69,9

## 2.5 Condições analíticas

*Coluna:* Waters Nova-Pack C18, 250 x 4,6 mm; 4 µm

*Fase móvel:* Metanol:Acetonitrilo:Água acidificada com 1% de Ácido fosfórico (45:35:20, v/v/v)

*Eluição:* modo isocrático

*Fluxo:* 1mlmin<sup>-1</sup>

*Temperatura da coluna:* 25±3°C

*Temperatura do Injetor automático:* 4±1°C

*Deteção:* UV a 285 nm

*Volume de injeção:* 20µl

*Tempo de corrida:* 10 min

*Solvente:* Metanol

*Solução de lavagem do injetor:* Metanol

## 2.6 Preparação das soluções

### 2.6.1 Selectividade

#### 1. Solvente

Solvente: Metanol

#### 2. Solução amostra

Substância	Toma (mg)	V (ml)(a)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
Gel NLS etofenamato	1000	20	250

(a) A solução foi submetida a agitação em vortex durante 3 min.

#### 3. Solução placebo

Componente	Toma (mg)	V (ml) (a)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
Placebo	1000	25	---

(a) A solução foi submetida a agitação em vortex durante 3 min.

#### 4. Solução padrão

Substância	Toma (mg)	V (ml) (a)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
Etofenamato	25	100	250

(a) A solução foi submetida a agitação manual até completa solubilização.

Para a selectividade, foram efectuadas duas injecções de cada solução.

### 2.6.2 Linearidade

- Solução Stock

Substância	Solução Stock (SS)		
	Toma (mg)	V (ml) (a)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
Etofenamato	62,5	25	2500

(a) A solução foi submetida a agitação manual até completa solubilização.

- *Soluções de trabalho*

Nível (%)	Sol. Inicial	Toma (ml)	Volume (ml)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
50	SS	1	20	125,0
75	SS	1,5	20	187,5
100 (a)	SS	2	20	250,0
125	SS	2,5	20	312,5
150	SS	3	20	375,0

(a) Foram efectuadas seis injeções desta solução para avaliar a repetibilidade do sistema.

### 2.6.3 *Exactidão*

- *Solução amostra*

O placebo foi sobrecarregado com quantidades conhecidas de etofenamato ao longo de três níveis de concentração que cobrem a gama de trabalho (50%, 100% e 150% da concentração de teste). Foram preparados três replicados a cada nível de concentração, num total de nove determinações.

Nível	Toma(mg)	Placebo (mg)	V (ml)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
50%	12,5	1000,0	100	125,0
100%	25	1000,0	100	250,0
150%	50	1000,0	100	500,0

As soluções foram submetidas a agitação em vortex durante 3 min.

### 2.6.4 *Precisão*

#### 2.6.4.1 *Repetibilidade do sistema*

Para a repetibilidade do sistema foi utilizada a solução a 100% preparada para a linearidade (Secção 2.6.3).

#### 2.6.4.2 *Repetibilidade de análise*

- *Solução amostra*

Prepararam-se seis replicados da solução amostra com o etofenamato à concentração do ensaio (100%), tal como descrito em 2.6.1.2 (selectividade).

- *Solução padrão*

A solução padrão foi preparada como descrito em 2.6.1.4 (selectividade).

### **2.6.5 Estabilidade das soluções**

A) A solução amostra foi preparada de acordo com o descrito na Secção 2.6.1.2 (selectividade).

B) A solução padrão a 250 µg/ml de etofenamato foi preparada, imediatamente antes de ser utilizada de acordo com o descrito na Secção 2.6.1.4 (selectividade).

A estabilidade da solução amostra foi avaliada durante 3 dias a 22°C±2°C sem protecção da luz e a 4±1°C ao abrigo da luz.

### 3. Resultados

#### 3.1 Selectividade

A selectividade foi avaliada pela análise do solvente, da solução amostra de etofenamato a  $250 \mu\text{gml}^{-1}$ , da solução padrão do etofenamato a  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  e da solução placebo.

