

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Maria João Fernandes Faria

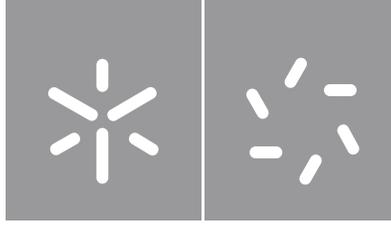
**Desenvolvimento e otimização de nanoformulações lipídicas com ação microbicida anti-VIH**

**Desenvolvimento e otimização de nanoformulações lipídicas com ação microbicida anti-VIH**

Maria João Fernandes Faria

UMinho | 2019

janeiro 2019



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Maria João Fernandes Faria

**Desenvolvimento e otimização de  
nanoformulações lipídicas com ação  
microbicida anti-VIH**

Tese de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da

**Professora Doutora Marlene Susana Dionísio Lúcio**

e do

**Doutor José Alberto Gonçalves das Neves**

## DECLARAÇÃO

Nome: Maria João Fernandes Faria

Endereço electrónico: faria.mariajf@gmail.com

Telefone: 934636332

Número do Cartão de Cidadão: 14731471

Título dissertação: Desenvolvimento e otimização de nanoformulações lipídicas com ação microbicida anti-VIH

Orientador(es):

Doutora Marlene Susana Dionísio Lúcio

Doutor José Alberto Gonçalves das Neves

Ano de conclusão: 2019

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

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

Universidade do Minho, 31/01/2019

**Assinatura:** \_\_\_\_\_



## Agradecimentos

Ao finalizar esta dissertação gostaria de agradecer o apoio e incentivo de diversas pessoas e entidades que tornaram possível este projeto.

À minha orientadora, Prof. Doutora Marlene Lúcio, a quem dirijo o meu maior agradecimento. Antes de mais, pelo voto de confiança e pela forma como me recebeu desde o primeiro dia. Obrigada por me desafiar e por me motivar a ser sempre a melhor versão de mim mesma. Foi, neste ano que passou, absolutamente incansável. Obrigada por todo o conhecimento e experiências partilhadas que tanto me enriqueceram e moldaram enquanto “mini-cientista”. Pela amizade e pelo pronto auxílio que, sem ser necessário pedir, estiveram sempre presentes. Foi um prazer percorrer esta etapa tão importante consigo.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor José das Neves, a quem agradeço todo o companheirismo e conhecimento transmitido. Pelo apoio constante e hospitalidade durante a curta estadia pelo Porto e ainda, por disponibilizar todos os meios necessários à realização dos ensaios celulares.

À Prof. Doutora Teresa Viseu que, desde o início, esteve sempre presente. Obrigada por toda a disponibilidade, ajuda e conselhos, fundamentais para a realização desta dissertação.

À Rita e à Sarah, que foram muito mais do que companheiras de laboratório. Obrigada pela amizade e pela boa disposição permanente. Pela paciência e persistência. Por, às vezes, serem literalmente o meu braço direito. Foi um gosto partilhar esta aventura convosco.

Ao Prof. Doutor Bruno Sarmiento, ao Prof. Doutor Artur Ribeiro e ao Prof. Doutor Raúl Machado por, gentilmente, terem colaborado e contribuído para a construção desta dissertação.

À menina Elisabete, pela afabilidade, pelas dicas e pelo apoio prestado no laboratório sempre que necessário.

Ao pilar da minha vida, a minha mãe, pelo apoio incondicional durante esta jornada. Tenho em ti a maior amizade do mundo. Obrigada pelas palavras sábias e por, sem saberes, seres a peça central de tudo isto. Pela enorme paciência e pelos sorrisos, mas acima de tudo por nunca me impedires de voar.

Ao meu irmão, por ser o maior companheiro a qualquer hora e por ter sempre as palavras certas.

Ao Costeira e à Mariana, por viverem esta aventura comigo. Por serem loucos comigo. Por me arrancarem gargalhadas sem fim. Mas acima de tudo, pela bonita amizade com que me presentearam todos os dias.

À Telma, por ser a minha pessoa. Por me acompanhar desde o primeiro dia que pousei em Braga. Obrigada por, mesmo quando longe, estares apenas à distância de um clique. Pelas deslocações ao Porto. Por me fazeres rir, mas acima de tudo pela amizade.

À Ni e ao Fru que, por tantas vezes, me acolheram e me apoiaram. Obrigada por cuidarem tão bem de mim e por serem incansáveis.

À Ju, à Laura, ao Ivo, à Márcia, à Irene, à Rute, à Durão, à Soraia, obrigada pela amizade permanecer sempre a mesma.

A todos, amigos e conhecidos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um dos maiores problemas de saúde pública ao nível mundial e as terapias à base de antirretrovirais (ARV) continuam a ser, nos dias de hoje, a melhor opção para o seu tratamento. No entanto, e apesar dos ARV terem melhorado significativamente a qualidade e esperança média de vida dos indivíduos infetados, é imperativo que, para além de propostas de tratamento, se invista no desenvolvimento de novas estratégias de prevenção para o combate da infeção pelo VIH e os nanossistemas provaram ser uma alternativa promissora, particularmente para a administração vaginal de microbicidas. A presente dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma estratégia profilática tópica para o combate do VIH/SIDA, tendo por base a formulação comercial Truvada<sup>®</sup>. Mais concretamente, desenvolveram-se sistemas coloidais lipídicos carregados com tenofovir disoproxil fumarato (TDF) que foram, posteriormente, incorporados em hidrogéis (HG) de carbómero com emtricitabina (FTC) para administração vaginal.

De modo a avaliar a influência da carga superficial dos nanossistemas na sua capacidade de interação com a mucina, vesículas unilamelares grandes (LUV) catiónicas, aniónicas e neutras foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta ( $\zeta$ ) antes e após incubação com uma suspensão de mucina. Avaliou-se ainda o efeito dos LUV na fluorescência intrínseca da proteína e no comportamento reológico de HG com 25 % (v/v) de mucina. Os estudos posteriores prosseguiram apenas com sistemas zwitteriónicos com diferentes graus de rigidez membranar, nos quais se encapsulou TDF por três metodologias distintas. Os nanossistemas foram caracterizados quanto ao tamanho e PDI; potencial- $\zeta$ ; eficácia de encapsulamento (EE %) e efeitos biofísicos dos fármacos no nanossistema. O desempenho terapêutico foi igualmente avaliado através do estudo *in vitro* da: cinética de libertação e permeação dos fármacos; citotoxicidade e avaliação reológica após incorporação dos LUV nos HG.

Os nanossistemas desenvolvidos não demonstraram citotoxicidade; apresentaram uma elevada capacidade de carga de TDF e permitiram que a libertação do fármaco a partir da base semissólida fosse mais controlada, favorecendo ainda a permeação do TDF encapsulado. As características do HG após incorporação dos nanossistemas mantiveram o adequado perfil pseudoplástico favorável à administração.



## **Abstract**

Human immunodeficiency virus (HIV) is an increasing global health concern, and antiretroviral-based therapies remain, in the present days, the best treatment option. However, even though these therapies have greatly improved life quality and expectancy of infected individuals, the development of new preventive strategies to prematurely fight HIV infection is imperative and nanotechnology-based systems have proven to be a promising alternative, mainly in microbicides field. The aim of this study was to develop a topical prophylactic strategy to fight HIV/AIDS, based on the commercial formulation Truvada®. Specifically, lipid-based colloidal systems loaded with tenofovir disoproxil fumarate (TDF) were developed and further incorporated in carbomer-based hydrogels (HG) with emtricitabine (FTC) for vaginal administration.

In order to evaluate the influence of nanosystems surface charge on its ability to interact with mucin molecules, cationic, anionic and neutral large unilamellar vesicles (LUV) were characterized regarding their size, polydispersity index (PDI) and zeta ( $\zeta$ ) potential before and after incubation with a mucin suspension. Furthermore, LUV's effect on mucin intrinsic fluorescence and on 25 % (v/v) of mucin HG was assessed. The following studies were carried out using zwitterionic nanosystems with different membrane rigidity degrees, in which TDF was encapsulated by three different methodologies. A thorough characterization of the nanosystems was carried out, including evaluation of size and PDI;  $\zeta$ -potential; encapsulation efficiency (EE %); and drugs biophysical effects in the nanosystem. The therapeutic performance was also evaluated through the *in vitro* study of: drug kinetics release and permeation; cytotoxicity and rheological evaluation after incorporation of LUV into HG.

The developed nanosystems did not show cytotoxicity; it showed a high TDF loading capacity and allowed the drug release from the semi-solid base to be more controlled, favouring the encapsulated TDF permeation. The characteristics of HG after incorporation of the nanosystems maintained the suitable pseudo plastic profile adequate for administration.



# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de abreviaturas .....	xxiii
<b>1. Introdução</b> .....	<b>27</b>
1.1. Motivação.....	27
1.2. Objetivo principal e objetivos específicos .....	27
1.3. Organização da dissertação .....	29

## Capítulo 1

---

<b>1. O vírus da imunodeficiência humana: uma pandemia com 38 anos</b> .....	<b>33</b>
1.1. Etiologia do vírus da imunodeficiência humana .....	33
1.2. Epidemia do VIH/SIDA: Incidência global e nacional.....	34
1.3. Visão geral sobre o vírus da imunodeficiência humana .....	36
1.3.1. Estrutura, genoma e modo de atuação .....	36
1.3.2. Vias de transmissão: um destaque à transmissão sexual.....	38
1.3.3. Locais de latência do vírus da imunodeficiência humana.....	40
<b>2. Antirretrovirais como o primeiro marco no combate ao VIH/SIDA</b> .....	<b>42</b>
2.1. Classificação dos fármacos antirretrovirais .....	42
2.2. Terapias clássicas no combate à pandemia VIH/SIDA.....	44
<b>3. Emergência de estratégias de pré-exposição profilática</b> .....	<b>46</b>
3.1. Pré-exposição profilática oral.....	46
3.1.1. Trato gastrointestinal: uma barreira à administração oral de fármacos .....	47
3.1.2. Ensaio clínico e disponibilidade no mercado de medidas de pré-exposição profilática oral.....	47
3.2. Pré-exposição profilática tópica .....	49
<b>4. Nanomedicina na prevenção do VIH/SIDA</b> .....	<b>51</b>
4.1. Nanossistemas lipídicos para a veiculação e entrega de fármacos: o caso particular dos lipossomas .....	51
4.2. Muco cérvico-vaginal: uma barreira à entrega vaginal de fármacos passível de ser permeada pelos nanossistemas .....	55
4.3. Incorporação dos lipossomas em bases semissólidas .....	58

## Capítulo 2: Materiais e Métodos

---

<b>1. Materiais</b> .....	63
1.1. Materiais e equipamentos utilizados ao longo do trabalho.....	63
1.2. Reagentes utilizados ao longo do trabalho .....	64
<b>2. Métodos</b> .....	65
<b>2.1. Descritores moleculares <i>in silico</i> do tenofovir disoproxil fumarato e da emtricitabina para apoio ao desenvolvimento de uma formulação</b> .....	65
2.1.1. pKa.....	67
2.1.2. LogD e LogP .....	67
2.1.3. Estabelecimento de ligações de hidrogénio .....	68
2.1.4. Área de superfície polar.....	69
2.1.5. Área de superfície de <i>van der Waals</i> .....	69
2.1.6. Solubilidade .....	69
<b>2.2. Preparação das soluções e/ou suspensões dos reagentes utilizados neste trabalho</b> .....	70
<b>2.3. Preparação das formulações lipossomais placebo e com fármacos</b> .....	70
2.3.1. Método de Hidratação .....	72
2.3.2. Método de Incubação .....	73
2.3.3. Método de Mistura Direta .....	74
<b>2.4. Incorporação das formulações lipossomais em bases semissólidas</b> .....	74
<b>2.5. Incorporação de formulações lipossomais em nanofibras poliméricas</b> .....	75
<b>2.6. Doseamento dos fármacos por espectroscopia UV/Vis</b> .....	75
<b>2.7. Caracterização das formulações desenvolvidas</b> .....	77
2.7.1. Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).....	77
2.7.1.1. Avaliação do diâmetro médio e homogeneidade das formulações lipossomais .....	78
2.7.1.2. Avaliação das propriedades biofísicas das formulações lipossomais.....	79
2.7.2. Dispersão Eletroforética de Luz (ELS) .....	81
2.7.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, usando a técnica de refletância total atenuada (ATR-FTIR).....	83
2.7.4. Difração de raios-X de baixo e alto ângulo (SWAXS) .....	84
2.7.5. Estudos reológicos dos géis.....	87
2.7.6. Estudos de desativação de fluorescência em estado estacionário .....	88
<b>2.8. Eficiência de encapsulamento dos fármacos nas formulações lipossomais</b> .....	89
<b>2.9. Estudos <i>in vitro</i> da cinética de libertação dos fármacos</b> .....	90
<b>2.10. Estudos de permeação membranas dos fármacos</b> .....	91
<b>2.11. Estudos de viabilidade celular</b> .....	92

## Capítulo 3: Resultados e Discussão

---

1.	Ensaio de pré-formulação .....	97
1.1.	Previsão <i>in silico</i> de descritores moleculares para apoio ao desenvolvimento de uma formulação .....	97
1.1.1.	Ionização .....	98
1.1.2.	Lipofilicidade .....	99
1.1.3.	Solubilidade .....	100
1.1.4.	Permeabilidade .....	101
1.1.5.	Classificação Biofarmacêutica .....	102
2.	Desenvolvimento e caracterização da formulação .....	103
2.1.	Qual deverá ser a carga superficial da formulação sabendo que na administração vaginal temos uma mucosa rica em mucina? .....	103
2.1.1.	Avaliação da mucoadesividade .....	103
2.2.	Qual deverá ser a composição da formulação e qual o método de encapsulamento dos fármacos? .....	111
2.2.1.	Determinação da eficiência de encapsulamento dos fármacos .....	112
2.2.2.	Avaliação do tamanho e carga de superfície das formulações lipossomais .....	114
2.2.3.	Avaliação das propriedades biofísicas dos nanossistemas .....	119
2.3.	Qual das formulações poderá vir a ter uma melhor performance <i>in vivo</i> ? .....	132
2.3.1.	Ensaio de libertação controlada .....	132
2.3.2.	Estudo da permeação dos fármacos .....	137
2.3.3.	Ensaio de viabilidade celular .....	138
2.3.4.	Determinação dos perfis reológicos dos hidrogéis contendo as formulações .....	139

## Capítulo 4: Conclusões e Perspetivas Futuras

---

1.	Conclusões .....	147
2.	Perspetivas Futuras .....	149
	Referências Bibliográficas .....	151
	Anexos .....	171



# Lista de Figuras

## Capítulo 1

---

- Figura 1.1** - Estimativa segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas para o VIH/SIDA (do inglês, The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)) do número total de adultos e crianças portadores do VIH no final de 2017 e a sua distribuição pelas diferentes regiões continentais. Adaptada de <sup>1</sup> .....34
- Figura 1.2** - Estrutura do vírus da imunodeficiência humana. Adaptado de <sup>2</sup> .....37
- Figura 1.3** - Etapas do ciclo de vida do VIH. (1) Fusão do vírus com a superfície do hospedeiro; (2) Entrada do RNA viral, TR, integrases e outras proteínas no seu interior; (3) Formação do DNA viral por intermédio da TR; (4) DNA viral é transportado para o núcleo e integrado no genoma do hospedeiro; (5) Novo material viral é clivado e agregado pela protease ocorrendo migração do novo RNA viral e das proteínas para a superfície da célula, formando-se um VIH novo e imaturo; (6) Maturação do vírus por ação de proteases que libertam viriões individuais de VIH. Adaptada de <sup>3</sup> .....38
- Figura 1.4** - Representação gráfica dos principais eventos inerentes à transmissão sexual do VIH. (1) deposição do VIH no lúmen cérvico-vaginal ou colorretal na sua forma livre ou associado a leucócitos; (2) o VIH tem de enfrentar a barreira de muco para atingir o epitélio vaginal; (3) o VIH pode atravessar a barreira epitelial por diversos mecanismos: (3a) infeção de células T CD4<sup>+</sup> intraepiteliais ou outros leucócitos; (3b) captura de partículas virais pelas células de Langerhans que auxiliam na sua passagem para o sub-epitélio sem que ocorra infeção celular; (3c) passagem direta através de falhas no epitélio derivadas de microtraumas, infeções ou inflamações vaginais e (3d) passagem direta através do epitélio; (4) após chegada ao sub-epitélio, o VIH pode infetar células suscetíveis tais como células dendríticas, células T CD4<sup>+</sup> ou macrófagos; (5) Células T CD4<sup>+</sup> promovem a amplificação local do vírus e (6) Migração do vírus para os nódulos linfáticos na sua forma livre ou associada sendo a infeção posteriormente propagada antes de atingir a circulação sistémica. Adaptado de <sup>4</sup> .....39
- Figura 1.5** - Estrutura das moléculas de mucina. Adaptado de <sup>5</sup> .....56
- Figura 1.6** - Representação esquemática da capacidade das partículas difundirem pelo muco, tendo em consideração as suas propriedades mucoadesivas e mucopenetrantes derivadas da sua carga superficial e tamanho médio. Adaptada de <sup>6</sup> .....58

## Capítulo 2

---

<b>Figura 2.1</b> - Representação esquemática dos tipos de formulação e constituição lipídica dos lipossomas utilizados ao longo do trabalho experimental. As formulações lipossomais foram desenvolvidas com o objetivo de testar: formulações de diferente fluidez, com e sem colesterol, com diferente carga superficial e miméticas da membrana viral <sup>7</sup> .....	71
<b>Figura 2.2</b> - Representação esquemática do procedimento experimental para obtenção de LUV.....	72
<b>Figura 2.3</b> - Representação esquemática do procedimento experimental para obtenção de LUV e encapsulamento de TDF ou FTC pelo método de hidratação do filme lipídico.....	73
<b>Figura 2.4</b> - Representação esquemática do procedimento experimental para obtenção de LUV e encapsulamento de TDF ou FTC pelo método de incubação.....	73
<b>Figura 2.5</b> - Representação esquemática do procedimento experimental para obtenção de LUV e encapsulamento de TDF ou FTC pelo método de mistura direta.....	74
<b>Figura 2.6</b> - Transição de fase principal em membranas lipídicas <sup>8</sup> .....	80
<b>Figura 2.7</b> - Representação esquemática da DIP cell <sup>®</sup> e do seu funcionamento (esquerda) bem como da deteção do movimento dos nanossistemas, induzido pela aplicação de um campo elétrico (direita) .....	83
<b>Figura 2.8</b> - Esquematização da difração de raios-X por bicamadas de fosfolípidos de espessura $d$ na direção perpendicular ao seu plano <sup>8</sup> .....	85
<b>Figura 2.9</b> - Esquema da classificação do comportamento reológico dos fluidos, com base na relação entre a viscosidade e a tensão de corte.....	87
<b>Figura 2.10</b> - <b>(A)</b> Comportamento dos fluidos newtonianos e não newtonianos em função da velocidade de corte e respetiva tensão de corte e <b>(B)</b> Representação do comportamento de fluidos não newtonianos dependentes do tempo.....	88
<b>Figura 2.11</b> - Célula de difusão de Franz. É constituída por dois compartimentos principais: a câmara dadora, onde é colocada a amostra e a câmara recetora. A separar estes dois sistemas encontra-se a membrana de polissulfona, através da qual ocorre a permeação do fármaco para a câmara recetora. Para além disso, possui ainda dois tubos paralelos que permitem a entrada e saída de água de modo a garantir a manutenção da temperatura e um tubo coletor através do qual é retirada a amostra e reposto o volume da câmara recetora com meio de dissolução fresco.....	92

## Capítulo 3

---

- Figura 3.1** - Estudo in silico de alguns parâmetros físico-químicos tendo por base a estrutura molecular da emtricitabina (esquerda) e do tenofovir disoproxil fumarato (direita), obtidas com recurso ao software da Chemaxon® incorporado com o módulo MarvinSketch®. Abreviaturas: ASVW, área de superfície de Van der Waals; LogP, coeficiente de partição (num sistema octanol/água) e PSA, área da superfície polar.....97
- Figura 3.2** - Representação gráfica da distribuição de microespécies de FTC e TDF em função da escala de pH bem como do valor de pKa do fármaco.....98
- Figura 3.3** - Representação gráfica da solubilidade intrínseca da FTC e do TDF (mg/mL) em função do pH. Elaborada com recurso ao software MarvinSketch®.....100
- Figura 3.4** - Divisão dos fármacos segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) .....102
- Figura 3.5** - Estudo do efeito da carga superficial das vesículas lipídicas no seu grau de mucoadesão por análise do (A) diâmetro hidrodinâmico; (B) índice de polidispersão; (C) potencial zeta e (D) intensidade de fluorescência em que o “A” representa antes e o “P” representa pós interação com uma solução de mucina.....104
- Figura 3.6** - Representação esquemática das possíveis interações da mucina com lipossomas de DODAC.....105
- Figura 3.7** - Representação esquemática das possíveis interações da mucina com lipossomas de DMPG.....106
- Figura 3.8** - Representação esquemática das possíveis interações da mucina com lipossomas de DMPC.....108
- Figura 3.9** - Perfis reológicos de (A) HG com diferentes percentagens de mucina (0,4 mg/mL); (B) HG após incorporação de MLV (4 mM) com diferentes cargas superficiais e (C) HG após incorporação de MLV com diferentes cargas superficiais e posterior adição de 25 % de mucina.....110
- Figura 3.10** - Eficácia de encapsulamento do TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M) em formulações com diferentes graus de rigidez membranar (4 mM) pelos métodos de hidratação, mistura direta e incubação.....113
- Figura 3.11** - Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e índice de polidispersão das formulações lipossomais desenvolvidas (4 mM) antes e após a incorporação de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), em que P representa as formulações placebo; H as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de hidratação; M.D., as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de mistura direta e I, as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de incubação.....116
- Figura 3.12** - Potencial zeta médio (mV) das formulações lipossomais desenvolvidas (4 mM), antes e após a incorporação de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), em que P representa as formulações placebo; H as formulações lipossomais

com TDF encapsulado pelo método de hidratação; M.D., as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de mistura direta e I, as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de incubação.....117

**Figura 3.13** - Carga superficial dos lipossomas zwitteriônicos (DOPC, DMPC e DSPC) após a incorporação de TDF. (A) Representação gráfica do potencial- $\zeta$  dos LUV após adição de volumes crescentes de uma solução de TDF concentrada ( $4 \times 10^{-4}$  M); (B) Comparação dos valores de potencial- $\zeta$  de (A), antes e após a adição da maior concentração de TDF e (C) Representação esquemática da interação entre o TDF e um fosfolípido zwitteriônico constituinte das formulações desenvolvidas. Na imagem do meio apresenta-se a estrutura química plana e na imagem à direita a projeção espacial da interação com o fármaco.....118

**Figura 3.14** - Representação gráfica dos perfis sigmóides e respectivos ajustes não lineares da temperatura de transição de fase principal de LUV de DPPC (4 mM) na ausência ou presença de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), encapsulado por incubação, hidratação e mistura direta.....119

**Figura 3.15** - Perfis de difração SAXS de DPPC. (A) Fase gel à temperatura de 20 °C e (B) Fase fluida à temperatura de 55 °C. As linhas a tracejado indicamos os principais picos de difração do DPPC em cada fase.....122

**Figura 3.16** - Perfis de difração WAXS de DPPC na fase gel à temperatura de 20 °C. As linhas a tracejado indicamos os principais picos de difração do DPPC.....123

**Figura 3.17** - Representação esquemática dos principais efeitos biofísicos dos fármacos TDF e FTC em bicamadas de DPPC avaliados por SAXS e WAXS.....126

**Figura 3.18** - Espectro de transmitância de ATR-FTIR obtido a partir de lipossomas de DPPC, sem fármacos. Nas zonas sombreadas destacam-se os grupos funcionais característicos dos fosfolípidos.....127

**Figura 3.19** - Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol.....128

**Figura 3.20** - Detalhe dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol, mostrando as bandas de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos  $\text{CH}_2$ .....129

**Figura 3.21** - Detalhe dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol, mostrando as bandas de vibração de dobramento angular ( $\delta$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$ .....130

<b>Figura 3.22</b> - Detalhe dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol, mostrando as bandas de vibração do grupo C=O.....	<b>131</b>
<b>Figura 3.23</b> - Representação gráfica dos perfis de libertação in vitro da FTC, a uma temperatura controlada de 37 °C, em solução aquosa e após incorporação no HG.....	<b>133</b>
<b>Figura 3.24</b> - Comparação dos perfis de libertação in vitro e a uma temperatura controlada de 37 °C do (A) TDF quando disperso em água e (B) do TDF encapsulado em MLV com crescentes graus de rigidez (DOPC, DPPC e DSPC, respetivamente).....	<b>134</b>
<b>Figura 3.25</b> - Representação gráfica dos perfis de libertação dos fármacos in vitro em meio aquoso e a uma temperatura controlada de 37 °C. (A) Perfil de libertação do TDF não-encapsulado, encapsulado em lipossomas de DPPC e encapsulado em lipossomas de DPPC incorporado no HG. (B) Comparação dos perfis de libertação do TDF quando encapsulado em lipossomas de DMPC:CHOL:DOPE (7:2:1) incorporados em nanofibras poliméricas e lipossomas de DPPC incorporados no HG; Comparação dos perfis de libertação da FTC quando encapsulada em lipossomas de DMPC:CHOL:DOPE (7:2:1) incorporados em nanofibras poliméricas e quando dispersa no gel.....	<b>136</b>
<b>Figura 3.26</b> - Representação gráfica dos perfis de difusão do TDF não-encapsulado e encapsulado em lipossomas de DMPC (4 mM) através de uma membrana de polissulfona, com uma temperatura controlada de 37 °C.....	<b>137</b>
<b>Figura 3.27</b> - Viabilidade das células CaSki e HEC-1-A avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com MLV DODAB, MLV DODAB+TDF e MLV DODAB+FTC.....	<b>138</b>
<b>Figura 3.28</b> - Viabilidade das células CaSki avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com MLV DPPC:CHOL (6:4), MLV DPPC:CHOL (6:4)+TDF e MLV DPPC:CHOL (6:4)+FTC.....	<b>138</b>
<b>Figura 3.29</b> – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DOPC e de DOPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DOPC e DOPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DOPC com e sem os fármacos. (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DOPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (D) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DOPC:chol (7:3) com e sem os fármacos.....	<b>140</b>
<b>Figura 3.30</b> – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DMPC e de DMPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DMPC e DMPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento	

reológico do HG após incorporação de lipossomas de DMPC com e sem os fármacos. (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DMPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (D) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DMPC:CHOL (7:3) com e sem os fármacos.....141

**Figura 3.31** – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DPPC e de DPPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DPPC e DPPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DPPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DPPC:CHOL (7:3) com e sem os fármacos.....142

**Figura 3.32** – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DSPC e de DSPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DSPC e DSPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DSPC com e sem os fármacos. (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DSPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (D) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DSPC:chol (7:3) com e sem os fármacos.....143

# Lista de Tabelas

## Capítulo 1

---

<b>Tabela 1.1</b> - Classes dos antirretrovirais consoante o seu alvo e mecanismo de ação.....	<b>43</b>
<b>Tabela 1.2</b> - Ensaios clínicos para a avaliação de novas estratégias de PrEP oral. Adaptada de <sup>96</sup> .....	<b>48</b>
<b>Tabela 1.3</b> - Ensaios clínicos de estratégias de PrEP tópica. Adaptada de <sup>96</sup> .....	<b>50</b>
<b>Tabela 1.4</b> - Sumário dos sistemas de transporte lipídicos utilizados na entrega de fármacos antiretrovirais e os principais objetivos alcançados.....	<b>52</b>

## Capítulo 2

---

<b>Tabela 2.1</b> - Materiais e equipamentos utilizados ao longo da dissertação.....	<b>63</b>
<b>Tabela 2.2</b> - Reagentes utilizados ao longo da dissertação.....	<b>64</b>
<b>Tabela 2.3</b> - Impacto do Sistema de Classificação Biofarmacêutica no desenvolvimento de uma formulação.....	<b>66</b>
<b>Tabela 2.4</b> - Concentrações de lipossomas e de fármaco testadas nos ensaios de viabilidade celular. <b>a)</b> Lipossomas testados na ausência de fármaco (formulações placebo) e <b>b)</b> Lipossomas com fármaco encapsulado.....	<b>93</b>

## Capítulo 3

---

<b>Tabela 3.1</b> - Eficácia de encapsulamento da FTC ( $7,19 \times 10^{-5}$ M) em formulações com diferentes graus de rigidez membranar (4 mM) testada apenas pelos métodos de hidratação e mistura direta.....	<b>112</b>
<b>Tabela 3.2</b> - Temperatura de transição de fase principal ( $T_m$ ) e cooperatividade da transição (B) de sistemas lipídicos de DMPC, DPPC, DSPC e DODAB (4 mM) antes e após o encapsulamento do TDF ( $4 \times 10^{-5}$ M) por diferentes metodologias: incubação, hidratação e mistura direta.....	<b>121</b>
<b>Tabela 3.3</b> - Valores de dL obtidos a partir dos picos de difração SAXS em estruturas multilamelares de DPPC, na fase gel ( $L\beta$ a 20 °C) e na fase fluida ( $L\alpha$ a 50 °C) e das dC obtidas a partir dos picos de difração WAXS em estruturas multilamelares de DPPC, na fase gel ( $L\beta$ a 20 °C).....	<b>124</b>
<b>Tabela 3.4</b> - Modos de vibração num espectro IV de um fosfolípido <sup>248,249</sup> .....	<b>128</b>
<b>Tabela 3.5</b> - Alteração dos modos vibracionais do espectro de DPPC após a introdução de FTC ou TDF.....	<b>131</b>



## Lista de abreviaturas

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
APV	Amprenavir
ARV	Antiretroviral
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com atenuação total da reflexão
ATR	Atenuação total da reflexão
ATV	Mesilato de atazanavir
AZT	Zidovudina
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica (do inglês, <i>Biopharmaceutical Classification System</i> )
BHE	Barreira hematoencefálica
cDNA	DNA complementar
CHOL	Colesterol
d4T	Estavudina
d <sub>c</sub>	Distância de curto alcance
d <sub>L</sub>	Distância de longo alcance
ddC	Zalcitabina
ddl	Didanosina
ddl EC	Didanosina revestida entericamente
DLS	Dispersão de luz dinâmica (do inglês, <i>dynamic light scattering</i> )
DLV	Delavirdina
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DOPS	Dioleoilfosfatidilserina

DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAC	Cloreto de dioctadecildimetilamônio
DRV	Darunavir
DSPC	Distearoilfosfatidilcolina
DTG	Dolutegravir
EE	Eficácia de Encapsulamento
EFV	Efavirenz
ELS	Dispersão de luz eletroforética (do inglês, <i>electrophoretic light scattering</i> )
ENF	Enfuvirtida
ETR	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FBS	Soro Fetal Bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i> )
FDA	Administração federal de alimentos e medicamentos (do inglês, <i>food and drug administration</i> )
F.M.	Fora do mercado
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (do inglês, <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
GUV	Vesículas unilamelares gigantes (do inglês, <i>giant unilamellar vesicles</i> )
HG	Hidrogel
IDV	Indinavir
IE	Inibidores de entrada
IF	Inibidores de fusão
II	Inibidores da integrase
IP	Inibidores da protease
IR	Infravermelho (do inglês, <i>infrared</i> )
LogD	Logaritmo do coeficiente de distribuição
LogP	Logaritmo do coeficiente de partição

LogS	Solubilidade intrínseca
LPV	Lopinavir
LUV	Vesículas unilamelares grandes (do inglês, <i>large unilamellar vesicles</i> )
MLV	Vesículas multilamelares grandes (do inglês, <i>large multilamellar vesicles</i> )
MTT	Brometo de ((3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio)
MVC	Maraviroc
NFV	Mesilato de nelfinavir
NITR	Nucleósidos inibidores da transcriptase reversa
NNITR	Não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa
NPV	Nevirapina
OMS	Organização mundial de saúde
p.a.	<i>Pro analysis</i>
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PDI	Índice de polidispersão (do inglês, <i>polydispersity index</i> )
PEG	Polietilenoglicol
pKa	Cologaritmo da constante de acidez
POPC	Palmitoiloleoilfosfatidilcolina
PrEP	Pré-exposição profilática
PSA	Área de superfície polar (do inglês, <i>polar surface area</i> )
QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade (do inglês, <i>quantitative structure–activity relationship</i> )
QSPR	Relação quantitativa estrutura-propriedade (do inglês, <i>quantitative structure–property relationship</i> )
RAL	Raltegravir
RNA	Ácido ribonucleico
RPV	Rilpivirina
RTV	Ritonavir
SAXS	Difração de raios-X de baixo ângulo (do inglês <i>small-angle x-ray scattering</i> )
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SM	Esfingomielina

<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SQV</b>	Saquinavir
<b>SQVm</b>	Mesilato de saquinavir
<b>SUV</b>	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês, <i>small unilamellar vesicles</i> )
<b>TDF</b>	Tenofovir disoproxil fumarato
<b>Tm</b>	Temperatura de transição de fase
<b>TPV</b>	Tipranavir.
<b>TR</b>	Transcriptase reversa
<b>UNAIDS</b>	Programa Conjunto das Nações Unidas para o VIH/SIDA (do inglês, <i>The Joint United Nations programme on HIV/AIDS</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIH</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>Vis</b>	Visível
<b>VIS</b>	Vírus da imunodeficiência símia
<b>VWSA</b>	Área de superfície de van der Waals (do inglês, <i>van der Waals surface area</i> )
<b>WAXS</b>	Difração de raios-X de alto ângulo (do inglês, <i>wide-angle x-ray scattering</i> )

# 1. Introdução

## 1.1. Motivação

O VIH continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública atuais tendo vindo a ser explorado o desenvolvimento de estratégias profiláticas, nomeadamente através do uso de microbicidas<sup>9</sup>.

Os lipossomas têm sido extensivamente estudados como sistemas de entrega tópica de fármacos, destacando-se as suas aplicações dermatológicas<sup>10-12</sup> e, mais recentemente, a administração destes sistemas por via genital<sup>13-15</sup>. No entanto, o facto de as formulações lipossomais serem dispersões coloidais aquosas, constitui um entrave à sua aplicação tópica uma vez que o carácter fluído e pouco viscoso destas formulações poderá promover a sua expulsão precoce e, conseqüentemente, um menor tempo de retenção do fármaco no local terapêutico. Assim, a incorporação destes sistemas em veículos de maior viscosidade é uma boa alternativa, sendo que vários estudos demonstraram compatibilidade entre os lipossomas e bases semissólidas, como por exemplo hidrogéis, à base de ácido poliacrílico<sup>16-19</sup>.

## 1.2. Objetivo principal e objetivos específicos

O principal objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização e caracterização de uma estratégia profilática tópica para o combate do VIH, tendo por base a formulação comercial Truvada®. Mais concretamente, desenvolveram-se sistemas coloidais lipídicos carregados com tenofovir disoproxil fumarato que foram, posteriormente, incorporados em géis hidrofílicos com emtricitabina para administração vaginal.

Inicialmente, e com o intuito de desenvolver um nanossistema inovador e eficaz, foram realizados estudos de pré-formulação com o intuito de responder às seguintes questões:

- (i) Serão as características físico-químicas dos fármacos TDF e FTC adequadas para as formulações propostas?
- (ii) Qual a influência da carga superficial dos nanossistemas no seu grau de interação com a mucosa vaginal?
- (iii) O tamanho dos nanossistemas será adequado para uma boa mucoadesão/mucopenetração?

- (iv) Quais os efeitos do fármaco na estrutura membranar dos lipossomas quando o fármaco é encapsulado?
- (v) Existirão diferenças significativas entre diferentes métodos de encapsulação do fármaco nos nanossistemas?
- (vi) Terá o grau de fluidez/rigidez das membranas lipídicas influência no seu tamanho e eficácia de encapsulação?

Assim, após seleção do sistema lipídico mais promissor procedeu-se à sua incorporação em géis hidrofílicos de viscosidade adequada para administração vaginal. Desta forma, definiram-se ao longo desta dissertação alguns objetivos específicos, tais como:

- (a)** caracterização biofísica e físico-química da formulação desenvolvida;
- (b)** avaliação da cinética de libertação dos fármacos em condições *in vitro*;
- (c)** avaliação da permeação em condições *in vitro*;
- (d)** avaliação da citotoxicidade das formulações desenvolvidas em linhas celulares cervicais e endometriais;
- (e)** avaliação reológica dos géis desenvolvidos.

### **1.3. Organização da dissertação**

A seguinte dissertação encontra-se dividida em 4 capítulos, abaixo sumarizados.

#### **Capítulo 1 – Estado da Arte**

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão da literatura sobre o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), sendo também apresentados alguns exemplos de trabalhos de investigação desenvolvida nesta área. Inclui ainda uma pequena referência aos fármacos antirretrovirais (ARV) como primeiro marco no combate à doença e à sua recente implementação em estratégias de carácter profilático. Por último, é feita uma revisão da utilização de nanotransportadores lipídicos para a entrega de ARV.

#### **Capítulo 2 – Materiais e Métodos**

Neste capítulo faz-se uma descrição dos reagentes, materiais e metodologias experimentais utilizados, apresentando-se uma pequena nota introdutória sobre o fundamento de cada uma das técnicas utilizadas.

#### **Capítulo 3 – Resultados e Discussão**

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental, assim como uma breve discussão dos mesmos.

#### **Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras**

Neste capítulo são enumeradas as principais conclusões obtidas no trabalho desenvolvido assim como sugestões de futuros ensaios a serem realizados no âmbito deste projeto.



# CAPÍTULO 1



## ESTADO DA ARTE



# 1. O vírus da imunodeficiência humana: uma pandemia com 38 anos

## 1.1. Etiologia do vírus da imunodeficiência humana

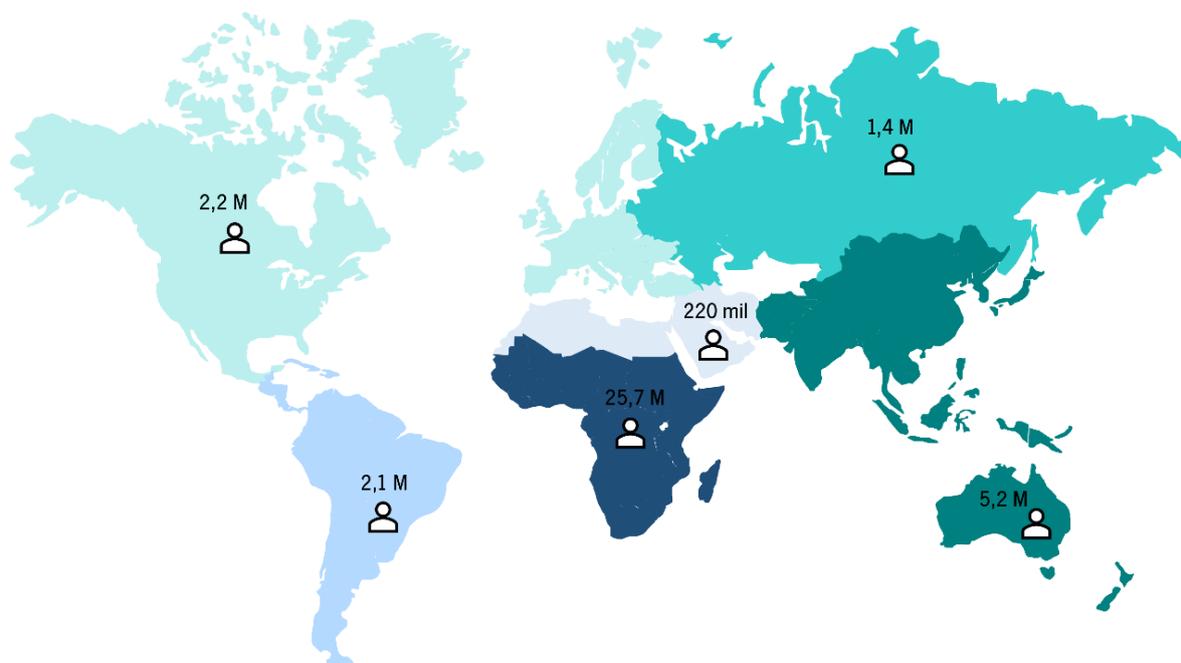
O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um lentivírus que se caracteriza por deteriorar de forma progressiva o sistema imunitário do hospedeiro, sendo o responsável pelo síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) <sup>20,21</sup>. A infeção pelo VIH normalmente compreende três etapas distintas: (i) uma fase inicial de infeção aguda que se caracteriza pelo desenvolvimento de sintomas semelhantes aos de uma gripe, podendo não se chegar a manifestar; (ii) uma fase assintomática ou de latência e (iii) uma fase final em que ocorre um aumento da carga viral e o aparecimento da doença <sup>22</sup>. A SIDA corresponde à última e mais grave etapa de infeção pelo VIH levando, normalmente, a uma diminuição dramática no número de células T que expressam a glicoproteína CD4. Nesta fase, o sistema imunitário já se encontra de tal forma debilitado que é alvo de uma série de doenças oportunistas <sup>22,23</sup>.

Apesar de a sua origem não ser totalmente conhecida, pensa-se que o vírus se desenvolveu primordialmente no continente africano devido a infeções zoonóticas com o vírus da imunodeficiência simia (VIS), presente em múltiplas espécies de primatas não-humanos <sup>24-26</sup>. As estirpes virais VIScpz e VISsmm, presentes em linhagens de chimpanzés comuns e na espécie *Cercocebus atys* respetivamente, terão infetado grupos de caçadores que perseguiram primatas para obtenção de alimento e contactavam diretamente com o seu sangue, dando origem aos dois tipos de VIH hoje conhecidos (VIH-1 e VIH-2) <sup>24,27,28</sup>.

Os primeiros casos de SIDA foram reportados nos Estados Unidos da América (EUA) em 1981 <sup>29,30</sup> e motivaram, desde logo, grande parte da comunidade científica a descobrir qual seria o agente responsável por tal patologia <sup>27</sup>. Dois anos mais tarde, o vírus responsável pela danificação contínua do sistema imunitário foi isolado <sup>31</sup> e, no ano seguinte, identificado como o principal causador da SIDA <sup>32-35</sup>. Desde então, e num período de tempo relativamente curto, a SIDA transformou-se numa das maiores e mais agressivas pandemias do século XXI provocando a morte de milhões de pessoas <sup>36,37</sup>.

## 1.2. Epidemia do VIH/SIDA: Incidência global e nacional

O VIH/SIDA é um dos maiores problemas de saúde pública ao nível mundial e uma das doenças infecciosas com maior taxa de mortalidade entre os adultos <sup>38,39</sup>. Desde o início da epidemia, mais de 77 milhões de indivíduos contraíram o VIH e cerca de 35 milhões perderam a vida. Atualmente, estima-se que 36,9 milhões de pessoas por todo o mundo estejam infetadas com o vírus (Figura 1.1) e que metade das infeções incidam sobre o género feminino <sup>40,41</sup>. Para além disso, apenas uma fração da população infetada tem conhecimento do seu estado (75 %) e, desta, cerca de 79 % já tem acesso a tratamento <sup>40</sup>. Em 2017 o VIH causou a morte de 940 mil pessoas, o que constituiu uma redução de 51 % face a 2004, e levou ao aparecimento de 1,8 milhões de novos casos, menos 400 mil do que em 2015, tendência que se tem mantido e que sugere um decréscimo anual no número de novas infeções pelo vírus<sup>40</sup>. Apesar da sua distribuição ao nível mundial, a incidência do VIH/SIDA em países de baixo e médio rendimento é consideravelmente superior, estimando-se que os países da África Subariana representem 67 % de todos os casos reportados <sup>20,42</sup>. As Caraíbas, América Latina, sul e sudeste da Ásia são também regiões criticamente afetadas pelo VIH e, apesar das estatísticas mostrarem uma diminuição evidente no número de novos casos a serem diagnosticados, a taxa de prevalência do VIH/SIDA tem, de modo geral, aumentado <sup>43</sup>.



**Figura 1.1** - Estimativa segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas para o VIH/SIDA (do inglês, *The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)*) do número total de adultos e crianças portadores do VIH no final de 2017 e a sua distribuição pelas diferentes regiões continentais. Adaptada de <sup>1</sup>.

Portugal continua a ser um dos países da Europa Ocidental com maior taxa de diagnóstico anual de novos casos VIH/SIDA <sup>44</sup>. Nos últimos anos, e graças à implementação de terapias e estratégias de prevenção mais eficazes, esta tendência tem vindo a ser contrariada, assistindo-se a um decréscimo de cerca de 73,5 % entre 2000 e 2016 <sup>45</sup>. As regiões mais afetadas pela epidemia continuam a ser as grandes áreas metropolitanas, nomeadamente, Lisboa, Porto, Setúbal e Faro sendo que, no que diz respeito ao género, o sexo masculino é o mais predominante e representa 67 % dos 841 casos reportados em 2016 <sup>45</sup>. Para além disso, continua a verificar-se que a transmissão heterossexual é a responsável pelo maior número de novas infeções, seguida de casos de relações homossexuais entre homens <sup>44,45</sup>.