#### Critérios de aceitação

Os picos cromatográficos resultantes do solvente e do placebo não devem interferir com o analito de interesse. O factor de resolução deve ser  $\geq 1,5$ .

Os resultados obtidos incluem-se na Tabela 1.

**Tabela 1. Selectividade**

Solução	Identificação	tR(min)
Solvente	Solvente	< 3,00
Solução padrão de etofenamato a $250 \mu\text{g ml}^{-1}$	Solvente Etofenamato	< 3,00 5,22
Solução amostra de etofenamato a $250 \mu\text{g ml}^{-1}$	Solvente Etofenamato	< 3,00 5,22
Solução placebo	Solvente	< 3,00

tR= tempo de retenção

#### Comentários

O método analítico para a determinação de etofenamato no gel com NLS demonstrou ser selectivo uma vez que o solvente e o placebo não interferem com o analito de interesse.

#### 3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da análise de soluções padrão de etofenamato, no intervalo de concentração estabelecido, utilizando-se um mínimo de cinco soluções. De cada solução foram efectuadas duas injecções. A regressão linear das respostas analíticas em função da concentração do analito foi estimada pelo método dos mínimos quadrados.

Os factores de resposta são expressos pela seguinte equação:

$$R_f = R/C$$

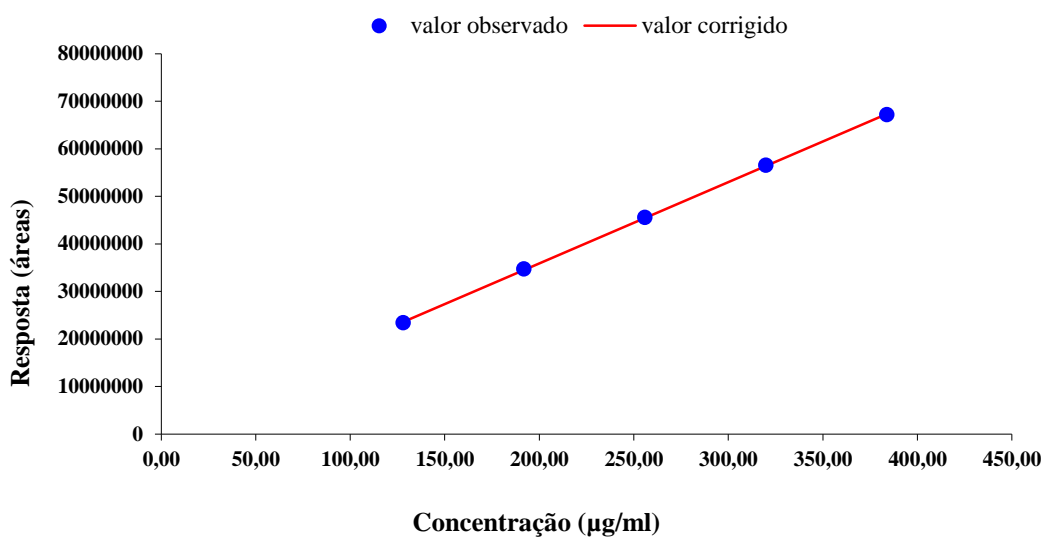
R – Resposta analítica; C – Concentração nominal da solução.

Os resultados obtidos incluem-se na Tabela 2. A Figura 1 representa a recta de calibração obtida.

**Tabela 2. Parâmetros da linearidade**

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Critérios de aceitação</b>
<b>Intervalo</b>	127,94 a 383,82 $\mu\text{gml}^{-1}$	---
<b>Factores de resposta</b>		
Média	178528	---
CV (%)	0,59	$\leq 3,0$
$r^2$	0,9998	$\geq 0,999$
<b>Regressão linear</b>		
Declive	170965,135	---
Intercepção	1688387,500	---
Limite inferior	756024,845	
Limite superior	2620750,155	

O limite inferior e superior foram calculados com o intervalo de confiança de 95% para a intercepção.



**Figura 1. Regressão linear**

### *Comentários*

Os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, demonstrando que o método analítico é linear dentro da gama de concentrações de trabalho.