Apesar dos recentes avanços terapêuticos, o VIH/SIDA continua a afetar uma grande percentagem da população mundial e a constituir um grave problema de saúde pública <sup>20,46</sup>. Neste sentido, o Programa Conjunto das Nações Unidas para o VIH/SIDA (do inglês, *The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)*) em colaboração com outras entidades e líderes mundiais, tem reunido esforços e levado a cabo uma série de iniciativas com o intuito de erradicar a epidemia até ao final de 2030 <sup>47</sup>. Para tal, e de modo a acelerar a resposta contra o VIH/SIDA, estabeleceram-se em dezembro de 2013 um conjunto de metas de carácter preventivo e terapêutico com a designação “*90-90-90: Treatment for all*” cujos objetivos são, até ao final de 2020, que: 90 % da população seropositiva tenha conhecimento do seu estado; 90 % dos indivíduos com conhecimento do seu estado tenham acesso a terapias ARV e, por último, que os 90 % que se encontram em regimes ARV consigam atingir a supressão viral <sup>47</sup>. Para além disso, pretende-se ainda reduzir o número de novas infeções para 500 mil até ao final de 2020, objetivo que está longe de ser concretizado uma vez que o decréscimo tem ocorrido a um ritmo demasiado lento. A indústria biomédica tem também disponibilizado vários recursos e mobilizado grandes quantias financeiras no combate a esta patologia, prevendo-se que os 21 biliões de dólares investidos em 2017 aumentem para 26 biliões até ao final de 2020 <sup>40</sup>.

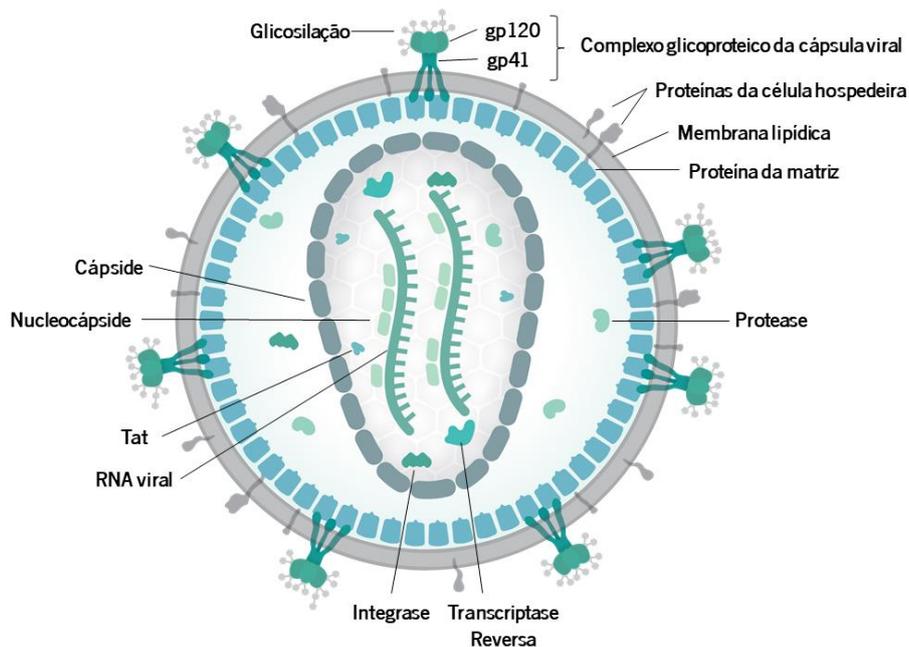
Dadas as estatísticas alarmantes e a grande inquietação que tem gerado ao nível económico e social, nas últimas décadas têm-se reunido esforços de modo a desenvolver estratégias inovadoras de carácter preventivo, capazes de impedir a disseminação do vírus e oferecer novas oportunidades no combate ao VIH/SIDA <sup>20,48</sup>.

### 1.3. Visão geral sobre o vírus da imunodeficiência humana

#### 1.3.1. Estrutura, genoma e modo de atuação

Há cerca de três décadas, foram identificados dois tipos de um mesmo lentivírus pertencente à família Retroviridae, o VIH-1 e VIH-2, que viriam a estar na base de uma das doenças infecciosas mais devastadoras da atualidade <sup>49</sup>. O VIH-1 compreende quatro grupos genotipicamente distintos (M, N, O e P) que resultaram de eventos isolados de cruzamento entre espécies <sup>24,28,49</sup>. O grupo M, principal responsável pela infecção de milhões de pessoas em todo o mundo, foi o primeiro a ser descoberto e encontra-se dividido em 9 subtipos: A-D, F-H, J e K <sup>24</sup>. Destes, destaca-se o subtipo C por ser o mais prevalente e incidir maioritariamente no continente africano e na Índia, sendo que nas Américas, Europa Ocidental e na Austrália o subtipo B é o mais predominante <sup>24,28</sup>. Já os grupos N, O e P estão restritos ao oeste de África e a sua prevalência é consideravelmente menor do que a do grupo M <sup>24,28</sup>. Paralelamente, mas com algumas diferenças estruturais e funcionais, o VIH-2 engloba um total de 5 grupos e apresenta uma distribuição geográfica muito mais confinada <sup>28</sup>. Ambas as formas do vírus são capazes de infectar o ser humano, no entanto o tipo 1 é o que exibe maior virulência uma vez que apresenta uma progressão clínica extremamente rápida e taxas de transmissão mais elevadas comparativamente ao VIH-2 <sup>20,27,50</sup>.

O VIH é um agente patogénico de dimensões nanométricas (100–150 nm), constituído por três elementos fundamentais: uma cápsula viral associada a uma matriz proteica, uma nucleocápside e duas cadeias simples de ácido ribonucleico (RNA) que codificam os nove genes do vírus <sup>20</sup>. O seu genoma (Figura 1.2) é composto por três genes principais (*gag*, *pol* e *env*) responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e algumas enzimas, mas também por seis genes com funções regulatórias (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) <sup>20,51</sup>. Os genes estruturais são particularmente importantes uma vez que codificam grupos específicos de antigénios (*gag*), enzimas como a transcriptase reversa (TR), integrases e proteases (*pol*) e ainda a gp120 e a gp41, duas glicoproteínas presentes na membrana externa do vírus, capazes de reconhecer o recetor CD4 e os co-recetores CCR5 ou CXCR4 da membrana da célula hospedeira e ainda promover a fusão do vírus com a célula, respetivamente (*env*) <sup>20,21,51</sup>.

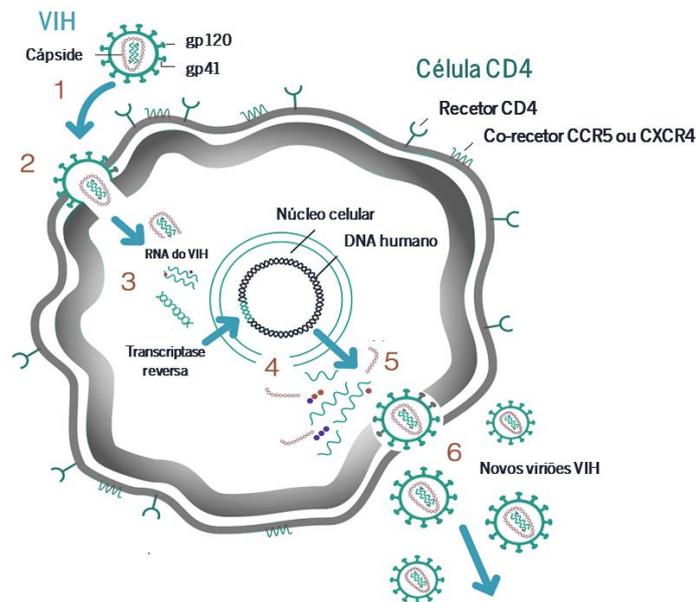


**Figura 1.2** - Estrutura do vírus da imunodeficiência humana. Adaptado de <sup>2</sup>.

Os principais alvos do VIH são células pertencentes ao sistema imunitário do hospedeiro, tais como macrófagos, células T e células dendríticas, todas elas de extrema importância por desempenharem um papel fundamental na defesa do organismo contra diversos agentes patogénicos <sup>52</sup>. Um elemento fundamental da composição estrutural da maioria das células suscetíveis ao VIH é a expressão à sua superfície da glicoproteína CD4 e elementos da família de recetores de quimiocinas transmembranares, tais como o CCR5 ou o CXCR4, que constituem requisitos necessários para que ocorra infeção <sup>20</sup>.

O processo de infeção (Figura 1.3) envolve, numa primeira fase, a ligação da glicoproteína gp120 da cápsula viral ao recetor CD4 presente na membrana da célula hospedeira <sup>20,53</sup>. Quando a ligação se encontra completamente estabelecida, a gp120 sofre uma alteração conformacional que permitirá a sua interação com outros co-recetores e, dependendo do tipo de co-recetor presente na célula, os vírus podem ser categorizados como R5 ou X4, no entanto a maioria das infeções derivam de vírus do tipo R5 <sup>28</sup>. Posteriormente, e como resultado da interação entre a glicoproteína e o co-recetor, a gp41 fica exposta promovendo a fusão do vírus com a membrana celular do hospedeiro <sup>20</sup>. Por último, os conteúdos presentes no núcleo viral do VIH são libertados e dispersos no citoplasma da célula hospedeira, ocorrendo a conversão do RNA em ácido desoxirribonucleico (DNA) por intermédio da TR <sup>20,42</sup>. O processo de infeção termina quando o DNA viral é incorporado no genoma do hospedeiro, passando este a ser

capaz de produzir viriões que irão infectar novas células hospedeiras, propagando a infecção e, nesta fase, a infecção torna-se irreversível<sup>20,42,53</sup>.



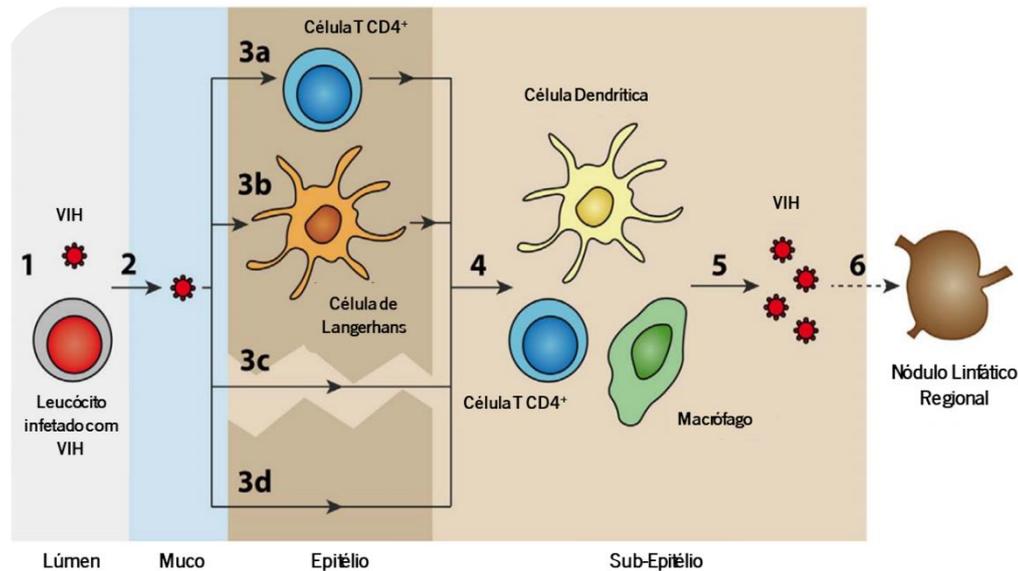
**Figura 1.3** - Etapas do ciclo de vida do VIH. (1) Fusão do vírus com a superfície do hospedeiro; (2) Entrada do RNA viral, TR, integrases e outras proteínas no seu interior; (3) Formação do DNA viral por intermédio da TR; (4) DNA viral é transportado para o núcleo e integrado no genoma do hospedeiro; (5) Novo material viral é clivado e agregado pela protease ocorrendo migração do novo RNA viral e das proteínas para a superfície da célula, formando-se um VIH novo e imaturo; (6) Maturação do vírus por ação de proteases que libertam viriões individuais de VIH. Adaptada de <sup>3</sup>.

### 1.3.2. Vias de transmissão: um destaque à transmissão sexual

O VIH está presente em diversos fluídos corporais tais como o sangue, sêmen, fluídos vaginais e pré-ejaculatórios, líquido cefalorraquidiano e leite materno, sendo que grande parte deles podem ser potenciais fontes de transmissão<sup>27</sup>. Neste sentido, o ser humano pode contrair o vírus por diferentes vias, sendo as mais comuns a via parentérica ou percutânea através da troca de agulhas contaminadas entre toxicod dependentes, transfusões de sangue contaminado ou exposição direta de fluídos corporais a feridas abertas ou membranas mucosas e a via de transmissão mãe-filho durante a gravidez, o parto ou a amamentação<sup>20,28</sup>. No entanto, é a via sexual que continua a registar as maiores taxas de transmissão pelo que se torna imperativo compreender os mecanismos subjacentes a este modo de infecção quando se consideram os microbicidas como estratégia de prevenção<sup>9,52</sup>.

Normalmente, o processo de transmissão viral de homens para mulheres (Figura 1.4) inicia-se após ejaculação e deposição do vírus no lúmen vaginal na forma livre ou associado a estruturas celulares (e.g. macrófagos)<sup>9,20</sup>. O sêmen, para além de ser um importante transportador natural do VIH, é

constituído por fibrilas amiloides que conferem proteção ao vírus e, simultaneamente, potenciam o processo de infecção na medida em que estimulam o epitélio cérvico-vaginal a produzir quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que levarão a um aumento no número de células alvo do VIH, facilitando a sua ligação às mesmas <sup>54</sup>.



**Figura 1.4** - Representação gráfica dos principais eventos inerentes à transmissão sexual do VIH. **(1)** deposição do VIH no lúmen cérvico-vaginal ou colorretal na sua forma livre ou associado a leucócitos; **(2)** o VIH tem de enfrentar a barreira de muco para atingir o epitélio vaginal; **(3)** o VIH pode atravessar a barreira epitelial por diversos mecanismos: **(3a)** infecção de células T CD4+ intraepiteliais ou outros leucócitos; **(3b)** captura de partículas virais pelas células de Langerhans que auxiliam na sua passagem para o sub-epitélio sem que ocorra infecção celular; **(3c)** passagem direta através de falhas no epitélio derivadas de microtraumas, infeções ou inflamações vaginais e **(3d)** passagem direta através do epitélio; **(4)** após chegada ao sub-epitélio, o VIH pode infectar células suscetíveis tais como células dendríticas, células T CD4+ ou macrófagos; **(5)** Células T CD4+ promovem a amplificação local do vírus e **(6)** Migração do vírus para os nódulos linfáticos na sua forma livre ou associada sendo a infecção posteriormente propagada antes de atingir a circulação sistémica. Adaptado de <sup>4</sup>.

Uma vez no lúmen vaginal e de modo a ser distribuído sistemicamente, o VIH necessita de enfrentar duas barreiras distintas: numa primeira fase a barreira de muco cérvico-vaginal e, posteriormente, a barreira epitelial <sup>9</sup>. A mucosa vaginal é uma barreira física e química de extrema importância que atua como primeira linha de defesa contra diversos agentes patogénicos, nomeadamente, o VIH <sup>55,56</sup>. O seu ambiente naturalmente rico em agentes com atividade antiviral (e.g. ácido láctico, quimiocinas, citocinas, anticorpos) aliado às suas propriedades acidicas (pH entre 3,5-4,5), resultantes da produção constante de ácido láctico pelos lactobacilos, tornam a migração através desta

barreira numa tarefa árdua, promovendo assim a defesa contra a infecção viral <sup>57</sup>. Para além disso, a mucosa vaginal conta ainda com uma densa rede de mucina e com a presença de fluidos externos que poderão também contribuir como uma barreira na defesa contra a transmissão viral <sup>58</sup>.

No que diz respeito à camada epitelial, esta destaca-se como o principal entrave à penetração do VIH uma vez que, se o epitélio vaginal e ectocervical pavimentoso estratificado se encontrarem intactos, a entrada do VIH será pouco provável e muito limitada <sup>4,9</sup>. Existem, no entanto, diferentes mecanismos pelos quais o VIH é capaz de atravessar este epitélio: **a)** os viriões livres conseguem penetrar até determinada profundidade, o que poderá ser suficiente para infetarem algumas células alvo intraepiteliais, tais como células de Langerhans ou células T CD4<sup>+</sup> que completarão o transporte transepitelial do VIH; **b)** existência de microtraumas, inflamações ou infeções vaginais que promovem o estreitamento do epitélio ou destruição da camada mucosa, facilitando o transporte transepitelial do VIH; **c)** passagem direta através do epitélio, dificilmente observável quando este se encontra íntegro, mas comum no epitélio colunar endocervical e colorretal <sup>9,20,59,60</sup>.

Após a infecção inicial, os viriões ou células infetadas dirigem-se para os nódulos linfáticos regionais onde ocorrerá uma amplificação do vírus em células T naïve que, por sua vez, promoverão a rápida propagação da infecção viral até aos órgãos linfáticos onde o vírus será continuamente replicado até atingir a circulação sistémica <sup>9</sup>.

### **1.3.3. Locais de latência do vírus da imunodeficiência humana**

O combate ao VIH continua a ser um dos maiores desafios da atualidade médica e tal deve-se, em boa parte, à capacidade que este possui de se camuflar e permanecer no corpo humano <sup>61</sup>. Esta habilidade advém da existência no organismo do hospedeiro de determinados locais que funcionam como reservatórios ou locais de latência viral <sup>20</sup>. Estes locais albergam provírus de VIH quiescentes, isto é, o genoma viral encontra-se integrado no DNA da célula hospedeira garantindo que, aquando da replicação, o vírus continua a propagar-se <sup>20,62</sup>. Estes reservatórios, que podem ser do tipo celular ou anatómico (extensivo a tecidos ou órgãos), protegem o vírus de respostas imunológicas, do efeito dos ARV e ainda da sua eliminação por vias biológicas, tornando a sua erradicação impossível <sup>20</sup>.

#### **Locais de latência celulares**

Várias linhas celulares foram propostas como potenciais reservatórios de provírus de VIH, no entanto só algumas foram reconhecidas como tal: células T CD4<sup>+</sup> em repouso, macrófagos e células dendríticas foliculares <sup>63,64</sup>. Todas estas células apresentam mecanismos de resistência a diversos ARV,

nomeadamente através de proteínas de membrana como a glicoproteína-P que promovem o efluxo dos fármacos, prevenindo que estes atinjam concentrações terapêuticas nestes locais <sup>52</sup>. Além disso, estes reservatórios celulares permitem que o vírus se mantenha num estado latente que propicia a sua permanência no organismo por longos períodos de tempo <sup>20</sup>.

As células T CD4<sup>+</sup> são um importante alvo do VIH e quando o vírus penetra nestas células, integra o seu DNA complementar (cDNA) no genoma celular passando a ser replicado quando ocorre a replicação celular <sup>53</sup>. Tal resulta na produção de um grande número de partículas virais causando, eventualmente, a morte das células hospedeiras <sup>53</sup>. Quando comparadas às células T CD4<sup>+</sup>, os macrófagos são de particular relevância na patogénese da infeção viral, uma vez que apresentam um tempo médio de vida superior, assim como maior resistência face aos efeitos citopáticos virais <sup>20</sup>. São estas propriedades chave dos macrófagos que possibilitam a contínua replicação do VIH nas fases finais de infeção, quando já grande parte das células T CD4<sup>+</sup> foram eliminadas <sup>20</sup>. Para além disso, os macrófagos têm a capacidade de transportar o VIH disseminando a infeção viral ao nível do sistema nervoso central (SNC) <sup>20,61</sup>.

### **Locais de latência anatómicos**

Os principais reservatórios anatómicos que albergam células infetadas com o VIH são os órgãos linfáticos, nomeadamente os nódulos linfáticos, baço e tecidos linfáticos associados aos intestinos, o SNC e os pulmões <sup>52,61</sup>. Os órgãos linfáticos são compostos, maioritariamente, por células altamente suscetíveis à infeção pelo vírus, estando também envolvidos no processo de circulação e produção de linfócitos, fatores que contribuem para que o sistema linfático se destaque como o maior reservatório anatómico do VIH <sup>20</sup>. Estes locais são frequentemente designados como santuários virais devido à dificuldade inerente que os ARV têm de atingir estes órgãos devido à existência de barreiras biológicas, mas também pela capacidade que estes locais têm de manterem o vírus na sua forma latente, fatores que contribuem para a persistência viral <sup>52</sup>.

O SNC também se evidencia como um dos reservatórios de maior importância o que se deve, em boa parte, à barreira hematoencefálica (BHE) que apresenta uma permeabilidade altamente seletiva limitando extensivamente a passagem de potenciais compostos neurotóxicos para o cérebro <sup>53,65</sup>. Desta forma, as concentrações de fármaco que conseguem penetrar esta barreira são muito reduzidas, permitindo que o vírus se continue a replicar livremente <sup>20,26</sup>.

## 2. Antirretrovirais como o primeiro marco no combate ao VIH/SIDA

### 2.1. Classificação dos fármacos antirretrovirais

O isolamento e posterior reconhecimento do VIH como o principal agente responsável pelo aparecimento da SIDA foram eventos chave que estiveram na base de uma das maiores conquistas médicas da atualidade <sup>66</sup>. Rapidamente se começaram a assistir a progressos significativos que permitiram uma caracterização detalhada do vírus e do seu ciclo de vida assim como uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes ao seu modo de ação <sup>67,68</sup>. Neste sentido, tornou-se possível identificar novos alvos farmacológicos altamente específicos no ciclo de vida do VIH que permitiram o desenvolvimento dos primeiros fármacos que viriam revolucionar a história do VIH/SIDA <sup>37,53</sup>.

Nos tempos primordiais da epidemia não existia qualquer esperança após o diagnóstico da doença. No espaço de semanas ou alguns meses, o indivíduo era alvo de uma série de cancro e outras doenças oportunistas que acabariam por ser fatais <sup>37</sup>. Em 1987, a zidovudina foi aprovada como o primeiro ARV para uso terapêutico. Desde então, e num curto espaço de tempo, mais 5 classes de ARV foram desenvolvidas e, até aos dias de hoje, 40 medicamentos foram aprovados e disponibilizados no mercado pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration* (FDA)) para o tratamento clínico do VIH/SIDA <sup>69</sup>. Os fármacos existentes podem ser classificados de acordo com o local de atuação e o seu alvo <sup>26</sup>. Quanto ao seu local de atuação, podem atuar ao nível extracelular na mucosa ou lúmen vaginal e/ou colorretal ou ao nível intracelular nas células do sistema imunitário suscetíveis ao vírus <sup>26</sup>. Consoante o alvo, os ARV podem ser agrupados em seis categorias (Tabela 1.1): nucleósidos análogos inibidores da TR, não-nucleósidos inibidores da TR, inibidores da integrase, inibidores da protease, inibidores de entrada celular e inibidores de fusão <sup>20,26,70</sup>.

**Tabela 1.1** - Classes dos antirretrovirais consoante o seu alvo e mecanismo de ação.

<b>Categoria</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Fármacos e algumas associações comuns</b>
<b>Não-nucleósidos inibidores da TR (NNITR)</b>	<b>Inibição da TR.</b> Interferem com a sua conformação original ao ligarem-se a locais muito próximos ( $\approx 10 \text{ \AA}$ ) do local de ligação do substrato da enzima. <sup>71,72</sup>	EFV; RPV; ETR; NVP; DLV
<b>Nucleósidos/Nucleótidos inibidores da TR (NITR/NtITR)</b>	<b>Inibição da TR.</b> Atuam tipicamente alongando a cadeia do cDNA, prevenindo a formação do DNA proviral. <sup>71,72</sup>	3TC; ABC; AZT; d4T; ddl; ddl EC; ddC (F.M.); FTC; TDF; 3TC+AZT; ABC+3TC; ABC+AZT+3TC; TDF+FTC
<b>Inibidores da integrase (II)</b>	<b>Inibição da integrase viral.</b> Impedem a incorporação de cadeias de DNA proviral do VIH no genoma da célula hospedeira <sup>71,72</sup> .	RAL; DTG; EVG
<b>Inibidores da protease (IP)</b>	<b>Inibição da protease viral.</b> Impedem a clivagem de algumas proteínas virais e a maturação dos viriões, resultando em partículas não virais <sup>71,72</sup> .	APV (F.M.); TPV; IDV; SQV (F.M.); SQVm; RTV; DRV; FPV; NFV; ATV; LPV+RTV
<b>Inibidores de entrada (IE)</b>	<b>Inibição do co-recetor CCR5 e da glicoproteína gp120.</b> Estabelecem uma ligação alostérica ao co-recetor CCR5, impedindo a sua interação com a glicoproteína gp120 da cápsula viral, que é necessária para a entrada do VIH na célula <sup>71,72</sup> .	MVC
<b>Inibidores de fusão (IF)</b>	<b>Inibição da glicoproteína gp41.</b> Interferem com a ligação, fusão e entrada celular do VIH pois impedem que a gp41 fique exposta e promova a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira <sup>71,72</sup> .	ENF

Abreviaturas: 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; APV, amprenavir; ATV, mesilato de atazanavir; AZT, zidovudina; d4T, estavudina; ddC, zalcitabina; ddl, didanosina; ddl EC, didanosina revestida entericamente; DLV, delavirdina; DRV, darunavir; DTG, dolutegravir; EFV, efavirenz; ENF, enfuvirtida; ETR, etravirina; EVG, elvitegravir; F.M., fora do mercado; FPV, fosamprenavir; FTC, emtricitabina; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; MVC, maraviroc; NFV, mesilato de nelfinavir; NPV, nevirapina; RAL, raltegravir; RPV, rilpivirina; RTV, ritonavir; SQV, saquinavir; SQVm, mesilato de saquinavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarato; TPV, tipranavir.

## 2.2. Terapias clássicas no combate à pandemia VIH/SIDA

Atualmente, as terapias à base de antirretrovirais continuam a ser a melhor opção no combate à pandemia VIH/SIDA uma vez que proporcionam uma supressão viral mais prolongada e, conseqüentemente, menores taxas de mortalidade <sup>46,73</sup>. Desde a sua introdução no panorama clínico no final da década de 80 e início de 90, estes fármacos melhoraram a qualidade de vida dos doentes e aumentaram significativamente a sua esperança média de vida <sup>20</sup>.

Inicialmente, os tratamentos de combate ao VIH/SIDA apostaram em regimes únicos com apenas um tipo de ARV na sua constituição, contudo rapidamente se desenvolveram mecanismos de resistência a estas terapias o que motivou a adoção da terapia antirretroviral de alta eficácia (HAART do inglês, *highly active antiretroviral therapy*) que consiste em estratégias mais potentes que envolvem a administração simultânea de três ou mais classes diferentes de fármacos <sup>20,48,52</sup>. Apesar de ter alcançado resultados promissores, sobretudo em países em desenvolvimento, este tipo de abordagem continua a gerar algumas questões pertinentes e o seu sucesso varia em função de múltiplos fatores tais como: as terapias multi-regime prolongam-se por largos períodos de tempo e podem levar à manifestação de alguns efeitos adversos, mas podem também promover o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos ARV o que se traduz pela incapacidade de uma supressão viral efetiva devido à dificuldade em manter níveis constantes de fármaco, sobretudo nos reservatórios virais <sup>48,74</sup>. Para além disto, a baixa adesão e toma descuidada do paciente, os elevados custos associados, as interações entre fármacos e problemas farmacocinéticos também contribuem para o insucesso desta terapia <sup>20,75,76</sup>.

Surge assim a necessidade de procurar alternativas inovadoras capazes de contornar os problemas inerentes à administração oral de fármacos. Desde que Macht <sup>77</sup> demonstrou, em 1918, a capacidade de absorção sistémica de fármacos pela vagina que esta via de administração tem sido extremamente explorada <sup>78</sup>. A vagina apresenta uma densa rede de vasos sanguíneos que, a par com a sua camada de muco, a tornam uma excelente via de administração quer para aplicação sistémica ou local <sup>78</sup>. Para além disso, o facto de contornar o metabolismo pré-sistémico e permitir a auto-administração de fármacos de forma contínua durante semanas ou até meses com uma única aplicação são propriedades altamente vantajosas <sup>79</sup>.

Por outro lado, e numa perspetiva profilática, tem-se dado particular destaque a estratégias de carácter preventivo uma vez que o controlo antecipado da doença é crucial para a diminuição da sua incidência ao nível global <sup>9,80,81</sup>. Algumas alternativas já se encontram disponíveis tais como: a implementação de programas educacionais ou de troca de agulhas; a utilização adequada do preservativo; a circuncisão masculina ou o uso de ARV como medida de prevenção da transmissão do

vírus de mães para filhos <sup>25,76,82</sup>. No entanto, apesar da circuncisão ou o uso do preservativo apresentarem eficácias razoáveis (50 e 98 %, respetivamente), em regiões onde a incidência do VIH é elevada apenas uma pequena fração da população tem acesso a estas opções devido a questões socioculturais <sup>83</sup>. Face a estes obstáculos, novas alternativas de pré-exposição profilática têm sido desenvolvidas de forma intensiva, especialmente no campo dos microbicidas <sup>84</sup>.

Atualmente, uma das estratégias terapêuticas mais utilizadas quer no tratamento quer na prevenção profilática da infeção é a formulação comercial Truvada<sup>®</sup>, selecionada para a presente dissertação. O Truvada<sup>®</sup> é uma combinação oral de dois fármacos em dose fixa, a emtricitabina (200 mg) e o tenofovir disoproxil fumarato (300 mg) <sup>85</sup>. A combinação está indicada, desde 2004, para uso terapêutico com outros ARV em adultos e crianças com pelo menos 17 kg ou como estratégia de pré-exposição profilática em adultos e adolescentes com um peso igual ou superior a 35 kg <sup>85</sup>, tendo esta sido apenas aprovada em julho de 2012 nos EUA <sup>85</sup> e em julho de 2016 na Europa <sup>86</sup>. Atualmente, o Truvada<sup>®</sup> é a única formulação no mercado recomendada pela FDA como estratégia de pré-exposição profilática para indivíduos em risco iminente de adquirir a doença. Em Setembro de 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passa a recomendar regimes à base de TFV como uma estratégia de prevenção adicional para indivíduos em elevado risco de infeção pelo VIH <sup>87</sup>.

A emtricitabina ( $C_8H_{10}FN_3O_3S$ ), é o princípio ativo da formulação comercial Emtriva<sup>®</sup>. É um pó branco que pertence à classe dos nucleósidos análogos inibidores da TR sendo reconhecido pela sua forte atividade antiviral contra o VIH-1 <sup>88</sup>. Este fármaco de pequenas dimensões apresenta uma massa molecular de 247,24 g/mol e uma solubilidade em água de 112 mg/mL, exibindo propriedades hidrofílicas que garantem a sua excelente solubilização em ambientes aquosos <sup>89</sup>. De modo a desempenhar a sua função e garantir a inibição da TR, este nucleósido análogo de citidina sofre, numa fase inicial, uma fosforilação por intermédio de enzimas celulares que leva à formação do composto ativo emtricitabina 5'-trifosfato. Sob esta forma, a emtricitabina 5'-trifosfato irá competir com substratos naturais (e.g. desoxicidina 5'-trifosfato) da TR e inibir esta enzima. A emtricitabina 5'-trifosfato é incorporada a nascente do DNA viral o que resulta na terminação precoce da cadeia e consequente interrupção da replicação viral <sup>88,90</sup>.

O tenofovir disoproxil fumarato ( $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$ ), é o princípio ativo da formulação comercial Viread<sup>®</sup>, um pró-fármaco do tenofovir e um nucleósido acíclico análogo da adenosina monofosfato com atividade antiviral contra o VIH-1, VIH-2 e outros vírus da família hepadnavírus <sup>91</sup>. Morfologicamente apresenta-se na forma de pequenos cristais brancos e finos, exibindo uma massa molecular igual a 635,52 g/mol, uma ligeira solubilidade em água (13,4 mg/mL) e uma lipofilia moderada ( $\log P=1,25$ ) <sup>85</sup>.

Tipicamente a administração do TDF é feita por via oral e até atingir o seu alvo na conformação ativa, o TDF passa por um conjunto de modificações estruturais no organismo de modo a que ocorra inibição da TR. Inicialmente, o fármaco sofre uma hidrólise através das esterases fisiológicas que causam a perda dos dois grupos éster da molécula e promovem a sua rápida conversão em tenofovir que irá, numa fase posterior, ser metabolizado e formar o composto ativo tenofovir difosfato. O tenofovir difosfato define-se como um inibidor competitivo do substrato natural desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP) e, em semelhança ao que acontece com a emtricitabina, o tenofovir difosfato não possui o grupo hidroxilo no carbono 3' da sua desoxirribose pelo que a ligação fosfodiéster de 5'-3' com o desoxinucleótido seguinte não é formada e a elongação da cadeia de DNA é interrompida. A incorporação do tenofovir difosfato na cadeia de DNA resulta na terminação precoce da sua transcrição e conseqüente suspensão da replicação viral <sup>85,90,91</sup>.

### **3. Emergência de estratégias de pré-exposição profilática**

Atualmente, as estratégias de prevenção têm atraído particular atenção e promovido a crescente interdisciplinaridade entre grupos com o objetivo de retardar a expansão da epidemia VIH/SIDA e arranjar ferramentas de controlo precoce do processo de infeção <sup>83</sup>. Ao longo dos anos, as vacinas têm-se afirmado como eficazes agentes de combate contra uma vasta gama de doenças infecciosas, contudo o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva contra o VIH continua a ser uma meta difícil de atingir <sup>48,72,92</sup>.

Neste sentido, as estratégias orais de pré-exposição profilática (PrEP) têm sido largamente utilizadas na prevenção da infeção pelo VIH e, ao contrário da terapia, têm como público alvo indivíduos não infetados com o vírus, mas que se encontram em ambientes e situações de risco, estando em perigo iminente de contrair infeção por este vírus <sup>80</sup>. Medidas de PrEP por administração oral e tópica têm demonstrado o seu potencial profilático e capacidade protetora, constituindo estratégias mais próximas e equiparáveis a uma vacina <sup>6,80</sup>.

#### **3.1. Pré-exposição profilática oral**

Nos dias de hoje, a administração de fármacos por via oral continua a ser a mais popular entre as diferentes faixas etárias uma vez que se caracteriza por ser de fácil utilização, não invasiva, indolor, monetariamente acessível e por, conseqüentemente, possuir maiores taxas de adesão ao tratamento <sup>93,94</sup>. Apesar de apresentar um conjunto de vantagens evidentes, a administração de fármacos por via oral

depara-se com inúmeras barreiras e desafios, sendo o trato gastrointestinal o que oferece maior dificuldade <sup>94</sup>.

### **3.1.1. Trato gastrointestinal: uma barreira à administração oral de fármacos**

A administração oral de fármacos pressupõe um elevado conhecimento e compreensão das condições que o composto bioativo terá de enfrentar durante o seu trajeto, desde a boca até ao local de absorção <sup>94</sup>.

A interação dos fármacos com o trato gastrointestinal inicia-se na mucosa oral e, no caso particular dos ARV, os maiores obstáculos encontrados a este nível consistem em problemas galénicos, tais como o paladar desagradável que apresentam <sup>94</sup>. Mais concretamente, as formulações líquidas de ARV, normalmente desenvolvidas para tratamento pediátrico ou geriátrico, são as que evidenciam mais este problema, o que acaba por ter repercussões no bem-estar dos pacientes e promover uma menor adesão aos regimes terapêuticos <sup>94</sup>. Numa fase posterior, os ARV migram para o estômago onde ficam expostos a um ambiente extremamente ácido capaz de induzir a rápida degradação dos fármacos <sup>95</sup>. Tal, leva a uma redução considerável da concentração de substância ativa no local alvo <sup>93</sup>. Por último, e tendo em conta que grande parte dos fármacos são absorvidos no intestino delgado, é impreterível que possuam uma boa solubilidade em ambientes aquosos. No entanto, a maior parte dos ARV existentes no mercado são pouco solúveis, apresentam um tempo de vida relativamente curto e têm dificuldade em atravessar a mucosa intestinal cuja constituição varia grandemente ao longo do trato gastrointestinal <sup>94</sup>.

### **3.1.2. Ensaio clínicos e disponibilidade no mercado de medidas de pré-exposição profilática oral**

Até à data foram conduzidos vários ensaios clínicos com o objetivo de testar a eficiência de diferentes formulações orais na prevenção da transmissão do VIH, estando os mais relevantes sintetizados na Tabela 1.2.

O ensaio iPrEX avaliou a eficácia da administração oral diária de Truvada<sup>®</sup> na prevenção da infeção do VIH em homens homossexuais e mulheres transgénero, verificando-se a redução na probabilidade de aquisição do vírus em 44 % quando comparado com a formulação placebo <sup>96,97</sup>. Neste estudo, 93 % dos participantes afirmaram ter tomado os comprimidos corretamente, mas o que pôde ser confirmado após análise sanguínea do teor dos fármacos foi que, na realidade, se verificou apenas 51 % de adesão à terapêutica. Após algumas projeções pensa-se que, se todos os indivíduos tivessem

feito a toma correta da medicação, a eficácia do tratamento seria aproximadamente 92 %. Um outro ensaio, IPERGAY, teve como grupo de estudo homens homossexuais com práticas de sexo anal desprotegido e assistiu a uma redução de 86 % no risco de adquirir o vírus face ao grupo placebo <sup>98</sup>.

**Tabela 1.2** - Ensaio clínico para a avaliação de novas estratégias de PrEP oral. Adaptada de <sup>99</sup>

Ensaio	Regime	Grupo	Intervenção	Eficácia	Ref.
iPrEX	Diário	♂ homossexuais	Truvada <sup>®</sup>	44 %	96
		♀ transgénero			97
Partners PrEP	Diário	Casais serodiscordantes	Viread <sup>®</sup> (300 mg)	67 %	100
			Truvada <sup>®</sup>	75 %	
TDF2	Diário	Casais heterossexuais não-infetados	Truvada <sup>®</sup>	62,2 %	101
BTS	Diário	Toxicodependetes	Viread <sup>®</sup> (300 mg)	48,9 %	102
FEM-PrEP	Diário	♀ VIH-negativas	Truvada <sup>®</sup>	S.D.	103
VOICE	Diário	♀ VIH-negativas	Viread <sup>®</sup> (300 mg)	S.D.	104
			Gel VG (1 % TNF)		
IPERGAY	Antes e após sexo	♂ Homossexuais	Truvada <sup>®</sup>	86 %	98

Abreviaturas: S.D., sem diferenças; TNF, tenofovir; VG, vaginal.

Noutros ensaios com casais heterossexuais serodiscordantes (Partners PrEP) <sup>100</sup>, não-infetados (TDF2) <sup>101</sup> ou em indivíduos toxicodependentes (BTS) <sup>102</sup>, houve uma clara diminuição no risco de contração do vírus em 67-75 %, 62,2 % e 48,9 %, respetivamente. No entanto, nem todos os testes se mostraram bem-sucedidos e verificou-se que a ingestão diária de Truvada<sup>®</sup> no ensaio FEM-PrEP <sup>103</sup> e de Viread<sup>®</sup>, Truvada<sup>®</sup> ou, até mesmo, a aplicação de um gel vaginal com tenofovir no VOICE <sup>104</sup> não demonstraram qualquer efeito na redução da aquisição do VIH, acabando por ser cancelados. Mais tarde, e após colheitas de sangue dos indivíduos em estudo, verificou-se que não existiam indícios dos fármacos o que provou a falta de adesão à terapêutica e consequente fracasso da intervenção profilática.

## 3.2. Pré-exposição profilática tópica

A PrEP por via tópica tem-se focado, maioritariamente, no desenvolvimento e otimização de microbicidas. Idealmente, os microbicidas são produtos capazes de reduzir ou inibir a transmissão sexual do VIH quando aplicados topicamente na mucosa vaginal e/ou retal e podem ser encontrados na forma farmacêutica de cremes, géis, cápsulas, filmes, óvulos, esponjas, anéis ou comprimidos vaginais <sup>6,21,92,105</sup>. Em função da estrutura na qual estão inseridos, estes agentes podem ser aplicados antes e/ou depois do ato sexual, diariamente ou por longos períodos de tempo <sup>105</sup>.

Até à data, foram testados diferentes compostos como potenciais agentes anti-VIH e categorizados como microbicidas de primeira ou segunda geração <sup>106</sup>. A primeira geração inclui compostos com atividade antiviral inespecífica que se mostraram incapazes de prevenir a transmissão do VIH em humanos, chegando mesmo a aumentar as taxas de transmissão pois causariam a irritação e desintegração da barreira epitelial <sup>71,106</sup>. Dentro destes, destacam-se três grupos principais de microbicidas: os surfactantes (nonoxynol-9 (N-9)), os polianiões (Carrageenan; Ushercell; sulfonato de naftaleno (PRO2000)) e os agentes de tamponamento ácido (BufferGel). Já a segunda geração é constituída por ARV potentes e extremamente específicos que atuam em etapas cruciais do ciclo de vida do VIH, sendo extensivamente estudados para administração vaginal e/ou retal <sup>71,72,106</sup>.

Uma das principais vantagens dos microbicidas é que, por serem de aplicação tópica, são colocados diretamente em superfícies expostas ao vírus e proporcionam concentrações locais de fármaco mais elevadas <sup>105</sup>. Com esta estratégia, o risco de ocorrer exposição sistémica é significativamente menor e, conseqüentemente, a possibilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência em indivíduos saudáveis mas em risco iminente de contrair o vírus é reduzida <sup>105</sup>. Para além disto, outros aspetos como a adesão do paciente à terapêutica, o acesso e custo do produto, e ainda a capacidade de ultrapassar questões socioculturais que surgem em certos países em desenvolvimento são algumas vantagens inerentes à utilização de microbicidas <sup>107</sup>. Neste sentido, e tendo em conta todos estes fatores, os microbicidas são ainda uma boa alternativa às medidas de PrEP por via oral pois conseguem contornar os principais obstáculos inerentes a esta via de administração ao reduzirem os efeitos adversos dos ARV no trato gastrointestinal e evitarem problemas farmacocinéticos como por exemplo o metabolismo pré-sistémico <sup>21,108</sup>. No entanto, a aplicação de microbicidas no âmbito de uma PrEP tópica pressupõe um conhecimento prévio e alargado da anatomia e fisiologia vaginal e rectal, em particular da barreira mucosa que pode constituir uma barreira importante a este tipo de administração <sup>109</sup>.

Recentemente, foi apresentada uma prova de conceito relativa ao uso de microbicidas como estratégia de PrEP por administração tópica. Esta prova de conceito consistiu no ensaio clínico CAPRISA

004 <sup>110</sup>, realizado entre Maio de 2007 e Março de 2010, que visava a administração vaginal de um gel placebo ou um gel com 1 % de tenofovir. Neste estudo, adotou-se o regime BAT-24 (do inglês *before and after sex*) que se baseou na aplicação de uma primeira dose do gel 12 horas antes e uma segunda dose 12 horas depois da relação sexual. A eficácia deste tipo de abordagens ficou comprovada ao demonstrar-se que a utilização do gel composto por 1 % de tenofovir em mulheres heterossexuais foi 39 % mais eficiente que um gel placebo. Para além disto, em participantes que mostraram grande adesão ao produto, verificou-se um aumento de cerca de 54 % na proteção contra a infeção pelo VIH. No entanto, os ensaios posteriores VOICE <sup>104</sup> e FACTS 001 <sup>111</sup> foram incapazes de mostrar a eficácia de outros géis com a mesma concentração de tenofovir quando aplicados diariamente ou perto do ato sexual, em parte devido à pouca adesão ao tratamento.

Outros métodos de entrega mais prolongada de ARV têm sido investigados como alternativa à aplicação diária ou dependente do coito. Dois estudos recentes (ASPIRE <sup>112</sup> e Ring Study <sup>113</sup>) mostraram que a aplicação mensal de um anel vaginal contendo dapivirina reduziu a incidência do VIH em 27 % e 31 %, respetivamente (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3** - Ensaios clínicos de estratégias de PrEP tópica. Adaptada de <sup>99</sup>

Ensaio	Regime	Grupo	Intervenção	Eficácia	Ref.
CAPRISA 004	Antes e após o ato sexual	♀ heterossexuais em alto risco	Gel VG (1 % TNF)	39 %	110
VOICE	Diariamente oral e vaginal	♀ heterossexuais em alto risco	Viread® (300 mg) Truvada® Gel VG (1 % TNF)	S.D.	104
FACTS 001	Pericoital	♀ heterossexuais em alto risco	Gel VG (1% TNF)	S.D.	111
ASPIRE	Mensalmente	♀ heterossexuais em alto risco	Anel VG (25 mg DPV)	27 %	112
Ring Study	Mensalmente	♀ heterossexuais em alto risco	Anel VG (25 mg DPV) vs. Anel VG placebo	30,7 %	113

Abreviaturas: DPV, dapivirina; S.D., sem diferenças; TNF, tenofovir; VG, vaginal.

## 4. Nanomedicina na prevenção do VIH/SIDA

Apesar de não existir uma definição universal, a nanotecnologia refere-se à compreensão, controlo e reestruturação da matéria na escala nanométrica (1-100 nm) de modo a obter materiais inovadores com propriedades e funções únicas <sup>114</sup>. A combinação da nanotecnologia com a medicina, nanomedicina, possibilitou o desenvolvimento de novas estratégias tanto no diagnóstico e monitorização como a nível terapêutico, prevendo-se que até 2025 este mercado atinja os 350,8 biliões de dólares <sup>115</sup>.

Neste contexto, compreende-se que o desenvolvimento de nanossistemas para veiculação de ARV seja altamente vantajoso uma vez que permitem uma maior proteção dos fármacos tendo em conta que o ambiente vaginal apresenta baixos valores de pH (3,5-4,5) e enzimas que poderão comprometer a sua atividade terapêutica <sup>116</sup>. Para além disso, a possibilidade de modulação do perfil de libertação do fármaco assim como o seu direcionamento específico através, por exemplo, da funcionalização da superfície dos nanossistemas são também propriedades extremamente importantes proporcionadas pela nanomedicina <sup>9,52</sup>. Por último, os nanossistemas poderão aumentar a permanência dos fármacos no canal vaginal por adesão ao muco ou por penetração nesta camada, aspetos que serão desenvolvidos no ponto 4.2.