### **3.3 Exactidão**

A exactidão foi avaliada através da análise de nove preparações de placebo sobrecarregado com quantidades conhecidas de analito ao longo de 3 níveis de concentração, que cobrem a gama de trabalho (50%, 100% e 150% da concentração de teste). A cada nível de concentração foram preparados três replicados.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Exactidão**

Nível	Conc. ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )		Recuperação (R) (%)			Critérios de aceitação	
	Teórica	Experimental	Individual	Média	CV (%)	Individual (R%)	CV (%)
50%	129,20	128,56	99,51	99,95	1,67	98,0 – 102,0	$\leq 2,0$
	124,70	122,89	98,55				
	144,95	144,75	101,80				
100%	282,70	286,09	101,20	100,79	1,26	98,0 – 102,0	$\leq 2,0$
	262,60	267,27	101,78				
	245,00	243,41	99,35				
150%	501,00	491,78	98,16	98,55	0,39	98,0 – 102,0	$\leq 2,0$
	502,00	494,78	98,56				
	510,70	505,23	98,93				

**Comentários**

Os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, demonstrando que o método analítico possui uma exactidão adequada nas concentrações de trabalho utilizadas.

**3.4 Repetibilidade****3.4.1 Repetibilidade do sistema**

A repetibilidade do sistema foi avaliada através da análise da variabilidade da resposta analítica de uma solução de padrão de etofenamato a  $250 \mu\text{gml}^{-1}$  (100%). Foram efectuadas seis injeções consecutivas da mesma solução.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Repetibilidade do sistema**

Parâmetros	Resultados	Critérios de aceitação
Conc. ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	249,59	---
Área (média), n=6	45510694	---
CV (%)	0,14	$\leq 2,0$
tR (média) (min)	5,22	---
CV (%)	0,1	---

### 3.4.2 Repetibilidade de análise

A repetibilidade de análise foi avaliada através da variabilidade obtida no doseamento de seis de amostra, preparados ao nível 100% da concentração de trabalho, sendo expressa pelo replicados coeficiente de variação.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5. Repetibilidade de análise**

Parâmetros	Resultados	Critérios de aceitação
<i>Etofenamato</i>		
Doseamento (%)	101,35	---
	100,78	
	99,48	
	102,31	
	99,78	
	98,94	
Média	100,42	---
CV (%)	1,28	$\leq 2,0$

### Comentários

Os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, demonstrando que o método analítico é preciso na concentração de trabalho.

### 3.5 Estabilidade das soluções

A estabilidade da solução padrão de etofenamato e da solução amostra foi avaliada à temperatura ambiente (20°C – 24°C) com exposição à luz, e a 4±1°C, ao abrigo da luz. A variação da concentração foi determinada através da seguinte equação:

$$\text{Variação (\%)} = (C_f - C_i / C_i) \times 100$$

$C_f / i$  - concentração final / inicial

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6. Estabilidade das soluções**

Solução	C <sub>i</sub> (µgml <sup>-1</sup> )	C <sub>f</sub> (µgml <sup>-1</sup> )	Variação (%)	Crítérios de aceitação
<i>A 20°C – 24°C, não protegida da luz, 3 dias</i>				
Solução padrão	252,2	253,3	0,43	≤ 2,0%
Solução amostra	253,5	254,6	0,43	
<i>A 4 ± 1°C, ao abrigo da luz, 3 dias</i>				
Solução padrão	252,2	253,6	0,55	≤ 2,0%
Solução amostra	253,5	255,0	0,59	

### Comentários

Os resultados demonstram que as soluções são estáveis durante 3 dias à temperatura ambiente (20°C - 24°C), não protegidas da luz e a 4±1°C, ao abrigo da luz.

### 4. Conclusões

Foi desenvolvida uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta pressão com detecção por ultravioleta para o doseamento do etofenamato no gel de NLS. O método demonstrou ser selectivo, linear, exacto e preciso dentro da gama de concentrações de trabalho. As soluções demonstraram ser estáveis durante pelo menos três dias.