Existe assim um grande conjunto de transportadores que se podem utilizar na veiculação de fármacos, dando-se, nesta dissertação, especial destaque aos nanossistemas lipídicos, pelas vantagens que na secção seguinte se enumeram <sup>20,48,117</sup>.

### 4.1. Nanossistemas lipídicos para a veiculação e entrega de fármacos: o caso particular dos lipossomas

Nas últimas décadas, os nanossistemas lipídicos atraíram grande atenção como possíveis sistemas de transporte de fármacos devido à sua versatilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, mas também pela mimetização do ambiente lipídico natural <sup>118</sup>. Para além disso, a superfície dos nanossistemas lipídicos é facilmente funcionalizada, o seu tamanho é controlável e o seu carácter anfífilico permite o encapsulamento de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, aumentando a sua solubilidade em meios aquosos ou a sua permeabilidade através de membranas lipídicas <sup>119</sup>.

São vários os tipos de nanotransportadores lipídicos utilizados para fins terapêuticos, sendo de particular relevância os lipossomas, micelas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e os

etossomas. Na Tabela 1.4 encontram-se sumarizados os estudos em que se utilizaram este tipo de sistemas para o transporte de ARV e os principais objetivos alcançados.

**Tabela 1.4** - Sumário dos sistemas de transporte lipídicos utilizados na entrega de fármacos antiretrovirais e os principais objetivos alcançados.

NTs	Fármaco veiculado	Principais <i>outcomes</i>	Ref.
Lipossomas (1990)	Zalcitabina	↑ tempo residência no SNC ↑ libertação controlada	120
Lipossomas (1991/92)	Zidovudina	↑ atividade contra a SIDA ↓ toxicidade na medula óssea	121,122
Lipossomas (1994)	Didanosina	↑ biodisponibilidade ↓ libertação para a circulação sistémica ↓ eficácia no combate ao vírus do que ddl livre	123
Lipossomas (1995)	Zalcitabina	↑ internalização nos macrófagos	124
Lipossomas (1996)	Didanosina	Melhor perfil farmacocinético ↑ direcionamento para reservatórios virais ↑ biodisponibilidade	125
Lipossomas (2000)	Estavudina	↑ <i>uptake</i> máximo de lipossomas contendo DPPC em monócitos/macrófagos	126
Lipossomas (2003)	Indinavir	↑ n° células T CD4 <sup>+</sup> ↓ RNA viral	127
Lipossomas (2005)	Miristato de zidovudina	↑ [ARV] no cérebro e órgãos RES	128
Lipossomas (2006)	Estavudina	↑ direcionamento ↑ tempo residência em locais de reserva do VIH ↑ tempo semi-vida da estavudina ↑ atividade farmacológica ↑ distribuição ↓ eliminação	129
Lipossomas (2006)	Zidovudina	↑ tempo semi-vida da zidovudina ↑ tempo residência ↑ biodisponibilidade	130
Lipossomas (2006)	Zidovudina	Melhor perfil farmacocinético ↑ acumulação nos órgãos RES alvo ↑ tempo semi-vida da zidovudina ↑ tempo residência, direcionamento e libertação controlada	131
Lipossomas (2007)	Estavudina	↑ tempo semi-vida da estavudina ↑ tempo residência ↑ <i>uptake</i> em hepatócitos	132

**Tabela 1.4** - Sumário dos sistemas de transporte lipídicos utilizados na entrega de fármacos antiretrovirais e os principais objetivos alcançados. (Continuação)

Lipossomas (2007)	Didanosina	↑ biodisponibilidade	133
Lipossomas (2007)	Indinavir	↑ solubilidade	134
Lipossomas (2008)	Zidovudina	↑ <i>uptake</i> em células linfóides ↑ biodistribuição ↑ tempo residência e libertação controlada	135
Lipossomas (2008)	Zidovudina	↑ <i>uptake</i> e localização em nódulos linfáticos e baço quando revestido c/ manose	136
Lipossomas (2017)	Estavudina	↑ libertação controlada ↑ <i>uptake</i> e hemocompatibilidade ↑ tempo semi-vida da estavudina ↓ libertação para a circulação sistêmica	137
Lipossomas (2017)	Tenofovir	↑ significativo (10x) da permeabilidade celular ↑ EE %	138
Etossomas (2007)	Lamivudina	↑ <i>uptake</i> celular ↑ fluxo transdérmico (25x)	139
Imunolipossomas (2015)	Nevirapina e Saquinavir	↑ inibição viral c/ concentrações menores do que os fármacos livres Nevirapina mais libertada na fase inicial e Saquinavir na fase final de infeção	140
Prolipossomas (2017)	Ritonavir	↑ libertação e ↑ [Ritonavir] nos tecidos linfáticos	141
SLN (1998)	Zidovudina	↑ biodisponibilidade ↑ acumulação dos SLNs no fígado	142
SLN (2011)	Estavudina Delavirdina Saquinavir	↑ EE % para a estavudina Libertação controlada: D4T>DLV>SQV	143
SLN (2011)	Lopinavir	↑ biodisponibilidade e direcionamento ↑ % Lopinavir secretada na linfa	144
SLN (2011)	Tenofovir	Não-tóxicos e facilmente funcionalizados ↑ solubilidade	145
SLN e NLC (2011)	Nevirapina	↑ EE % nos SLNs e libertação mais rápida nos NLCs	146
SLN e NLC (2011)	Sinvastatina	↑ EE % dos NLCs ↑ biodisponibilidade ↑ acumulação de NLCs no fígado	147
SLN (2013)	Saquinavir	Capaz de permear a BHE ↑ biodisponibilidade, solubilidade, EE % e libertação controlada ↓ <i>uptake</i> linfático	148

**Tabela 1.4** - Sumário dos sistemas de transporte lipídicos utilizados na entrega de fármacos antiretrovirais e os principais objetivos alcançados. (Conclusão)

SLN (2015)	Efavirenz	Capazes de passar a BHE ↑ biodisponibilidade ↑ liberação controlada	149
SLN (2015)	Efavirenz	↑ biodisponibilidade ↑ [Efavirenz] nos rins ↑ biodistribuição nos órgãos linfáticos	150
SLN (2016)	Zidovudina	↑ solubilidade ↑ <i>uptake</i> celular ↑ EE %	151
SLN (2016)	Lopinavir	↑ direcionamento e liberação em órgãos/tecidos ricos em macrófagos ↑ biodistribuição e ↓ eliminação	152
NPs lipídicas (1996)	Zidovudina	↑ biodisponibilidade em órgãos RES	153
NPs lipídicas (2017)	Nevirapina	↑ [Nevirapina] no fígado, rins e cérebro Direcionamento para múltiplas reservas virais	154
Emulsossoma (2006)	Zidovudina	↑ <i>uptake</i> por hepatócitos ↑ liberação controlada	155
Nanoemulsão (2008)	Saquinavir	↑ biodisponibilidade e distribuição no cérebro	156

Abreviaturas: BHE, Barreira Hematoencefálica; D4T, Estaduvina; ddl, Didanosina; DLV, Delavirdina; EE %, Eficácia de encapsulamento; NTs, Nanotransportadores; RES, Sistema Reticuloendotelial; SNC, Sistema Nervoso Central; SQV, Saquinavir.

No âmbito da presente dissertação, os lipossomas foram os nanossistemas selecionados para a possível veiculação do TDF e da FTC. Desde a sua primeira observação por Bangham e Horne em 1964<sup>157</sup>, os lipossomas têm sido extensivamente estudados como potenciais sistemas de entrega controlada de fármacos a partir das mais variadas vias de administração<sup>158</sup>. Estas estruturas são compostas por moléculas anfifílicas (e.g. fosfolípidos) que, uma vez dispersas em água, têm a capacidade de se auto-organizarem em vesículas<sup>159</sup>. Este fenómeno inerente às moléculas anfifílicas em solução aquosa ocorre quando a concentração vesicular crítica é ultrapassada, formando-se agregados na forma de bicamadas lipídicas concêntricas que contêm uma região interna aquosa capaz de reter substâncias hidrofílicas e uma região hidrofóbica que pode albergar compostos insolúveis em água<sup>159,160</sup>.

Inicialmente, e devido à sua estrutura peculiar e altamente mimética do ambiente natural, os lipossomas foram utilizados como sistemas modelo das membranas biológicas nomeadamente para o estudo da difusão de iões<sup>161</sup>. Só mais tarde, a partir de 1970, foram testados pela primeira vez como

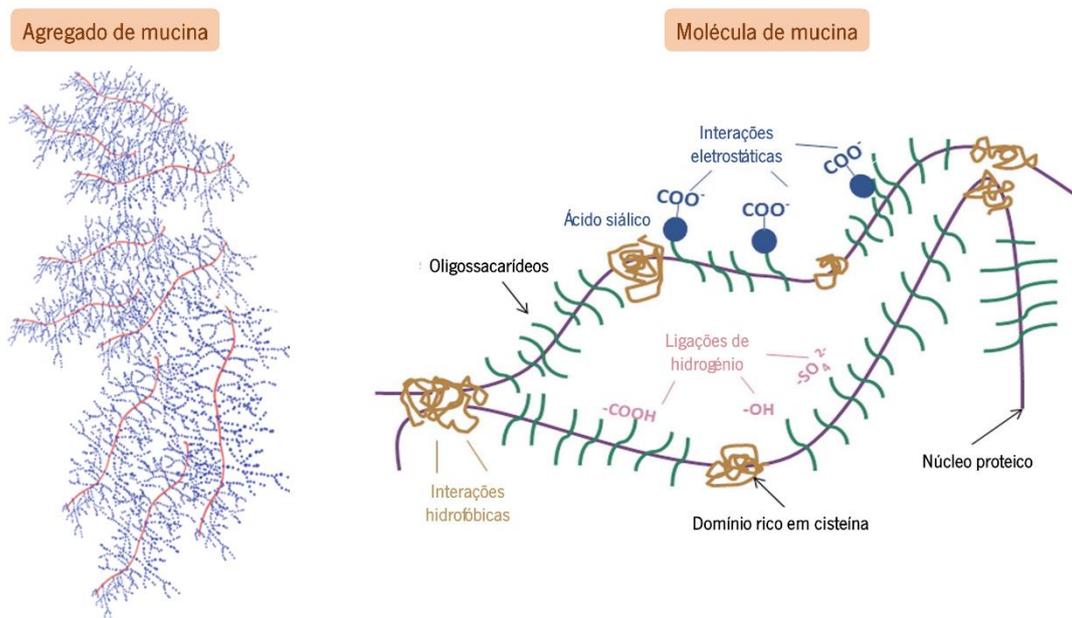
sistemas de transporte de substâncias bioativas <sup>162-164</sup> e, desde então, rapidamente se estabeleceram como líderes no ramo da entrega e direcionamento de fármacos. Existem, à data, 10 medicamentos aprovados pela FDA baseados em lipossomas: Ambisome<sup>®</sup>, Doxil<sup>®</sup>, DaunoXome<sup>®</sup>, Myocet<sup>™</sup>, DepoDur<sup>™</sup>, DepoCyt<sup>®</sup>, Inflexal<sup>®</sup>V, Mepact<sup>®</sup>, Visudyne<sup>®</sup> e Marqibo<sup>®</sup> <sup>165</sup>. De facto, para além das vantagens já mencionadas do uso de lipossomas, a capacidade destes nanossistemas veicularem compostos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, ou ainda, anfífilicos contribui para que os lipossomas se destaquem como sistemas de entrega muito versáteis. Para além disso, o facto de os lipossomas possibilitarem a encapsulação de fármacos na sua forma não modificada, isto é, sem que seja necessário estabelecer qualquer tipo de funcionalização ou ligação covalente do fármaco à vesícula e a proteção que estes nanossistemas conferem ao fármaco face ao meio externo são também atributos de extrema importância <sup>108</sup>.

Consoante o método de produção e a finalidade para que são concebidos, podemos destacar quatro tipos de lipossomas: vesículas multilamelares grandes (MLV, do inglês *large multilamellar vesicles*); vesículas unilamelares gigantes (GUV, do inglês *giant unilamellar vesicles*); vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *large unilamellar vesicles*) e vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *small unilamellar vesicles*) <sup>158,160</sup>. Os MLV são constituídos por várias bicamadas lipídicas e, normalmente, são gerados espontaneamente adquirindo morfologias e tamanhos mais heterogéneos (1-2  $\mu$ M). Estes tamanhos podem, no entanto, ser diminuídos e uniformizados para obter vesículas unilamelares cujos tamanhos podem ser superiores a 1  $\mu$ M (GUV) ou estar compreendidos entre 100-500 nm (LUV) e 25-100 nm (SUV) <sup>108,159</sup>.

#### **4.2. Muco cérvico-vaginal: uma barreira à entrega vaginal de fármacos passível de ser permeada pelos nanossistemas**

O muco é uma barreira biológica que confere proteção e recobre várias superfícies expostas do organismo, estando maioritariamente presente em zonas húmidas (e.g. vias aéreas, olhos, trato gastrointestinal e genital) <sup>55,56</sup>. Este fluido viscoelástico com propriedades adesivas apresenta-se na forma de um gel cujas principais funções consistem na lubrificação e manutenção da hidratação epitelial <sup>56</sup>. Para além disso, o muco caracteriza-se pela sua permeabilidade seletiva que permite a troca de água, nutrientes e gases com o epitélio subjacente mas, pelo contrário, se mostra impenetrável a agentes patogénicos e algumas partículas (e.g. nanossistemas), condicionando a entrega e penetração de fármacos ao longo de superfícies mucosas <sup>55,166</sup>.

A sua composição engloba uma complexa mistura de lípidos, proteínas globulares, DNA, bactérias, células e detritos celulares, sais, água (90-95 %) e mucina (1-2 %) <sup>56,167</sup>. As moléculas de mucina (Figura 1.5) são o principal elemento estrutural do muco, sendo capazes de estabelecer ligações cruzadas entre si e formar estruturas tridimensionais <sup>168</sup>. Para além disso, caracterizam-se como glicoproteínas poliméricas de elevado peso molecular constituídas por um núcleo proteico central altamente glicosilado com várias cadeias de oligossacarídeos, que conferem carga negativa à mucina devido à presença de grupos carboxilo e sulfato. Na sua constituição, existem ainda domínios repetidos de prolina, treonina e serina que se encontram espaçados por regiões globulares hidrofóbicas ricas em cisteína <sup>56,167</sup>.



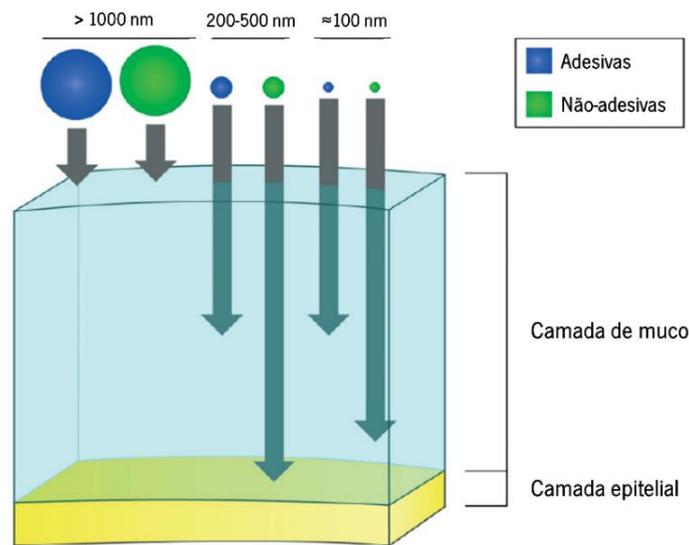
**Figura 1.5** - Estrutura das moléculas de mucina. Adaptado de <sup>5</sup>.

Assim, as ligações que os fármacos ou sistemas de entrega estabelecem com a mucina podem categorizar-se em três tipos principais: ligações eletrostáticas, estabelecidas entre os grupos carregados dos sistemas e os grupos carregados negativamente da mucina; ligações hidrofóbicas aos domínios hidrofóbicos da molécula de mucina ou ligações por pontes de hidrogénio a entidades mucoadesivas ao funcionar como âncora e permitir um maior tempo de retenção no canal vaginal, promovendo assim uma maior libertação dos fármacos <sup>169</sup>. Em determinados casos, quando os sistemas de entrega estão funcionalizados com péptidos ou grupos tióis, é ainda possível o estabelecimento de pontes dissulfureto aos grupos de cisteína da mucina <sup>169</sup>.

De acordo com o objetivo pretendido, e no caso particular desta dissertação, as características dos nanossistemas podem ser adaptadas de modo a potenciar ou reduzir as suas propriedades mucoadesivas – capacidade de adesão ao muco e superfícies mucosas - ou mucopenetrantes - capacidade de penetração do muco (Figura 1.6) <sup>58,168</sup>. Por exemplo, a produção de vesículas lipídicas carregadas positivamente promove interações eletrostáticas com as cargas negativas da mucina o que, por sua vez, promove uma maior mucoadesão e distribuição local. Contudo, o desenvolvimento de vesículas mucoadesivas pode ser prejudicial na medida em que, uma elevada aderência facilita a sua expulsão do canal vaginal e pode ser um entrave à passagem desta barreira <sup>168,170</sup>. Por outro lado, um excesso de cargas positivas pode ser vantajoso ao promover o colapso do muco e levar à formação de canais que facilitam o acesso dos fármacos às superfícies epiteliais. Uma estratégia promissora que se pode adotar para diminuir a mucoadesividade é a funcionalização dos nanotransportadores com polímeros muco-inertes como, por exemplo, o polietilenoglicol (PEG) que não interage nem adere ao muco, permitindo uma melhor distribuição pelo lúmen vaginal <sup>20,52,168</sup>.

No entanto, se o que se pretende é otimizar as suas propriedades mucopenetrantes, é importante ter em atenção outras características físico-químicas dos nanossistemas como, por exemplo, o seu tamanho e forma. Quando o diâmetro hidrodinâmico é muito elevado ( $> 1 \mu\text{m}$ ), as partículas mostram-se incapazes de atravessar os pequenos canalículos que compõem o muco, ficando retidas à superfície do muco cérvico-vaginal <sup>9</sup>. O tamanho ideal para uma penetração mais profunda estará compreendido entre os 200-500 nm <sup>171</sup> e, surpreendentemente, observou-se que partículas com um diâmetro igual ou inferior a 100 nm atingem, à partida, regiões menos profundas da camada de muco do que as de tamanho intermédio <sup>6</sup>. Tal, poderá ser explicado pelo aprisionamento destes sistemas na matriz heterogénea da mucina, composta por poros de diferentes tamanhos que poderão bloquear a passagem a estas partículas <sup>116</sup>. Relativamente à forma, as partículas esféricas apresentam melhores taxas de difusão e são capazes de atingir regiões mais profundas do muco <sup>172</sup>.

Neste sentido, e no caso particular do VIH, é importante encontrar um balanço entre estes dois parâmetros uma vez que a existência de mucoadesão é crucial para que o nanossistema apresente um maior tempo de retenção local mas, é igualmente importante que os sistemas penetrem para regiões mais profundas da camada de muco de modo a não serem precocemente expulsos do canal vaginal <sup>6,9,20,52</sup>.



**Figura 1.6** - Representação esquemática da capacidade das partículas difundirem pelo muco, tendo em consideração as suas propriedades mucoadesivas e mucopenetrantes derivadas da sua carga superficial e tamanho médio. Adaptada de <sup>6</sup>.

### 4.3. Incorporação dos lipossomas em bases semissólidas

Normalmente, e devido ao reduzido grau de viscosidade que apresentam, as suspensões lipossomais aplicadas topicamente apresentam um tempo de retenção local bastante reduzido que acaba por comprometer o potencial terapêutico do composto bioativo. Assim, torna-se necessário proceder à sua incorporação em bases semissólidas (p.e. hidrogéis) de modo a obter formulações com consistência apropriada para a aplicação tópica de fármacos <sup>17,108</sup>.

Os géis são estruturas semissólidas tridimensionais nas quais pequenas quantidades de sólido se encontram interligadas por um determinado solvente presente em maiores quantidades <sup>173</sup>. A maioria dos produtos vaginais disponíveis encontram-se sob a forma de cremes e géis o que motivou, a par com os resultados promissores obtidos no ensaio Caprisa 004, o desenvolvimento de um hidrogel para administração vaginal <sup>173</sup>. Ambas as formas de dosagem caracterizam-se por serem de fácil aplicação, indolores, não-invasivas e monetariamente acessíveis. No entanto, e no contexto de uma administração vaginal, os hidrogéis são produtos extremamente atrativos e apresentam algumas vantagens face aos cremes, nomeadamente: estética agradável, transparência, capacidade de atuar como lubrificante durante o ato sexual e uma absorção mais rápida<sup>174</sup>.

Tipicamente, a encapsulação de compostos hidrofílicos em nanossistemas lipídicos é de extrema dificuldade uma vez que estes tendem a ficar dissolvidos no meio aquoso aquando da formação das vesículas. Assim, estes produtos são uma boa alternativa para a incorporação deste tipo de fármacos,

sendo que a combinação das potencialidades dos lipossomas com as propriedades aliciantes dos géis permite a obtenção de um produto final promissor e com boa capacidade terapêutica <sup>175,176</sup>.



## CAPÍTULO 2



## MATERIAIS E MÉTODOS



# 1. Materiais

## 1.1. Materiais e equipamentos utilizados ao longo do trabalho

Na Tabela 2.1 listam-se os materiais e equipamentos utilizados para a realização de análises e medições ao longo da dissertação.

**Tabela 2.1-** Materiais e equipamentos utilizados ao longo da dissertação.

<b>Designação</b>	<b>Empresa</b>
Amicons unidades de filtração de 100 kDa	Merck Millipore Ireland Ltd
ATR-FTIR	Perkin Elmer
Banho de ultrassons	BransonUltrasonics
Banho termostaticado	VWR
Biotek Synergy 2	BioTek Instruments, Inc.
Células de difusão de Franz	PermeGear
Células de quartzo	Helma Analytics
Células descartáveis de poliestireno	Sarstedt AG&Co
Centrifuga Hettich Universal 320	Hettich Lab Technology
DIP CELL®	Paralab
Espetrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC	Shimadzu
Extrusor Lipex	Northern Lipids Inc.
Filtros de membrana de policarbonato	Whatman
Fluorímetro Perkin Elmer LS 50	Perkin Elmer
Membranas de diálise SnakeSkin®	VWR
Viscosímetro Rotacional FUNGI LAB série EVO Expert L	Reagente5
Vórtex Lab Dancer	VWR
Zetasizer nano ZS	Malvern Instruments Ltd

## 1.2. Reagentes utilizados ao longo do trabalho

Na Tabela 2.2 listam-se os reagentes e as linhas celulares utilizados ao longo da dissertação.

**Tabela 2.2-** Reagentes e linhas celulares utilizados ao longo da dissertação.

Reagente	Empresa
Água ultrapura	Millipore Corporations
Azoto gasoso	Alphagaz™
CaSki	ATCC
Clorofórmio	Sigma – Aldrich
Colesterol	Sigma – Aldrich
DMPC	COATSOME
DMPG	Sigma – Aldrich
DODAB	Tokyochemical
DODAC	Tokyochemical
DOPC	COATSOME
DOPS	COATSOME
DPPC	COATSOME
DSPC	COATSOME
Etanol <i>p.a.</i>	Panreac AppliChem
FTC	Gilead Sciences, Inc.
HEC-1-A	ATCC
MTT	Sigma – Aldrich
Mucina extraída do estômago de porco	Sigma – Aldrich
POPC	COATSOME
SM	Sigma – Aldrich
TDF	Gilead Sciences, Inc.

## 2. Métodos

### 2.1. Descritores moleculares *in silico* do tenofovir disoproxil fumarato e da emtricitabina para apoio ao desenvolvimento de uma formulação

Para projetar e desenvolver uma formulação robusta com um determinado objetivo e alvo terapêutico, devem, em primeiro lugar, ser tidas em consideração as propriedades biofarmacêuticas dos fármacos a formular <sup>177,178</sup>. Estas propriedades biofarmacêuticas incluem propriedades físicas (e.g. solubilidade aquosa em função do pH e parâmetros de geometria molecular que podem condicionar o estabelecimento de interações com os componentes da formulação), propriedades químicas (e.g. cologaritmo da constante de acidez) e propriedades biológicas (e.g. coeficiente de distribuição e de partição, permeabilidade membranar e avaliação de parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) <sup>177-179</sup>. A investigação destas propriedades é designada de estudos de pré-formulação <sup>177-179</sup>, cujo objetivo é avaliar e compreender as propriedades críticas de um fármaco de modo a entender o seu comportamento sob várias condições de processamento e *in vivo*, levando assim a um desenvolvimento racional do sistema de entrega <sup>177,178</sup>. A avaliação biofarmacêutica fornece as informações necessárias para selecionar a composição mais adequada da formulação e para avaliar o fármaco, classificando-o de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês *Biopharmaceutical Classification System*) <sup>179</sup>. A Tabela 2.3 mostra como o BCS pode ajudar a concentrar esforços nas opções de desenvolvimento de formulações para superar limitações de fraca solubilidade, fraca permeabilidade ou fraca estabilidade dos fármacos <sup>179</sup>.

**Tabela 2.3** - Impacto do Sistema de Classificação Biofarmacêutica no desenvolvimento de uma formulação.

<b>Classificação BCS</b>	<b>Impacto no desenvolvimento da formulação</b>
<b>Classe I: Elevada solubilidade e Elevada Permeabilidade</b>	Não são necessárias grandes estratégias para formular estes fármacos, apenas desenvolver formulações de liberação mais controlada
<b>Classe II: Baixa solubilidade e Elevada Permeabilidade</b>	São necessárias estratégias (e.g. formular em dispersões coloidais lipídicas) para melhorar as taxas de dissolução do fármaco
<b>Classe III: Alta solubilidade e Baixa Permeabilidade</b>	São necessárias estratégias para aumentar a permeabilidade (usando promotores de permeação e componentes bioadesivos)
<b>Classe IV: Baixa solubilidade e Baixa Permeabilidade</b>	São fármacos muito difíceis de formular. Devem usar-se estratégias da classe II e III

A avaliação das propriedades biofarmacêuticas pode ser feita com recurso a modelos *in silico*, que possibilitam o estabelecimento de relações entre a estrutura e propriedades moleculares de um fármaco com importantes propriedades físicas, químicas e biológicas do mesmo <sup>180</sup>.

Os modelos *in silico* podem basear-se em duas abordagens distintas: a modelação de dados e a modelação molecular. A modelação de dados aplica normalmente abordagens como a relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR, do inglês *quantitative structure–activity relationship*) e a relação quantitativa estrutura-propriedade (QSPR, do inglês *quantitative structure–property relationship*). Ambas utilizam ferramentas estatísticas para procurar correlações entre uma determinada propriedade biológica ou físico-química e um conjunto de descritores moleculares e estruturais das moléculas em questão. Já a modelação molecular estuda o potencial de interação entre pequenas moléculas e proteínas envolvidas nos processos de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) <sup>181,182</sup>.

Para o cálculo dos descritores moleculares dos fármacos obteve-se primeiro a notação SMILES (do inglês, *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) isomérica da molécula de TDF e FTC na base de dados online Pubmed Compound (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). A notação SMILES corresponde a uma representação unidimensional da constituição e organização atômica das moléculas, passível de ser traduzida em representações bidimensionais e tridimensionais das moléculas correspondentes quando são empregues softwares específicos. Assim, com recurso ao software da Chemaxon® com o módulo MarvinSketch® procedemos ao desenho da estrutura química da molécula de TDF e FTC e à determinação *in silico* de diversos descritores químicos, tais como: lipofilicidade, pKa

e formas de ionização, tamanho, forma, geometria, características elétricas e topologia de superfície. Seguidamente, apresenta-se uma introdução breve a cada um destes descritores e a relação com as propriedades biofarmacêuticas dos fármacos.

### 2.1.1. pKa

O pKa, cologaritmo da constante de acidez (Ka), pode ser relacionado com o pH através da relação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que [A] representa a concentração de moléculas do fármaco que se encontram no estado ionizado e [AH] representa a concentração de moléculas do fármaco não ionizado.

Por observação da equação anterior é possível perceber que o valor de pH é igual ao valor de pKa quando a razão [A-]/[AH] é igual à unidade (e  $\log_{10}1=0$ ). Por esse motivo, o pKa também se define como o valor de pH no qual 50 % das moléculas de um composto se encontram no estado ionizado e 50 % se encontram no estado neutro ou não ionizado <sup>183</sup>. Assim, através do estudo do pKa do fármaco é possível: (i) prever o grau de ionização do composto a diferentes valores de pH e estimar a sua absorção durante o seu percurso no organismo; (ii) entender a ligação do composto a proteínas plasmáticas bem como ao seu alvo terapêutico e (iii) prever a disponibilidade do composto para participar em reações biológicas <sup>180,181</sup>. A determinação do valor de pKa dos fármacos permite ainda compreender determinadas interações estabelecidas entre o fármaco e os componentes da formulação, sendo, por isso, um importante fator em estudos de pré-formulação <sup>177-179</sup>.

### 2.1.2. LogD e LogP

A lipofilicidade de um composto é a medida da sua afinidade para um meio lipídico e pode ser expressa de duas formas distintas: a lipofilicidade efetiva, Log D, correspondente ao logaritmo do coeficiente de distribuição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa, a um pH definido, onde as moléculas se podem encontrar no estado ionizado ou neutro; e Log P, correspondente ao logaritmo do coeficiente de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa, a um valor de pH ao qual todas as moléculas se encontram neutras <sup>181</sup>.

Estes parâmetros são de particular interesse uma vez que, por estarem relacionados com outras propriedades físicas e químicas, afetam grandemente o perfil farmacocinético e farmacodinâmico de um composto<sup>183</sup>. Entre estas propriedades encontram-se: (i) permeabilidade, uma vez que compostos altamente lipofílicos (elevado Log P) tendem a ter uma elevada permeabilidade membranar; (ii) solubilidade, um composto altamente lipofílico será, à partida, muito pouco solúvel em água e (iii) distribuição, uma vez que a lipofilicidade de um composto é diretamente proporcional à força da sua ligação a proteínas plasmáticas – elevada lipofilia traduz-se numa fraca distribuição do composto pelo organismo no entanto, elevada hidrofília traduz-se numa baixa permeação das membranas biológicas levando, igualmente, a uma fraca distribuição. É importante que exista um bom balanço destes parâmetros <sup>183</sup>. Em estudos de pré-formulação a avaliação da lipofilicidade de um fármaco permite classificá-lo de acordo com o sistema BCS e, conseqüentemente, perceber quais os desafios a enfrentar no desenvolvimento de uma formulação adequada a esse fármaco <sup>179</sup>.

### 2.1.3. Estabelecimento de ligações de hidrogénio

As ligações de hidrogénio caracterizam-se como interações de natureza não-covalente entre átomos de hidrogénio e átomos eletronegativos <sup>184</sup>. Para que uma ligação de hidrogénio ocorra deve haver, simultaneamente, átomos dadores e aceptores de hidrogénio. O dador é o átomo ao qual o átomo de hidrogénio participante da ligação é covalentemente ligado - geralmente um átomo eletronegativo como N, O ou F. O aceitador de hidrogénio é o ião eletronegativo ou molécula vizinha, e deve possuir um par de eletrões para formar uma ligação de hidrogénio.

Um composto capaz de estabelecer um grande número de ligações de hidrogénio apresenta elevada polaridade, fator condicionante na permeação de membranas biológicas uma vez que para que ocorra permeação estas ligações têm de ser quebradas. Assim, facilmente se compreende que compostos com elevado potencial para estabelecer ligações de hidrogénio terão uma menor absorção e permeabilidade <sup>185</sup>. Os fármacos mais promissores da terapêutica apresentam um número de grupos químicos aceptadores menor ou igual a 9 e um número de grupos químicos dadores menor ou igual a 5

<sup>181</sup>.

#### 2.1.4. Área de superfície polar

A área de superfície polar (PSA, do inglês *polar surface area*) é a soma da área superficial dos átomos polares de uma molécula, sendo assim uma medida da sua capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio.<sup>186</sup> Este descritor é comumente utilizado na previsão das propriedades de transporte molecular, nomeadamente absorção intestinal<sup>187,188</sup>, permeação de monocamadas de Caco-2<sup>189-191</sup> e penetração da BHE<sup>192,193</sup>.

Por exemplo, para uma boa penetração da BHE foram propostos dois limites: Keler *et al.* apresentam como limite o intervalo de PSA=60-70 Å<sup>2</sup><sup>193</sup> e Van der Waterbeemd *et al.* sugerem um limite de PSA=90 Å<sup>2</sup><sup>194</sup>.

#### 2.1.5. Área de superfície de *van der Waals*

A área de superfície de *van der Waals* (VWSA, do inglês *van der Waals surface area*) tem por base o cálculo da área de superfície ocupada pelos átomos básicos da molécula e é um indicador comumente utilizado na medição da basicidade do composto. Assim, sob condições fisiológicas, um composto com elevada VWSA tem tendência a ser protonado e a adquirir cargas positivas<sup>195</sup>.

A sua basicidade funciona também como indicador da permeabilidade do composto através da BHE, sendo que uma alta basicidade (elevada VWSA) facilita a permeação desta barreira ao passo que compostos com menor VWSA, ácidos ou neutros, têm a passagem dificultada<sup>195</sup>.

#### 2.1.6. Solubilidade

A solubilidade é a concentração máxima que um composto atinge num solvente em equilíbrio com um composto sólido, ou seja, representa a medida da capacidade de um composto se dissolver e permanecer em meio aquoso. É uma das propriedades mais relevantes a ter em consideração aquando do desenvolvimento de um fármaco e nunca assume um único valor uma vez que são vários os fatores que a determinam: (i) estrutura do composto; (ii) estado físico do composto aquando da sua introdução no meio de dissolução; (iii) composição e condições físicas do solvente e (iv) métodos de medição<sup>181</sup>.

A utilização de preditores *in silico* permite fazer uma previsão da solubilidade intrínseca do composto, Log S, que se define como a concentração máxima de soluto passível de ser dissolvida num solvente, em condições padrão de temperatura, pressão e pH<sup>181</sup>. O perfil de solubilidade em função do pH é extremamente útil para compreender a absorção do composto ao longo do organismo, mas também

tirar ilações acerca da permeabilidade, distribuição e transporte <sup>196</sup>. Para além disso, em estudos de pré-formulação, a determinação da lipofilicidade de um fármaco em conjunto com a avaliação da sua solubilidade permite classificá-lo de acordo com o sistema BCS e assim perceber quais os desafios a enfrentar no desenvolvimento de uma formulação adequada a esse fármaco <sup>179</sup>.

## **2.2. Preparação das soluções e/ou suspensões dos reagentes utilizados neste trabalho**

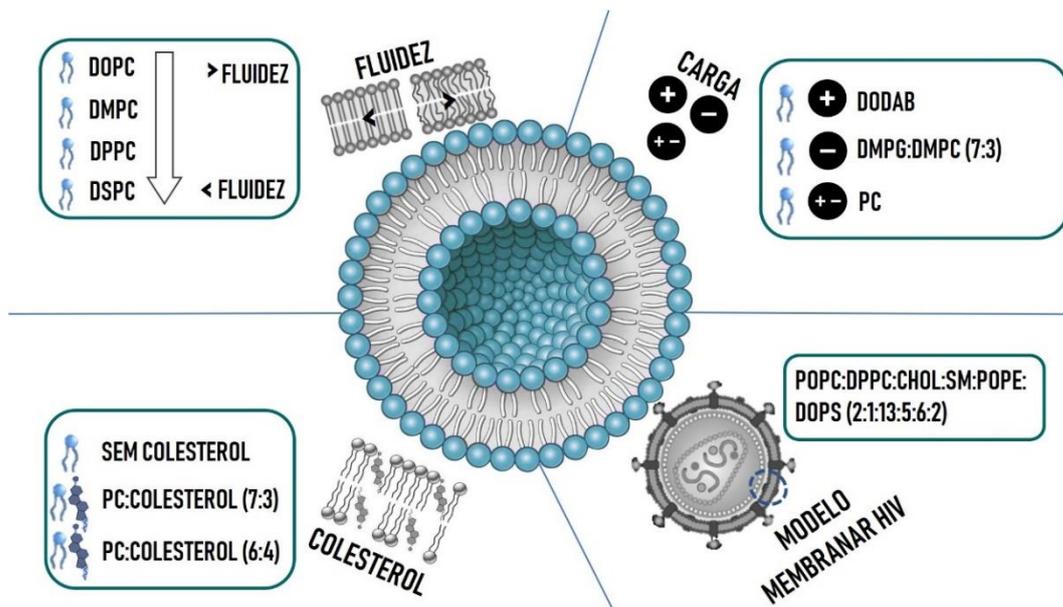
As soluções de trabalho de TDF e de FTC foram preparadas em água ultrapura e em etanol *pro analysis* (p.a.), mantendo-se a proporção dos dois fármacos igual à que é utilizada na formulação comercial Truvada<sup>®</sup>. De forma rigorosa, pesaram-se 1,271 mg de TDF e 0,889 mg de FTC que foram, posteriormente, dissolvidos em 5 mL de cada solvente de modo a obter soluções de trabalho com a concentração de  $4 \times 10^{-4}$  e  $7,19 \times 10^{-4}$  M, respetivamente.

Os vários lípidos utilizados foram igualmente pesados e dissolvidos em clorofórmio de modo a obter soluções *stock* com uma concentração final de  $2 \times 10^{-2}$  M.

Preparou-se ainda, a partir de mucina extraída do estômago de porco, uma suspensão de mucina em água ultrapura com a concentração de 0,4 mg/mL. Para além disso, foi preparado 1 L de uma solução mimética do fluido vaginal <sup>197</sup>, para a qual se pesaram rigorosamente: 3,51 g de NaCl, 1,40 g de KOH, 0,222 g de Ca(OH), 2 g de ácido láctico, 1 g de ácido acético, 0,16 g de glicerol, 0,4 g de ureia e 5 g de glucose. O seu pH foi ajustado para 4,2 de modo a reproduzir de forma mais realista o ambiente vaginal.

## **2.3. Preparação das formulações lipossomais placebo e com fármacos**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram preparados lipossomas de: DOPC; DOPC:CHOL (7:3 e 6:4), DMPC; DMPC:CHOL (7:3 e 6:4); DPPC; DPPC:CHOL (7:3 e 6:4); DSPC; DSPC:CHOL (7:3 e 6:4); DODAB; DMPC:DMPG (7:3) e POPC:DPPC:CHOL:SM:POPE:DOPS (2:1:13:5:6:2) com o objetivo de testar formulações lipossomais com diferentes graus de fluidez, diferentes cargas superficiais, testando ainda o efeito do colesterol e um modelo lipídico mimético da membrana viral <sup>7,198</sup> (Figura 2.1.).



**Figura 2.1** - Representação esquemática dos tipos de formulação e constituição lipídica dos lipossomas utilizados ao longo do trabalho experimental. As formulações lipossomais foram desenvolvidas com o objetivo de testar: formulações de diferente fluidez, com e sem colesterol, com diferente carga superficial e miméticas da membrana viral <sup>7</sup>.

A preparação dos lipossomas foi feita pelo método de hidratação do filme lipídico seguida de extrusão, de forma semelhante ao descrito na literatura <sup>199</sup>. Inicialmente, e em função da quantidade pretendida, procedeu-se à preparação dos lipossomas adicionando diferentes volumes das soluções *stock* lipídicas a um balão de vidro de fundo redondo. Posteriormente, e de modo a obter um filme lipídico fino, foi necessário proceder à evaporação do solvente orgânico sob uma corrente constante de azoto e em contínua rotação até que ocorresse a evaporação total do solvente e de modo a garantir uma boa homogeneização dos lípidos.

Após obtenção do filme lipídico procedeu-se, de seguida, à sua hidratação com um volume previamente definido de água ultrapura acima da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) dos lípidos ou mistura de lípidos. A suspensão resultante foi submetida a ciclos alternados de incubação acima da  $T_m$  e agitação vigorosa no vórtex durante cerca de 20 minutos, com o intuito de garantir a remoção completa do filme lipídico das paredes do tubo. No final deste processo, obteve-se uma suspensão de MLV.

Finalmente, e de forma a obter LUV com diâmetros entre os 100-200 nm, a suspensão de MLV foi extrudida por um extrusor *Lipex*<sup>®</sup> (Northern Lipids, Inc) termostaticado a uma temperatura superior à  $T_m$  do lípido ou mistura de lípidos e sob uma pressão de 6-8 bar. De modo a garantir a homogeneidade e uniformidade dos LUV produzidos, foram utilizadas membranas de policarbonato *Nucleopore Track-Etched*<sup>®</sup> (Millipore, SAS) com poros de distintos tamanhos sendo realizadas 5 extrusões por uma membrana de 400 nm, 5 extrusões por uma membrana de 200 nm e 10 extrusões por uma membrana

de 100 nm. Antes da utilização, as suspensões de LUV foram equilibradas à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos. Esta metodologia encontra-se esquematizada na Figura 2.2.

Com o objetivo de determinar que procedimento seria mais eficiente para o encapsulamento dos ARV nos lipossomas, foram testados três métodos distintos: o método de hidratação, incubação e mistura direta. Cada um destes métodos encontra-se brevemente descrito nas seguintes secções.

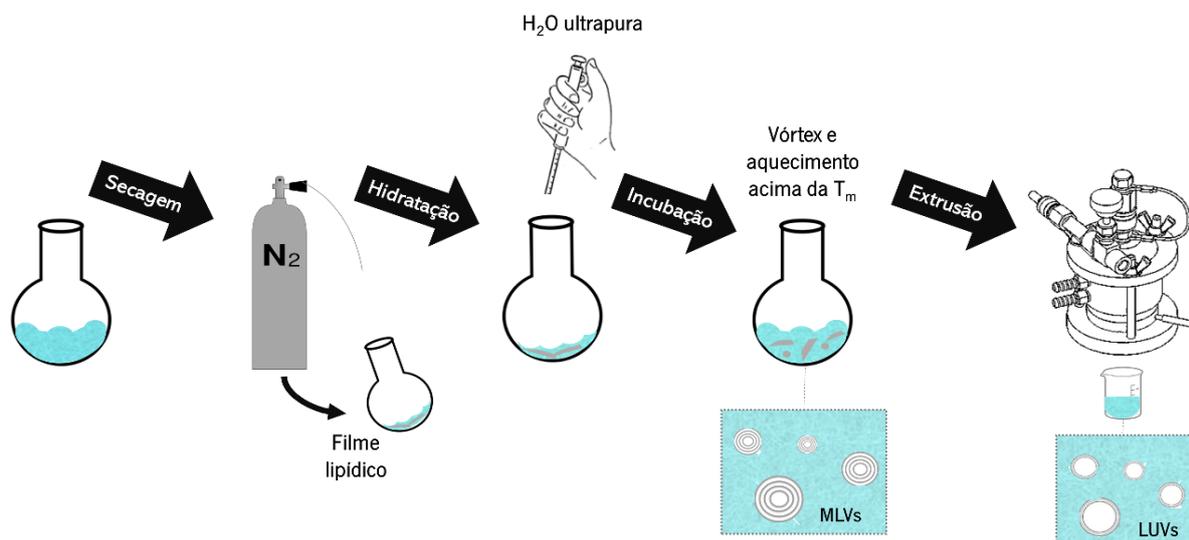
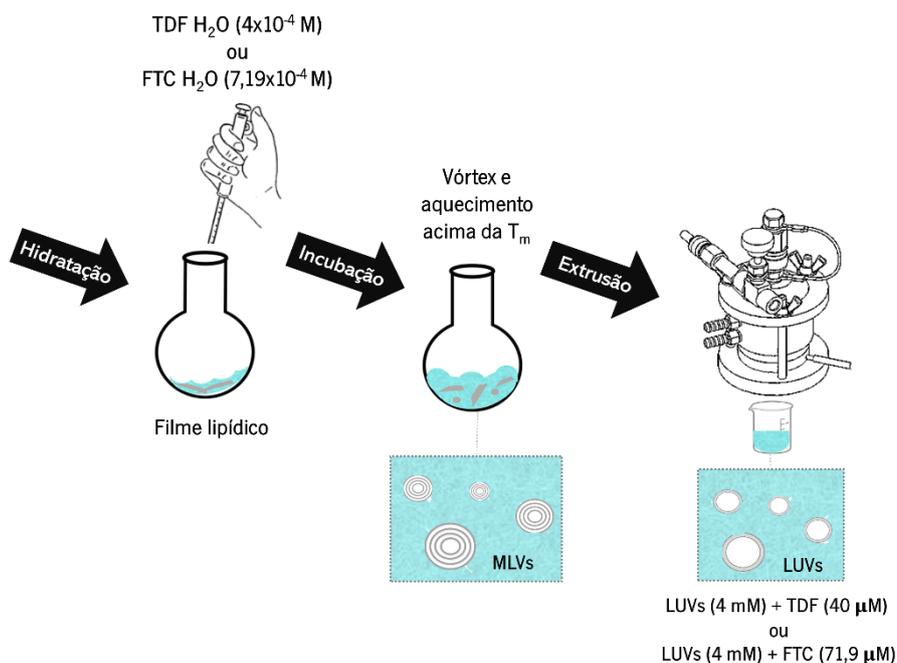


Figura 2.2– Representação esquemática do procedimento experimental para obtenção de LUV.