## **ANEXO II**

**Desenvolvimento do método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o ibuprofeno incorporado numa formulação tópica a 0,3%**

## Índice

1. Objectivo.....	3
2. Materiais e Métodos.....	3
2.1 Equipamentos.....	3
2.1.1 Sistema cromatografico.....	3
2.2 Substancia de referencia.....	3
<b>2.3 Reagentes</b> .....	3
<b>2.5 Identificação amostras</b> .....	4
<b>2.5.1 Identificação amostras</b> .....	4
<b>2.5.2 Composição do gel NLS ibuprofeno</b> .....	4
2.6 Condições analíticas.....	4
2.7 Preparação das soluções.....	4
2.7.1 Selectividade .....	5
2.7.2 Linearidade.....	5
2.7.3 Exatidão .....	6
2.7.4 Precisão .....	6
2.7.5 Estabilidade das soluções.....	7
3. Resultados.....	8
3.1 Selectividade .....	8
3.2 Linearidade.....	8
3.3 Exactidão.....	10
3.4 Repetibilidade .....	10
3.4.1 Repetibilidade do sistema .....	11
3.4.2 Repetibilidade de análise .....	11
3.5 Estabilidade das soluções.....	12
4. Conclusões.....	12

## **1. Objectivo**

O objectivo deste estudo é a validação do método analítico por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação do ibuprofeno incorporado numa formulação tópica contendo 0,3% de ibuprofeno.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Equipamentos**

#### **2.1.1 Sistema cromatográfico**

Bomba VWR Hitachi Elite LaChrom L-2130, Injetor automático VWR Hitachi Elite LaChrom L-2200, Detector Diode Array VWR Hitachi Elite LaChrom L-2450, Organizer Merck Hitachi Elite LaChrom, Coluna Waters Nova-Pack C18, 250 x 4,6 mm; 4 µm.

#### **Outros equipamentos**

Balança analítica Sartorius R200D, Registador Sartorius YDP03 OCE, Balança Mettler PJ3000, Balança analítica Mettler Toledo AB204-S, Registador Mettler Toledo RS-P42, Balança Mettler Toledo AE240-S, Balança analítica Mettler Toledo MS205DU, Registador Mettler Toledo P25, Medidor de pH Metrohm 713, Eléctrodo de vidro Metrohm, Vortex.

### **2.2 Substância de referência**

Ibuprofeno EPBASf the chemical company (Alemanha); Doseamento 100%. Data de produção 7 Dezembro 2010, reanálise 12 Agosto 2013.

### **2.3 Reagentes**

Metanol e acetonitrilo grau HPLC, Fisher Chemical, ácido fosfórico grau analítico (Fisher Chemical). A água ultrapurificada foi obtida através de um sistema Enkrott Purelab Ultra system.

## 2.5 Identificação amostras

### 2.5.1 Identificação amostras

Gel NLS ibuprofeno (Lote laboratorial de 1 kg)

Gel NLS (Placebo)

### 2.5.2 Composição do gel NLS ibuprofeno

Componentes	Composição do gel	
	Componentes	Concentração (%)
<b>Excipientes</b>		
Gel	Hidroxipropilmetilcellulose	2
	Propilenoglicol	10
	Álcoolético	10
	Mentol	0,1
NLS (Solução aquosa)	Compritol <sup>®</sup>	3
	Tween <sup>®</sup> 80	2
	Ibuprofeno	0,3
NLS Total (ml)		69,9

## 2.6 Condições analíticas

*Coluna:* Waters Nova-Pack C18, 250 x 4,6 mm; 4 µm

*Fase móvel:* Metanol:Acetonitrilo:Água acidificada com 1% de Ácido fosfórico (45:35:20, v/v/v)

*Eluição:* modo isocrático

*Fluxo:* 1ml/min

*Temperatura da coluna:* 25±3°C

*Temperatura do Injetor automático:* 4±1°C

*Deteção:* UV a 220 nm

*Volume de injeção:* 20 µl

*Tempo de corrida:* 10 min

*Solvente:* Metanol

*Solução de lavagem do injetor:* Metanol

## 2.7 Preparação das soluções

### 2.7.1 *Selectividade*

#### 1. *Solvente*

**Solvente:**Metanol

#### 2. *Solução amostra*

<b>Substancia</b>	<b>Toma (mg)</b>	<b>V (ml)(a)</b>	<b>C (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>
Gel NLS ibuprofeno	1000	20	140

(a) A solução foi submedida a agitação em vortex durante 3 min.

#### 3. *Solução placebo*

<b>Componente</b>	<b>Toma (mg)</b>	<b>V (ml) (a)</b>	<b>C (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>
Placebo	1000	20	---

(a) A solução foi submedida a agitação em vortex durante 3 min.

#### 4. *Solução padrão*

<b>Substância</b>	<b>Toma (mg)</b>	<b>V (ml) (a)</b>	<b>C (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>
Ibuprofeno	14	100	140

(a) A solução foi submetida a agitação manual até completa solubilização.

Para a selectividade, foram efectuadas duas injeções de cada solução.

### 2.7.2 *Linearidade*

- *Solução Stock*

<b>Substância</b>	<b>Solução Stock (SS)</b>		
	<b>Toma (mg)</b>	<b>V (ml) (a)</b>	<b>C (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>
Ibuprofeno	35	25	1400

(a) A solução e submetida a agitação manual até completa solubilização.

- *Soluções de trabalho*

Nível (%)	Sol. Inicial	Toma (ml)	Volume (ml)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
50	SS	1	20	70,0
75	SS	1,5	20	105
100 (a)	SS	2	20	140
125	SS	2,5	20	175
150	SS	3	20	250

Foram efectuadas seis injeções desta solução para avaliar a repetibilidade do sistema.

### 2.7.3 *Exatidão*

- *Solução amostra*

O placebo foi sobrecarregado com quantidades conhecidas de fármaco ao longo de 3 níveis de concentração que cobrem a gama de trabalho (50%, 100% e 150% da concentração de teste). Três repetições em cada nível de concentração foram preparadas, dando um total de nove determinações.

Nível(a)	Toma(mg)	Placebo (mg)	V (ml)	C ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
50%	5,6	1000,0	80	70,0
100%	5,6	1000,0	40	140,0
150%	5,6	1000,0	20	280,0

As soluções foram submetidas a agitação em vortex durante 3 min.

### 2.7.4 *Precisão*

#### 2.7.4.1 *Repetibilidade do sistema*

Para a repetibilidade do sistema foi utilizada a solução a 100% preparada para a linearidade (Secção 2.6.3).

#### 2.7.4.2 *Repetibilidade de análise*

- *Solução amostra*

Prepararam-se seis replicados da solução amostra com o ibuprofeno à concentração do ensaio (100%), tal como descrito em 2.6.1.2 (selectividade).

- *Solução padrão*

A solução padrão foi preparada como descrito em 2.6.1.4 (selectividade).

#### **2.7.5 Estabilidade das soluções**

A) A solução amostra foi preparada de acordo com o descrito na Secção 2.6.1.2 (selectividade).

B) A solução padrão a 140µg/ml de ibuprofeno é preparada, imediatamente antes de ser utilizada de acordo com o descrito na Secção 2.6.1.4 (selectividade).

A estabilidade da solução amostra foi avaliada durante 3 dias a 25°C sem protecção da luz e a 4±1°C ao abrigo da luz.

### 3. Resultados

#### 3.1 Selectividade

A selectividade foi avaliada pela análise do solvente, da solução amostra de ibuprofeno a  $140 \mu\text{gml}^{-1}$ , da solução padrão do ibuprofeno a  $140 \mu\text{gml}^{-1}$  e da solução placebo.

##### *Critérios de aceitação*

Os picos cromatográficos resultantes do solvente e do placebo não devem interferir com o analíto de interesse. O factor de resolução deve ser  $\geq 1,5$ .