### 2.3.1. Método de Hidratação

No método de encapsulamento por hidratação (Figura 2.3) procedeu-se, numa primeira fase, à preparação do filme lipídico de acordo com a metodologia descrita na secção 2.3. e, posteriormente, à sua hidratação com uma solução aquosa de TDF ou de FTC, previamente aquecida acima da  $T_m$  do lípido ou mistura de lípidos. A suspensão lipossomal obtida foi submetida a ciclos alternados de agitação no vórtex seguidos de incubação acima da  $T_m$  de modo a que todo o filme lipídico fosse removido das paredes do vidro.

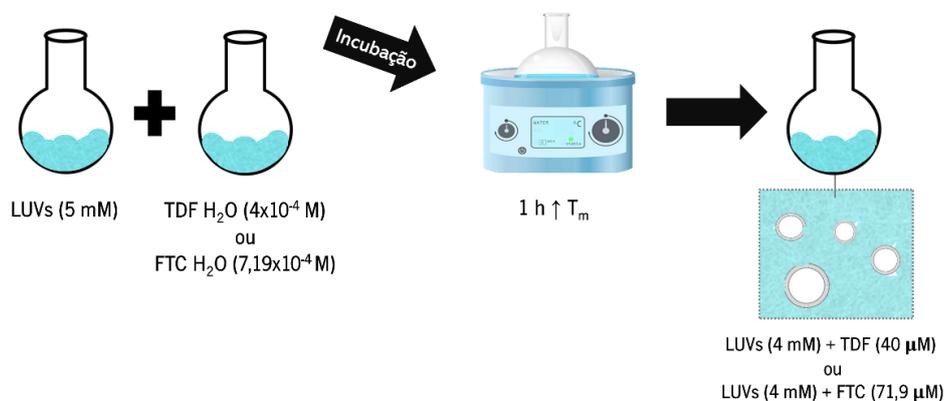
Os MLV resultantes foram extrudidos tal como é descrito no capítulo 2.2., dando origem a LUV (4 mM) com TDF (40  $\mu\text{M}$ ) ou FTC (71,9  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 2.3** - Representação esquemática do procedimento experimental para o encapsulamento de TDF (40 µM) ou FTC (71,9 µM) em LUV (4 mM) pelo método de hidratação do filme lipídico.

### 2.3.2. Método de Incubação

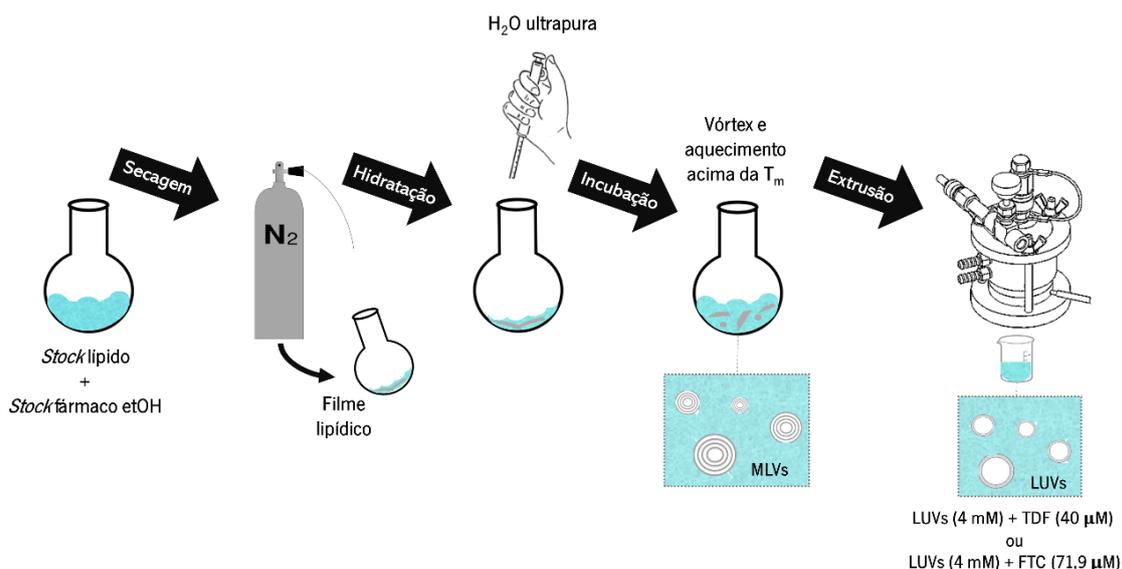
Para proceder ao método de encapsulamento por incubação (Figura 2.4) prepararam-se lipossomas placebo tal como descrito na secção 2.3. aos quais foi adicionado um volume definido da solução stock de TDF ou de FTC. Esta mistura foi incubada a uma temperatura superior à  $T_m$  do lípido ou mistura de lípidos durante 60 minutos e equilibrada, posteriormente, à temperatura ambiente durante mais 60 minutos. No final obtiveram-se LUV (4 mM) com TDF (40 µM) ou FTC (71,9 µM).



**Figura 2.4** - Representação esquemática do procedimento experimental para o encapsulamento de TDF (40 µM) ou FTC (71,9 µM) em LUV (4 mM) pelo método de incubação.

### 2.3.3. Método de Mistura Direta

Este método de encapsulamento consistiu na mistura direta de uma solução etanólica de fármaco com a solução *stock* de lípido ou mistura de lípidos (Figura 2.5.). O restante processo (evaporação do solvente para originar um filme lipídico; hidratação do filme lipídico e extrusão) foi semelhante ao descrito na secção 2.3. obtendo-se LUV (4 mM) com TDF (40  $\mu$ M) ou FTC (71,9  $\mu$ M).



**Figura 2.5** - Representação esquemática do procedimento experimental para o encapsulamento de TDF (40  $\mu$ M) ou FTC (71,9  $\mu$ M) em LUV (4 mM) pelo método de mistura direta.

## 2.4. Incorporação das formulações lipossomais em bases semissólidas

A incorporação de nanotransportadores lipídicos numa base semissólida pode ocorrer de diferentes formas. Neste trabalho procedeu-se, numa primeira fase, à preparação de géis sem fármaco por dissolução do agente gelificante PFC<sup>®</sup> (0,5 % m/m) em 30 g de água ultrapura seguida da adição de 2 a 3 gotas de trietanolamina com pH igual a 6,5 de modo a promover a gelificação.

Para incorporação das suspensões lipídicas no gel, procedeu-se ao método de incorporação direta, pela substituição de parte da fase externa pela formulação lipídica (10 % m/m).

## 2.5. Incorporação de formulações lipossomais em nanofibras poliméricas

Adicionalmente, e no âmbito de uma colaboração com um outro trabalho de mestrado, foram produzidos lipossomas com a mistura lipídica DMPC:CHOL:DOPE (7:2:1) para o encapsulamento de TDF e FTC e posterior incorporação em nanofibras poliméricas produzidas por *electrospinning*. A composição lipídica do sistema foi selecionada tendo em consideração o estudo de Garg & Jain <sup>130</sup>, no qual se obtiveram boas EE % para um ARV hidrofílico. Para a preparação destes sistemas, recorreu-se ao método de hidratação do filme lipídico já detalhado na secção 2.3. em que o solvente de hidratação foi previamente aquecido a uma temperatura superior à T<sub>m</sub> dos lípidos e, após dissolução total dos fármacos, procedeu-se à hidratação de cada um dos filmes com este solvente.

## 2.6. Doseamento dos fármacos por espectroscopia UV/Vis

A espectroscopia de absorção molecular nas regiões espectrais ultravioleta (UV) e visível (Vis) é uma técnica comumente utilizada na determinação quantitativa de moléculas orgânicas, inorgânicas ou biológicas e foi selecionada como método de doseamento ao longo de todo o trabalho desenvolvido <sup>200,201</sup>. Quando um feixe de luz atravessa um meio absorvente e a energia por ele produzida é suficiente para promover a transição de eletrões do estado fundamental para o estado excitado, ocorre absorção dos fotões do feixe de luz por parte da amostra <sup>200</sup>. Esta capacidade de absorção de radiação de determinados compostos pode ser utilizada para os quantificar através da medição da intensidade do feixe de luz, num comprimento de onda específico, antes e depois da sua interação com a amostra uma vez que a intensidade será atenuada ao atravessar um determinado meio que contém espécies absorventes. Estes parâmetros podem ser correlacionados através da equação 2: <sup>200,202</sup>

$$I_{\lambda} = I_0 e^{-\alpha(\lambda)l} \quad \text{(Equação 2)}$$

Sendo  $I_{\lambda}$  a intensidade da luz transmitida;  $I_0$  a intensidade da luz incidente;  $\alpha(\lambda)$  o coeficiente de absorção da espécie e  $l$  o percurso ótico da radiação no meio.

Quando ocorre absorção, a intensidade de luz transmitida que atinge o detetor será inferior à intensidade de luz incidente e esta razão de intensidades define-se como transmitância ( $T_{\lambda}$ ), podendo ser obtida através da equação 3 <sup>200,202</sup>:

$$T_{\lambda} = \frac{I_{\lambda}}{I_0} \quad \text{(Equação 3)}$$

A transmitância pode, por sua vez, ser relacionada com a absorvância ( $A_{\lambda}$ ) através da seguinte equação <sup>202</sup>:

$$A_{\lambda} = -\log T_{\lambda} \quad \text{(Equação 4)}$$

Por último, a lei de Lambert-Beer (equação 4) permite relacionar a absorvância de uma determinada amostra com a sua concentração e com a distância percorrida pelo feixe de luz através da mesma <sup>200,202</sup>:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} c l \quad \text{(Equação 5)}$$

Sendo,  $A_{\lambda}$  a absorvância a um comprimento de onda definido,  $l$  o percurso ótico da radiação no meio;  $\varepsilon_{\lambda}$  a absorvidade ou coeficiente de absorção molar ao  $\lambda$  definido; e, por fim,  $c$  a concentração da espécie absorvente.

Assim, a lei de Lambert-Beer prevê uma proporcionalidade direta entre a absorvância da luz e a concentração de um composto a um determinado comprimento de onda. No entanto, esta lei só pode ser aplicada para radiação monocromática e para amostras que apresentam apenas uma espécie absorvente. Quando há mais que uma espécie absorvente na mesma amostra, a absorvância corresponde à soma da absorvância de ambas as espécies. <sup>200</sup>

A obtenção dos espectros de absorção foi feita num espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC de duplo feixe que permite uma aquisição entre os 190 e os 900 nm. De modo a dosear os fármacos por espectroscopia UV/Vis procedeu-se ao traçado das curvas de calibração (Anexo 1) de cada um dos fármacos em água e etanol. Para tal, e recorrendo à equação 4, fez-se uma correlação entre os valores máximos de absorvância ( $\lambda_{\text{TDF}} = 260 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{FTC}} = 280 \text{ nm}$ ) obtidos para concentrações crescentes da espécie absorvente sendo possível, através de um ajuste linear, estimar os coeficientes de extinção molar do TDF e FTC. Em algumas circunstâncias e de forma a eliminar interferências espectrais decorrentes, por exemplo, de difusão devida à presença de vesículas lipídicas, efetuou-se a derivação dos espectros das amostras com o fármaco e procedeu-se ao doseamento recorrendo à derivação dos espectros da curva de calibração (Anexo 1).

## 2.7. Caracterização das formulações desenvolvidas

### 2.7.1. Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

A dispersão dinâmica de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), também denominada de espectroscopia de correlação de fótons, é uma ferramenta de caracterização importante que permite o estudo do coeficiente de difusão das partículas em solução <sup>203</sup>. Quando irradiadas por um feixe de luz monocromático, as partículas tendem a dispersar luz e a intensidade da luz dispersa sofre flutuações ao longo do tempo <sup>204</sup>. Estas flutuações resultam de mudanças constantes na posição das partículas devido a eventos colisionais com as moléculas circundantes e que se devem, maioritariamente, a movimentos brownianos <sup>204</sup>.

A intensidade de luz dispersa captada pelo detetor depende grandemente do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão e da sua mobilidade. Considerando um mesmo solvente, partículas de menores dimensões movem-se de forma mais rápida o que irá promover mais flutuações na intensidade de luz dispersa que chega ao detetor. Por outro lado, diâmetros médios mais elevados estão associados a menores velocidades de migração no solvente e, conseqüentemente, a menores flutuações na intensidade de luz. Conhecendo a temperatura e a viscosidade do solvente estas flutuações serão detetadas e correlacionadas com o coeficiente de difusão das partículas, sendo possível determinar o seu raio hidrodinâmico através da equação de Stokes-Einstein (Equação 6) <sup>205</sup>:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{(Equação 6)}$$

Em que  $D$  é o coeficiente de difusão da partícula,  $K_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ );  $T$  a temperatura,  $\eta$  a viscosidade do solvente e  $R_H$  é o raio hidrodinâmico da partícula.

Para além da distribuição de tamanhos obtida com base na dispersão de luz é possível ainda obter distribuições de tamanho com base no volume ou no número de partículas. Esta última é de particular interesse na distinção do número de populações com partículas do mesmo tamanho <sup>205</sup>.

O índice de polidispersão (PDI, do inglês *Polydispersity Index*) é uma medida usada para descrever o grau de uniformidade na distribuição do tamanho de partículas e funciona como indicador do grau de agregação das partículas em solução <sup>205</sup>. Este parâmetro, relacionado com a largura do pico da distribuição gaussiana da intensidade da luz dispersa, varia entre 0,0 e 1,0 <sup>205,206</sup>. Na prática, valores

menores que 0,05 correspondem a dispersões de partículas altamente monodispersas e valores acima de 0,7 indicam que a dispersão tem uma distribuição de tamanhos de partículas muito ampla, o que está associado a sistemas heterogêneos e mais polidispersos, fenômeno que se pode dever, quer à agregação das partículas, quer a diferenças significativas no seu tamanho. Por esse motivo, dispersões com valores de PDI superiores a 0,7 não são adequadas para análise por DLS <sup>206</sup>.

Os nanossistemas lipídicos (e.g. lipossomas) são sistemas mais deformáveis e o seu empacotamento lipídico pode ser afetado quer pela composição lipídica, quer pela presença de outros aditivos, como fármacos ou bioativos incorporados. Assim, dada a sua heterogeneidade e deformabilidade, para estes nanossistemas, um PDI igual ou inferior a 0,3 indica uma polidispersão aceitável <sup>206,207</sup>.

Neste trabalho, a técnica de DLS foi utilizada para a caracterização do tamanho e índice de polidispersão das formulações lipossomais e também para a avaliação do efeito do fármaco encapsulado (TDF) nas propriedades biofísicas destas formulações.

#### **2.7.1.1. Avaliação do diâmetro médio e homogeneidade das formulações lipossomais**

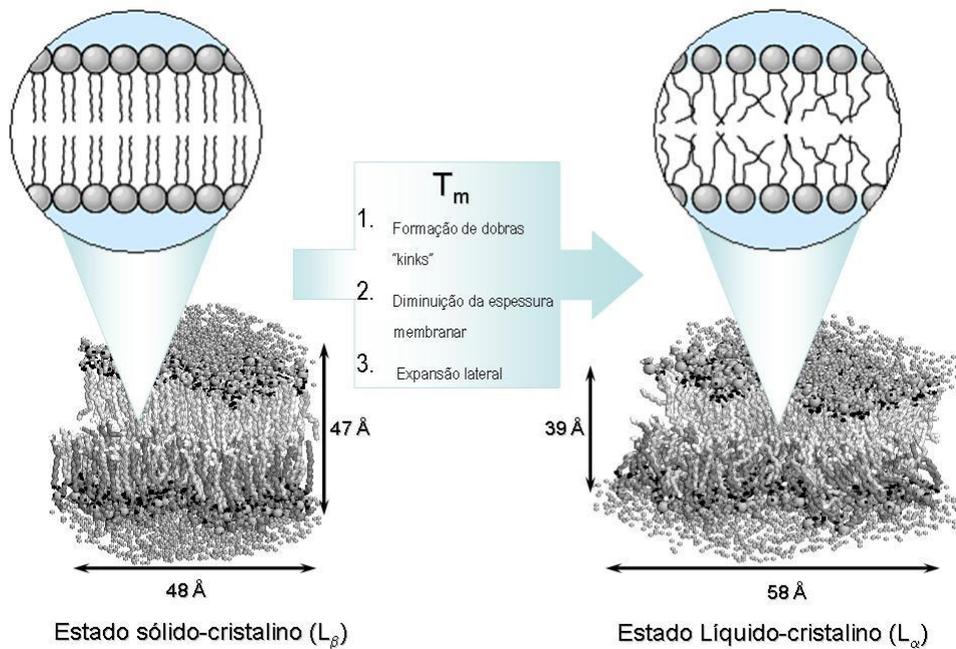
A determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão das formulações lipossomais desenvolvidas foi feita por DLS no *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments). Para tal, alíquotas de 1 mL de formulação (diluída na razão 3:7 em água ultrapura) foram colocadas em células descartáveis de poliestireno, apropriadas para este tipo de medições. No protocolo utilizado, definiu-se previamente que para cada amostra haveria um tempo de equilíbrio de 60 segundos à temperatura de medição (25 °C), bem como três medições independentes com um número mínimo de 13 análises por cada medição. Para além disso, todas as leituras foram realizadas em água e os parâmetros definidos para este solvente foram 0,8872 cP de viscosidade e um índice de refração de 1,330. Considerou-se ainda que as formulações lipossomais apresentavam um índice de refração de 1,590 e uma absorção de 0,01. Os resultados foram analisados considerando a distribuição da luz dispersa em intensidade e em número recorrendo ao *software Malvern Dispersion Technology* (DTS).

### 2.7.1.2. Avaliação das propriedades biofísicas das formulações lipossomais

A incorporação de um fármaco em nanossistemas lipídicos pode promover alterações ao nível do empacotamento dos lípidos provocando, por exemplo, uma diminuição da sua microviscosidade. Este fenómeno acaba por ter consequências no desempenho terapêutico da formulação devido a alterações na permeabilidade do nanossistema mas também no perfil de libertação do fármaco <sup>199</sup>. Assim, é aconselhável que durante o processo de desenvolvimento de formulações lipossomais (ou formulações baseadas noutros nanossistemas lipídicos) se proceda à avaliação do impacto do fármaco encapsulado nas propriedades biofísicas do nanossistema <sup>208</sup>.

De todos os aspetos relativos à avaliação biofísica de formulações lipossomais, o mais importante é, sem dúvida, o que se refere à transição de fase principal entre o estado sólido-cristalino (também designado de fase gel) e o estado líquido-cristalino (também designado de fase fluída) <sup>209</sup>. Nos lipossomas, a transição de fase das suas bicamadas lipídicas para o estado líquido-cristalino afeta a ordem e a fluidez da formulação lipossomal <sup>209</sup>. Esta transição de fase é sensível à temperatura, à concentração de lípidos ou à inserção de moléculas na bicamada lipídica e dela resultam uma grande variedade de estados com organizações estruturais diferentes, fenómeno designado de mesomorfismo liotrópico <sup>209</sup>.

A uma temperatura inferior à  $T_m$ , as cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos constituintes dos fosfolípidos estão rigidamente empacotadas, com as suas ligações C-C numa conformação “*all-trans*”, o que permite acomodar as “caudas” hidrofóbicas num volume mínimo. À medida que a temperatura do sistema aumenta, verifica-se uma diminuição da rigidez estrutural, ordem e espessura membranares e um aumento do volume membranar. Assim, a temperaturas superiores à  $T_m$ , as bicamadas lipídicas apresentam uma organização mantida à custa de uma estrutura razoavelmente rígida ao nível das “cabeças” polares dos fosfolípidos e consideravelmente menos rígida ao nível das “caudas” hidrofóbicas, com possibilidades de movimentos, incluindo a possibilidade de difusão lateral das moléculas e liberdade de rotação em torno do eixo carbonado das cadeias de ácidos gordos. A liberdade de movimentos rotacionais implica que, as ligações C-C, ao sofrerem uma rotação de  $120^\circ$  alterem a sua conformação “*all-trans*” do estado ordenado para a conformação “*gauche*”. Estes isómeros rotacionais apresentam dobras (“*kinks*”) nas cadeias carbonadas dos ácidos gordos com conformações “*gauche-trans-gauche*”. Tais dobras parecem ser altamente móveis ao longo da extensão da cadeia de ácidos gordos e afetam a estrutura da bicamada lipídica provocando um encurtamento das cadeias hidrocarbonadas e um aumento da distância entre moléculas, de onde resulta a mencionada diminuição da espessura da membrana acompanhada por um aumento de volume por expansão lateral (Figura 2.6.)



**Figura 2.6** - Transição de fase principal em membranas lipídicas <sup>8</sup>.

A definição de  $T_m$  aqui descrita como uma temperatura única à qual se dá a transição da fase gel para a fase fluida é válida para um determinado tipo de lípidos e deve-se essencialmente ao facto de esta transição ser um processo altamente cooperativo (uma vez iniciado num ponto da membrana, propaga-se rapidamente). No caso de formulações lipossomais com vários componentes lipídicos e com fármacos encapsulados ao nível da bicamada, este fenómeno é ainda cooperativo, mas a heterogeneidade da sua composição lipídica determina que seja igualmente coligativo, pois não pode ser descrito em termos das propriedades das moléculas individuais <sup>8</sup>. O carácter coligativo implica que não haja um valor único de  $T_m$ , mas um intervalo de temperaturas ao qual a transição de fase ocorrerá. A determinação da cooperatividade do processo de transição de fase lipídica permite, portanto, inferir se o fármaco se distribui de uma forma homogénea na bicamada lipídica não afetando grandemente a transição de fase lipídica, ou se pelo contrário a distribuição do fármaco é perturbadora do empacotamento lipídico e heterogénea, pelo que a cooperatividade da transição de fase irá diminuir.

De modo a estudar de que forma o TDF afeta as propriedades biofísicas das formulações lipossomais, nomeadamente a temperatura de transição de fase, a cooperatividade da transição de fase e a microviscosidade membranar, preparam-se LUV tal como descrito na secção 2.3., sem fármaco encapsulado (formulação placebo) ou com TDF encapsulado pelos três métodos de encapsulamento utilizados. A determinação da temperatura de transição de fase lipídica realizou-se na presença ou na ausência de fármaco.

Para tal, uma alíquota de 1 mL de LUV (diluídos na razão 3:7 em água ultrapura) foi colocada numa célula descartável de poliestireno e por DLS, o tamanho dos LUV foi analisado no Zetasizer Nano ZS Malvern em modo automático. Esta análise permitiu a determinação do valor ótimo de ajuste da posição da célula e do valor ideal de atenuador da intensidade de luz dispersa. De seguida, definiu-se uma posição fixa da célula, e um valor fixo do atenuador de acordo com os valores previamente testados na medição automática por DLS e procedeu-se a leituras de tamanho e número médio de contagens da intensidade de luz dispersa pelos LUV ao longo de um intervalo de temperaturas (definido para cada tipo de constituição lipídica, mas contendo a  $T_m$  do lípido ou mistura de lípido), com 0,5 °C de diferença entre leituras. Foram realizadas três medições a cada temperatura com um tempo de estabilização prévio de 60 s.

O tratamento dos resultados foi efetuado com recurso ao *software* Origin 8.0<sup>®</sup>, onde foi aplicado um ajuste sigmoide da equação modificada de Boltzmann (Equação 7), aos dados da intensidade média da luz dispersa em função da temperatura <sup>210</sup>:

$$NMC = m_1 + b_1T + \frac{m_2 - m_1 + b_2T - b_1T}{1 + 10^{B\left(\frac{T - T_m}{T_m}\right)}} \quad \text{(Equação 7)}$$

Sendo  $NMC$ , a intensidade de luz dispersa expressa em número médio de contagens normalizado ;  $m_1$  e  $b_1$ , respetivamente, o declive e a ordenada na origem da tendência linear anterior à transição de fase;  $m_2$  e  $b_2$ , respetivamente, o declive e a ordenada na origem da tendência linear posterior à transição de fase;  $T$  a temperatura;  $B$  a cooperatividade da transição de fase e, por fim,  $T_m$  a transição de fase.

## 2.7.2. Dispersão Eletroforética de Luz (ELS)

A dispersão eletroforética de luz (ELS, do inglês *Electrophoretic Light Scattering*) é uma técnica que permite medir a mobilidade eletroforética das partículas após aplicação de uma diferença de potencial <sup>205</sup>. De modo geral, as partículas coloidais apresentam cargas à sua superfície capazes de atrair iões de carga oposta (contra-iões) e, conseqüentemente, causar desequilíbrios na distribuição iónica do meio que as circunda <sup>205</sup>. Tal, irá promover a formação de uma bicamada elétrica em torno da superfície das partículas: a camada de Stern, região mais interna na qual os iões se encontram firmemente ligados à superfície; e uma camada mais externa, na qual os iões estão mais suscetíveis a interações com outros

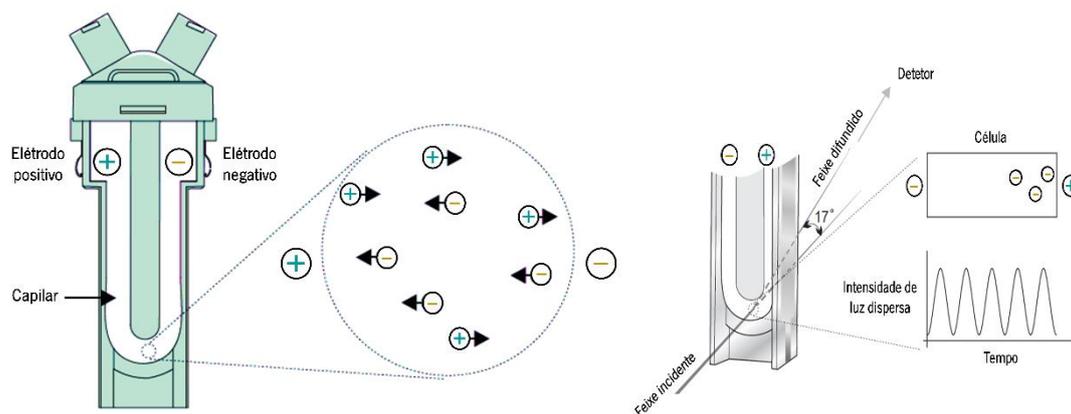
iões<sup>205,211</sup>. Esta dupla camada fornece às partículas um potencial elétrico específico, potencial- $\zeta$ , que é passível de ser medido através da aplicação de um campo elétrico de força conhecida<sup>205</sup>.

A mobilidade eletroforética ( $\mu_E$ ) das partículas pode ser correlacionada com o potencial- $\zeta$  a partir da equação de Henry (Equação 8):

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad \text{(Equação 8)}$$

Em que  $\varepsilon$  representa a constante dielétrica do meio;  $f(ka)$ , a função de Henry que pode adotar os valores 1 ou 1,5 dependendo do raio das partículas e da constante dielétrica do meio e  $\eta$ , a viscosidade do meio.

Para a medição do potencial- $\zeta$  das formulações lipossomais, é necessária a inserção de uma DIP cell<sup>®</sup> (Paralab, Portugal) nas células descartáveis de polistireno contendo as amostras. A DIP cell<sup>®</sup> permite posicionar elétrodos em cada extremo da célula aos quais será aplicada uma diferença de potencial. Desta forma, os nanossistemas tendem a mover-se para o elétrodo com carga oposta (mobilidade eletroforética) (Figura 2.7). A medição do potencial- $\zeta$  baseia-se no efeito de Doppler, isto é, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa pelo nanossistema em movimento. Como a frequência da luz é demasiado elevada, a sua alteração pelo movimento dos nanossistemas deve ser medida recorrendo-se a uma técnica interferométrica, usando as barras de interferência causada pelo cruzamento de dois raios laser. Estes últimos são originados pela mesma fonte e, seguindo trajetórias similares, cruzam-se, formando barras de interferência, cujo espaçamento é conhecido. Os nanossistemas em movimento interagem com as barras, causando a dispersão da luz que oscila ao longo do tempo de uma forma que depende da velocidade dos nanossistemas. A luz dispersa é medida por um fotomultiplicador focado para o ponto de confluência dos lasers e a contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de frequência, a partir do qual a mobilidade e, conseqüentemente, o potencial- $\zeta$  dos nanossistemas pode ser calculado (Figura 2.7). É de notar que a velocidade real dos nanossistemas depende da carga associada à sua superfície, da viscosidade do meio e do potencial aplicado, pelo que tal como na determinação do tamanho dos nanossistemas estes parâmetros devem ser conhecidos.



**Figura 2.7** - Representação esquemática da *DIP cell*<sup>®</sup> e do seu funcionamento (esquerda) bem como da detecção do movimento dos nanossistemas, induzido pela aplicação de um campo elétrico (direita).

Para a medição do potencial- $\zeta$  das formulações lipossomais, e utilizando as alíquotas previamente analisadas por DLS, inseriu-se a *DIP cell*<sup>®</sup> nas células descartáveis de polistireno de forma cuidada e sem que ocorresse formação de bolhas. A análise foi realizada no equipamento Zetasizer Nano ZS de acordo com os parâmetros já indicados anteriormente para as determinações do diâmetro médio e índice de polidispersão. Os resultados foram analisados recorrendo ao *software Malvern Dispersion Technology* (DTS).

### 2.7.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, usando a técnica de refletância total atenuada (ATR-FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IR, do inglês *infrared*) é uma técnica de caracterização que se baseia na absorção de radiação eletromagnética na região do infravermelho e que permite a análise detalhada da composição química de uma amostra <sup>212</sup>. Esta propriedade advém do facto de cada molécula absorver energias específicas que estão associadas a movimentos vibracionais das suas ligações, funcionando assim como uma espécie de impressão digital de identificação molecular <sup>212,213</sup>.

A espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica não-destrutiva, mais vantajosa face à espectroscopia dispersiva uma vez que o feixe de luz que incide na amostra é composto pela gama total de comprimentos de onda da região dos infravermelhos que se pretende analisar <sup>213</sup>. Inicialmente, a radiação IR incidente e transmitida é detetada por um interferograma ao qual é necessário aplicar, posteriormente, transformadas de Fourier de modo a converter a informação

obtida em medidas espectrais <sup>213</sup>. O aparecimento dos picos de absorção ocorre quando as frequências vibracionais específicas das ligações das moléculas coincidem com a frequência do feixe de radiação IR incidente <sup>214</sup>.

O modo de atenuação total da reflexão (ATR) acoplado ao FTIR permite medir amostras sólidas sem qualquer preparação prévia através da sua deposição num pequeno cristal com um índice de refração superior ao da amostra e uma baixa absorção no IR <sup>215</sup>. Este modo baseia-se em direcionar, segundo um dado ângulo, o feixe de radiação IR para a interface cristal-amostra, sendo este feixe depois refletido internamente <sup>212,216</sup>. A onda evanescente associada à reflexão propaga-se na amostra e é absorvida seletivamente permitindo obter informação sobre os seus níveis vibracionais <sup>216</sup>.

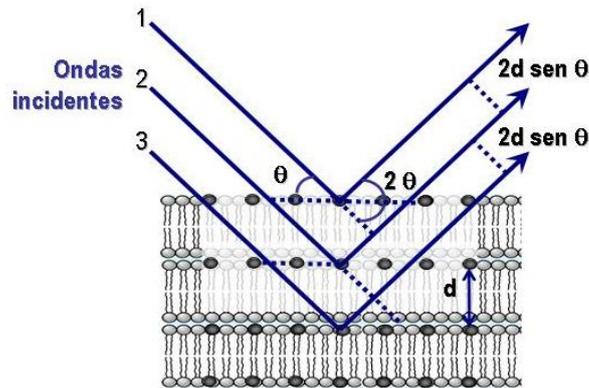
Para as medições de ATR-FTIR, as formulações lipossomais com e sem fármaco foram previamente preparadas de modo a garantir a eliminação total do conteúdo aquoso para, consequentemente, eliminar ou minimizar a interferência espectral de uma banda larga e intensa a 1645  $\text{cm}^{-1}$ . Para tal, colocaram-se alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de formulação em cadinhos de papel de alumínio, alternando-se a adição da amostra com secagem em estufa (40 °C) durante cerca de 25 min. De modo a que toda a superfície interna do cadinho ficasse recoberta com amostra, a sua adição foi feita de forma gradual e até atingir um volume total de 200  $\mu\text{L}$ . Durante as medições dos espectros ATR-FTIR, os cadinhos foram invertidos com o intuito de colocar os filmes de formulações lipossomais em contacto com o cristal de diamante do acessório ATR. Por último, e para remover qualquer interferência espectral derivada do alumínio, foram ainda medidos cadinhos sem a adição de qualquer amostra.

As medidas de ATR-FTIR foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade do Minho, no Campus de Gualtar, num espectrofotómetro Perkin-Elmer, Spectrum Two Spetrometer equipado com um acessório de ATR com um cristal de diamante (índice de refração 2,4 e profundidade de penetração da ordem de 1,66  $\mu\text{m}$ ). Os espectros foram medidos na região 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com incrementos de 4  $\text{cm}^{-1}$  e fazendo 16 varrimentos para cada espetro.

#### **2.7.4. Difração de raios-X de baixo e alto ângulo (SWAXS)**

Os raios-X são ondas eletromagnéticas na ordem dos  $10^2$  a  $10^3$  Å, que podem interagir com a matéria por intermédio de três processos principais: absorção, refração ou reflexão <sup>217</sup>. Quando estamos perante materiais cristalinos, em que os átomos estão organizados de forma regular e ordenada, é possível a observação de fenómenos de difração provocados pela existência de distâncias fixas entre planos de átomos que são da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação incidente.

Tal como referido na secção 2.7.1.2., os diferentes estados físicos das bicamadas lipídicas apresentam o sufixo “cristalino”. Assim, por exemplo, o estado fluido de uma membrana ou de uma bicamada lipídica não é um estado líquido, mas um estado líquido-cristalino. Esta designação decorre do facto de as bicamadas lipídicas, mesmo no seu estado fluido, apresentarem uma certa organização estrutural repetida, o que leva a que a difração de raios-X por bicamadas lipídicas seja possível e possa ser interpretada por analogia direta com uma rede cristalina de difração.



**Figura 2.8** - Esquemática da difração de raios-X por bicamadas de fosfolípidos de espessura  $d$  na direção perpendicular ao seu plano <sup>8</sup>.

Os planos das bicamadas lipídicas atuam como espelhos paralelos que difratam os raios-X, introduzindo diferenças de fase nas ondas incidentes (1, 2 e 3) devido às suas separações espaciais (Figura 2.8.). Se a diferença de fase introduzida na separação das ondas incidentes for um múltiplo inteiro ( $n$ ) do comprimento de onda incidente ( $\lambda$ ), a radiação difratada interferirá construtivamente, originando uma reflexão de acordo com a Lei de Bragg <sup>8</sup>:

$$n \lambda = 2 d \operatorname{sen}(\theta) \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde  $\theta$  é o ângulo entre a radiação incidente e o plano da bicamada (plano de Bragg) e  $d$  é a distância entre dois planos da membrana consecutivos.

O resultado destes estudos é um difratograma com uma série de picos correspondentes a distintos valores do ângulo de difração  $2\theta$ . Cada pico (pico de Bragg) indica um plano cristalográfico específico de uma dada fase, que difratou a radiação incidente segundo a lei de Bragg. Uma vez obtido o padrão experimental de difração, a posição ( $S$  em  $\text{\AA}^{-1}$ ) e a intensidade dos picos ( $I$  em unidades

arbitrárias) podem ser facilmente medidos de forma a determinar a estrutura das bicamadas lipídicas analisada.

A difração de raios-X de baixo ângulo (SAXS, do inglês *small-angle X-ray scattering*) permite avaliar distâncias de longo alcance da estrutura lipídica: espessura da bicamada mais a camada de hidratação. Para além disso, esta técnica possibilita ainda inferir acerca da fase lipídica da amostra através da posição dos picos de Bragg <sup>218</sup>.

Por outro lado, a técnica de difração de raios-X de alto ângulo (WAXS, do inglês *wide-angle X-ray scattering*) fornece informações sobre distâncias de curto alcance da estrutura lipídica, nomeadamente, as distâncias entre as cabeças de fosfolípidos. Esta técnica permite assim analisar o empacotamento lipídico, o qual pode ser utilizado para diferenciar as várias fases lamelares <sup>218</sup>.

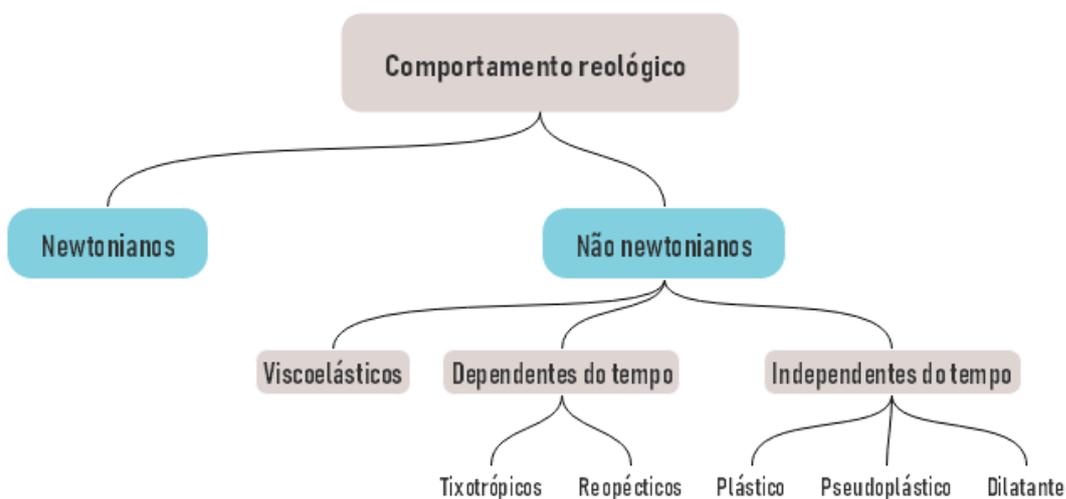
Os estudos de SAXS e WAXS foram feitos com o objetivo de analisar o efeito da incorporação do TDF e FTC na ordem e empacotamento lipídico, permitindo assim complementar os estudos das alterações biofísicas induzidas por estes fármacos. Para tal, foram preparadas amostras de bicamadas de DPPC sem fármacos; bicamadas de DPPC com TDF; bicamadas de DPPC com FTC e bicamadas de DPPC com FTC:TDF (7:4).

Para a preparação das amostras, os fármacos foram co-solubilizados com o DPPC numa mistura clorofórmio-metanol (9:1, v/v) de forma a obter a fração molar fármaco/lípido pretendida, sendo que a concentração de lípido final em cada amostra era de  $\approx 15-20\%$  m/v. Após dissolução dos compostos nos solventes orgânicos, a preparação dos MLV seguiu as mesmas etapas descritas para o método de hidratação do filme lipídico segundo o processo descrito na secção 2.3. Após a hidratação e formação das vesículas lipídicas, as amostras de MLV (90  $\mu\text{L}$ ) foram transferidas para capilares de vidro (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Alemanha; diâmetro 0,1 mm) e centrifugadas a 1000 rpm para permitir a sua deposição no fundo do capilar, a destruição dos MLV e a formação de bicamadas lipídicas. A extremidade oposta ao fundo do capilar foi selada à chama e os capilares foram colocados no suporte de amostras com controlo de temperatura. As amostras foram então analisadas por difração de raios-X de baixo e alto ângulo (SAXS e WAXS) numa fonte sincrotrão produtora de radiação com um comprimento de onda fixo de 0,15 nm (Elettra Sincrotrone Trieste, Itália). A luz difratada foi analisada por um sistema de detetores lineares durante os varrimentos de aquecimento e arrefecimento a uma velocidade de  $1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Os espaços recíprocos  $S=1/d$  foram calibrados para os estudos de SAXS usando um padrão de difração de behenato de prata ( $\text{AgC}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2$ ) e para os estudos de WAXS com o ácido p-bromobenzóico ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrO}_2$ ). Inicialmente foram feitas exposições estáticas da amostra para obter informações acerca das estruturas formadas depois da sua preparação. Os estudos subsequentes foram realizados em intervalos

de temperaturas de 5 a 70 °C (1 °C min<sup>-1</sup>). Entre os ciclos de determinação de difração resolvida no tempo realizaram-se exposições estáticas da amostra abaixo (20 ° C) e acima (55 °C) T<sub>m</sub>, que foram comparadas para garantir a qualidade da amostra e excluir qualquer possibilidade de dano da radiação.

### 2.7.5. Estudos reológicos dos géis

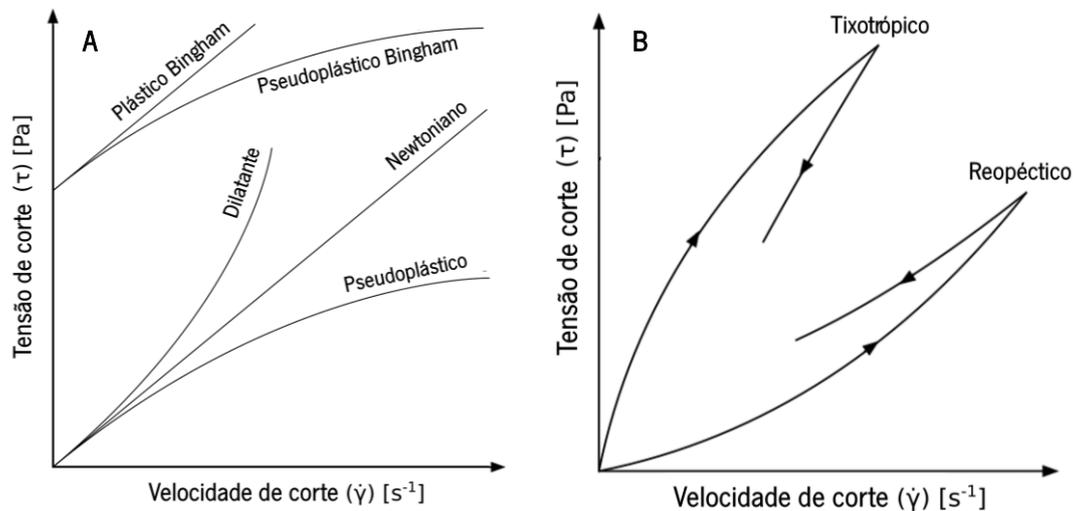
A reologia pode ser definida como o estudo das propriedades de fluxo, fluidez e deformação da matéria em líquidos, sólidos e semissólidos. O estudo das propriedades reológicas é de extrema importância quando se considera a via de administração tópica para aplicação farmacêutica uma vez que permite a previsão do comportamento da formulação perante a ação mecânica, no momento da administração, ou a previsão de como as suas propriedades se poderão alterar *in vivo* sendo que a sua performance e potencial terapêutico dependerão em larga medida destas propriedades <sup>219</sup>.



**Figura 2.9** - Esquema da classificação do comportamento reológico dos fluidos, com base na relação entre a viscosidade e a tensão de corte.

A relação entre a viscosidade e a tensão de corte revela a natureza do comportamento reológico, que pode ser do tipo Newtoniano ou não Newtoniano (Figura 2.9.). Nos sistemas Newtonianos verifica-se uma proporção direta entre a tensão de corte ( $\tau$ ) e a velocidade de corte ( $\dot{\gamma}$ ), onde a viscosidade é constante. Pelo contrário, nos sistemas não newtonianos ocorre uma variação da viscosidade em função da tensão de corte e estes podem ser subdivididos em plásticos, pseudoplásticos ou dilatantes (Figura 2.10.). Mais concretamente, o comportamento plástico caracteriza-se por necessitar de uma tensão mínima de corte para que exiba fluidez; os pseudoplásticos exibem uma diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de corte e os dilatantes exibem um aumento da viscosidade com o aumento

da velocidade de corte. Para além disso, estes sistemas podem apresentar tixotropia, isto é, uma diminuição da viscosidade com o tempo; ou reopexia, caso a viscosidade da formulação tenda a aumentar em função do tempo.



**Figura 2.10** - (A) Comportamento dos fluidos newtonianos e não newtonianos em função da velocidade de corte e respetiva tensão de corte e (B) Representação do comportamento de fluidos não newtonianos dependentes do tempo.

Nestes ensaios pretendeu-se avaliar o efeito da incorporação de diferentes formulações lipossomais no perfil reológico de géis hidrofílicos e, para além disso, estudar de que forma concentrações crescentes de uma solução de mucina interagem com a estrutura tridimensional da base semissólida. A análise reológica dos vários géis foi feita com recurso a um viscosímetro rotacional FUNGILAB, série EVO Expert L (Reagente 5, Portugal), e o seu comportamento foi avaliado através da variação da tensão de corte ( $\tau$ , Pa) em função da velocidade de corte ( $\dot{\gamma}$ ,  $s^{-1}$ ).

### 2.7.6. Estudos de desativação de fluorescência em estado estacionário

A mucina é uma glicoproteína filamentosa que apresenta na sua constituição aminoácidos fluorescentes (triptofanos) conferindo-lhe uma marcação intrínseca sem ser necessário recorrer à sua marcação com fluoróforos extrínsecos. A emissão de fluorescência da mucina é, portanto, a característica do triptofano e ocorre entre 300-500 nm após uma excitação entre 270-280 nm.

De modo a determinar as propriedades mucoadesivas dos nanotransportadores lipídicos, isto é, estimar o seu grau de ligação ou adsorção à mucina foram realizados estudos de avaliação da desativação da fluorescência intrínseca da mucina.

Assim, preparou-se uma suspensão aquosa de mucina (0,4 mg/mL) e procedeu-se ao traçado do espectro de emissão de fluorescência entre os 285 aos 460 nm obtido pela excitação a um comprimento de onda de 270 nm. Após a adição de formulações lipossomais (200 µM) à suspensão de mucina, procedeu-se novamente ao traçado do espectro de emissão, avaliando a desativação de fluorescência promovida pela interação dos nanossistemas e a mucina.

Uma vez que a carga superficial dos lipossomas pode ditar uma maior ou menor interação com a mucina, foram testados LUV com carga superficial positiva (DODAC), negativa (DMPG) e neutra (DMPC).

## 2.8. Eficiência de encapsulamento dos fármacos nas formulações lipossomais

A determinação da eficiência de encapsulamento é um dos parâmetros mais importantes a ter em consideração aquando do desenvolvimento de um nanotransportador para veiculação de compostos bioativos. Idealmente, seria expectável que o teor de fármaco adicionado às formulações lipossomais fosse totalmente encapsulado, contudo certos fatores como por exemplo a solubilização dos compostos na fase aquosa ou a sua retenção nas membranas de policarbonato após passagem das vesículas pelo extrusor poderão comprometer o seu sucesso.

Para determinar a EE % dos fármacos nas formulações lipossomais colocou-se 1 mL de formulação em unidades filtrantes (Amicon® 100 kDa), procedendo-se à centrifugação das mesmas a 3000 rpm durante 20 minutos. Após centrifugação e separação das fases lipídica e aquosa, procedeu-se ao doseamento espectralométrico do fármaco na fase aquosa (filtrado) como descrito em 2.6. A EE % é determinada pela seguinte expressão:

$$EE (\%) = \frac{[\text{Fármaco}]_{\text{total}} - [\text{Fármaco}]_{\text{filtrado}}}{[\text{Fármaco}]_{\text{total}}} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

Sendo  $[\text{Fármaco}]_{\text{filtrado}}$  a concentração de fármaco doseada na fase aquosa (e, portanto, a concentração de fármaco não encapsulado) e  $[\text{Fármaco}]_{\text{total}}$  a concentração total de fármaco adicionada no processo de encapsulamento. Uma vez que este é um método indireto de doseamento, de onde se infere a quantidade de fármaco encapsulada, através do doseamento da quantidade não encapsulada,

foi ainda possível confirmar a EE % por doseamento direto do fármaco na fase lipídica recorrendo à derivação dos espectros conforme o descrito em 2.6.

## 2.9. Estudos *in vitro* da cinética de libertação dos fármacos

De modo a determinar o perfil de libertação dos fármacos a partir das formulações desenvolvidas recorreu-se ao método *in vitro* de difusão através de membranas de diálise (SnakeSkin<sup>®</sup>, poro 3,5 kDa, VWR, Portugal). A libertação dos fármacos foi analisada num meio de dissolução aquoso e decorreu a partir de diferentes sistemas:

- i) Formulações lipossomais
- ii) Formulações lipossomais incorporadas em géis hidrofílicos;
- iii) Formulações lipossomais incorporadas em nanofibras poliméricas.

Estas diferentes plataformas de entrega permitiram estabelecer relações entre os diferentes perfis de libertação:

- a) comparação do perfil de libertação do TDF quando disperso em água; encapsulado em lipossomas com crescentes graus de rigidez; ou encapsulado em lipossomas incorporados num gel hidrofílico;
- b) comparação do perfil de libertação da FTC quando dispersa em água; ou incorporada num gel hidrofílico;
- c) perfil de libertação do TDF/FTC quando encapsulados em formulações lipossomais que estão incorporadas em nanofibras poliméricas e quando ambos se encontram incorporados no gel, estando o TDF encapsulado e a FTC livre.

Neste sentido, procedeu-se à preparação prévia de géis hidrofílicos tal como descrito na secção 2.4., de nanofibras poliméricas através da técnica de *electrospinning* como descrito na secção 2.5. e de lipossomas com uma concentração igual a 9 mM cujo encapsulamento foi realizado pelo método de hidratação do filme lipídico descrito na secção 2.3.

Para as várias formulações a testar foi predefinido um volume (2 mL) a colocar no interior da manga de diálise sendo esta posteriormente fixada e imersa num recipiente contendo 15 mL de meio de dissolução aquoso.

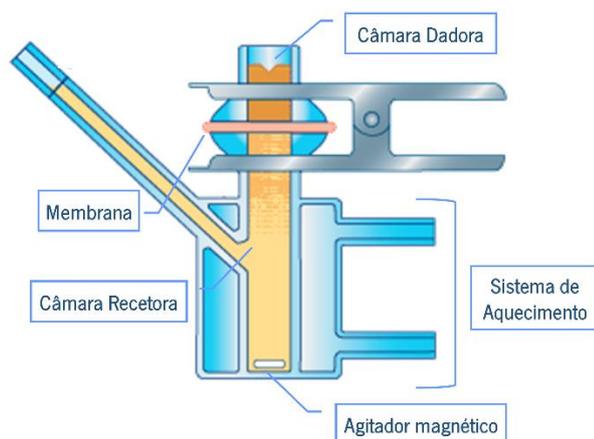
De modo a garantir a reprodutibilidade do método, cada formulação foi preparada e analisada em triplicado. O sistema foi mantido sob agitação magnética (120 rpm) a  $37\pm 0,5$  °C e coberto, para prevenir a evaporação do meio de dissolução durante o ensaio. Ao longo do tempo total de ensaio (24

h) foram recolhidas, em intervalos de tempo predeterminados (0, 0,083, 0,167, 0,250, 0,5, 0,750, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 h), alíquotas de 1 mL de meio de dissolução, volume este que era repostado pela adição de 1 mL de meio de dissolução fresco. A concentração de fármaco libertada foi determinada por espectroscopia UV/Vis (como descrito em 2.6.). O valor cumulativo de fármaco libertado foi calculado e expresso como uma percentagem do máximo teórico de teor de fármaco e representado em função do tempo, obtendo-se assim um perfil de libertação do fármaco.

## 2.10. Estudos de permeação membranar dos fármacos

O estudo da taxa de permeação membranar dos fármacos foi realizado *in vitro* com recurso a células de difusão de Franz (V-Series Stirrers for Franz Cells; PermeGear, USA). Como ilustrado na Figura 2.11., este sistema é constituído por uma câmara dadora onde se coloca a amostra em estudo e por uma câmara recetora que contém o meio de dissolução. Para além disso, a separar os dois compartimentos, foi colocada uma membrana polimérica sintética com o objetivo de mimetizar a permeação membranar epitelial (membrana de polissulfona área de difusão de 0,64 cm<sup>2</sup>) e através da qual se avaliou o perfil de difusão do fármaco. A utilização de membranas sintéticas (e.g. silicone, celulose ou polissulfona) neste tipo de ensaios é considerada adequada pela FDA para a avaliação da performance terapêutica de formulações tópicas <sup>220</sup>. Apesar de não mimetizarem o ambiente lipídico natural, estas membranas permitem retirar ilações à cerca da partição e difusão de agentes bioativos <sup>221</sup>.

Os estudos de permeação membranar foram realizados no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, no Campus de Gualtar. O procedimento experimental consistiu na adição de 800 µL de uma amostra de fármaco livre ou encapsulado em LUV de DMPC na câmara dadora e 5 mL de solução aquosa na câmara recetora. O líquido recetor foi mantido a 37 °C utilizando um banho de água circulante continuamente homogeneizado com agitação magnética. Posteriormente, e a diferentes tempos de ensaio (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h), foram retiradas alíquotas de 400 µL do compartimento recetor procedendo-se à quantificação do fármaco por espectrofotometria UV/Vis tal como descrito na secção 2.6.



**Figura 2.11** - Célula de difusão de Franz. É constituída por dois compartimentos principais: a câmara dadora, onde é colocada a amostra e a câmara recetora. A separar estes dois sistemas encontra-se a membrana de polissulfona, através da qual ocorre a permeação do fármaco para a câmara recetora. Para além disso, possui ainda dois tubos paralelos que permitem a entrada e saída de água de modo a garantir a manutenção da temperatura e um tubo coletor através do qual é retirada a amostra e repostado o volume da câmara recetora com meio de dissolução fresco.

## 2.11. Estudos de viabilidade celular

Com o intuito de avaliar a citotoxicidade das formulações em estudo, procedeu-se à realização do ensaio de MTT, brometo de ((3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio), em duas linhas celulares distintas: células de origem endometrial (HEC-1-A) e cervical (CaSki) (ATCC, EUA), utilizadas da passagem 22 à 27 e da 23 à 28, respetivamente.

Este ensaio é do tipo colorimétrico e estuda a atividade metabólica da célula ao nível mitocondrial através das desidrogenases presentes neste compartimento<sup>222</sup>. O MTT é um corante amarelo solúvel em água que, em células viáveis, é metabolizado e reduzido a cristais de formazano adquirindo uma coloração púrpura. Estes cristais, após solubilização, podem ser quantificados por espectrofotometria UV/Vis ao comprimento de onda de 570 nm, sendo assim possível estimar a viabilidade mitocondrial das células que será diretamente proporcional à viabilidade celular.<sup>222</sup>

As células HEC1-A foram mantidas em meio de McCoy's 5A e as CaSki em meio RPMI 1640, ambos modificados com 10 % de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) e suplementados com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomina. Ambas as linhas foram cultivadas em frascos T75 até que fosse atingida uma confluência de cerca de 90 % para, de seguida, se proceder ao seu plaqueamento em placas de 96 poços. Para tal, definiu-se uma concentração de 10,000 células em 200 µL de meio de cultura por poço e procedeu-se à incubação das placas por um período de 24 h, a

uma temperatura de 37 °C numa atmosfera saturada de água e com 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, fez-se a remoção e substituição do meio de cultura por meio fresco contendo as diferentes formulações lipossomais. Para tal, prepararam-se soluções concentradas de lipossomas (10 mM) e de fármaco (100 μM), testando-se três formulações distintas: lipossomas placebo, lipossomas com TDF encapsulado e lipossomas com FTC encapsulado. Estes sistemas foram diluídos serialmente (F.D.= 10) em meio de cultura de modo a testar cinco concentrações distintas, tal como indicado na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** - Concentrações de lipossomas e de fármaco testadas nos ensaios de viabilidade celular. **a)** Lipossomas testados na ausência de fármaco (formulações placebo) e **b)** Lipossomas com fármaco encapsulado.

a)		b)	
[Lipossomas] μM	[Fármaco] μM	[Lipossomas] μM	[Fármaco] μM
1000		1000	10
100		100	1
10	-	10	0,1
1		1	0,01
0,1		0,1	0,001

Para além disso, foram ainda realizados controlos negativos e positivos na própria placa. O primeiro realizou-se por adição de meio fresco às células e o segundo por adição de Triton X-100 (1 %), capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular. As células foram incubadas durante 24 h com as formulações e, no final, fez-se a aspiração do conteúdo de cada poço seguido de duas lavagens com 200 μL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) de modo a remover qualquer excipiente. Por último, adicionou-se a solução de MTT em PBS (5 mg/mL) previamente preparada e diluída em meio de cultura na razão de 1:9 (concentração final de MTT: 0,5 mg/mL) e deixou-se a placa a incubar durante 4 h no escuro. No final, aspirou-se todo o volume dos poços e procedeu-se à solubilização dos cristais de formazano com a adição de 200 μL DMSO por poço. A placa foi mantida em agitação durante cerca de 15 minutos de modo a garantir que todos os cristais eram solubilizados sendo, mais tarde, medida a absorbância a 570 nm da mesma num leitor de placas (Biotek Synergy 2,

EUA). Foi também realizada uma leitura a 630 nm, sendo os valores utilizados como fundo inespecífico e deduzidos aos valores obtidos a 570 nm.

Os resultados foram analisados de acordo com a equação 11:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{\text{formulação em estudo}}}{Abs_{\text{controlo positivo}}} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

## CAPÍTULO 3



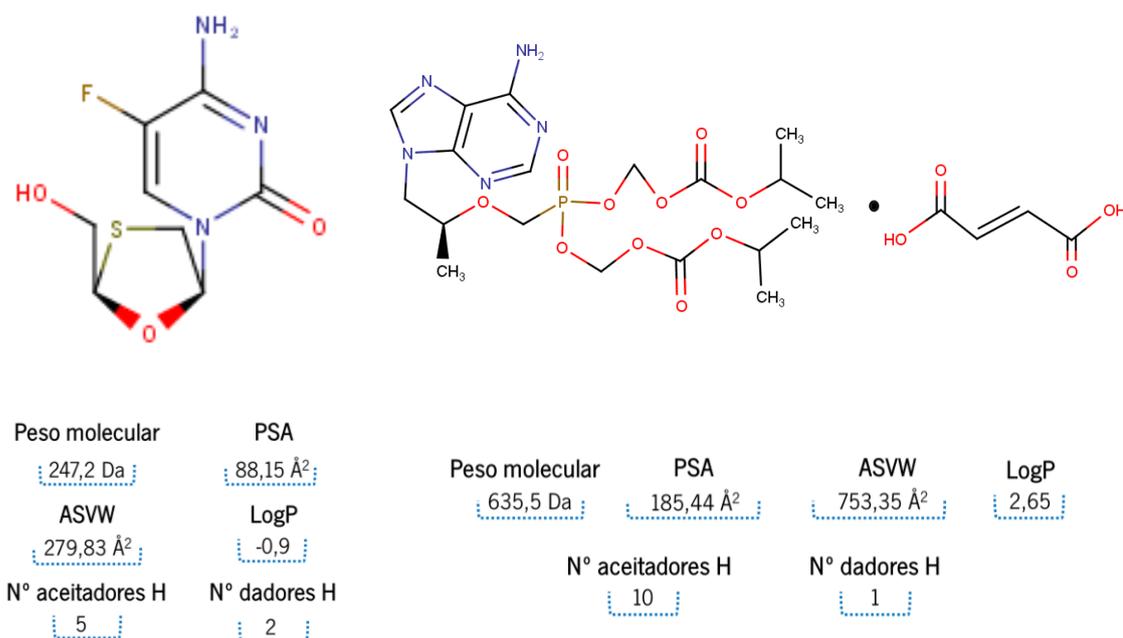
## RESULTADOS E DISCUSSÃO



# 1. Ensaio de pré-formulação

## 1.1. Previsão *in silico* de descritores moleculares para apoio ao desenvolvimento de uma formulação

Recorrendo ao *software* da Chemaxon® com o módulo MarvinSketch® foi possível calcular e estimar importantes parâmetros físico-químicos com base na estrutura da molécula do TDF e da FTC, tal como pode ser observado na Figura 3.1.



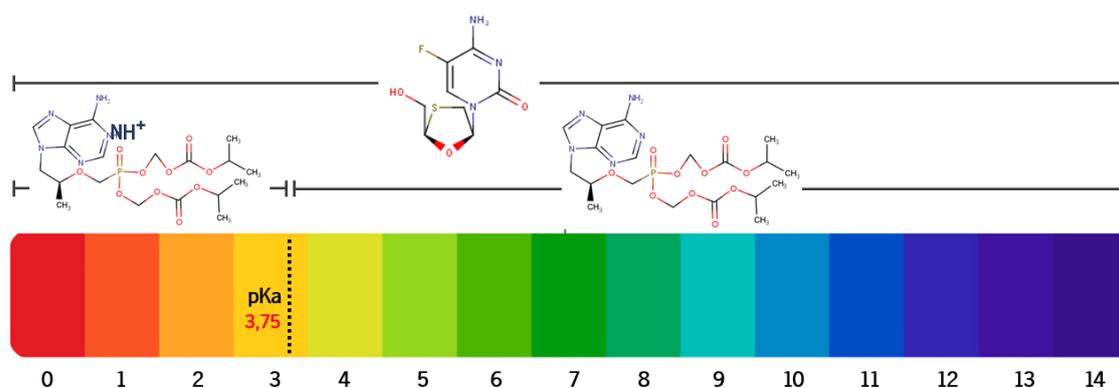
**Figura 3.1** - Estudo *in silico* de alguns parâmetros físico-químicos tendo por base a estrutura molecular da emtricitabina (esquerda) e do tenofovir disoproxil fumarato (direita), obtidas com recurso ao *software* da Chemaxon® incorporado com o módulo MarvinSketch®. Abreviaturas: ASVW, área de superfície de Van der Waals; LogP, coeficiente de partição (num sistema octanol/água) e PSA, área da superfície polar.

A partir destes parâmetros, é possível retirar algumas considerações sobre: ionização, lipofilicidade, solubilidade, permeabilidade e classificação biofarmacêutica, parâmetros que serão avaliados nas secções seguintes.

### 1.1.1. Ionização

Com recurso ao *software* da Chemaxon<sup>®</sup>, foi realizada uma previsão teórica dos valores de pKa dos fármacos em estudo e concluiu-se que, à semelhança do que é descrito na literatura, a molécula de TDF apresenta um valor de pKa igual a 3,75<sup>85</sup>. Pelo contrário, a previsão *in silico* do pKa da FTC apresentou um valor de pKa mais baixo que o reportado (pKa=1,75 em vez de 2,65)<sup>85</sup> e que está associado à ionização da amina primária da molécula. No entanto, um pKa=2,65 corresponde a um pKb=11,35 de onde se pode determinar uma constante de dissociação muito baixa ( $K_b=4,47 \times 10^{-12}$ ) e que indicia, desde já, a baixa probabilidade de ionização deste grupo. Se considerarmos o valor teórico obtido (pKa=1,75) a constante de dissociação da FTC será ainda mais baixa ( $K_b=5,62 \times 10^{-13}$ ). Assim, a ionização do grupo amina, embora possível, é altamente improvável, até pela presença de um grupo halogenado (F), muito eletronegativo em posição *orto* em relação ao grupo amina, o que retirará reatividade ao par de eletrões não ligantes do N da amina. Além disso, apenas a valores de pH < pKa poderá ocorrer esta ionização, o que em termos fisiológicos é altamente improvável, uma vez que valores tão baixos de pH só são possíveis ao nível gástrico em situações de jejum<sup>180</sup>. Uma vez que se pretende que este fármaco atue, num contexto profilático, como um microbicida de administração vaginal é importante avaliar a sua ionização aos valores de pH passíveis de encontrar após administração. Assim, numa situação de administração tópica vaginal, pré-ejaculação (3,5 < pH < 4,5)<sup>58</sup> ou pós-ejaculação (7,0 < pH < 8,5)<sup>58</sup> a molécula de FTC encontrar-se-á na forma neutra.

No caso particular do TDF, e perante valores de pH < pKa, é evidente a clara predominância de uma isoforma de TDF carregada positivamente devido à protonação do grupo amina enquanto que, face a valores de pH > pKa a molécula se encontra maioritariamente no seu estado neutro (Figura 3.2). Como tal, no contexto de administração tópica vaginal, o TDF apresentar-se-á também maioritariamente na sua forma neutra.



**Figura 3.2** - Representação gráfica da distribuição de microespécies de FTC e TDF em função da escala de pH bem como do valor de pKa do fármaco

### 1.1.2. Lipofilicidade

Como descrito na secção anterior, ao nível fisiológico a molécula de FTC encontra-se no estado neutro o que se traduz num  $\text{LogP} = \text{LogD}$ , com um valor previsto de  $-0,90$  que vai de encontro aos valores obtidos experimentalmente<sup>85</sup>. Um  $\text{LogD} < 0$  é considerado um valor baixo e, por isso, indicador do carácter hidrofílico e elevada capacidade de solubilização do composto em ambientes aquosos. Para além disso, um  $\text{LogD} < 0$  é característico de compostos que apresentam uma absorção preferencial por via paracelular, uma baixa permeabilidade através das bicamadas lipídicas, uma baixa absorção e penetração na BHE e, por último, uma eliminação renal elevada<sup>180,183,223</sup>. Contrariamente à FTC, a previsão *in silico* do  $\text{LogP}$  do TDF ( $2,65$ ) indica que este fármaco tem uma lipofilicidade moderada ( $0 < \text{LogP} < 3$ )<sup>196,223</sup>, sendo o valor teórico obtido superior ao reportado ( $1,25$ )<sup>85</sup>. Compostos com lipofilicidade moderada têm sido descritos como possuindo um bom equilíbrio entre solubilidade e permeabilidade, o que tem um impacto positivo no seu desempenho terapêutico. Apesar destas características terapêuticas favoráveis é necessário atentar noutros fatores, como a PSA e o número de grupos de dadores e aceptadores de H que, em caso de serem elevados, conferem aos fármacos uma grande polarizabilidade<sup>223</sup>. De facto, o TDF apresenta uma elevada PSA e um grande número de grupos aceptadores de H (Figura 3.1), sendo expectável que este fármaco seja capaz de efetuar ligações do tipo pontes de H com diversas interfaces biológicas, o que pode prejudicar tanto a sua permeabilidade, como a sua absorção e a sua distribuição, que se torna inespecífica por tecidos não-alvo.

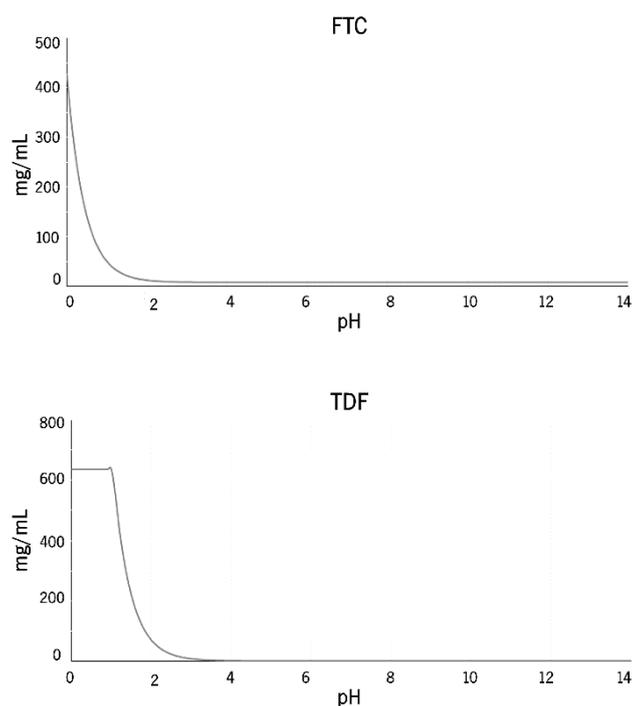
No contexto de uma administração vaginal profilática, a lipofilicidade dos fármacos aqui descrita apresenta alguns desafios. Por exemplo, a FTC possui uma lipofilicidade baixa que poderá motivar uma rápida eliminação através do “*turnover*” dos fluidos vaginais, e o TDF apresenta uma lipofilicidade moderada e elevada polarizabilidade que poderão motivar a sua ligação às redes de mucina presentes no muco e o seu consequente “aprisionamento” nesta barreira fisiológica. De acordo com esta previsão, a formulação desenvolvida para o encapsulamento da FTC, terá que permitir a solubilização do composto, e melhorar as suas propriedades. Assim, depreende-se que uma formulação ideal deverá ter um carácter anfílico, com zonas polares onde a solubilização do fármaco será preferencial e zonas apolares que lhe confirmem uma maior lipofilicidade e residência no local de administração. Já a formulação desenvolvida para o encapsulamento do TDF, terá que possuir regiões apolares onde a solubilização do composto seja possível, protegendo-o preferencialmente de interações que possa estabelecer com as interfaces biológicas que não constituam o seu tecido alvo, como é o caso das redes de mucina.

### 1.1.3. Solubilidade

Através da análise do gráfico da solubilidade expressa em mg/mL em função do pH, representado na Figura 3.3, é possível concluir que a solubilidade da FTC é menor (7,67 mg/mL) em ambientes aquosos ácidos, neutros e básicos. Da mesma forma, podemos igualmente inferir por análise da Figura 3.3 que a solubilidade do TDF em meios ácidos, neutros e básicos é mais baixa (1,24 mg/mL) aumentando apenas (138,34 mg/mL) para valores de pH extremamente acidicos.

A solubilidade destes fármacos em água é, no entanto, considerada elevada (> 1 mg/mL), sendo menor para o TDF que está perto do limite entre uma solubilidade elevada e uma solubilidade moderada (0,001 mg/mL a 1 mg/mL). A solubilidade elevada destes fármacos determina, mais uma vez, que estes sejam formulados em sistemas anfífilicos que lhes confirmam maior tempo de retenção após administração, maior capacidade de permeação (por exemplo das células do epitélio vaginal, para atingirem o seu alvo viral) <sup>224</sup> sem, no entanto, comprometerem a sua difusão nos fluidos aquosos vaginais

<sup>224</sup>.



**Figura 3.3.** - Representação gráfica da solubilidade intrínseca da FTC e do TDF (mg/mL) em função do pH. Elaborada com recurso ao software MarvinSketch®.

### 1.1.4. Permeabilidade

De acordo com a regra “*rule of 5*” de Lipinski, apenas apresentam baixa permeabilidade e baixa absorção compostos que possuam pelo menos 2 das seguintes características:  $\text{LogP} > 5$ ; Peso molecular  $> 500 \text{ Da}$ ; Dadores de H  $> 5$  e aceitadores de H  $> 10$ <sup>225</sup>. Face a isto, a FTC não apresenta problemas relativamente à sua permeabilidade contrariamente ao TDF cujo peso molecular e número de aceitadores de hidrogénio ultrapassam os valores estipulados. No entanto, a regra de Lipinski é bastante abrangente e a permeabilidade pode ser analisada de forma mais detalhada e em função do tipo de tecido.

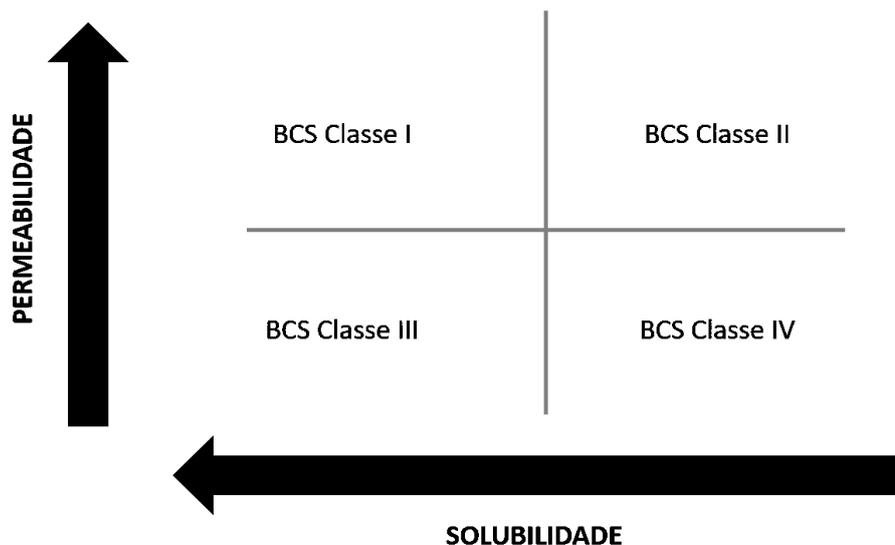
Por exemplo, de modo a estudar a permeabilidade dos fármacos através do epitélio intestinal, é de particular interesse atentar aos seus valores de PSA e de  $\text{LogD}$  que deverão, idealmente, ser menores que  $120 \text{ \AA}^2$  e maiores que 0 respetivamente para que a permeação seja bem-sucedida. Neste sentido, é possível concluir que a permeação da FTC através do epitélio intestinal poderá ser dificultada porque, apesar de apresentar um PSA favorável de  $88,15 \text{ \AA}^2$  ( $< 120 \text{ \AA}^2$ ), tem um  $\text{LogD} < 0$  que dificulta a sua penetração ao nível intestinal. Da mesma forma, a permeação gastrointestinal do TDF também será comprometida devido ao seu elevado valor de PSA ( $185,44 \text{ \AA}^2$ ), apesar de o seu  $\text{LogD} > 0$ . Estes valores permitem ainda concluir que o transporte da FTC através das membranas seria do tipo paracelular ao passo que o TDF seria transportado, muito provavelmente, por via transcelular.

Foi estabelecido, com base em medições de permeabilidade dos fármacos através da mucosa vaginal humana, que esta é, supostamente, mais permeável que a mucosa intestinal.<sup>226</sup> No entanto, os fármacos testados não são normalmente adequados para aplicação oral devido à sua profunda degradação enzimática intraluminal por proteases/peptidases, extenso metabolismo de primeira passagem ou propriedades físico-químicas problemáticas. Até à data, não foram realizados estudos com fármacos “não problemáticos” (isto é, fármacos sem problemas biofarmacêuticos extremos) para, com certeza, determinar a boa permeabilidade da mucosa vaginal como regra<sup>227</sup>. Assim, apesar de existirem vários preditores que fornecem as regras de uma boa permeação através do epitélio intestinal, esses preditores não são diretamente correlacionáveis com a permeação vaginal, sendo necessários ainda muitos estudos para estabelecer relações de causalidade neste tipo de administração. Independentemente disso, é possível afirmar que as propriedades físico-químicas tais como o peso molecular, lipofilicidade, ionização, carga de superfície e natureza química podem influenciar a absorção dos fármacos na vagina, sendo geralmente aceite que fármacos lipofílicos de baixo peso molecular são suscetíveis de ser mais absorvidos que fármacos lipofílicos ou hidrofílicos de grande peso molecular<sup>224</sup>. Neste contexto as formulações desenvolvidas para a entrega vaginal de fármacos são muito importantes,

pois podem, para além de modular a libertação do fármaco, modular também a capacidade de penetrar no epitélio de revestimento vaginal <sup>224</sup>.

### 1.1.5. Classificação Biofarmacêutica

O sistema BCS reúne alguns dos descritores moleculares discutidos anteriormente para uma classificação dos fármacos numa de quatro classes (Figura 3.4).



**Figura 3.4** - Divisão dos fármacos segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).

De acordo com os descritores determinados *in silico*, a FTC é um fármaco com elevada solubilidade e com um  $\text{LogP} < 0$  o que a colocaria numa classe BCS III. No entanto a regra de Lipinski sugere que este composto não apresenta problemas de permeabilidade pelo que a sua classificação BCS seria de classe I, sendo esta efetivamente a classificação reportada para este fármaco <sup>228</sup>. O TDF é igualmente considerado um fármaco com elevada solubilidade, no entanto apesar da lipofilicidade adequada, apresenta ainda um número elevado de grupos aceitadores de H e elevado peso molecular que lhe conferem problemas de permeabilidade. Assim, a previsão teórica aponta para uma BCS de classe III que é confirmada pela classificação reportada para este fármaco <sup>228,229</sup>. É de notar que um novo sistema designado por BDDCS (do inglês *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*) propôs uma classificação mais atualizada, tendo por base uma definição mais específica de permeabilidade, de 927 fármacos, e segundo este sistema o TDF e FTC pertencem ambos à classe III <sup>230</sup>. Segundo a Tabela 2.3 (secção Métodos) esta classificação biofarmacêutica dita que são necessárias

estratégias para aumentar a permeabilidade destes fármacos, usando promotores de permeação e componentes bioadesivos.

Assim, estes estudos de pré-formulação permitiram delinear uma estratégia baseada no desenvolvimento de nanossistemas lipídicos que, pelo seu carácter anfifílico, constituem vetores interessantes para a incorporação de fármacos com diferentes lipofilicidades; e que, pela sua composição mimética de membranas, são sistemas naturalmente promotores da permeação dos fármacos que transportam. A versatilidade de composição destes sistemas permite ainda alterar a sua superfície de forma a controlar a sua bioadesividade.

## **2. Desenvolvimento e caracterização da formulação**

Após a etapa de pré-formulação, onde se compreendeu os fármacos em estudo e os seus desafios, as etapas de desenvolvimento da formulação foram seguindo um racional de resposta a algumas questões. Estas questões, a seguir apresentadas, foram colocadas perante a proposta de desenvolver um nanossistema lipídico para a veiculação de TDF e FTC com o objetivo de uma administração vaginal profilática.

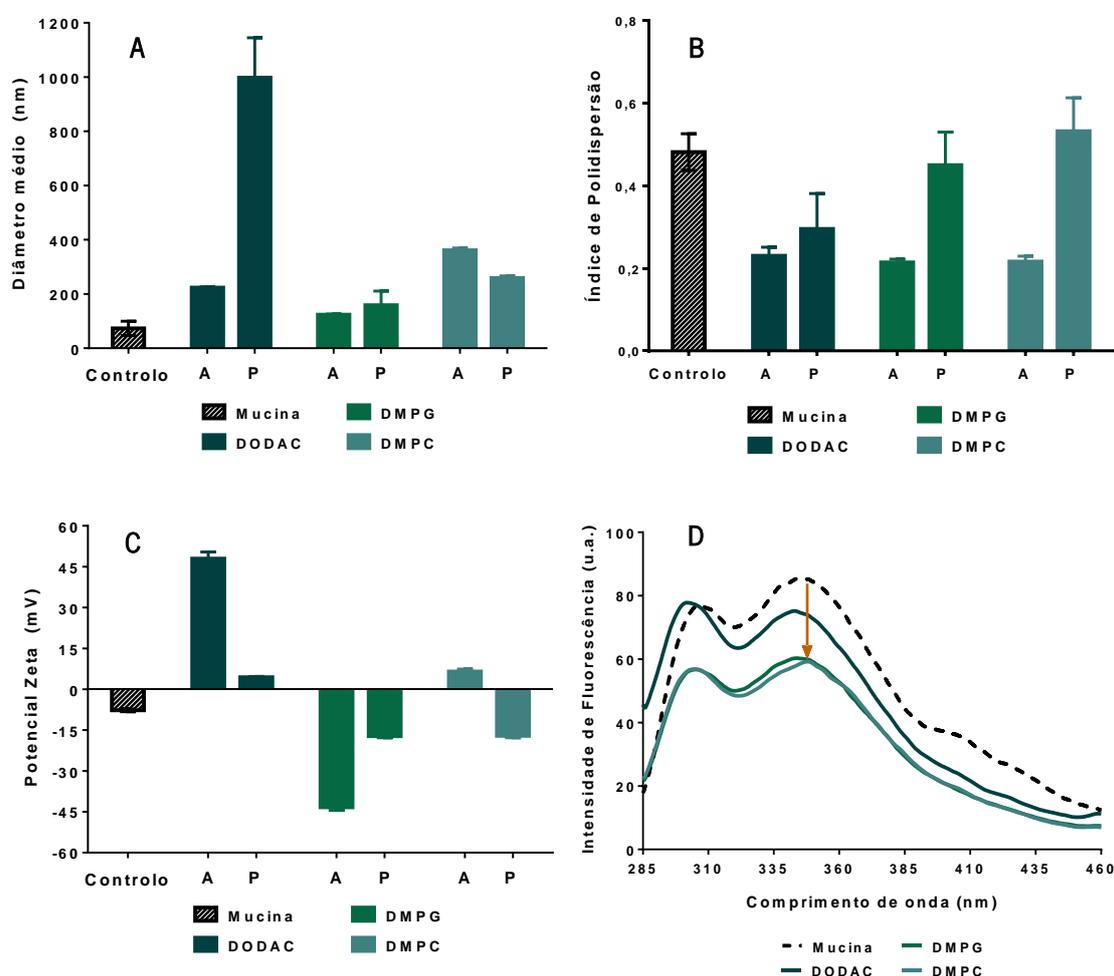
### **2.1. Qual deverá ser a carga superficial da formulação sabendo que na administração vaginal temos uma mucosa rica em mucina?**

#### **2.1.1. Avaliação da mucoadesividade**

Perante uma administração vaginal, um dos fatores que mais condicionam o tempo de residência da formulação é a sua mucoadesividade <sup>231</sup>.

Assim, numa primeira fase, e tendo em consideração o elevado teor de mucina característico do ambiente vaginal, desenvolveram-se nanossistemas lipídicos com diferentes cargas superficiais de modo a determinar a influência da carga no grau de mucoadesão. Para tal, LUV com carga superficial positiva (DODAC), negativa (DMPG) e neutra (DMPC) foram caracterizados relativamente ao seu diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial  $\zeta$  antes e após interação com uma suspensão de mucina sendo ainda avaliado o efeito dos nanossistemas na fluorescência intrínseca da proteína.

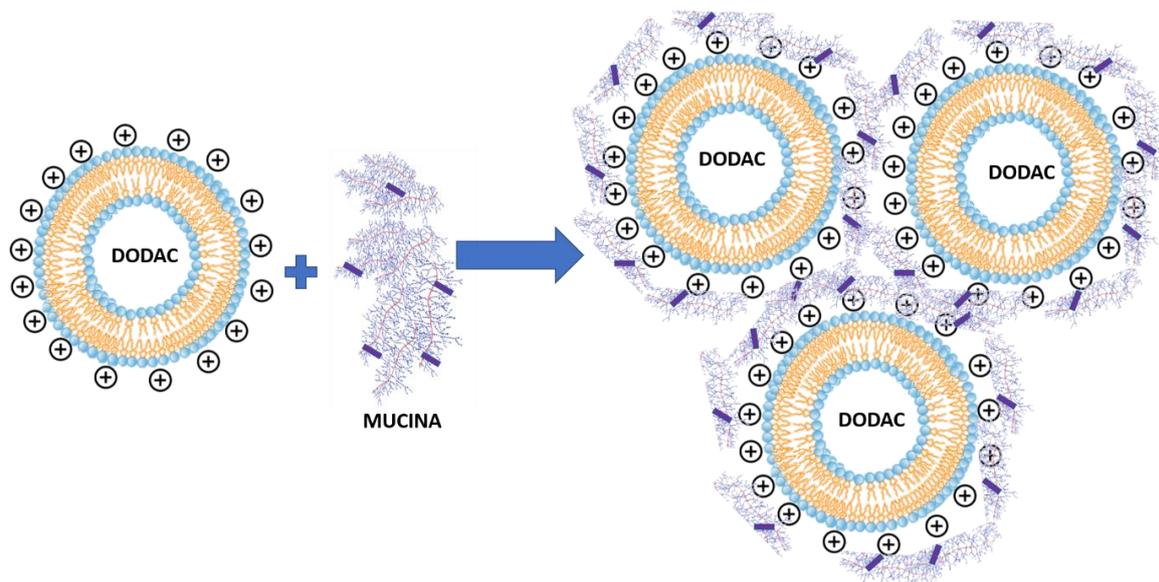
Por análise da Figura 3.5 A é possível observar que, os sistemas catiónicos, após contacto com uma suspensão de mucina, apresentam um grande aumento do seu diâmetro médio. Este comportamento foi igualmente demonstrado por Eric Chen et al.<sup>232</sup> que avaliou de que forma a carga de superfície afetava a mucoadesividade dos nanossistemas, ao medir alterações do seu tamanho após a interação com mucina. Assim, nanossistemas com carga superficial positiva estabelecem interações eletrostáticas com os resíduos negativos da mucina, promovendo a formação de complexos com um diâmetro superior. Pelo contrário, e ainda em concordância com o reportado por Eric Chen et al., os sistemas aniónicos e neutros não sofreram grandes alterações de tamanho após interação com a mucina, havendo até, no caso dos LUV de DMPC, uma ligeira redução do tamanho (Figura 3.5 A).



**Figura 3.5** - Estudo do efeito da carga superficial das vesículas lipídicas no seu grau de mucoadesão por análise do (A) diâmetro hidrodinâmico; (B) índice de polidispersão; (C) potencial zeta e (D) intensidade de fluorescência em que o “A” representa antes e o “P” representa pós interação com uma solução de mucina.

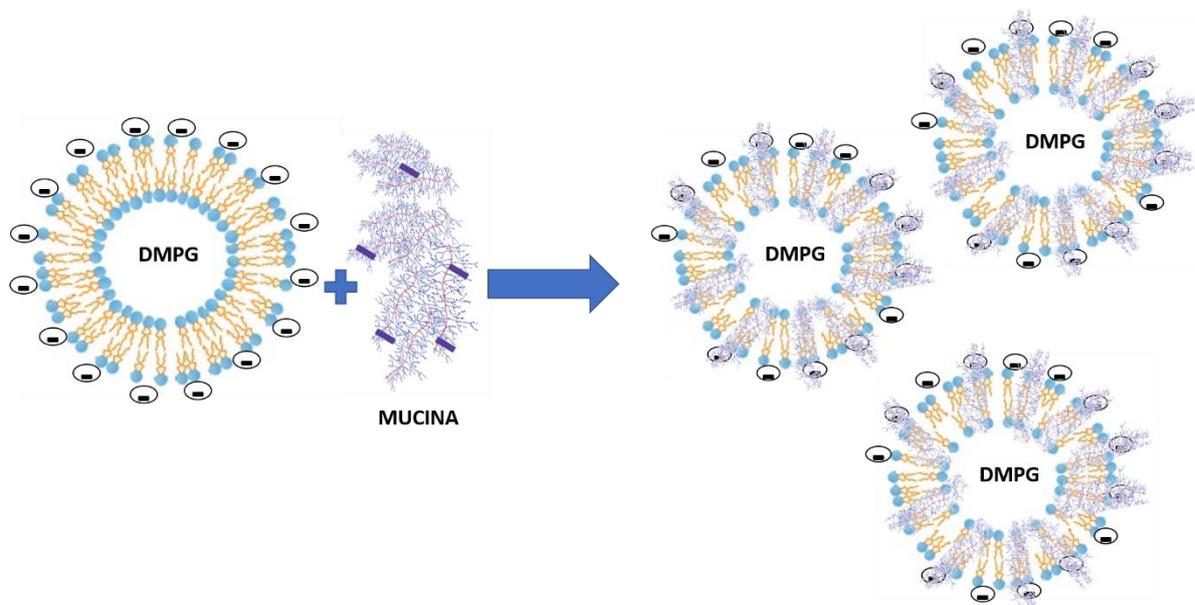
Os resultados obtidos são facilmente explicáveis se analisamos com mais detalhe cada um dos LUV testados:

1) A superfície dos LUV de DODAC apresenta uma elevada densidade de cargas positivas devida, em grande parte, à presença de um grupo amónio quaternário carregado positivamente a qualquer pH do meio <sup>233</sup>. Além disso, os LUV de DODAC apresentam-se no estado sólido-cristalino ou gel à temperatura dos ensaios ( $T_m$  DODAC=46,9 °C >  $T_{ensaio}$ =25 °C) <sup>234</sup> o que promove a existência de um empacotamento lipídico ordenado e, conseqüentemente, dificulta ou impede a penetração de domínios de mucina ao nível das caudas de ácidos gordos dos LUV. Para além disso, o seu estado gel condiciona que a interação entre a mucina e os LUV de DODAC se dê apenas à superfície dos nanossistemas sendo, por isso limitada ao estabelecimento de ligações eletrostáticas entre os grupos carboxilo e sulfato da proteína e os grupos amónio quaternário catiónicos do DODAC. A mucina adsorvida à superfície dos LUV de DODAC neutraliza as cargas da superfície dos lipossomas, o que é visível pela alteração do seu potencial- $\zeta$ , que passa de >+40 mV a próximo da neutralidade (Figura 3.5 C). Os sistemas eletricamente neutros têm tendência a sofrer agregação por falta de repulsão eletrostática ou porque a mucina adsorvida à superfície agrega várias vesículas (Figura 3.6), explicando a formação de grandes agregados com tamanhos micrométricos (Figura 3.5 A).



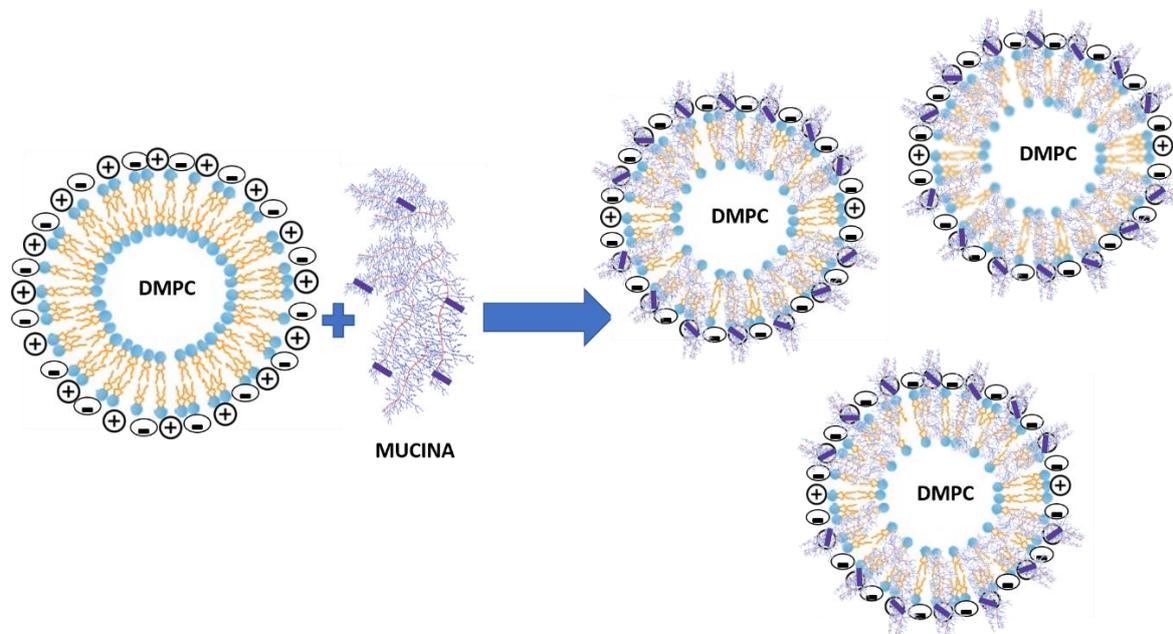
**Figura 3.6** - Representação esquemática das possíveis interações da mucina com lipossomas de DODAC.