Os resultados obtidos incluem-se na Tabela 1.

**Tabela 1. Selectividade**

Solução	Identificação	tR(min)
Solvente	Solvente	< 3,00
Solução padrão de ibuprofeno a $250 \mu\text{gml}^{-1}$	Solvente Ibuprofeno	< 3,00 6,52
Solução amostra de ibuprofeno a $250 \mu\text{gml}^{-1}$	Solvente Ibuprofeno	< 3,00 6,52
Solução placebo	Solvente	< 3,00

tR= tempo de retenção

#### Comentários

O método analítico para a determinação de ibuprofeno no gel com NLS demonstrou ser selectivo uma vez que o solvente e o placebo não interferem com o analíto de interesse.

#### 3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da análise de soluções padrão de ibuprofeno, no intervalo de concentração estabelecido, utilizando-se um mínimo de cinco soluções. De cada solução foram efectuadas duas injeções. A regressão linear das respostas analíticas em função da concentração do analíto foi estimada pelo método dos mínimos quadrados.

Os factores de resposta são expressos pela seguinte equação:

$$R_f = R/C$$

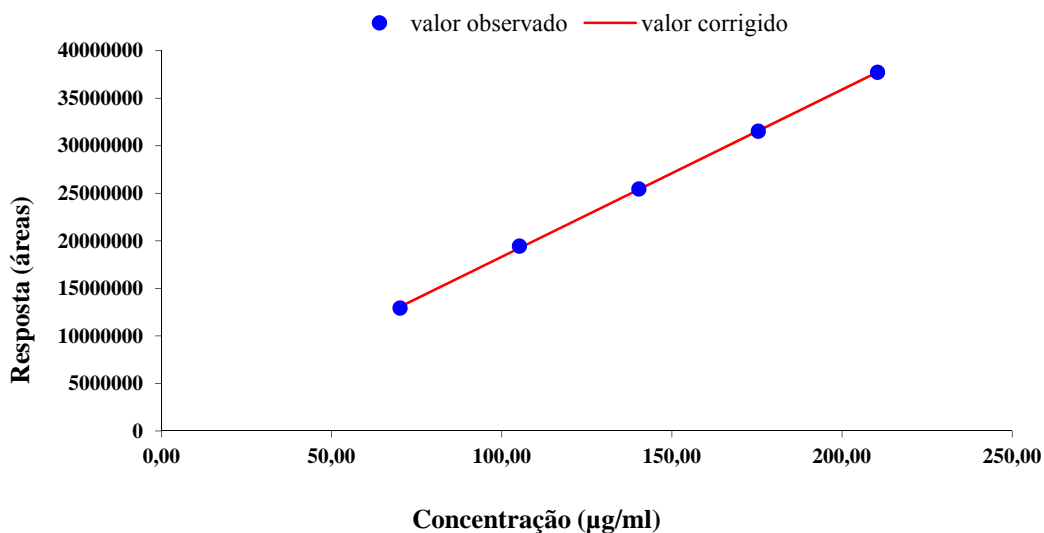
R – Resposta analítica; C – Concentração nominal da solução.

Os resultados obtidos incluem-se na Tabela 2. A Figura 1 representa a recta de calibração obtida.

**Tabela 2. Parâmetros de linearidade**

Parâmetros	Resultados	Critérios de aceitação
<b>Intervalo</b>	70,16 a 210,48 $\mu\text{gml}^{-1}$	---
<b>Factores de resposta</b>		
Media	181881,37	---
CV (%)	0,79	$\leq 3,0$
$r^2$	0,9998	$\geq 0,999$
<b>Regressão linear</b>		
Declive	175831,685	---
Intercepta	742913,300	---
Limite inferior	130984,532	---
Limite superior	1354842,068	---

O limite inferior e superior foram calculados com o intervalo de confiança a 95% para a intercepção.



**Figura1. Regressão linear**

### Comentários

Os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, demonstrando que o método analítico é linear dentro da gama de concentrações de trabalho.