2) Os sistemas de DMPG possuem um grande número de fosfatos aniônicos que justificam uma grande densidade de cargas negativas à superfície do sistema e que podem ser confirmadas pelo seu potencial- $\zeta$   $< -45$  mV (Figura 3.5 C). Ao contrário do que sucedia com os sistemas ordenados de DODAC, os LUV de DMPG apresentam-se no estado líquido-cristalino ou fluido à temperatura dos ensaios ( $T_m$  DMPG=23 °C  $< T_{\text{ensaio}}=25$  °C) <sup>235</sup> o que condiciona a existência de um empacotamento lipídico mais desordenado. Como tal, há uma maior facilidade de penetração de domínios de mucina ao nível das caudas de ácidos gordos dos LUV o que proporciona o estabelecimento de interações do tipo hidrofóbico entre resíduos hidrofóbicos de mucina e as caudas dos ácidos gordos. O facto de a mucina penetrar no *core* dos lipossomas, acaba por diminuir a densidade de cargas negativas à superfície dos nanossistemas e justifica que o potencial-  $\zeta$  se torne menos negativo ( $< -15$  mV, Figura 3.5 C) (Figura 3.7). Esta observação é concordante com o reportado por Klemetsrud et al. <sup>236</sup>, em que se verificou que a adição de mucina ao lípido aniónico DMPG promoveu igualmente um aumento do seu potencial- $\zeta$  para valores menos negativos, o que indica que a densidade de cargas do complexo formado será semelhante ao da mucina, sugerindo que esta se encontra adsorvida na superfície dos sistemas. Ao contrário do que sucedia com o DODAC, não ocorre uma neutralização da superfície dos LUV (Figura 3.5 C), o que justifica que estes se mantenham carregados negativamente e em suspensão por repulsão eletrostática. Consequentemente, não é expectável que da interação mucina e LUV de DMPG resultem a formação de agregados, pelo que não se observou um aumento substancial dos tamanhos (Figura 3.5 A).



**Figura 3.7** - Representação esquemática das possíveis interações da mucina com lipossomas de DMPG.

3) Os sistemas eletricamente neutros de DMPC, são, na realidade, sistemas zwitteriônicos com igual número de cargas negativas (atribuídas ao grupo fosfato) e de cargas positivas (atribuídas ao grupo colina). A neutralidade elétrica deste sistema é comprovada pela determinação do seu potencial- $\zeta$  próximo de zero (Figura 3.5 C). A presença de dois grupos polares de carga oposta possibilita a interação eletrostática entre os resíduos ácidos aniônicos da mucina e o grupo catiónico da colina. A menor densidade de cargas negativas à superfície deste sistema (em comparação com o sistema DMPG) não constitui um impedimento tão grande à ligação eletrostática da mucina e a sua penetração ao nível dos ácidos gordos será provavelmente mais facilitada, quer pela possibilidade de aproximação à superfície quer pelo estado fluído das vesículas ( $T_m$  DMPC = 23 °C <  $T_{ensaio}$  = 25 °C) <sup>235</sup>(Figura 3.8). A neutralização da carga positiva dos resíduos de colina pela mucina expõe a carga negativa dos resíduos de fosfato não ligados, o que justifica que os valores de potencial- $\zeta$  passem de muito próximos da neutralidade a valores negativos  $\approx$ -15 mV (Figura 3.5 C). Assim, ao contrário do que sucedia com o DODAC, não ocorre uma neutralização da superfície dos LUV (Figura 3.5 C), o que justifica que a carga negativa subjacente seja suficiente para que os LUV se mantenham em suspensão por repulsão eletrostática. Como tal, não há formação de agregados, que teria como consequência um aumento do seu tamanho (Figura 3.5 A). No entanto, e ao contrário do que se passava nos sistemas DMPG, nos LUV de DMPC a interação eletrostática que ocorre à superfície deve concorrer como processo facilitador à incorporação dos resíduos de mucina entre os ácidos gordos. Verifica-se aliás uma redução do tamanho dos LUV por interação com a mucina, o que pode decorrer de uma condensação resultante das interações hidrofóbicas estabelecidas ao nível do core dos lipossomas, entre os ácidos gordos e os resíduos hidrofóbicos da mucina (Figura 3.8).



**Figura 3.8** - Representação esquemática das possíveis interações da mucina com lipossomas de DMPC.

Para além da avaliação da alteração do tamanho e do potencial- $\zeta$  dos nanossistemas como prova de que ocorreu uma interação com a mucina, é possível verificar essa mesma interação pela variação dos valores de PDI, verificando-se que após contacto com a mucina todas as formulações sofrem um aumento do PDI dando origem a populações mais heterogéneas (Figura 3.5 B).

Os estudos de desativação de fluorescência (Figura 3.5 D), permitiram confirmar o que acima se discutiu acerca da interação entre a mucina e os nanossistemas lipídicos. A suspensão aquosa de mucina apresenta um espectro de fluorescência característico da emissão dos resíduos de triptofano (Figura 3.5 D – espectro a tracejado) <sup>237</sup>. Após a interação com a mucina, todos os nanossistemas foram capazes de reduzir significativamente a sua intensidade de fluorescência (IF). O DODAC foi o nanossistema que causou uma menor desativação da fluorescência intrínseca da mucina, seguido do DMPG e DMPC que provocaram uma desativação aproximada. O DMPC foi, no entanto, o responsável pela maior diminuição da IF observada e que decorre da interação dos nanossistemas com o triptofano.

Assim, como discutido anteriormente, os LUV de DODAC apresentam uma interação quase exclusivamente eletrostática por adsorção da mucina às cargas da superfície dos nanossistemas e, de todos os sistemas, é aquele que apresenta um maior empacotamento lipídico, que não permitirá penetração de resíduos de mucina nas caudas de ácidos gordos lipídicos. Sendo o triptofano parte dos domínios hidrofóbicos da mucina, facilmente se depreende que a desativação da sua fluorescência será mais eficaz quando a penetração dos resíduos da mucina ocorre no *core* lipídico. Tal explica o facto de

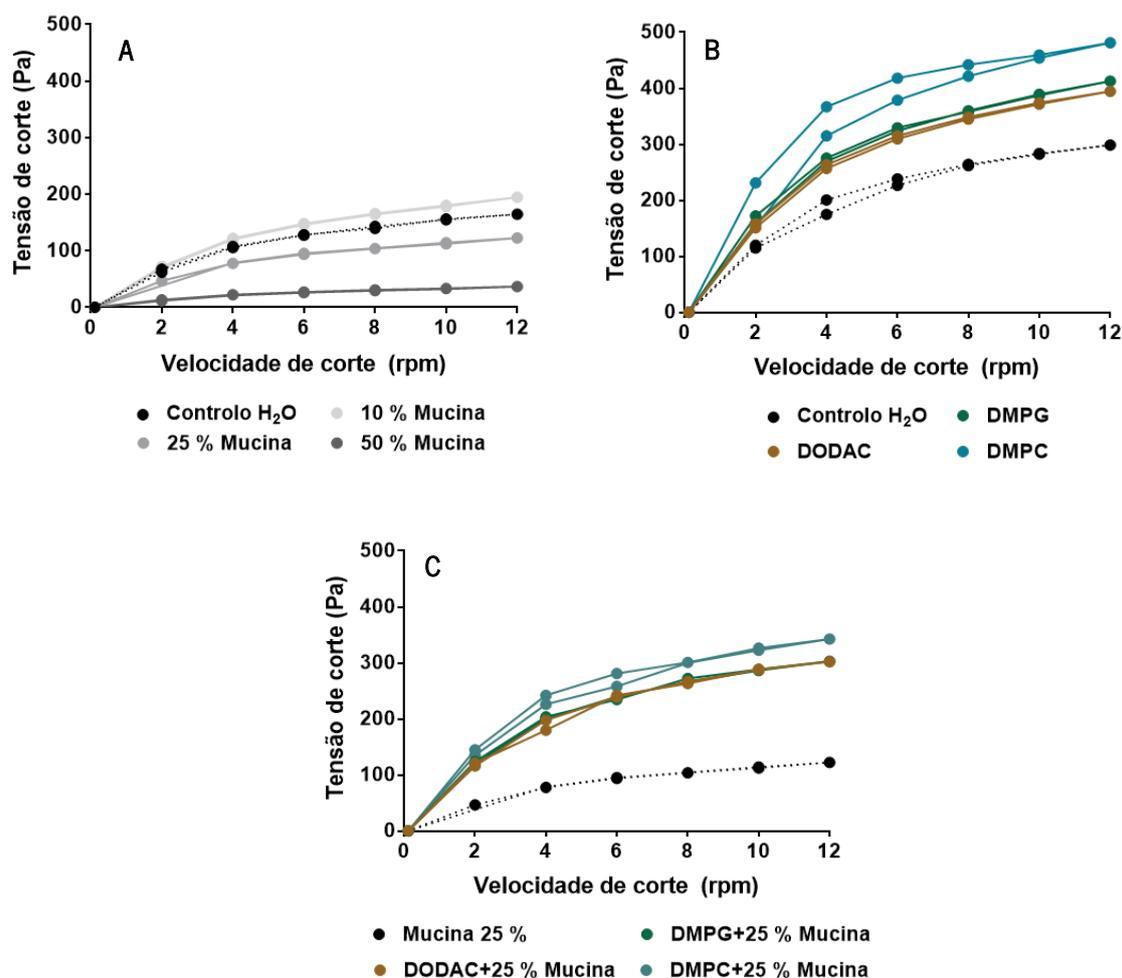
os LUV de DODAC provocarem menor desativação de fluorescência que os LUV de DMPC e DMPG, uma vez que nestes últimos o seu empacotamento favorece a penetração dos resíduos de mucina no *core* lipossomal e, como tal, é provável a existência de interações hidrofóbicas e maior proximidade aos resíduos do triptofano. É ainda possível observar que a adição dos nanossistemas à suspensão de mucina não afetou grandemente o  $\lambda_{em}$  máximo, no entanto é de realçar que no caso da interação da mucina com LUV de DODAC há um pequeno desvio hipsocrómico e no caso da interação da mucina com LUV de DMPC há um pequeno desvio batocrómico. Esses desvios observados são indicativos de alteração da conformação da mucina perante a ligação aos nanossistemas. Sendo que um desvio hipsocrómico é indicativo de uma conformação mais globosa e um desvio batocrómico é resultante de uma conformação mais alongada <sup>238</sup>.

No contexto de desenvolvimento das nanoformulações para uma administração vaginal a administração das formulações não será feita diretamente, mas sim após inclusão numa base farmacêutica semissólida (por exemplo em hidrogéis, HG), pelo que se queremos perceber qual será o efeito da carga da superfície dos sistemas na mucoadesão, deveremos também estudar a influência da carga superficial das formulações por análise reológica dos HG após incorporação dos lipossomas e posterior adição de uma suspensão de mucina. Primeiramente começou-se por testar o comportamento reológico do HG (sem a adição dos nanossistemas) aquando da presença de diferentes concentrações de mucina (Figura 3.9 A). Verificou-se que o aumento da concentração de mucina leva à diminuição gradual da viscosidade, o que parece indicar uma interação entre o hidrogel e a mucina no sentido da quebra da estrutura de reticulação do hidrogel. Em termos de aplicação, este aspeto pode ser interessante no sentido de permitir que na zona da mucosa vaginal o gel liberte a sua carga quando entra em contacto com a mucina.

Seguidamente testou-se o perfil reológico dos HG após a incorporação das formulações lipossomais. Os perfis reológicos obtidos mostraram que a incorporação das formulações nos géis promoveu um aumento da sua viscosidade, com especial destaque para o DMPC (Figura 3.9 B). A diferença de comportamento reológico terá possivelmente a ver com as diferentes interações estabelecidas entre os nanossistemas carregados e o polímero do HG, sendo a perda de reticulação do gel favorecida pela interação com nanossistemas carregados. Já os LUV de DMPC, sendo nanossistemas neutros, não só não afetam a reticulação do gel, como aumentam a viscosidade da base semissólida devido à viscosidade inerente às formulações coloidais.

Finalmente avaliou-se o perfil reológico dos HG contendo as formulações na presença de 25% de mucina. A adição de mucina aos géis provocou uma diminuição na sua viscosidade que, no entanto,

para as vesículas de DMPC se manteve superior à viscosidade do HG controlo com 25 % de mucina. Estes resultados indicam que o DMPC foi a composição lipídica que mais afetou o perfil reológico do HG antes e após a incorporação de mucina (Fig. 3.9 C) pelo que as formulações neutras terão, à partida, uma maior interação com a proteína, como também se confirmou pelas técnicas anteriores.



**Figura 3.9** - Perfis reológicos de (A) HG com diferentes percentagens de mucina (0,4 mg/mL); (B) HG após incorporação de MLV (4 mM) com diferentes cargas superficiais e (C) HG após incorporação de MLV com diferentes cargas superficiais e posterior adição de 25 % de mucina.

Além disso, nos reogramas das formulações em HG na presença da mucina foi possível observar uma diminuição da viscosidade em função do aumento da velocidade de corte, demonstrando que as bases semissólidas apresentam um comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico. Por outro lado, também se pode concluir que das bases semissólidas, a que continha LUV de DMPC era a única a apresentar tixotropia, ou seja, uma variação da viscosidade com o tempo, uma vez que as curvas

ascendentes de descendentes dos reogramas apresentam uma pequena histerese característica do comportamento tixotrópico <sup>239</sup>.

Para a administração vaginal das bases semissólidas com fins terapêuticos, o comportamento pseudoplástico tixotrópico é interessante, favorecendo a distribuição desta base no canal vaginal devido aos movimentos de espalhamento do produto e quando os movimentos cessam, a viscosidade retoma os seus valores iniciais <sup>239,240</sup>.

Em suma, o grande desafio na entrega vaginal é o tempo de contacto limitado devido a vários mecanismos de proteção da vagina, levando a curta duração de ação e menor eficácia terapêutica <sup>240</sup>, ou no caso do objetivo deste trabalho, menor eficácia profilática. Para permanecer no colo do útero, a formulação deve ter suficiente viscosidade para não correr para fora da vagina ou fluir para a parte de trás do colo do útero. O comportamento reológico dos géis vaginais é frequentemente dependente do tipo de agente gelificante utilizado, o que influencia diretamente sua propagação e propriedades de retenção após a aplicação. A propriedade tixotrópica reversível do polímero permite que as soluções fluam para a cavidade cervical, permitindo um contato íntimo com a superfície <sup>240</sup>.

A propriedade mucoadesiva das formulações foi também testada para três sistemas de cargas superficiais distintas. Foram testadas as formulações sozinhas ou incorporadas no HG. De todas as formulações desenvolvidas a formulação de DMPC exibiu características de mucoadesão e reológicas aceitáveis para ampliar o tempo de permanência na cavidade vaginal e aumentar a eficácia microbicida.

## **2.2. Qual deverá ser a composição da formulação e qual o método de encapsulamento dos fármacos?**

Os nanossistemas zwitteriônicos mostraram, como referido na secção anterior, uma maior interação com as moléculas de mucina assim como melhores propriedades reológicas por inclusão num HG sendo, por isso, os selecionados para os estudos de caracterização e performance terapêutica *in vitro*. A próxima questão colocada é relativa à composição dos nanossistemas, que tendo uma superfície polar zwitteriônica à base de fosfatidilcolina, podem ainda assim ter uma grande variabilidade de cadeias de ácidos gordos, que definirão diferentes *cores* lipídicos. Assim, nesta secção pretende-se analisar o impacto da composição lipídica dos nanossistemas e do método de encapsulamento dos fármacos em diferentes parâmetros relevantes para a administração: (i) eficácia de encapsulamento; (ii) tamanho, PDI e carga de superfície e (iii) propriedades biofísicas do nanossistema.

### 2.2.1. Determinação da eficiência de encapsulamento dos fármacos

Inicialmente, e seguindo um desenho experimental racional, foram produzidos LUV com diferentes graus de rigidez por variação da sua composição lipídica de modo a selecionar a formulação mais promissora. Para além disso, a encapsulação do TDF e da FTC foi testada por três metodologias diferentes – hidratação, mistura direta e incubação – com o intuito de selecionar o método mais eficaz. Todos os sistemas foram caracterizados quanto à sua eficácia de encapsulamento, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta.

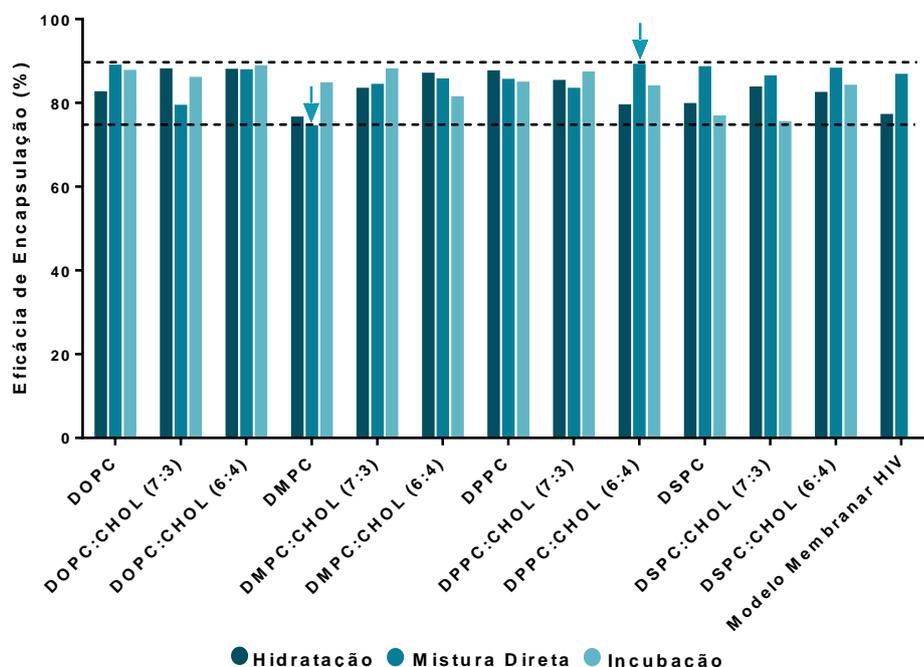
Em estudos prévios com a FTC, cedo se concluiu que devido ao seu reduzido tamanho e natureza extremamente hidrofílica, a sua encapsulação em sistemas lipídicos era muito reduzida (Tabela 3.1) conseguindo-se apenas um máximo EE % de 15,3 % com o DOPC e 8,8 % com o DSPC. Estes valores vão de encontro à previsão *in silico* realizada nos estudos de pré-formulação que haviam demonstrado a baixa lipofilicidade da FTC e a sua elevada solubilidade em ambientes aquosos. Apesar dos lipossomas possuírem, teoricamente, a capacidade de encapsulamento de compostos hidrofílicos no interior aquoso ou junto das cabeças polares dos fosfolípidos, quando os compostos são muito hidrossolúveis e não ionizados, essa capacidade acaba por estar limitada. Isto porque não existem oportunidades de estabelecimento de ligações eletrostáticas entre o composto e as cabeças polares dos lipossomas, sendo também difícil o seu aprisionamento no vacúolo aquoso, já que o fármaco não carregado poderá permear a membrana e sair desse vacúolo para o meio externo onde apresenta grande solubilidade.

Desta forma, optou-se por incorporar a FTC diretamente na base semissólida, que sendo um HG possui características que permitem a solubilidade da FTC ao mesmo tempo que apresentam viscosidade para aumentar o tempo de retenção do fármaco. Finalmente os HG permitirão ainda uma co-veiculação da FTC e do TDF (veiculado nos lipossomas). Tomada esta decisão, os estudos do desenvolvimento da formulação lipossomal prosseguiram apenas para o TDF.

**Tabela 3.1** - Eficácia de encapsulamento da FTC ( $7,19 \times 10^{-6}$  M) em formulações com diferentes graus de rigidez membranar (4 mM) testada apenas pelos métodos de hidratação e mistura direta.

Formulação	Eficácia Encapsulamento (%)	
	Hidratação	Mistura direta
DOPC	8,2	15,3
DSPC	8,8	6,8

Como se pode observar pela Figura 3.10, os estudos de eficácia de encapsulamento do TDF revelaram uma incorporação quase total do fármaco para todas as formulações testadas. Estes valores vão de encontro à previsão realizada nos estudos de pré-formulação que apontavam para uma boa lipossolubilidade do TDF ( $\log P=2,65$ ), o que indiciava uma boa capacidade de distribuição nas bicamadas lipídicas.



**Figura 3.10** - Eficácia de encapsulamento do TDF ( $4 \times 10^5$  M) em formulações com diferentes graus de rigidez membranar (4 mM) pelos métodos de hidratação, mistura direta e incubação.

As EE % obtidas para o TDF oscilaram entre 74-89 %, com uma média de encapsulação de aproximadamente 84 %. Estas percentagens de encapsulação garantem uma concentração cerca de 14-59 vezes superior ao  $IC_{50}$  do VIH-1 ( $0,5-2,2 \mu M$ )<sup>85</sup> e 6-19 vezes superior ao  $IC_{50}$  do VIH-2 ( $1,6-4,9 \mu M$ )<sup>85</sup>. Adicionalmente, verificou-se que todos os métodos de encapsulação utilizados se revelaram bastante eficazes e permitiram obter EE % elevadas: cerca de 83 % pelo método de hidratação, 85 % pelo método de mistura direta e 84 % pelo método de incubação. Estes resultados são ligeiramente superiores aos valores obtidos em alguns estudos conduzidos por Zidan et al.<sup>138,241,242</sup> em que se recorreu, igualmente, a formulações lipossomais para a incorporação de TFV e se deu particular destaque ao método de encapsulação por hidratação do filme lipídico. As vesículas lipídicas desenvolvidas, para além de colesterol e de phospholipon 100H (nome comercial para a fosfatidilcolina), apresentavam ainda na sua constituição quantidades variáveis de estearilamina que lhes conferiu carga superficial positiva. Observou-se que as formulações com maiores concentrações de estearilamina foram as que obtiveram

melhores resultados, com um máximo de 70,84 % de EE %, ao passo que neste trabalho conseguiu-se um aumento deste parâmetro em 13 % com os sistemas zwitteriónicos.

Para além disso, os lipossomas compostos por DOPC ou DPPC mostraram EE % ligeiramente superiores face aos restantes sistemas, no entanto nenhuma composição lipídica se destacou de forma significativa uma vez que os resultados obtidos foram todos muito próximos, com o valor mínimo a ser registado para o DMPC e o máximo para a mistura DPPC:CHOL (6:4). Os valores de EE % de todos os sistemas e métodos de encapsulação encontram-se detalhados no Anexo 2.

### 2.2.2. Avaliação do tamanho e carga de superfície das formulações lipossomais

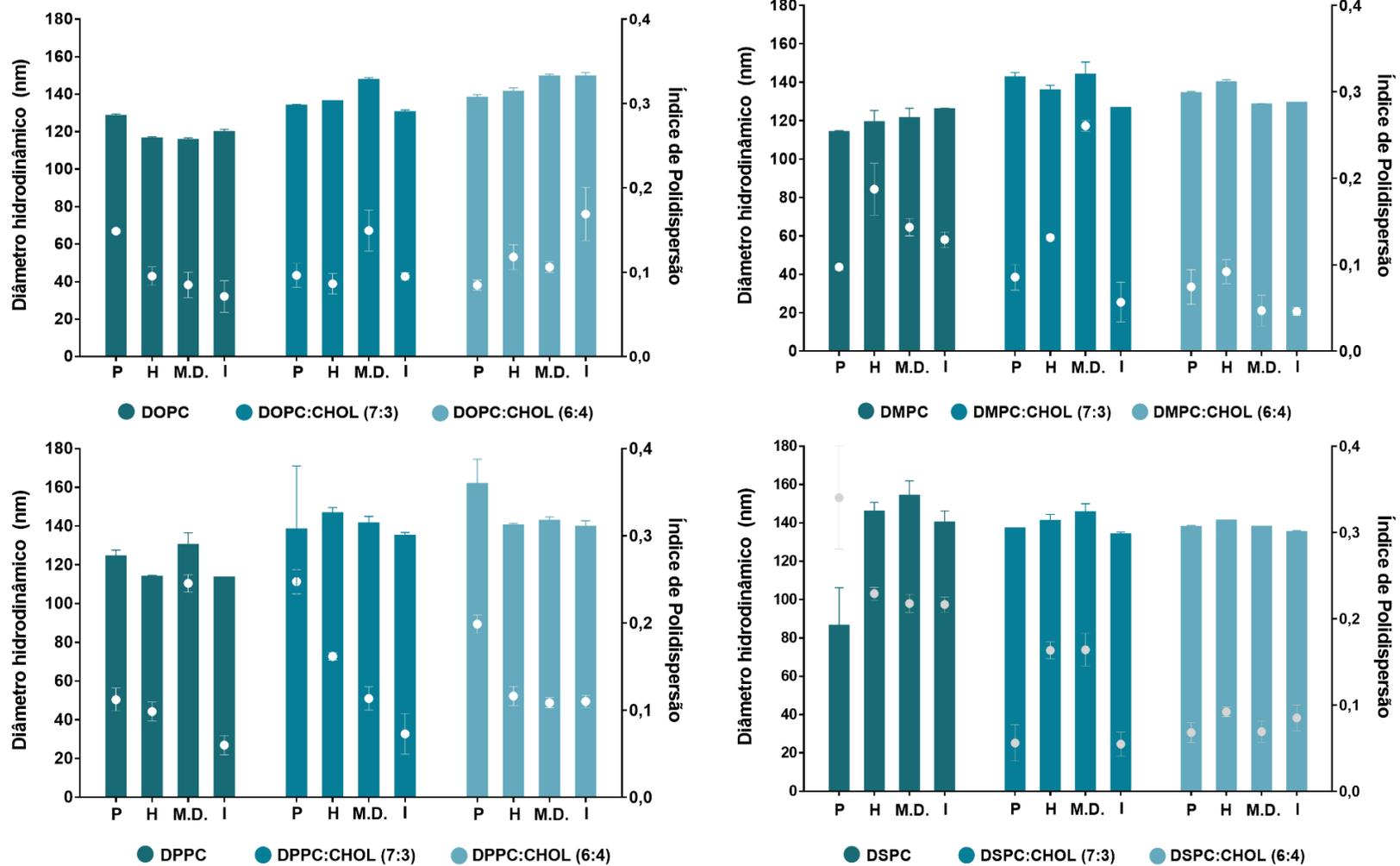
Relativamente ao diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas, obteve-se um intervalo de tamanhos entre 86 nm e 161 nm, com um tamanho médio igual a  $134 \text{ nm} \pm 13,12 \text{ nm}$  ( Figura 3.11), valores que apesar de não estarem dentro do intervalo de tamanhos considerado ótimo (200-500 nm) para mucopenetração ao longo da mucosa cérvico-vaginal, são compatíveis com uma capacidade mucopenetrante razoável <sup>6</sup>.

De um modo geral, verificou-se que não existem diferenças consideráveis entre as formulações placebo e as formulações com o fármaco incorporado, exceto para os LUV de DSPC que apresentaram um grande aumento do seu tamanho após a encapsulação do TDF. É bem conhecido que a introdução de fármacos ou outros compostos nas bicamadas lipídicas afeta de uma forma mais expressiva as zonas mais organizadas da bicamada (zona polar até ao carbono 9) do que zonas mais desordenadas (*core* lipídico a partir do carbono 12) e, portanto, menos sensíveis à introdução de um elemento perturbador <sup>243</sup>. O mesmo tipo de racional poderá ser aplicado aqui e talvez essa maior variação verificada nos LUV de DSPC se deva ao facto de este ser o sistema mais rigidamente empacotado, pelo que a introdução do fármaco poderá, pelo menos inicialmente, perturbar o empacotamento lipídico e originar alterações mais visíveis ao nível do tamanho dos nanossistemas.

De um modo geral, pela análise dos resultados, podemos afirmar que o tamanho dos nanossistemas obtidos não apresenta uma correlação notória com o método de encapsulamento utilizado. No entanto uma análise fatorial poderá, como uma perspetiva futura, ser aplicada de modo a fundamentar esta análise empírica.

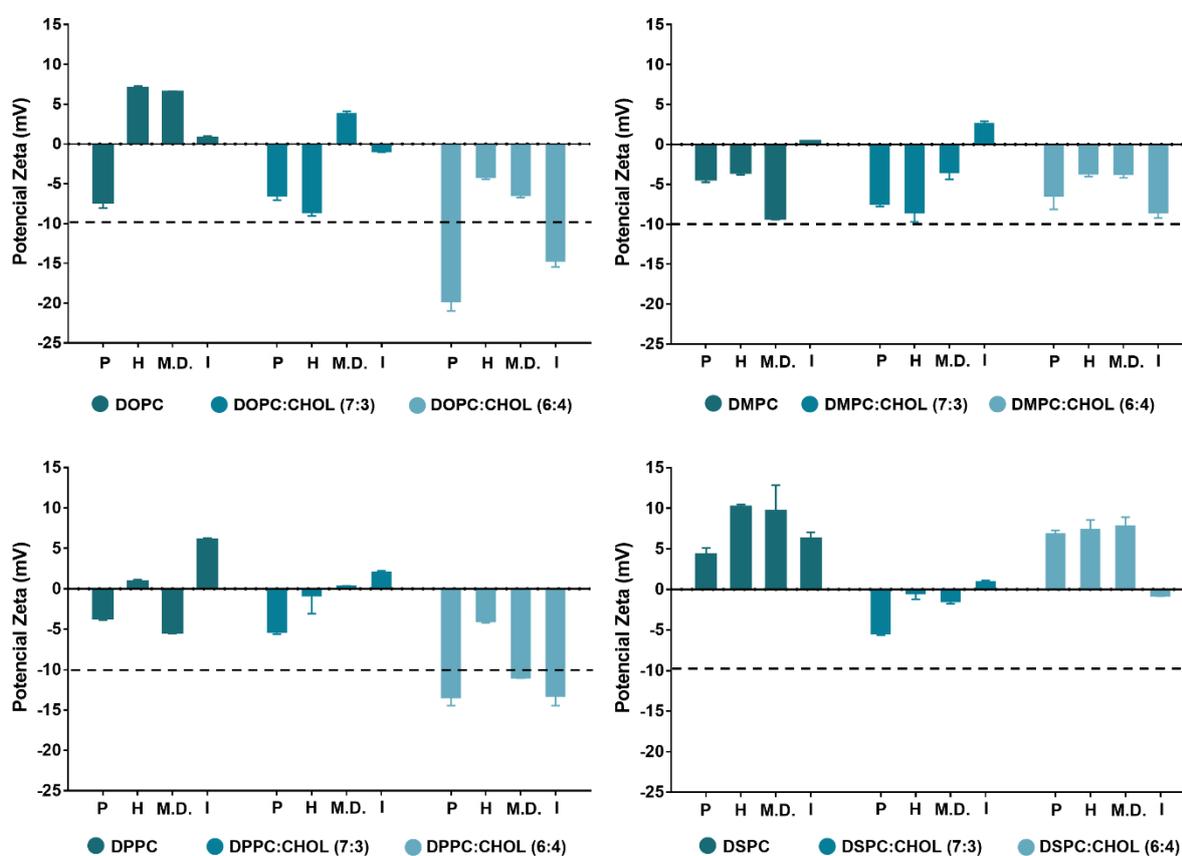
Para o PDI (Figura 3.11), obteve-se um valor médio de  $0,12 \pm 0,06 (< 0,2)$  que indica que as formulações se encontram, na sua maioria, monodispersas. Verificou-se ainda que o método de encapsulamento por mistura direta apresenta valores de PDI mais elevados em relação aos outros

métodos, o que estará associado à adição prévia do fármaco aos lípidos no momento da formação do filme lipídico. Isto implica que após a hidratação do filme lipídico e durante o processo de auto-organização lipídica (*self-assembly*) as moléculas de fármaco estejam presentes sendo expectável que perturbem a organização e empacotamento lipídicos durante esse processo de *self-assembly*.



**Figura 3.11** - Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e índice de polidispersão das formulações lipossomais desenvolvidas (4 mM) antes e após a incorporação de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), em que P representa as formulações placebo; H as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de hidratação; M.D., as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de mistura direta e I, as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de incubação.

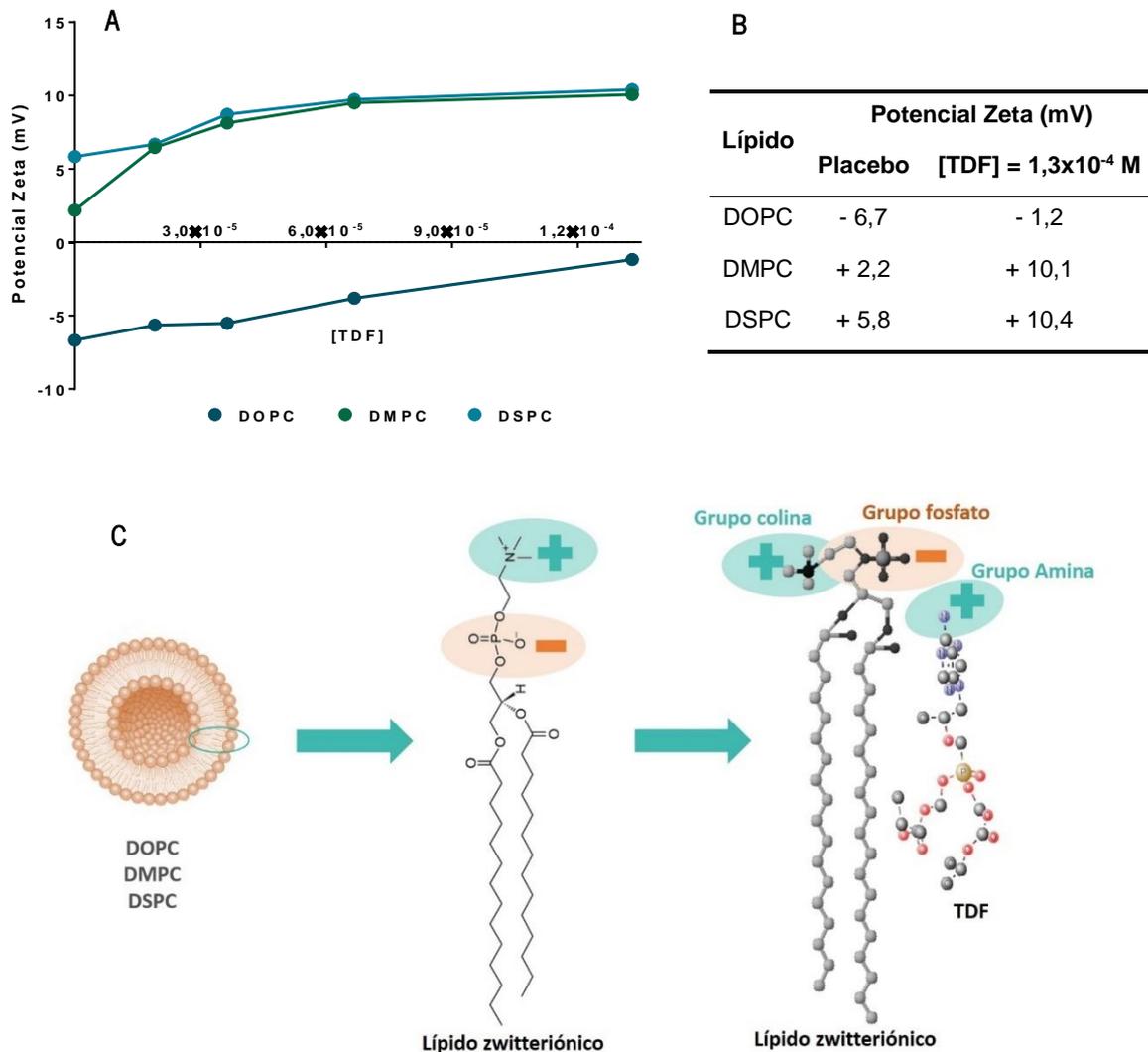
O estudo da carga superficial dos sistemas lipídicos zwitteriônicos (Figura 3.12) demonstrou valores de potencial- $\zeta$  baixos – ligeiramente negativos ou positivos – que indicam uma carga superficial perto da neutralidade devido ao balanço entre o grupo colina carregado positivamente e o grupo fosfato com carga negativa presentes na região da cabeça dos fosfolípidos. O intervalo de cargas obtido variou maioritariamente entre -10 mV e +10 mV, havendo apenas alguns valores discrepantes muito mais negativos (-15 e -19 mV), o que poderá dever-se à existência de ácidos gordos livres em suspensão (por exemplo resultantes da peroxidação lipídica). Para além disso, foi ainda possível observar que grande parte das formulações, após encapsulação do TDF, sofreu alterações consideráveis no seu potencial- $\zeta$  com uma clara tendência para valores mais positivos.



**Figura 3.12** - Potencial zeta médio (mV) das formulações lipossomais desenvolvidas (4 mM), antes e após a incorporação de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), em que P representa as formulações placebo; H as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de hidratação; M.D., as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de mistura direta e I, as formulações lipossomais com TDF encapsulado pelo método de incubação.

Com o intuito de confirmar esta tendência foram adicionados volumes crescentes (50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L e 500  $\mu$ L) de uma solução concentrada de TDF ( $[TDF]=4 \times 10^{-4}$  M) a lipossomas zwitteriônicos com diferentes graus de fluidez, estando o seu comportamento representado na Figura 3.13. Foi possível

observar que o TDF induziu um aumento do potencial- $\zeta$  para valores mais positivos em todas as formulações face ao placebo, corroborando o estudo anterior. Este aumento poderá dever-se à exposição da colina do nanossistema, após interação entre a amina carregada positivamente do TDF com o grupo fosfato do lípido o que se traduz numa carga de superfície global mais positiva (Figura 3.13 C).

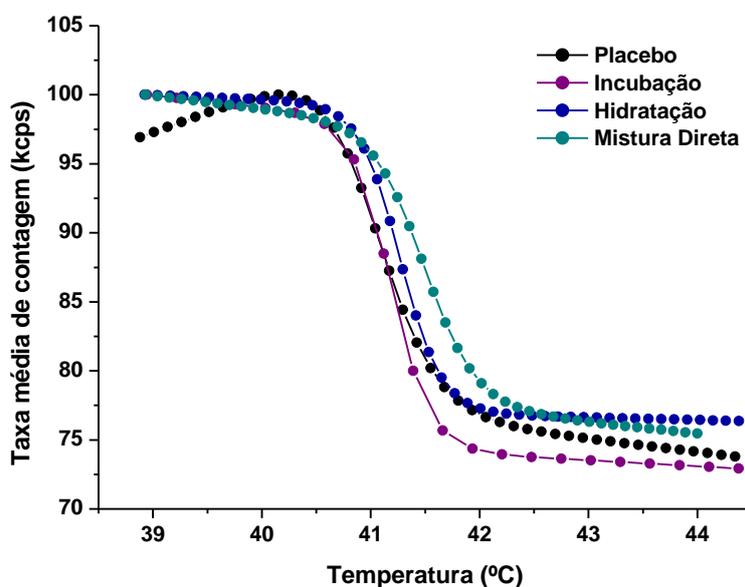


**Figura 3.13** - Carga superficial dos lipossomas zwitteriónicos (DOPC, DMPC e DSPC) após a incorporação de TDF. (A) Representação gráfica do potencial- $\zeta$  dos LUV após adição de volumes crescentes de uma solução de TDF concentrada ( $4 \times 10^{-4}$  M); (B) Comparação dos valores de potencial- $\zeta$  de (A), antes e após a adição da maior concentração de TDF e (C) Representação esquemática da interação entre o TDF e um fosfolípido zwitteriónico constituinte das formulações desenvolvidas. Na imagem do meio apresenta-se a estrutura química plana e na imagem à direita a projeção espacial da interação com o fármaco.

Tendo em conta o pKa calculado para o TDF (2,65), ao pH dos estudos (pH não ajustado de soluções aquosas de água ultrapura: 5,0-6,2) seria previsto que o fármaco estivesse praticamente todo na forma não ionizada. No entanto, usando a relação de Henderson–Hasselbalch (Equação 1), ao pH dos estudos verifica-se a presença de 2 a 5 % de moléculas carregadas positivamente o que será suficiente para a observação da interação proposta (Figura 3.13). Além disso, tal como o previsto nos estudos *in silico*, o TDF é extremamente polarizável e mesmo perante a ausência de ionização a formação de dipolos carregados positivamente poderá também explicar a interação com os fosfolípidos proposta na Figura 3.13 C.

### 2.2.3. Avaliação das propriedades biofísicas dos nanossistemas

De modo a entender de que forma o fármaco e/ou o método de encapsulamento utilizado influencia a transição de fase lipídica, procedeu-se à determinação da temperatura de transição de fase de LUV DMPC, DPPC, DSPC e DODAB (4 mM) antes e após a adição de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M) pelos métodos de incubação, hidratação e mistura direta. Na Figura 3.14 encontram-se representados um exemplo dos perfis sigmoides correspondentes à variação da intensidade de luz dispersa por vesículas de DPPC em função da temperatura. Os perfis das restantes formulações lipídicas encontram-se representados no Anexo 3.



**Figura 3.14** - Representação gráfica dos perfis sigmoides e respetivos ajustes não lineares da temperatura de transição de fase principal de LUV de DPPC (4 mM) na ausência ou presença de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), encapsulado por incubação, hidratação e mistura direta.

A partir do ajuste da equação 7 aos dados experimentais foi possível determinar a  $T_m$  e a cooperatividade (B) da transição dos sistemas lipídicos, tal como detalhado na Tabela 3.2. O ajuste não linear revelou que a temperatura de transição de fase de todas as vesículas lipídicas testadas é concordante com os valores reportados na literatura <sup>210,244</sup> e que a adição do fármaco aos LUV não promoveu alterações significativas neste parâmetro, não interferindo com o empacotamento lipídico. Para além disso, verificou-se que todos os sistemas apresentam valores de B elevados que indicam que o processo de transição de fase é instantâneo e idêntico em toda a bicamada lipídica. Isto indica que a distribuição do TDF na bicamada lipídica é homogênea. Apenas no caso dos LUV de DMPC e DODAB, o encapsulamento do TDF provocou uma diminuição de B, o que poderá indicar uma distribuição não tão uniforme do fármaco nas membranas lipídicas destes sistemas. Pelo contrário, o valor de B da transição de fase aumentou quando o TDF foi encapsulado nos LUV de DPPC e de DSPC. O fenómeno de aumento da cooperatividade da transição de fase não é tão vulgar e ocorre em circunstâncias em que o fármaco ou composto que penetra na membrana lipídica possui uma estrutura planar capaz de se interpor paralelamente aos fosfolípidos da bicamada (e.g. fármacos que funcionam como intercaladores de ácidos nucleicos) <sup>245</sup>. Este tipo de estruturas não volumosas, não só não perturbam o empacotamento lipídico, como o favorecem por estabelecimento de interação do tipo van der Waals com os fosfolípidos da membrana. Logo o favorecimento do empacotamento lipídico também se traduz num aumento da cooperatividade da transição de fase.

Para além de se verificar que a adição do fármaco aos LUV não promoveu alterações biofísicas significativas das formulações desenvolvidas também se observou que o método de encapsulamento utilizado não parece afetar essas mesmas características. Mais uma vez, uma análise fatorial poderá, como uma perspetiva futura, ser aplicada de modo a fundamentar esta análise empírica.

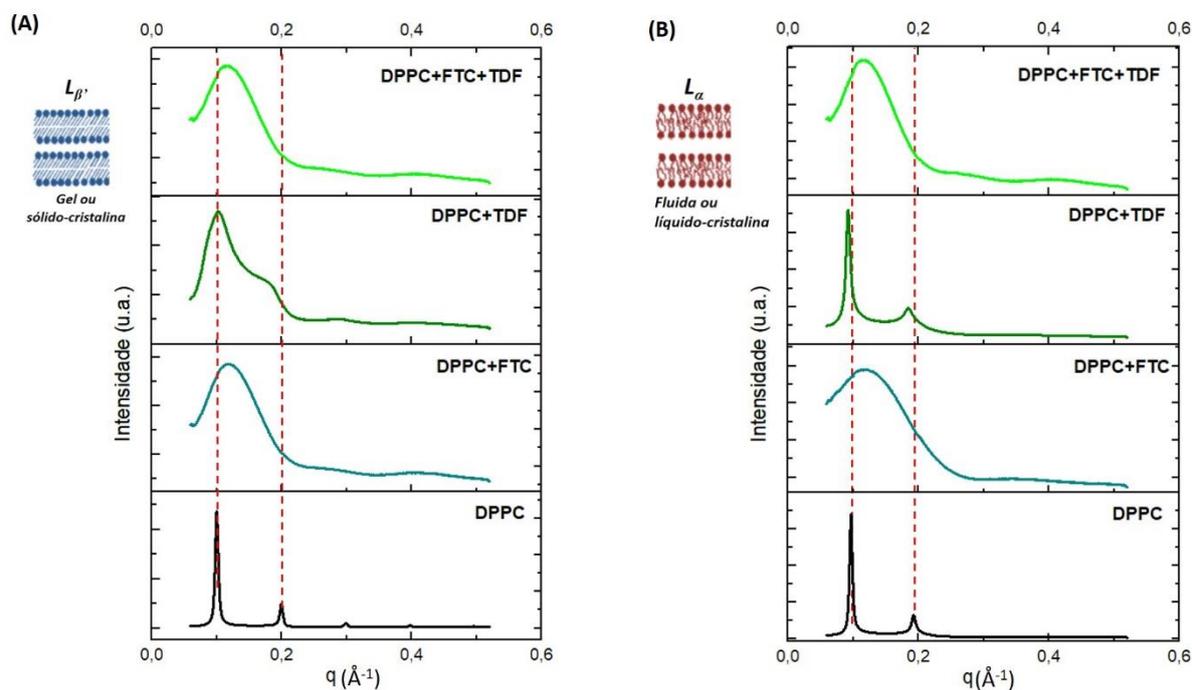
**Tabela 3.2** - Temperatura de transição de fase principal ( $T_m$ ) e cooperatividade da transição (B) de sistemas lipídicos de DMPC, DPPC, DSPC e DODAB (4 mM) antes e após o encapsulamento do TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M) por diferentes metodologias: incubação, hidratação e mistura direta.

	DMPC		DMPC+TDF	
		Incubação	Hidratação	Mistura Direta
$T_m$	$23,76 \pm 0,023$	$23,96 \pm 0,02$	$23,79 \pm 0,15$	$22,28 \pm 0,41$
B	$857,70 \pm 37,56$	$695,12 \pm 34,29$	$514,99 \pm 146,57$	$237,35 \pm 41,24$
$R^2$	0,999	0,999	0,848	0,991
	DPPC		DPPC+TDF	
		Incubação	Hidratação	Mistura Direta
$T_m$	$41,05 \pm 0,03$	$41,19 \pm 0,05$	$41,27 \pm 0,02$	$41,49 \pm 0,03$
B	$2780,89 \pm 234,32$	$4116,88 \pm 724,16$	$3921,77 \pm 237,81$	$3135,08 \pm 297,54$
$R^2$	0,999	0,999	0,999	0,999
	DSPC		DSPC+TDF	
		Incubação	Hidratação	Mistura Direta
$T_m$	$54,08 \pm 0,02$	$54,198 \pm 0,07$	$54,45 \pm 0,02$	$54,07 \pm 0,02$
B	$4400,78 \pm 391,19$	$3302,02 \pm 556,45$	$6237,21 \pm 668,93$	$4912,77 \pm 290,35$
$R^2$	0,999	0,975	0,997	0,989
	DODAB		DODAB+TDF	
		Incubação	Hidratação	Mistura Direta
$T_m$	$43,19 \pm 0,06$	- <sup>a</sup>	$44,03 \pm 0,68$	$43,53 \pm 0,04$
B	$1846,92 \pm 229,95$	- <sup>a</sup>	$914,64 \pm 280,57$	$1657,52 \pm 129,45$
$R^2$	0,994	- <sup>a</sup>	0,995	0,992

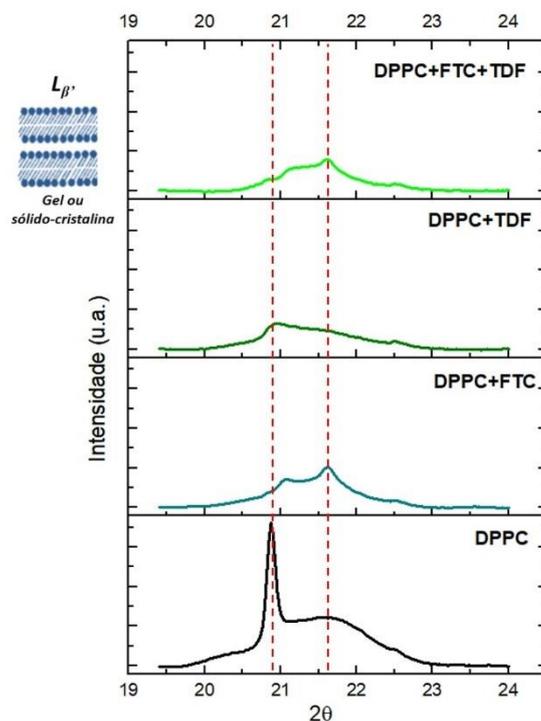
<sup>a</sup> não foi determinado

A avaliação das propriedades biofísicas das membranas e dos nanossistemas lipídicos envolve a determinação de diferentes parâmetros como a microviscosidade, a ordem e o empacotamento lipídico. A determinação da  $T_m$  pela técnica de DLS acima descrita permite estudar as variações da microviscosidade decorrentes da interação fármaco-lípido. A investigação da alteração das propriedades estruturais da matriz lipídica (relacionadas com a ordem e empacotamento lipídico), na fase gel e na fase fluida, pela ação dos fármacos, pode ser estudada usando difração de raios X de baixo e alto ângulo (SAXS e WAXS). SAXS e WAXS constituem as técnicas mais apropriadas para a determinação exata do espaçamento e hidratação entre as camadas dos sistemas lipídicos <sup>246</sup>. Assim, foram também estudados os efeitos do TDF e FTC nas propriedades estruturais da fase gel e fluida da bicamada lipídica (DPPC) por estas técnicas.

As Figuras 3.15-A e 3.15-B apresentam a difração SAXS de estruturas multilamelares de DPPC estudadas a uma temperatura de 20 °C e de 55 °C (SAXS) ao passo que a Figura 3.16 apresenta a difração WAXS a 20 °C. A estas temperaturas (20 °C e 55 °C) as bicamadas de DPPC encontram-se, respectivamente, na fase gel ( $L_\beta$ ) na fase fluida ( $L_\alpha$ ).



**Figura 3.15-** Perfis de difração SAXS de DPPC. (A) Fase gel à temperatura de 20 °C e (B) Fase fluida à temperatura de 55 °C. As linhas a tracejado indicam os principais picos de difração do DPPC em cada fase.



**Figura 3.16-** Perfis de difração WAXS de DPPC na fase gel à temperatura de 20 °C. As linhas a tracejado indicamos os principais picos de difração do DPPC.

A partir das posições dos picos de difração obtidos é possível calcular as distâncias de longo alcance (SAXS) e de curto alcance (WAXS):

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad \text{(Equação 12)}$$

A distância de longo alcance ( $d_L$  em Å) é periódica nas membranas lipídicas e corresponde à espessura da bicamada e da camada aquosa entre as bicamadas lipídicas. A distância de curto alcance ( $d_C$  em Å) é periódica nas membranas lipídicas e corresponde à distância de empacotamento verificada entre cada molécula fosfolípido constituinte da célula unitária da rede cristalina <sup>246</sup>.

A Tabela 3.3. apresenta um resumo das  $d_L$  obtidas a partir dos picos de difração SAXS em estruturas multilamelares de DPPC, na fase gel ( $L_\beta$  a 20 °C) e na fase fluida ( $L_\alpha$  a 50 °C) e das  $d_C$  obtidas a partir dos picos de difração WAXS em estruturas multilamelares de DPPC, na fase gel ( $L_\beta$  a 20 °C). Estas distâncias foram determinadas para o DPPC sem e com os fármacos incorporados.

**Tabela 3.3.-** Valores de  $d_L$  obtidas a partir dos picos de difração SAXS em estruturas multilamelares de DPPC, na fase gel ( $L_\beta$  a 20 °C) e na fase fluida ( $L_\alpha$  a 50 °C) e das  $d_c$  obtidas a partir dos picos de difração WAXS em estruturas multilamelares de DPPC, na fase gel ( $L_\beta$  a 20 °C).

<b>Distâncias de longo alcance (SAXS)</b>		
Formulações	$d_L$ médio(Å)	
	$L_\beta$	$L_\alpha$
DPPC	63,17	65,27
DPPC+FTC	52,73	52,96
DPPC+TDF	61,52	68,29
DPPC+FTC+TDF	53,72	54,93
<b>Distâncias de curto alcance (WAXS)</b>		
Formulações	$d_{c20}$ (Å)	$d_{c11}$ (Å)
	$L_\beta$	$L_\beta$
DPPC	4,25	4,11
DPPC+FTC	4,21	4,11
DPPC+TDF	4,24	4,14
DPPC+FTC+TDF	4,19	4,11

A adição de fármacos às estruturas multilamelares de DPPC provoca uma redução significativa da correlação entre as bicamadas, pois comparativamente ao DPPC puro, há uma diminuição da intensidade e um alargamento dos picos de Bragg (Figura 3.15). Este efeito é ainda mais notório na fase gel. É também possível observar que os 4 picos de difração das bicamadas de DPPC não aparecem mediante a adição de fármacos, passando a ser visível apenas um ou dois picos de difração. Isto significa que os fármacos têm um efeito perturbador no empacotamento lipídico.

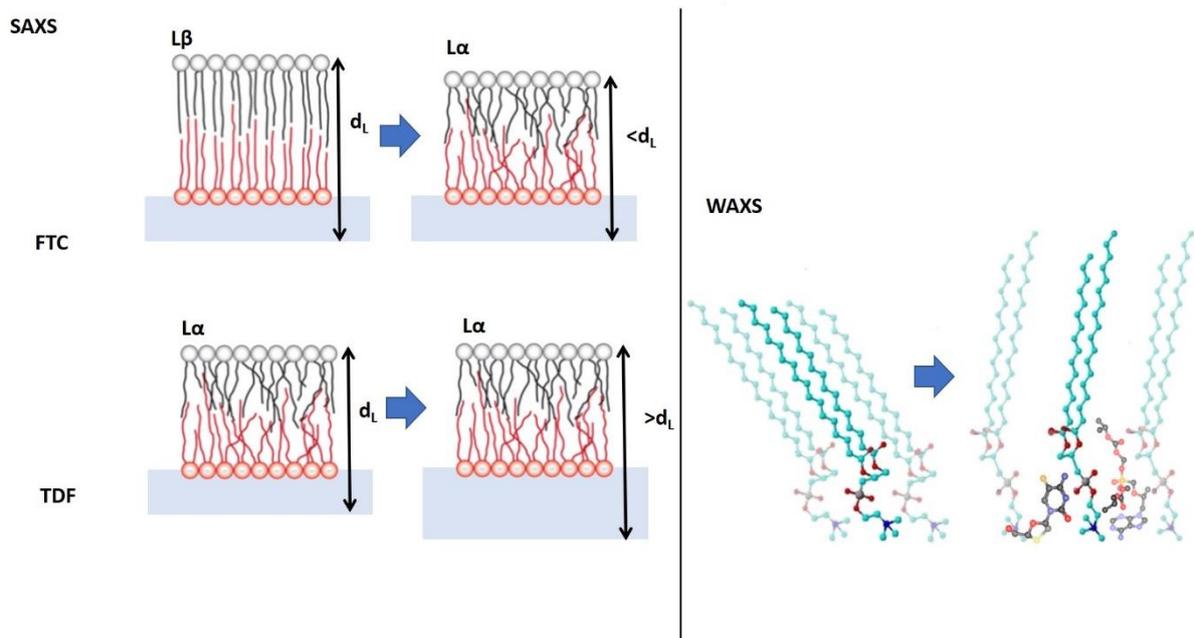
Na fase gel, a adição dos fármacos às bicamadas de DPPC resulta numa diminuição da  $d_L$ , ou seja, numa diminuição da espessura da bicamada mais a camada de água (Figura 3.17). Na fase fluida a adição de FTC ou FTC+TDF tem o mesmo efeito de diminuição da  $d_L$ , mas o TDF tem um efeito oposto. Um aumento da  $d_L$  significa um aumento da espessura da bicamada e camada aquosa e pode ser resultado de uma modificação da hidratação do DPPC (Figura 3.17) devido à interação com o TDF na fase fluida <sup>247</sup>.

Como os estudos de difração WAXS permitem essencialmente verificar o tipo de alterações induzidas no empacotamento dos fosfolípidos constituintes da bicamada ao nível das cabeças polares, é compreensível que na fase fluida não exista qualquer tipo de empacotamento e o pico de Bragg

desaparece, pelo que aqui só é apresentada a difração WAXS na fase gel. Para as bicamadas de DPPC puro a difração WAXS origina dois picos característicos de um empacotamento do tipo pseudo-hexagonal e traduz-se num pico de Bragg assimétrico (duplo) com distâncias de curto alcance  $d_{c20} \approx 4,2 \text{ \AA}$  e  $d_{c11} \approx 4,1 \text{ \AA}$  <sup>247</sup>. A adição dos fármacos às membranas de DPPC na fase gel, provoca uma aproximação dos dois picos o que sugere que os fármacos se intercalem entre as cadeias de fosfolípidos, retirando o ângulo de inclinação das cadeias lipídicas (Figura 3.17) <sup>247</sup>.

Em suma, os resultados aqui apresentados provam que ambos os fármacos interagem com os lípidos de uma membrana de DPPC. A FTC tem uma ação altamente perturbadora do empacotamento lipídico, quer na fase gel, quer na fase fluída, provocando uma apreciável diminuição da espessura da bicamada + camada aquosa, provavelmente devido a uma ação fluidificante da membrana. Na fase gel a FTC também é capaz de se intercalar entre as cabeças polares dos fosfolípidos reduzindo o seu ângulo de inclinação. Estes efeitos demonstram que a FTC, apesar de ser um fármaco muito hidrofílico, tem capacidade de estabelecer interações ao nível das cabeças polares lipídicas, sendo conseqüentemente altamente perturbadores da biofísica membranar. Provavelmente o efeito fluidificante e desordenador acentuado deste fármaco, aqui demonstrado, foi o que condicionou o seu encapsulamento, uma vez que a fluidização dos lipossomas torna-os mais permeáveis e menos capazes de reter o fármaco.

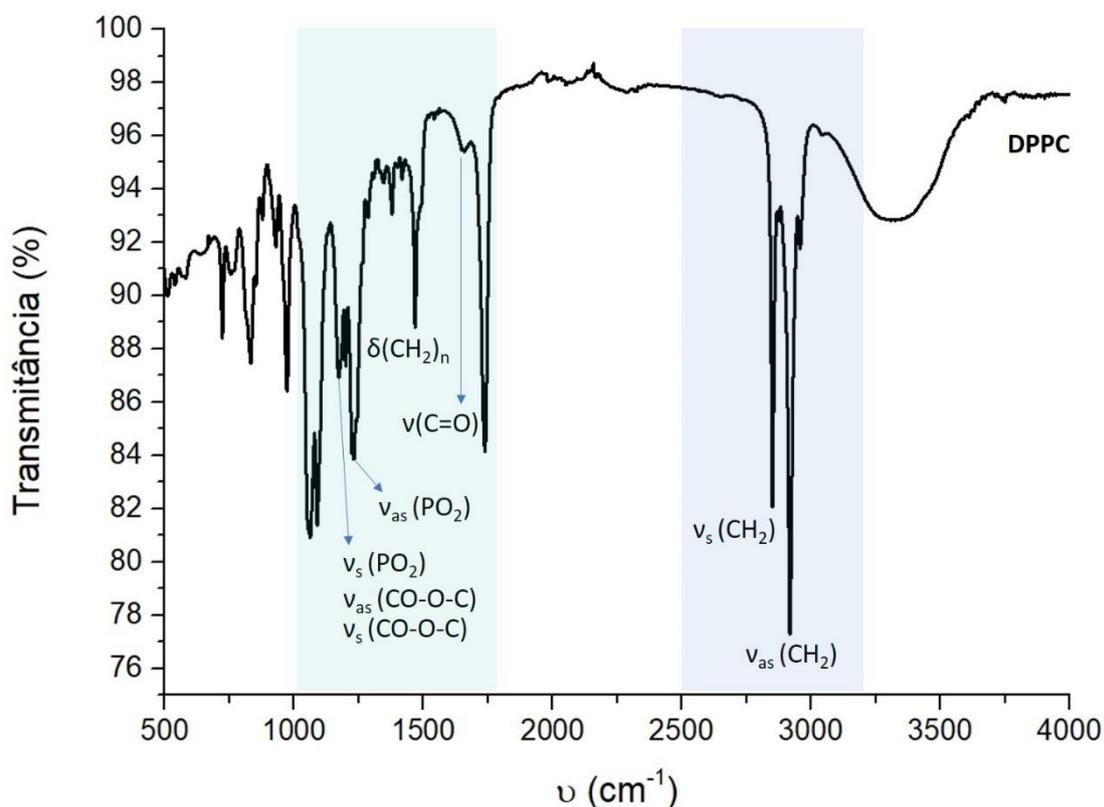
O TDF, sendo um fármaco mais lipofílico, tem maior capacidade de se distribuir nas membranas lipídicas, induzindo-lhes uma perturbação menos evidente. De facto, o TDF tem um efeito menos perturbador na fase fluída, provocando apenas um pequeno aumento da bicamada lipídica provavelmente por aumento da camada de hidratação. Este efeito pouco perturbador do empacotamento lipídico na fase fluída corrobora os resultados anteriores onde estudávamos a sua influência na  $T_m$  e  $B$ . Na fase gel das multicamadas de DPPC, os efeitos do TDF são mais acentuados, sendo visível uma perda da definição dos picos de Bragg que denotam uma perturbação do empacotamento lipídico com conseqüente redução da espessura da bicamada + camada de água. Estes resultados indicam que sistemas fluidos e mais desordenados serão menos perturbados pela introdução de TDF e sistemas mais ordenados e/ou na fase gel serão mais perturbados pela introdução de TDF o que também corrobora, de algum modo, os resultados obtidos com os LUV DSPC após introdução de TDF.



**Figura 3.17-** Representação esquemática dos principais efeitos biofísicos dos fármacos TDF e FTC em bicamadas de DPPC avaliados por SAXS e WAXS.

Fazendo as razões entre as posições dos picos de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> ordem obtém-se 1:2:3 o que é indicativo de uma fase lamelar, independente da temperatura.

Finalmente para complementar todo o estudo sobre as possíveis interações entre os fármacos e as formulações lipídicas e a possível influência dos fármacos nas propriedades biofísicas das bicamadas lipídicas foi efetuada uma análise de ATR-FTIR de modo a identificar (se possível) os modos de vibração das ligações químicas dos fármacos (TDF e FTC) e das formulações lipossomais na ausência ou presença dos fármacos. Nas Figuras seguintes mostram-se os espectros obtidos a partir das diferentes amostras analisadas.



**Figura 3.18-** Espectro de transmitância de ATR-FTIR obtido a partir de lipossomas de DPPC, sem fármacos. Nas zonas sombreadas destacam-se os grupos funcionais característicos dos fosfolípidos.

Na Figura 3.18 são visíveis os principais modos de vibração correspondentes aos fosfolípidos constituintes dos lipossomas <sup>248</sup>: 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos modos de vibração de estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) e assimétrico ( $\nu_{as}$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$ ; 1736  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao modo de vibração do grupo  $\text{C}=\text{O}$ ;  $\approx 1467 \text{cm}^{-1}$  corresponde ao modo de vibração de dobramento angular ( $\delta$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$  típico de um empacotamento hexagonal; 1220  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao modo de vibração de estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ) dos grupos  $\text{PO}_2$ ; 1130-1200  $\text{m}^{-1}$  corresponde uma banda mista característica dos modos de vibração de estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) e assimétrico ( $\nu_{as}$ ) do  $\text{C}-\text{O}$  dos grupos éster e ao modo de vibração de estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) dos grupos  $\text{PO}_2$ .

As informações estruturais e biofísicas que podem ser extraídas a são apresentadas na tabela seguinte:

Tabela 3.4. – Modos de vibração num espectro IV de um fosfolípido <sup>248,249</sup>.

Informação	Modo vibracional	Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Interpretação
Ordem conformacional	$\nu_s(\text{CH}_2)$	2849-2854	↓ <i>trans</i>
	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2916-2924	↑ <i>gauche</i>
Empacotamento	$\delta(\text{CH}_2)_n$	1462+1474	Ortorrômico
		1468	Hexagonal
Ligação e hidratação	$\nu_{as}(\text{PO}_2)$	1220-1260	↓ Pontes de H ↑ Desidratação ou formação de par iônico
Hidratação e Ligações de H	C=O	1710-1740	↓ Pontes de H

A introdução de colesterol nesta formulação não parece ter alterado significativamente o espectro de ATR-FTIR (Figura 3.19).

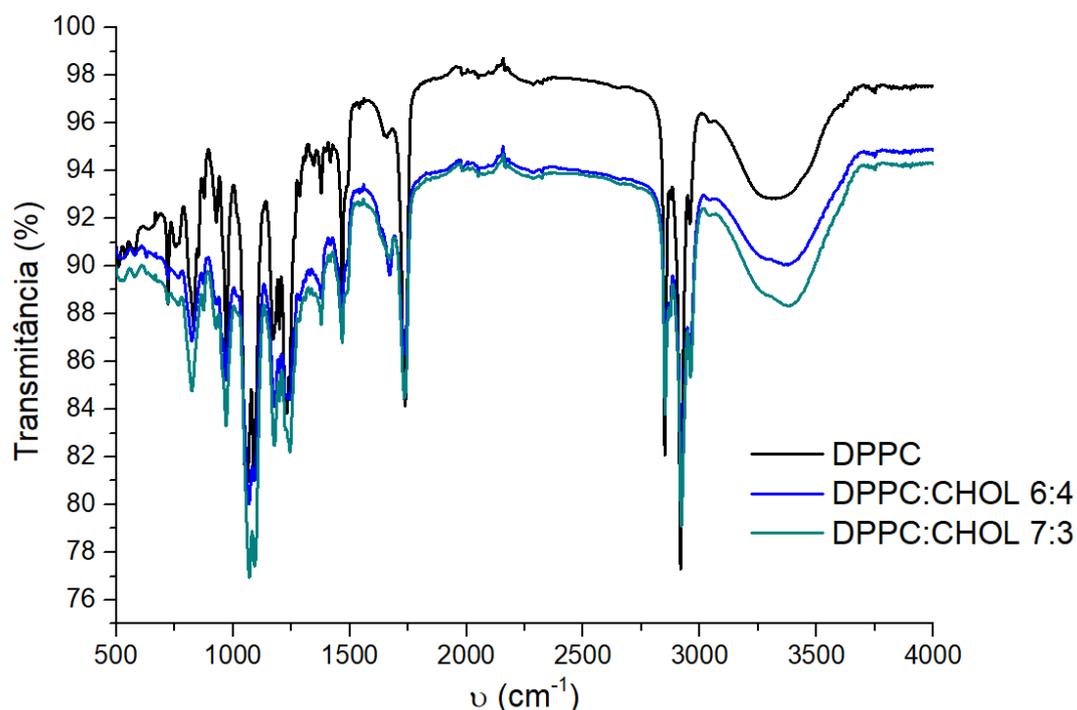
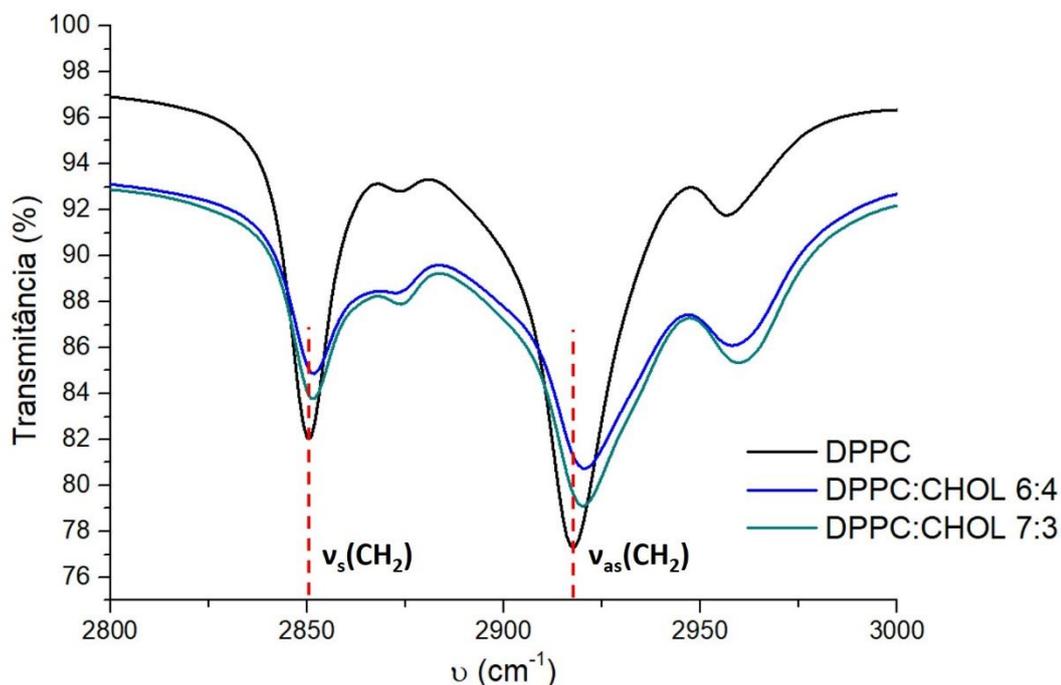


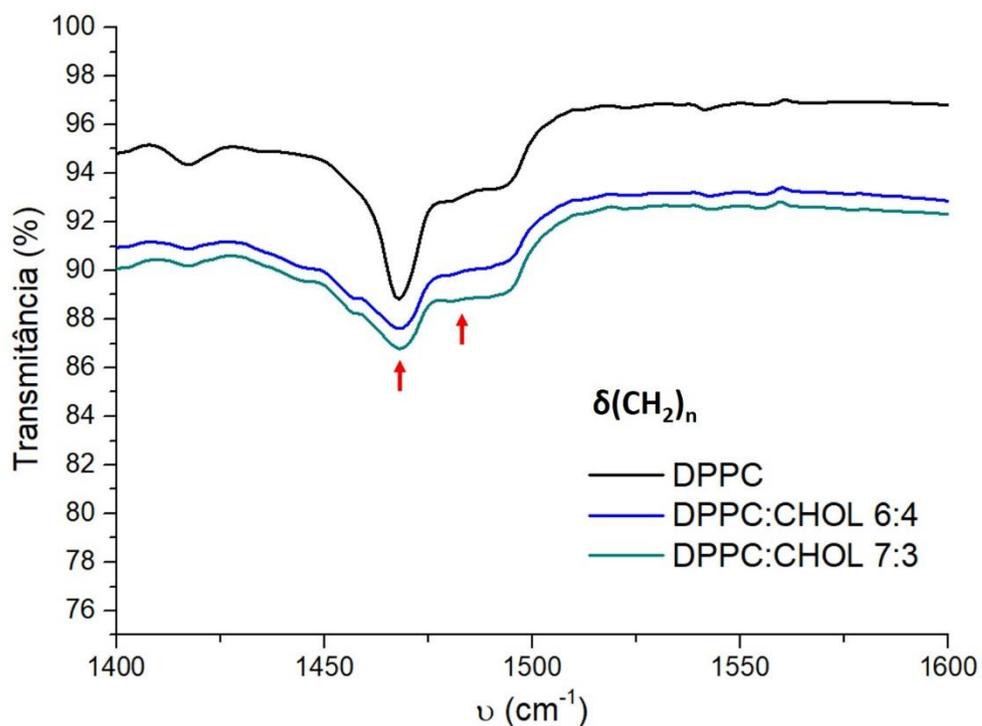
Figura 3.19- Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol.

No entanto é preciso analisar individualmente e detalhadamente os grupos mencionados na 3.4. As Figuras seguintes apresentam detalhes dos espectros onde se verificou alteração dos grupos mencionados:



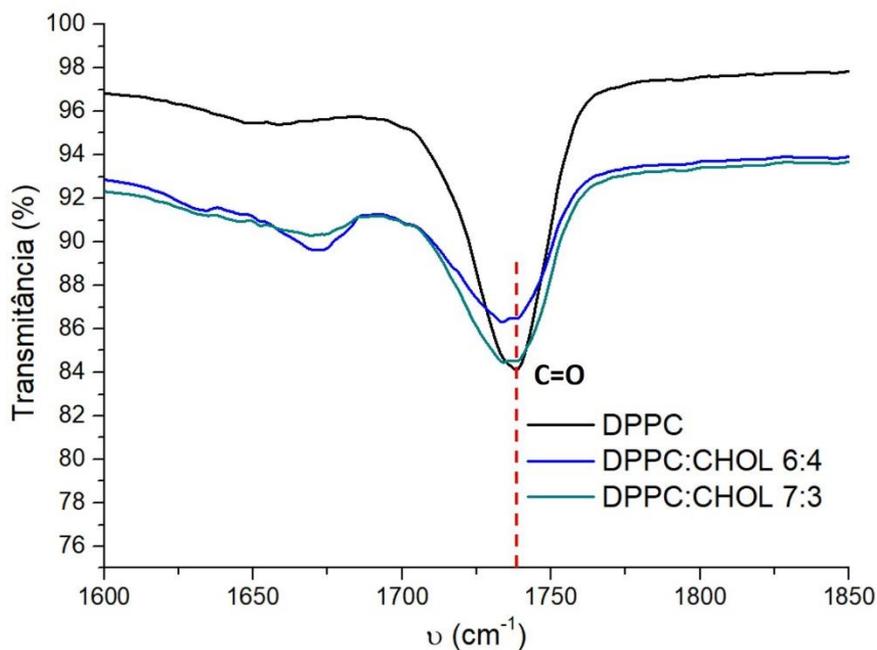
**Figura 3.20-** Detalhe dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol, mostrando as bandas de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH<sub>2</sub>.

Analisando a Figura 3.20 é possível perceber que a introdução do colesterol nos sistema lipídico provocou um aumento da frequência de vibração correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH<sub>2</sub>: 2850 cm<sup>-1</sup> (DPPC), 2851 cm<sup>-1</sup> (DPPC+30% colesterol), 2852cm<sup>-1</sup> (DPPC+40% colesterol) e 2918 cm<sup>-1</sup> (DPPC), 2920 cm<sup>-1</sup> (DPPC+30% colesterol) e 2921 cm<sup>-1</sup> (DPPC+40% colesterol). Isto quer dizer que a introdução do colesterol originou uma conversão de isómeros *trans* em *gauche*, ou seja, originou um aumento da fluidez dos sistemas.



**Figura 3.21** – Detalhe dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol, mostrando as bandas de vibração de dobramento angular ( $\delta$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$ .

Pela análise da Figura 3.21 verifica-se a existência de duas bandas de vibração de dobramento angular ( $\delta$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$  o que indica um empacotamento lipídico do tipo ortorrômico que não é alterado com a introdução de colesterol. Por outro lado, por análise da Figura 3.22 verifica-se que a introdução de colesterol provocou um aumento do número de pontes de H estabelecidas ou estabelecimento de pontes de H mais fortes, como se comprova pelo desvio da banda de vibração do grupo carbonilo para menores frequências. Mas se esta zona interfacial denota um aumento das pontes de H estabelecidas, a zona polar mais externa dos grupos fosfato não foi sensível a estas alterações pois não apresentou desvios.



**Figura 3.22** – Detalhe dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC com 30 % (DPPC:CHOL 7:3) ou com 40 % (DPPC:CHOL 6:4) de colesterol, mostrando as bandas de vibração do grupo C=O

O mesmo tipo de análise foi feito para perceber o efeito da introdução dos fármacos nas formulações de DPPC, DPPC:CHOL (7:3) e DPPC:CHOL (6:4). O espectro de ATR-FTIR destes sistemas encontra-se no Anexo 4. A introdução dos fármacos nos sistemas com colesterol não teve qualquer tipo de efeito detetável. Já a introdução dos fármacos nos sistemas de DPPC teve os efeitos resumidas na Tabela seguinte:

**Tabela 3.5** – Alteração dos modos vibracionais do espectro de DPPC após a introdução de FTC ou TDF

Formulação	Modo vibracional	Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Interpretação
	$\nu_s(\text{CH}_2)$	↑	<i>gauche</i> Fluidificação
DPPC+FTC ou DPPC+TDF	C=O	↓	Pontes de H
	$\nu_{as}(\text{PO}_2)$	↓	Pontes de H
	$\delta(\text{CH}_2)_n$	2 picos	Ortorrômico

Os efeitos dos fármacos na formulação de DPPC corroboram os efeitos de fluidificação já estudados por SAXS e WAXS. Para além disso, esta técnica de ATR-FTIR permitiu observar efeitos adicionais como estabelecimento de pontes de H.

Os estudos realizados até aqui permitiram definir uma série de conclusões:

- Os estudos de interação com a mucina e os estudos reológicos preliminares permitiram definir que as formulações seriam zwitteriônicas;
- A FTC não apresentou EE % suficiente nas formulações lipossomais, apresentando ainda indícios de perturbar muito as propriedades biofísicas dos sistemas lipídicos pelo que se decidiu que este fármaco deverá ser veiculado num hidrogel;
- O TDF apresentou uma boa EE % e não provocou alterações biofísicas relevantes nos sistemas fluidos que comprometessem a sua encapsulação nestes sistemas;
- O tipo de lípido (mais fluído ou mais rígido), a existência ou não de colesterol e o método de encapsulamento não tiveram grande impacto nas características físico-químicas dos sistemas, nem na EE%

A partir destas conclusões, algumas das formulações desenvolvidas foram estudadas por meio de testes *in vitro* que poderão dar indicações sobre a sua performance *in vivo*.

### **2.3. Qual das formulações poderá vir a ter uma melhor performance *in vivo*?**

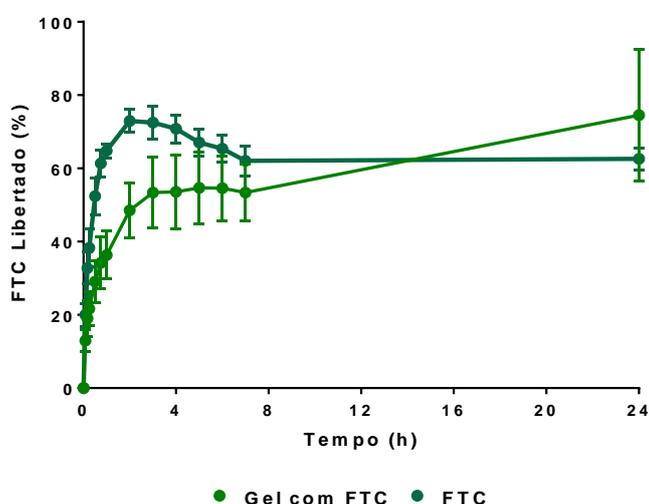
Com o intuito de determinar a formulação que poderá vir a ter um melhor desempenho *in vivo*, foram realizados estudos *in vitro* de cinética de libertação e difusão dos fármacos, estudos de reologia após incorporação das formulações nos géis e, por último, estudos de citotoxicidade em linhas endometriais e cervicais.

#### **2.3.1. Ensaio de libertação controlada**

Como referido na metodologia experimental estes ensaios foram feitos com recurso a uma membrana de diálise, dentro da qual se colocavam as formulações a testar. Inicialmente, foi determinado o perfil de libertação da FTC, não encapsulada e dispersa em solução aquosa e verificou-se uma libertação inicial muito rápida com cerca de 73 % do fármaco a atravessar a membrana em apenas 2 h após o início do ensaio. A FTC é um fármaco hidrofílico tendo, por essa razão, elevada afinidade para

solventes polares o que justifica a sua rápida difusão através da membrana. Este não seria um tipo de perfil de libertação pretendido, uma vez que num ambiente vaginal com grande quantidade de fluidos e um “turnover” fisiológico dos mesmos levaria a um tempo de residência insuficiente da FTC.

Assim, e como já referido em secções anteriores, optou-se por incluir a FTC diretamente na base semissólida (HG) uma vez que a sua incorporação em sistemas lipídicos não foi possível devido à sua natureza hidrofílica. Os estudos da cinética de libertação da FTC a partir do HG revelaram uma maior retenção do fármaco comparativamente à sua forma livre, com cerca de 48 % de FTC a ser doseada após 2 h de ensaio. Para além disso, é possível observar que o HG permitiu uma libertação mais completa da FTC ( $75 \pm 18 \%$  face a  $63 \pm 3 \%$  em 24 h).



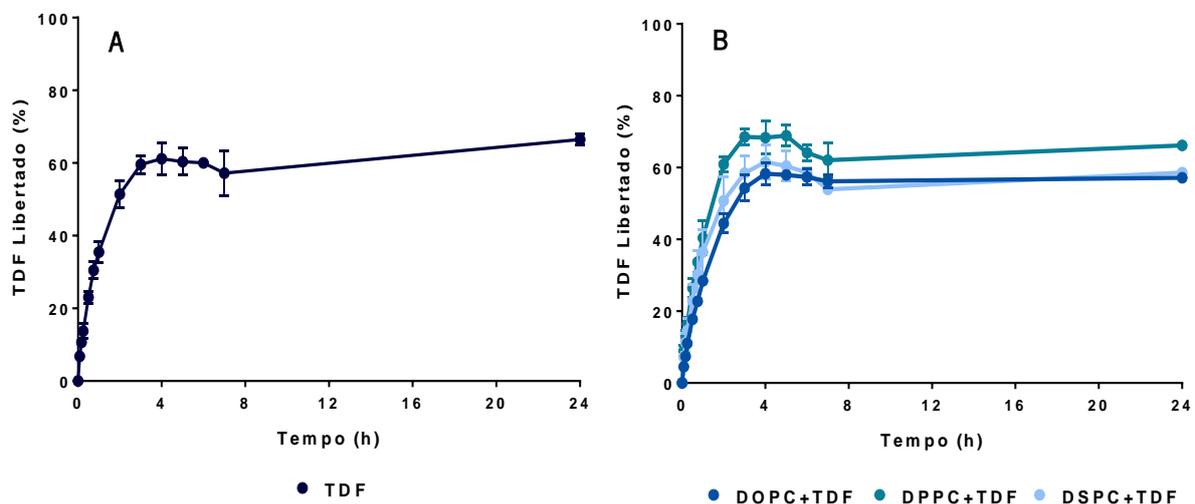
**Figura 3.23** – Representação gráfica dos perfis de libertação *in vitro* da FTC, a uma temperatura controlada de 37 °C, em solução aquosa e após incorporação no HG.

Uma vez que nos estudos anteriores, a composição do lipossoma e a sua rigidez não pareceram afetar a EE % do fármaco ou as suas propriedades físico-químicas, pretendeu-se avaliar se a incorporação de TDF em lipossomas com crescentes graus de rigidez teria influência no seu perfil de libertação, e consequentemente, comparar se a incorporação dos lipossomas com TDF no HG e em nanofibras poliméricas promoveria alguma alteração no perfil de libertação.

O TDF não-encapsulado (3.24-A) apresentou uma libertação inicial rápida, com cerca de 60 % a ser difundido pela membrana de diálise após 3 h do início do ensaio, acabando depois por estabilizar e atingir o máximo de libertação às 24 h, com um total de 66 % de TDF libertado para o meio de dissolução. Comparativamente com o perfil de libertação obtido para o TDF, Zidan et al.<sup>242</sup> e Belletti et al.<sup>250</sup>, reportaram que o TFV apresenta uma libertação muito rápida e completa nas primeiras 3 h de ensaio, intimamente correlacionada com o seu carácter hidrofílico. Contudo, Patil et al.<sup>251</sup> e Shailender et al.<sup>252</sup>

demonstraram recentemente que também o TDF era capaz de, ao fim de 4 h, se libertar totalmente para o exterior. Desta forma, e ao contrário do que seria esperado, o fármaco mostrou-se incapaz de difundir totalmente através da membrana de diálise, o que poderá dever-se a uma eventual adsorção do ARV à matriz polimérica do sistema. De facto, tal como foi previsto nos estudos *in silico* o TDF tem um grande número de grupos aceitadores de H e, portanto, revela grande capacidade de estabelecer interações com o meio circundante. Além disso, este é um problema relatado na literatura, já que após o uso de membranas de diálise a libertação total do fármaco observada é consequência de dois processos paralelos de transporte de massa: (1) a “verdadeira” libertação dos lipossomas, e (2) a difusão do fármaco libertado através da diálise membrana. Correspondentemente, é fundamental determinar a difusão cinética do fármaco puro através da membrana de diálise, a fim de entender as características “verdadeiras” da libertação de fármacos <sup>253</sup>. Como perspetiva futura a melhorar nestes ensaios será o uso de membranas de diálise com um *cutoff* ainda mais elevado.

Posteriormente, estudou-se de que forma a incorporação do TDF em lipossomas com crescentes graus de rigidez – DOPC, DPPC e DSPC – influenciaria o perfil de libertação final do fármaco (Figura 3.24-B). Verificou-se, tal como demonstrado na Figura 3.24-B, que nem o encapsulamento do TDF, nem a variação na composição lipídica do nanossistema promoveram diferenças significativas na libertação do fármaco face à sua forma não-encapsulada.



**Figura 3.24-** Comparação dos perfis de libertação *in vitro* e a uma temperatura controlada de 37 °C do (A) TDF quando disperso em água e (B) do TDF encapsulado em MLV com crescentes graus de rigidez (DOPC, DPPC e DSPC, respetivamente).

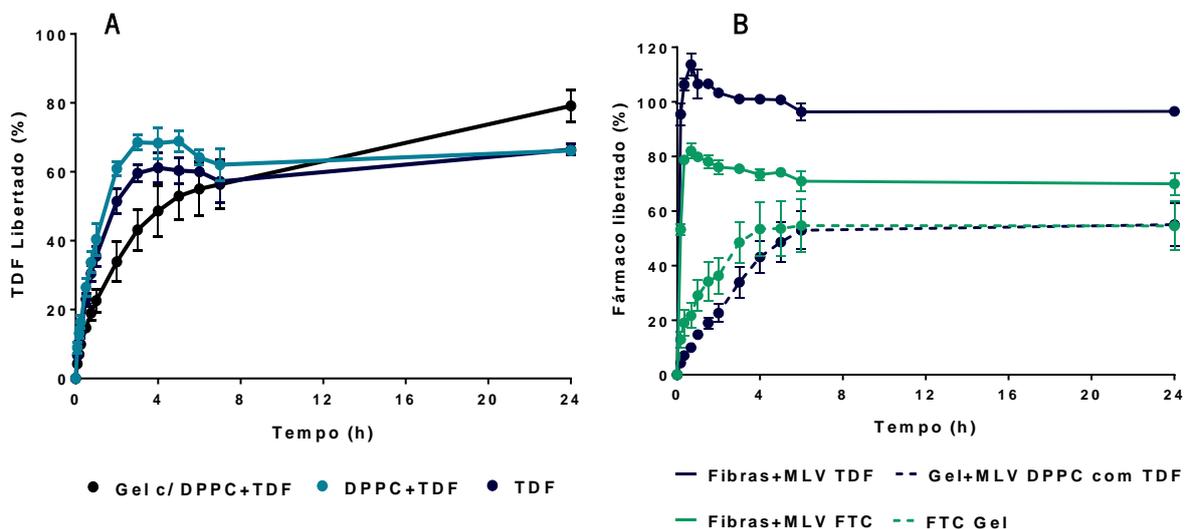
Os perfis de libertação do fármaco encapsulado devem ser analisados tendo em consideração (1) o coeficiente de partição do TDF, (2) a localização do fármaco na bicamada lipídica e (3) a

fluidez/rigidez das membranas lipídicas. Estes fatores têm especial importância uma vez que condicionam a localização do fármaco no interior das vesículas lipídicas assim como a capacidade do fármaco se difundir para o meio em função do tempo.

Os ensaios de libertação representados na Figura 3.24-B demonstraram, que não existem diferenças consideráveis entre as diferentes composições lipídicas testadas e que em nenhum dos sistemas ocorreu a total libertação do fármaco. Seria expectável que a libertação do TDF a partir dos nanossistemas fosse coerente com o grau de fluidez dos mesmos, isto é, que as vesículas de DOPC por estarem naturalmente fluídas à temperatura ambiente permitissem uma maior libertação do fármaco e, pelo contrário, que as vesículas de DPPC ( $T_m = 42\text{ }^\circ\text{C}$ ) e DSPC ( $T_m = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ) por apresentarem temperaturas de transição de fase mais elevadas promovessem uma maior retenção dos fármacos. No entanto, e ao contrário da previsão anterior, os lipossomas de DOPC e DSPC apresentaram uma cinética de libertação muito semelhante ( $\approx 44\%$  e  $\approx 51\%$  ao fim de 2 h, respetivamente), ao passo que os lipossomas de DPPC exibiram valores um pouco superiores ( $\approx 61\%$  ao fim de 2 h) sendo a composição lipídica a permitir a maior difusão de TDF. A baixa percentagem de libertação de TDF pelos lipossomas de DOPC pode dever-se ao facto de os lípidos, por estarem completamente fluidos, causarem algum tipo de obstrução nos poros da membrana de diálise impedindo que o TDF se difunda para o exterior. Por outro lado, a menor libertação com os lipossomas de DSPC face aos de DPPC pode ser explicado pela sua temperatura de transição ser mais elevada. Por último, Bhardwaj et al.<sup>254</sup> em estudos semelhantes com diferentes sistemas lipídicos à base de PC, verificaram que os lipossomas de DPPC apresentaram libertações mais elevadas do composto lipofílico em estudo que poderão ser explicadas por mudanças na transição do lípido após a sua incorporação, tal como poderá estar a acontecer com o TDF. Independentemente de todas estas considerações, nenhum perfil de libertação de TDF a partir das nanoformulações lipídicas mostrou grande diferenças relativamente à libertação do fármaco não encapsulado. Tal poderá ter a ver com o facto de apesar do TDF ser lipofílico e possuir um coeficiente de partição adequado para garantir lipossolubilidade apropriada nas bicamadas lipídicas, este também é um fármaco altamente polarizável, que como vimos é capaz de estabelecer diversas interações com o meio, nomeadamente pontes de H. Assim, não é expectável que a sua localização na bicamada lipídica seja profunda, mas sim similar ao já proposto anteriormente, com parte da molécula inserida nas caudas apolares e com o seu grupo amina polarizável a interagir com as cabeças dos fosfolípidos. Esta localização perto da zona da interface aquosa, é corroborada pelos estudos de raios X, onde WAXS revela a penetração nos grupos polares dos fosfolípidos e redução do seu ângulo de inclinação. Também a avaliação da variação do potencial- $\zeta$  dos sistemas lipídicos revelou uma interação eletrostática ou do tipo

dipolo induzido entre as cabeças dos fosfolípidos e o TDF. Ou seja, esta localização membranar, mas próxima da interface, poderá justificar a libertação do TDF ocorrer de forma rápida e não ser condicionada pelo empacotamento das caudas lipídicas de rigidez crescente.

Os estudos de cinética de libertação após incorporação de lipossomas de DPPC com TDF em HG (Figura 3.25-A) mostraram uma libertação mais controlada e completa do fármaco. Ao fim de 2 h cerca de 34 % de TDF tinha sido libertado face aos 51 % e 61 % de TDF em solução aquosa e incorporados nos lipossomas, respetivamente. Esta retenção do fármaco foi igualmente observada por Cautela et al.<sup>255</sup> em que a incorporação de nanopartículas poliméricas em filmes para aplicação vaginal retardou significativamente a saída do fármaco. Pensa-se também que tanto o sistema lipídico como o gel permitiram uma melhor dispersão do fármaco e, conseqüentemente, uma menor acumulação nas membranas de diálise e maior libertação final.