### 3.3 Exactidão

A exactidão foi avaliada através da análise de nove preparações de placebo sobrecarregado com quantidades conhecidas de analito ao longo de 3 níveis de concentração, que cobrem a gama de trabalho (50%, 100% e 150% da concentração de teste). A cada nível de concentração foram preparados três replicados.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Exactidão**

Nível	Concentração ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )		Recuperação (R) (%)			Critérios de aceitação	
	Teórica	Experimental	Individual	Media	CV (%)	Individual (R%)	CV (%)
50%	73,50	74,67	101,60	100,58	0,90	98,0 – 102,0	$\leq 2,0$
	80,37	80,27	99,87				
	72,25	72,43	100,26				
100%	165,50	163,15	98,58	99,20	1,11	98,0 – 102,0	$\leq 2,0$
	164,71	165,51	100,46				
	167,25	164,81	98,54				
150%	339,50	335,12	98,16	99,52	1,77	98,0 – 102,0	$\leq 2,0$
	338,00	332,25	98,30				
	322,50	327,47	101,54				

### Comentários

Os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, demonstrando que o método analítico possui uma exactidão adequada nas concentrações de trabalho utilizadas.

### 3.4 Repetibilidade

#### 3.4.1 Repetibilidade do sistema

A repetibilidade do sistema foi avaliada através da análise da variabilidade da resposta analítica de uma solução de padrão de ibuprofeno a  $140 \mu\text{gml}^{-1}$  (100%). Foram efectuadas seis injecções consecutivas da mesma solução.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Repetibilidade do sistema**

Parâmetros	Resultados	Critérios de aceitação
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	143,16	---
Área (média), n=6	25438391	---
CV (%)	0,10	$\leq 2,0$
tR (média) (min)	6,52	---
CV (%)	0,08	---

#### 3.4.2 Repetibilidade de análise

A repetibilidade de análise foi avaliada através da variabilidade obtida no doseamento de seis de amostra, preparados ao nível 100% da concentração de trabalho, sendo expressa pelo replicados coeficiente de variação.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5. Repetibilidade de análise**

Parâmetros	Resultados	Critérios de aceitação
<i>Ibuprofeno</i>		
Doseamento (%)	101,35	---
	100,78	
	99,48	
	100,31	
	99,78	
	98,94	
Média	100,10	---
CV (%)	0,01	$\leq 2,0$

## Comentários

Os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, demonstrando que o método analítico é preciso na concentração de trabalho.

### 3.5 Estabilidade das soluções

A estabilidade da solução padrão de ibuprofeno e da solução amostra foi avaliada à temperatura ambiente (20°C – 24°C) com exposição à luz, e a 4±1°C, ao abrigo da luz. A variação da concentração foi determinada através da seguinte equação:

$$\text{Variação (\%)} = (C_f - C_i / C_i) \times 100$$

$C_f / i$  - concentração final / inicial

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6. Estabilidade das soluções**

Solução	C <sub>i</sub> (µgml <sup>-1</sup> )	C <sub>f</sub> (µgml <sup>-1</sup> )	Variação (%)	CrITÉrios de aceitação
<i>A 20°C – 24°C, não protegidos da luz, 3º dia</i>				
Solução padrão	142,20	143,31	0,79	≤ 2,0%
Solução amostra	153,95	154,86	0,59	
<i>A 4°C ± 1°C, ao abrigo da luz, 3º dia</i>				
Solução padrão	142,20	143,59	0,97	≤ 2,0%
Solução amostra	153,95	155,00	0,68	

## Comentários

Os resultados demonstram que as soluções são estáveis durante 3 dias à temperatura ambiente (20°C-24°C), não protegidas da luz e a 4±1°C, ao abrigo da luz.

## 4. Conclusões

Foi desenvolvida uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta pressão com detecção por ultravioleta para o doseamento do ibuprofeno no gel de NLS. O método demonstrou ser selectivo, linear, exacto e preciso dentro da gama de concentrações de trabalho. As soluções demonstraram ser estáveis durante pelo menos três dias.