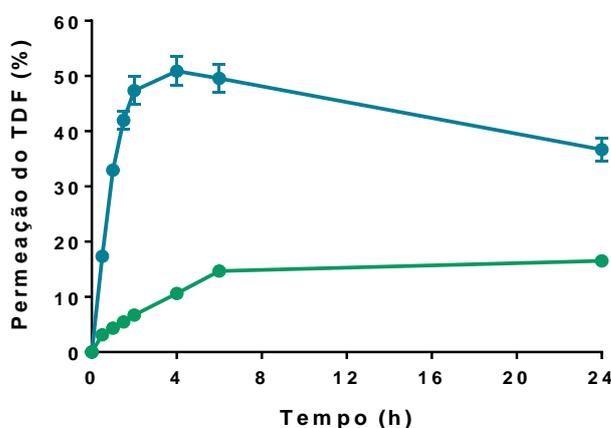
**Figura 3.25-** Representação gráfica dos perfis de libertação dos fármacos *in vitro* em meio aquoso e a uma temperatura controlada de 37 °C. (A) Perfil de libertação do TDF não-encapsulado, encapsulado em lipossomas de DPPC e encapsulado em lipossomas de DPPC incorporado no HG. (B) Comparação dos perfis de libertação do TDF quando encapsulado em lipossomas de DMPC:CHOL:DOPE (7:2:1) incorporados em nanofibras poliméricas e lipossomas de DPPC incorporados no HG; Comparação dos perfis de libertação da FTC quando encapsulada em lipossomas de DMPC:CHOL:DOPE (7:2:1) incorporados em nanofibras poliméricas e quando dispersa no gel.

Por último, foi ainda possível comparar a libertação do TDF e da FTC a partir de dois sistemas de veiculação distintos: nanofibras poliméricas e HG de carbómero. Como referido na secção 2.5., lipossomas com a mistura lipídica DMPC:CHOL:DOPE (7:2:1) contendo TDF/FTC foram incorporados nas nanofibras, a partir das quais se estimou a percentagem de libertação de cada um dos fármacos.

Do mesmo modo, o perfil de libertação destes fármacos foi estudado a partir de HG com lipossomas de DPPC contendo TDF e a partir de HG com FTC dispersa, permitindo o estabelecimento de comparações. Pela análise da Figura 3.25–B é possível observar que tanto a libertação do TDF como da FTC a partir das nanofibras se dá de modo quase imediato, com 96 % de TDF e 82 % de FTC a serem doseados após 5 min e 45 min após o início do ensaio, respetivamente. Tal, dever-se-á, muito provavelmente, à localização dos fármacos mais à superfície das fibras. Pelo contrário, os HG com lipossomas contendo TDF apresentaram uma retenção do fármaco, sendo que o seu perfil de libertação se mostra muito mais controlado ao longo do tempo ( $\approx 23\%$  às 2 h de ensaio). O mesmo se conclui para a FTC que, apesar de dispersa no HG, demonstrou uma libertação muito mais lenta do que quando encapsulada nos lipossomas de DMPC:CHOL:DOPE.

### 2.3.2. Estudo da permeação dos fármacos

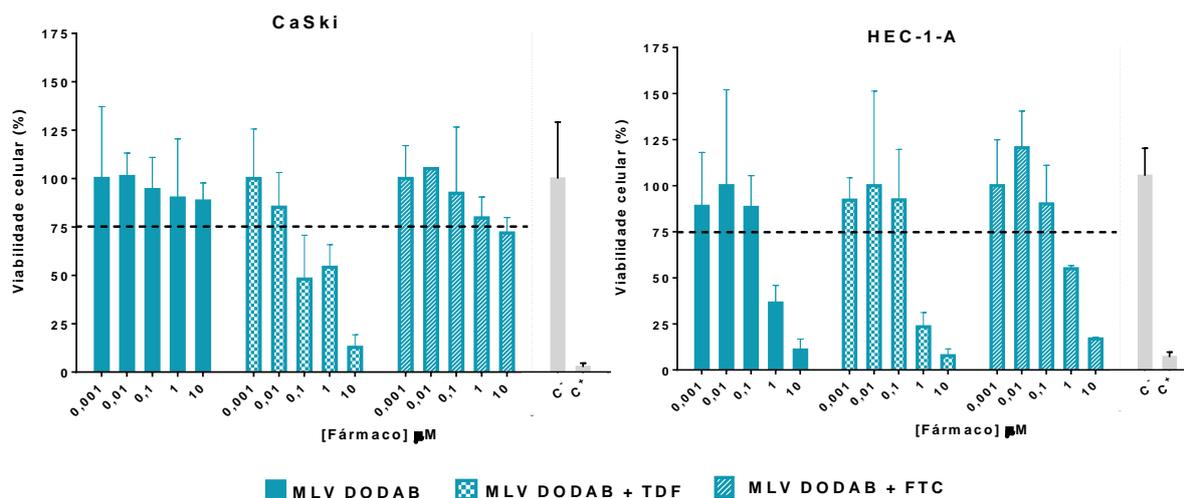
Os estudos de permeação dos fármacos foram realizados com membranas artificiais de polissulfona de modo a mimetizar a semi-permeabilidade existente numa interface membranas. No caso concreto deste trabalho, pretende-se mimetizar uma permeação através das membranas do epitélio vaginal, já que poderá ser requerido que os fármacos veiculados atravessassem estas membranas para atingirem o seu alvo viral. Após doseamento do TDF na câmara recetora a diferentes *timepoints* foi possível observar (Figura 3.26) que a sua incorporação nos lipossomas permitiu uma maior permeação relativamente ao fármaco disperso numa solução aquosa. Os resultados obtidos sugerem que, *in vivo*, a formulação lipossomal poderá favorecer a permeação das membranas do epitélio vaginal.



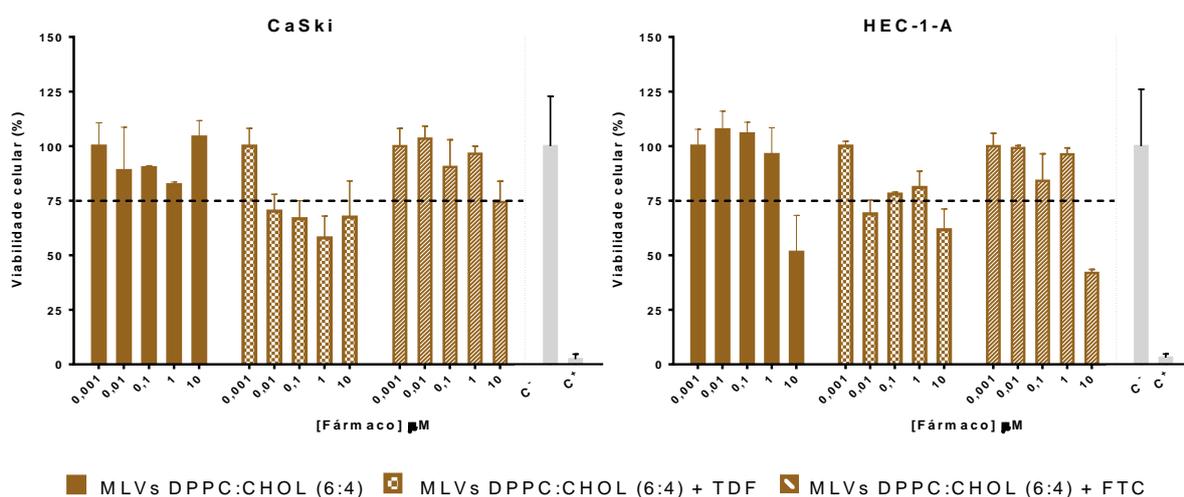
**Figura 3.26** – Representação gráfica dos perfis de difusão do TDF não-encapsulado e encapsulado em lipossomas de DMPC (4 mM) através de uma membrana de polissulfona, com uma temperatura controlada de 37 °C.

### 2.3.3. Ensaios de viabilidade celular

Com o intuito de avaliar o efeito citotóxico de algumas das formulações zwitteriônicas desenvolvidas, foram realizados ensaios de MTT nas linhas celulares CaSki e HEC-1-A. Paralelamente, e em termo de comparação, investigou-se também o efeito citotóxico de formulações com carga superficial positiva nestas mesmas linhas.



**Figura 3.27-** Viabilidade das células CaSki e HEC-1-A avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com MLV DODAB, MLV DODAB+TDF e MLV DODAB+FTC.



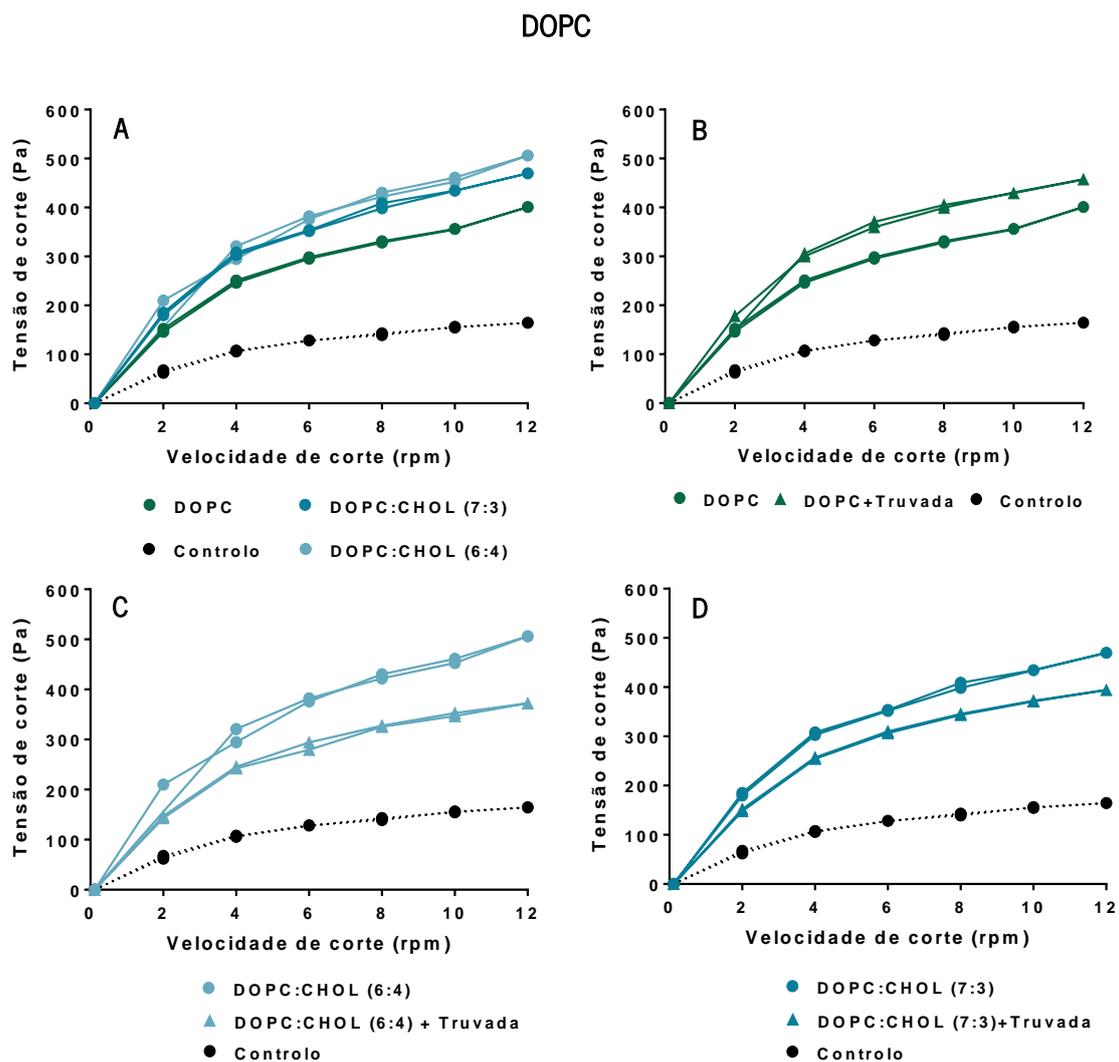
**Figura 3.28-** Viabilidade das células CaSki avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com MLV DPPC:CHOL (6:4), MLV DPPC:CHOL (6:4)+TDF e MLV DPPC:CHOL (6:4)+FTC.

Foi possível constatar que, perante concentrações mais elevadas de lípido e fármaco, os nanossistemas catiónicos de DODAB mostram-se bastante citotóxicos nas células endometriais apresentando viabilidades abaixo dos 60 %, tanto para os nanossistemas placebo como para os nanossistemas com os fármacos. Nas células cervicais não se observou uma citotoxicidade tão acentuada, exceto para a formulação DODAB+TDF que apresentou viabilidades celulares abaixo de 60 % para as concentrações de lípidos e fármaco mais elevadas. Estes estudos preliminares vão de encontro aos estudos conduzidos por Zidan et al.<sup>242</sup> que demonstraram que quanto maior a percentagem de agente catiónico incorporado nos lipossomas, maior era a citotoxicidade induzida. Pelo contrário, os nanossistemas zwitteriónicos (Figura 3.28) só para a maior concentração de lípido testada é que demonstram uma ligeira citotoxicidade mas que acaba por ser pouco significativa tendo em conta as barras de erro associadas e o limite definido pela ISSO 10993 (70 %) <sup>256</sup>. No Anexo 5 encontram-se representados alguns estudos complementares de outros sistemas zwitteriónicos para a linha celular CaSki.

#### **2.3.4. Determinação dos perfis reológicos dos hidrogéis contendo as formulações**

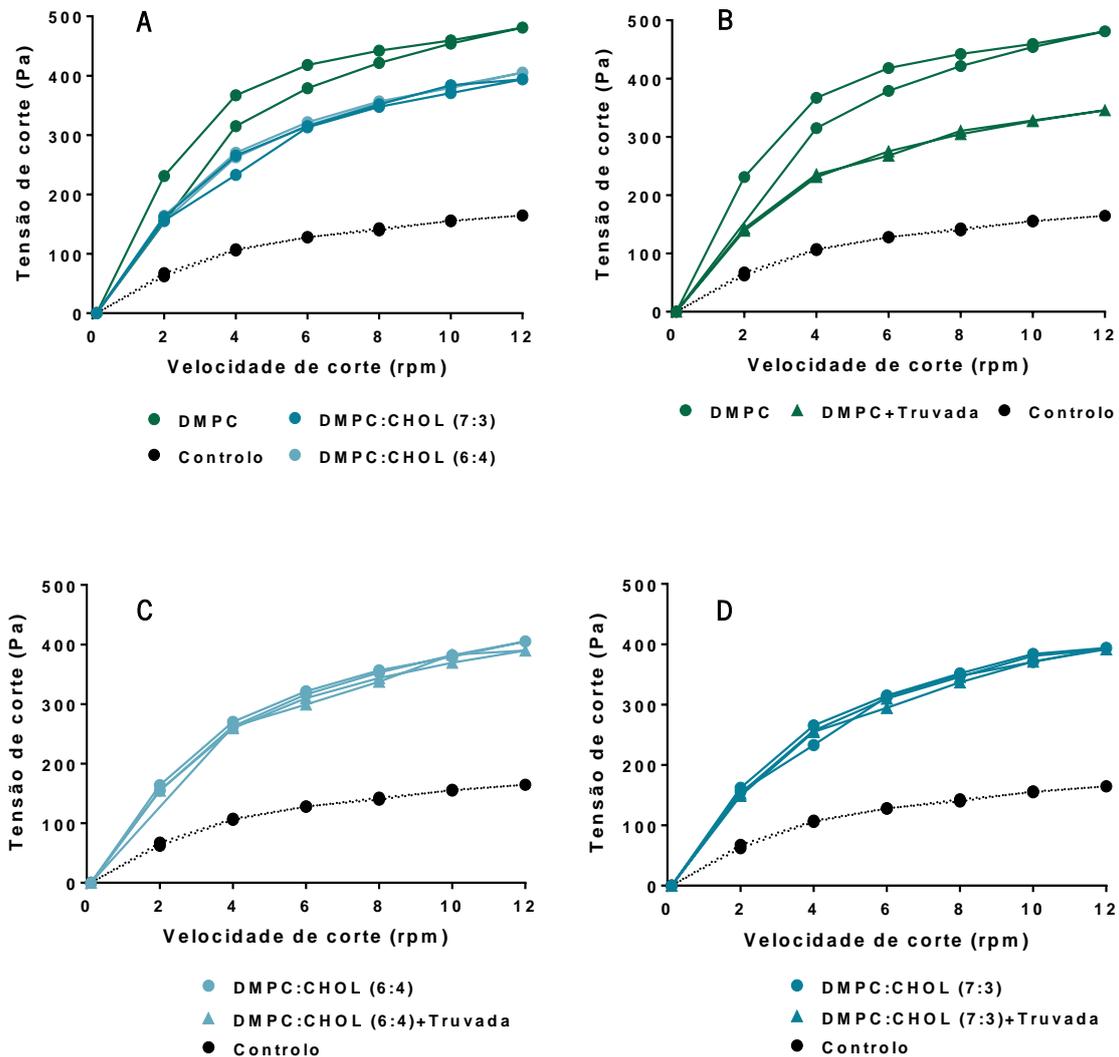
O comportamento reológico dos HG foi avaliado após incorporação das formulações lipídicas zwitteriónicas placebo e com os fármacos na sua estrutura. Os reogramas obtidos revelaram que os HG apresentam um comportamento do tipo não-Newtoniano pseudoplástico, isto é, ocorre uma diminuição quase linear da sua viscosidade à medida que é aplicada uma tensão de corte de velocidade crescente <sup>257</sup>. Esta tensão de corte promove quebras na rede tridimensional dos HG, levando a uma diminuição gradual da sua viscosidade. Adicionalmente, como as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas da maior parte das formulações zwitteriónicas testadas se sobrepõem, significa que os HG não apresentam tixotropia. Só para os nanossistemas lipídicos de DMPC é que se observou a existência da histerese característica do comportamento tixotrópico <sup>240</sup>. Esta propriedade traduz uma variação da viscosidade com o tempo e, no caso particular de uma administração tópica, é favorável uma vez que promove o espalhamento da base por diminuição da sua viscosidade no processo de aplicação, e quando esta cessa a viscosidade inicial é retomada <sup>240</sup>. Assim sendo, conclui-se que no contexto de uma administração vaginal, os sistemas com DMPC na sua composição lipídica seriam preferencialmente utilizados uma vez que permitiriam que as soluções fluíssem para a cavidade cervical, permitindo um contacto íntimo com a superfície <sup>240</sup>.

Para além disso, observou-se ainda que a tensão de corte necessária para fluir os HG sem os sistemas lipídicos é menor do que a que é aplicada nos HG com os lipossomas incorporados o que nos permite concluir que os lipossomas aumentam a viscosidade da base semissólida. A incorporação de colesterol nas formulações promoveu, em geral, uma diminuição na viscosidade do hidrogel. Do ponto de vista da variação da composição dos lipossomas, verificou-se mais uma vez que a maior ou menor fluidez dos sistemas não teve um grande impacto no perfil reológico obtido.



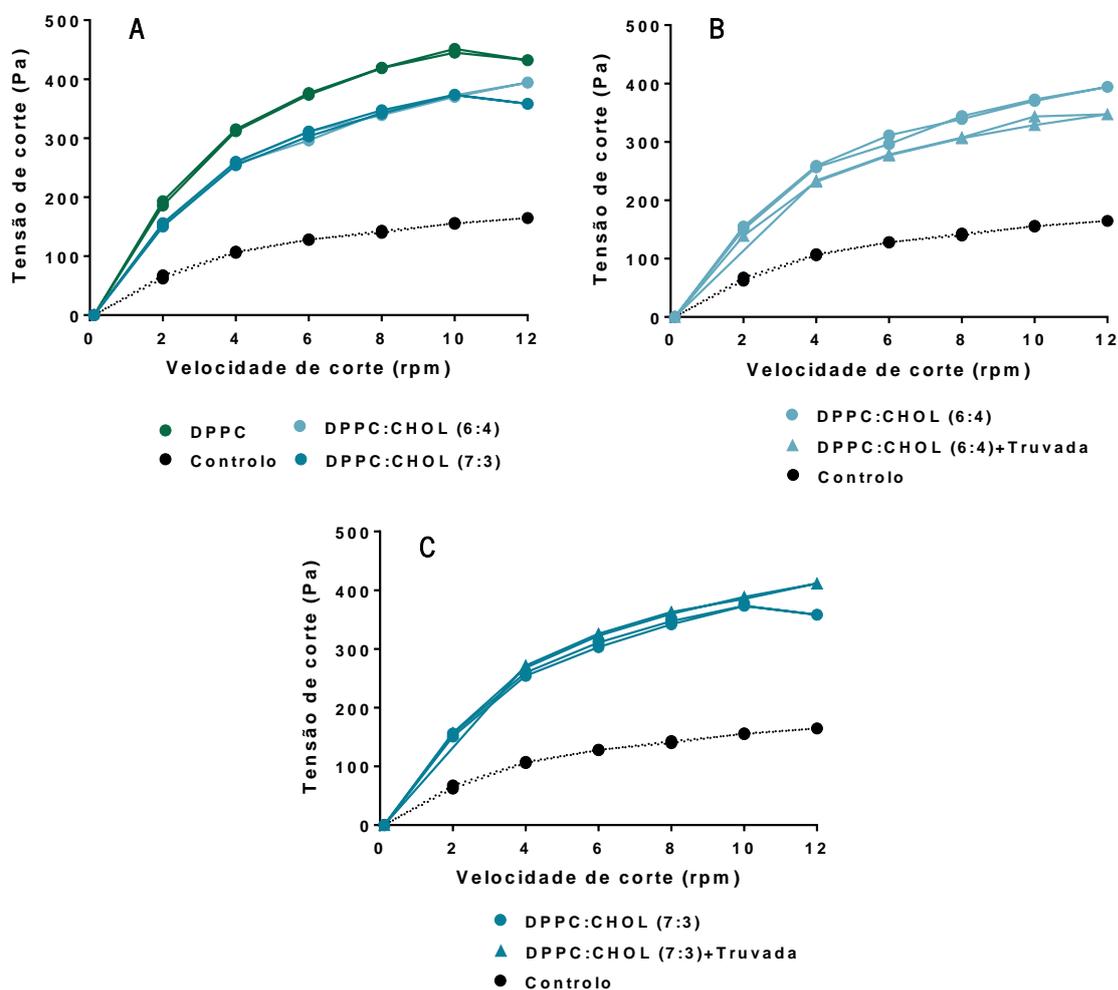
**Figura 3.29** – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DOPC e de DOPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DOPC e DOPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DOPC com e sem os fármacos. (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DOPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (D) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DOPC:chol (7:3) com e sem os fármacos.

## DMPC

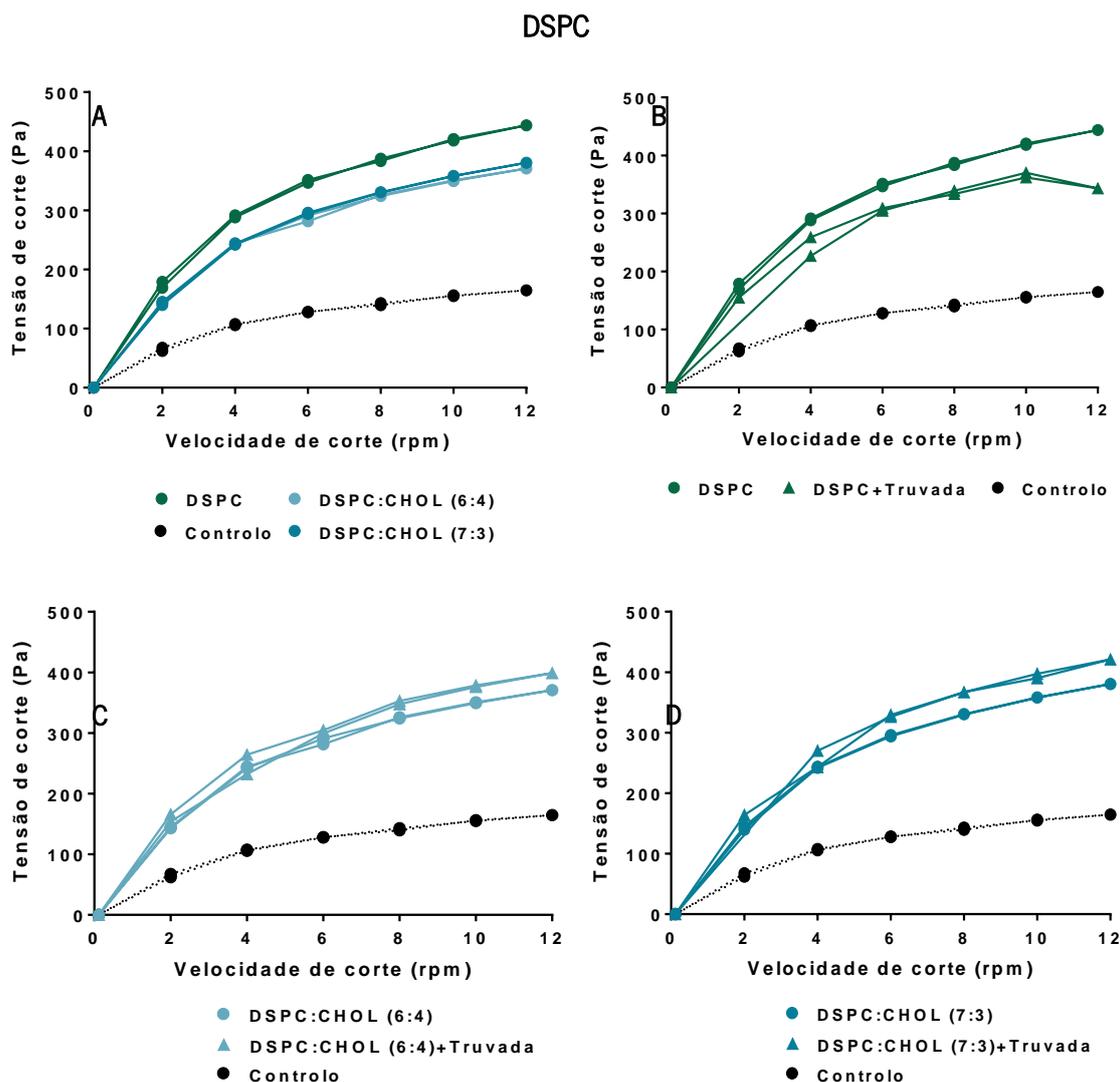


**Figura 3.30**– Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DMPC e de DMPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DMPC e DMPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DMPC com e sem os fármacos. (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DMPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (D) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DMPC:CHOL (7:3) com e sem os fármacos.

## DPPC



**Figura 3.31** – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DPPC e de DPPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DPPC e DPPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DPPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DPPC:CHOL (7:3) com e sem os fármacos.



**Figura 3.32** – Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DSPC e de DSPC:CHOL em diferentes proporções (7:3 e 6:4) com e sem TDF e FTC incorporados. (A) Comparação dos perfis reológicos de HG após incorporação de lipossomas de DSPC e DSPC:CHOL sem fármaco. (B) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DSPC com e sem os fármacos. (C) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DSPC:CHOL (6:4) com e sem os fármacos e (D) Comportamento reológico do HG após incorporação de lipossomas de DSPC:chol (7:3) com e sem os fármacos.



## CAPÍTULO 4



# CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS



## 1. Conclusões

O principal objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma estratégia profilática tópica para o combate à infecção pelo VIH, tendo por base a formulação comercial Truvada<sup>®</sup>.

Inicialmente, realizaram-se estudos de pré-formulação que permitiram, através da previsão *in silico* de alguns parâmetros físico-químicos e preditores dos fármacos, uma melhor compreensão do seu comportamento no organismo, em particular, ao nível vaginal. Mais concretamente, foi possível prever que a este nível: **(1)** os fármacos se encontrariam na sua forma não-ionizada; **(2)** enfrentariam obstáculos aquando da sua administração, correlacionados quer com a elevada hidrofília da FTC que poderá promover a sua expulsão precoce do canal vaginal, quer pela moderada lipofilicidade e elevada polarizabilidade do TDF que poderá causar o seu aprisionamento ao nível da barreira de muco; **(3)** os fármacos apresentam elevada solubilidade que determina a necessidade da sua incorporação em sistemas anfílicos e **(4)** uma permeabilidade altamente condicionada pela sua lipofilicidade. Desta forma, a partir dos estudos de pré-formulação, foi possível proceder ao planeamento racional e sistemático de uma estratégia profilática, tendo por base o desenvolvimento de nanossistemas lipídicos para a veiculação do TDF e a produção de HG para a veiculação de FTC. Assim

Os estudos de interação dos nanossistemas com a mucina, realizados por variação da carga de superfície dos mesmos, demonstraram que todas as cargas testadas – positiva, negativa e neutra - evidenciaram interações com a proteína, confirmadas pela análise do diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial- $\zeta$  das formulações antes e após incubação com uma suspensão de mucina. Para além disso, a sua ação na fluorescência intrínseca e na reologia de HG com mucina foi igualmente analisada. Os nanossistemas zwitteriónicos foram os que exibiram características de mucoadesão e reológicas mais aceitáveis e, nesse sentido, foram os sistemas selecionados para o desenvolvimento da formulação lipídica.

De modo a selecionar qual a composição lipídica e método de encapsulamento mais promissor, testaram-se lipossomas zwitteriónicos com diferentes graus de rigidez e compararam-se três metodologias para o encapsulamento do TDF. Todos os nanossistemas foram analisados em termos de tamanho, PDI, potencial- $\zeta$  e EE % sendo que nenhum se demarcou quanto a estes parâmetros. Concluiu-se que todos os métodos de encapsulamento eram adequados e apresentavam valores elevados de EE % e que todas as composições lipídicas foram capazes de incorporar o fármaco quase na sua totalidade. Adicionalmente, foi possível concluir que o tamanho dos nanossistemas desenvolvidos era compatível com uma capacidade de penetração ao longo da camada de muco cérvico-vaginal.

De seguida, e de forma a avaliar se o a incorporação e/ou método de encapsulamento do TDF promovia alguma alteração biofísica nas membranas lipídicas dos nanossistemas, estudou-se o seu efeito na transição de fase dos lípidos. Foi possível concluir que não ocorreram alterações neste parâmetro e que a incorporação do fármaco não afetava significativamente o empacotamento lipídico. Os resultados de SAXS e WAXS evidenciam a existência de interações entre os fármacos e as membranas lipídicas, sendo notável uma ação perturbadora mais acentuada para a FTC (quer na fase fluida, quer na fase gel) que induz um aumento acentuado da espessura da bicamada lipídica + camada de água e uma fluidificação dos sistemas. Já o TDF, dada a sua lipofilia, tem uma melhor capacidade de distribuição nas membranas lipídicas o que se traduz em perturbações menos evidentes. Estas são mais acentuadas na fase gel e promovem uma diminuição da espessura da bicamada lipídica + camada de água. Finalmente os estudos de ATR-FTIR confirmaram o efeito dos fármacos na fluidificação dos sistemas lipídicos e a capacidade de estabelecerem pontes de H com as cabeças polares dos fosfolípidos. Dos estudos realizados concluiu-se que os nanossistemas lipídicos não são bons veículos para a FCT, dada a sua ação perturbadora na estabilidade biofísica dos mesmos que poderá estar correlacionado com a pequena EE% atingida para este fármaco em lipossomas. Definiu-se portanto que o TDF será veiculado numa formulação lipossomal, mas a FTC será veiculada no HG.

Posteriormente, e com o objetivo de determinar qual a formulação com melhor potencial para um bom desempenho *in vivo*, foram realizados estudos de cinética de libertação e permeação dos fármacos, estudos de reologia após incorporação das formulações nos géis e, por último, estudos de citotoxicidade em linhas endometriais e cervicais. Os ensaios de libertação demonstraram que o encapsulamento do TDF em lipossomas com crescentes graus de rigidez não provocou alterações consideráveis no seu perfil de libertação ao passo que, quando incorporados no HG a libertação é retardada. Este comportamento foi também observável para a FTC após incorporação no HG.

A avaliação da permeação do TDF permitiu inferir que a incorporação do fármaco nos nanossistemas aumentou significativamente a sua difusão através das membranas sintéticas de polissulfona, indicando que a utilização de vetores lipídicos é altamente vantajosa e, *in vivo*, poderá favorecer a permeação através das membranas do epitélio vaginal tornando-se acessível ao seu alvo viral que também é capaz desta permeação.

Os estudos de citotoxicidade nas linhas CaSki e HEC-1-A demonstraram que, para as concentrações testadas, os nanossistemas zwitteriónicos não apresentaram nenhum efeito citotóxico ao passo que os sistemas catiónicos de DODAB induziram grande toxicidade perante as concentrações de lípido e fármaco mais elevadas.

## 2. Perspetivas Futuras

Como perspetivas futuras pretende-se implementar várias melhorias e formas de continuar o trabalho:

1) Utilizar os resultados das várias combinações de formulações testadas e aplicar um desenho fatorial que permita de forma mais clara perceber se existe algum fator determinante no desenvolvimento das formulações;

2) Decorar os sistemas com polímeros hidrofílicos e avaliar como afetará a sua mucodifusão;

3) Realizar ensaios de permeação mais realistas através de monocamadas celulares;

4) Testar outras alternativas de formulação da emtricitabina;

5) Melhorar os testes de libertação controlada, usando membranas de diálise de poros maiores e meios de difusão miméticos do ambiente vaginal.



## Referências Bibliográficas

1. UNAIDS. Number of people living with HIV. (2017). at <<http://aidsinfo.unaids.org/>>
2. Splettstoesser, T. Diagram of the HIV virion. (2014). at <[www.scistyle.com](http://www.scistyle.com)>
3. I-BASE, H. The HIV lifecycle. (2017). at <<http://i-base.info/guides/art-in-pictures/the-hiv-lifecycle>>
4. Coutinho, C., Sarmiento, B. & das Neves, J. Targeted microbicides for preventing sexual HIV transmission. *J. Control. Release* **266**, 119–128 (2017).
5. Yang, X., Forier, K., Steukers, L., van Vlierberghe, S., Dubruel, P. *et al.* Immobilization of Pseudorabies Virus in Porcine Tracheal Respiratory Mucus Revealed by Single Particle Tracking. *PLoS One* **7**, 1-9 (2012).
6. das Neves, J., Amiji, M. & Sarmiento, B. Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: Friend or foe? *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **3**, 389–399 (2011).
7. Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T. *et al.* The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 2641–2646 (2006).
8. Lúcio, M. Estudos de anti-inflamatórios não esteróides em modelos membranares. [Tese de Doutoramento]. (Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2006).
9. das Neves, J., Nunes, R., Rodrigues, F. & Sarmiento, B. Nanomedicine in the development of anti-HIV microbicides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **103**, 57–75 (2016).
10. De Leeuw, J., De Vijlder, H. C., Bjerring, P. & Neumann, H. A. M. Liposomes in dermatology today. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **23**, 505–516 (2009).
11. Schmid, M. H. & Korting, H. C. Liposomes: a drug carrier system for topical treatment in dermatology. *Crit Rev Ther Drug Carr. Syst* **11**, 97–118 (1994).
12. Pierre, M. B. R. & Dos Santos Miranda Costa, I. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Arch. Dermatol. Res.* **303**, 607–621 (2011).
13. Jøraholmen, M. W., Vanić, Ž., Tho, I. & Škalko-Basnet, N. Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: Assuring localized drug effect. *Int. J. Pharm.* **472**, 94–101 (2014).
14. Berginc, K., Suljaković, S., Škalko-Basnet, N. & Kristl, A. Mucoadhesive liposomes as new formulation for vaginal delivery of curcumin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**, 40–46 (2014).
15. Pavelić, Ž., Škalko-Basnet, N., Filipović-Grčić, J., Martinac, A. & Jalšenjak, I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J. Control. Release* **106**, 34–

- 43 (2005).
16. Pavelić, Ž., Škalko-Basnet, N. & Jalšenjak, I. Liposomes containing drugs for treatment of vaginal infections. *Eur. J. Pharm. Sci.* **8**, 345–351 (1999).
  17. Pavelić, Ž., Škalko-Basnet, N. & Schubert, R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **219**, 139–149 (2001).
  18. Pavelić, Ž., Škalko-Basnet, N., Filipović-Grčić, J., Martinac, A. & Jalšenjak, I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J. Control. Release* **106**, 34–43 (2005).
  19. Pavelić, Ž., Škalko-Basnet, N. & Jalšenjak, I. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *Int. J. Pharm.* **301**, 140–148 (2005).
  20. das Neves, J., Amiji, M. M., Bahia, M. F. & Sarmiento, B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 458–477 (2010).
  21. Mohapatra, S., Boyapalle, S. & Mohapatra, S. Nanotechnology applications to HIV vaccines and microbicides. *J. Glob. Infect. Dis.* **4**, 62–68 (2012).
  22. Hernandez-Vargas, E. A. & Middleton, R. H. Modeling the three stages in HIV infection. *J. Theor. Biol.* **320**, 33–40 (2013).
  23. U.S. Department of Health and Human Services. The Stages of HIV Infection. [www.aidsinfo.nih.gov](http://www.aidsinfo.nih.gov) (2016). at <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/46/the-stages-of-hiv-infection>>
  24. Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* **384**, 258–271 (2014).
  25. Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 877–883 (2013).
  26. Nelson, A. G., Zhang, X., Ganapathi, U., Szekely, Z., Flexner, C.W. *et al.* Drug delivery strategies and systems for HIV/AIDS pre-exposure prophylaxis and treatment. *J. Control. Release* **219**, 669–680 (2015).
  27. Levy, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *Aids* **23**, 147–160 (2009).
  28. Cohen, M. S., Hellmann, N., Levy, J. A., DeCock, K. & Lange, J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *J. Clin. Invest.* **118**, 1244–54 (2008).
  29. Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan Thim, P. *et al.* Pneumocystis Carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *N. Engl. J.*

- Med.* **305**, 1425–1431 (1981).
30. Centers for Disease Control (CDC). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York and California. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **30**, 305–308 (1981).
  31. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, M. L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **220**, 868–871. (1983).
  32. Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A. & Shimabukuro, J. M. Isolation of Lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco Patients with AIDS. **225**, 840–843 (1984).
  33. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. **224**, 500–502 (1982).
  34. Schüpbach, J., Popovic, M., Gilden, R.V., Gonda, M.A., Sarngadharan, M.G. *et al.* Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* **224**, 503–5 (1984).
  35. Brun-Vezinet, F., Barre-Sinoussi, F., Saimot, A.G., Christol, D., Montagnier, L. *et al.* Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients With AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet* **323**, 1253–1256 (1984).
  36. Amiji, M. M., Vyas, T. K. & Shah, L. K. Role of nanotechnology in HIV/AIDS treatment: Potential to overcome the viral reservoir challenge. *Discov. Med.* **6**, 157–162 (2006).
  37. Dieffenbach, C. W. & Fauci, A. S. Thirty Years of HIV and AIDS: Future Challenges and Opportunities. *Ann. Intern. Med.* **154**, 766–772 (2011).
  38. Furin, J. J., Behforouz, H.L., Shin, S.S., Mukherjee, J.S., Bayona, J. *et al.* Expanding global HIV treatment: Case studies from the field. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1136**, 12–20 (2008).
  39. Mahajan, S. D., Aalinkeel, R., Law, W.C., Reynolds, J.L., Nair, B.B. *et al.* Anti-HIV-1 nanotherapeutics: Promises and challenges for the future. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 5301–5314 (2012).
  40. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *Fact sheet July 2018: 2017 Global HIV Statistics.* (2018).
  41. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *UNAIDS Data 2017.* (2017).
  42. Weston, R. & Marett, B. HIV infection: pathology and disease progression. *Clin. Pharm.* **1**, 387–392 (2009).
  43. Fettig, J., Swaminathan, M., Murrill, C.S. & Kaplan, J.E. *et al.* Global Epidemiology of HIV. *HHS Public Acces* **28**, 323–337 (2016).

44. Cortes Martins, H. *Infeção VIH e SIDA: a situação em Portugal a 31 de dezembro de 2016*. (2017). at <<http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4846>>
45. Direção-Geral da Saúde (DGS). *Programa Nacional para a infeção VIH/SIDA e Tuberculose*. (2017).
46. Gupta, U. & Jain, N. K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 478–490 (2010).
47. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *90-90-90: An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic*. (2017).
48. Mamo, T., Moseman, E.A., Kolishetti, N., Salvador-Morales, C., Shi, J. *et al.* Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomedicine* **5**, 269–285 (2010).
49. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, 1–22 (2011).
50. Hidalgo, J. A., MacArthur, R. D. & Crane, L. R. An overview of HIV infection and AIDS: etiology, pathogenesis, diagnosis, epidemiology, and occupational exposure. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **12**, 130–139 (2000).
51. Sued, O., Figueroa, M. I. & Cahn, P. Clinical challenges in HIV/AIDS: Hints for advancing prevention and patient management strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **103**, 5–19 (2016).
52. Mallipeddi, R. & Rohan, L. C. Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. *Int. J. Nanomedicine* **5**, 533–547 (2010).
53. Kirtane, A. R., Langer, R. & Traverso, G. Progress in Formulation-Based Approaches for Antiretrovirals. *J. Pharm. Sci.* **105**, 3471–3482 (2016).
54. Münch, J., Rücker, E., Ständker, Ludger, Adermann, K., Goffinet, C. *et al.* Semen-Derived Amyloid Fibrils Drastically Enhance HIV Infection. *Cell* **131**, 1059–1071 (2007).
55. Cone, R. A. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 75–85 (2009).
56. Leal, J., Smyth, H. D. C. & Ghosh, D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **532**, 555–572 (2017).
57. Aldunate, M., Tyssen, D., Johnson, A., Zakir, T., Sonza, S. *et al.* Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2015–2025 (2013).
58. das Neves, J., Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., Rodrigues, F. & Sarmiento, B. Vaginal Mucosa and Drug Delivery in *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*. John Wiley & Sons, Ltd. 99–132 (2014).

59. Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M. *et al.* Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Immunity* **26**, 257–270 (2007).
60. Haase, A. T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**, 217–223 (2010).
61. Cao, S. & Woodrow, K. A. Nanotechnology approaches to eradicating HIV reservoirs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 30321-30327 (2018).
62. Churchill, M. J., Deeks, S. G., Margolis, D. M., Siliciano, R. F. & Swanstrom, R. HIV reservoirs: What, where and how to target them. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 55–60 (2015).
63. Venzke, S. & Keppler, O. T. Role of macrophages in HIV infection and persistence. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2**, 613–626 (2006).
64. Schragar, L. K. & D'Souza, M. P. Cellular and anatomic reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *J. Am. Med. Assoc.* **280**, 67–71 (1998).
65. Wong, H. L., Chattopadhyay, N., Wu, X. Y. & Bendayan, R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 503–517 (2010).
66. Palmisano, L. & Vella, S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Ann. Ist. Super. Sanita* **47**, 44–48 (2011).
67. Desai, M., Dikshit, R. & Iyer, G. Antiretroviral drugs: Critical issues and recent advances. *Indian J. Pharmacol.* **44**, 288 (2012).
68. Melhuish, A. & Lewthwaite, P. Natural history of HIV and AIDS. *Med. (United Kingdom)* **46**, 356–361 (2018).
69. U.S. Food & Drug Administration. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. [www.fda.gov](http://www.fda.gov) (2017). at <https://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>
70. Lisziewicz, J. & Toke, E. R. Nanomedicine applications towards the cure of HIV. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **9**, 28–38 (2013).
71. Nuttall, J. Microbicides in the prevention of HIV infection: current status and future directions. *Drugs* **70**, 1231–1243 (2010).
72. Garg, A. B., Nuttall, J. & Romano, J. The future of HIV microbicides: Challenges and opportunities. *Antivir. Chem. Chemother.* **19**, 143–150 (2009).
73. Simon, V., Ho, D. & Karim, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *Lancet* **368**, 489–504 (2010).

74. Kumar, L., Verma, S., Prasad, D.N., Bhardwaj, A., Vaidya, B. *et al.* Nanotechnology: A magic bullet for HIV AIDS treatment. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **43**, 71–86 (2014).
75. Siccardi, M., Martin, P., McDonald, Tom O., Liptrott, Neil J., Giardiello, M. *et al.* Nanomedicines for HIV therapy. *Ther. Deliv.* **4**, 153–156 (2013).
76. Roy, U., Barber, P., Sarmiento, B. & Nair, M. The potential of HIV-1 nanotherapeutics : from in vitro studies to clinical trials. *Nanomedicine* **10**, 3597–3609 (2015).
77. Macht, D. I. The absorption of drugs and poisons through the vagina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **10**, 509–522 (1918).
78. Hussain, A. & Ahsan, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. *J. Control. Release* **103**, 301–313 (2005).
79. Alexander, J., N., Baker, E., Kaptein, M., Karck, U., Miller, L. *et al.* Why consider vaginal drug administration? *Fertil. Steril.* **82**, 1–12 (2004).
80. Baeten, J. M. & Celum, C. L. Systemic and topical drugs for the prevention of HIV infection: Antiretroviral per-exposure prophylaxis. *Annu. Rev. Med.* **64**, 219–232 (2014).
81. das Neves, J., Michiels, J., Ariën, K.K., Vanham, G., Amiji, M. *et al.* Polymeric nanoparticles affect the intracellular delivery, antiretroviral activity and cytotoxicity of the microbicide drug candidate dapivirine. *Pharm. Res.* **29**, 1468–1484 (2012).
82. Padian, N. S., Buvé, A., Balkus, J., Serwadda, D. & Cates, W. Biomedical interventions to prevent HIV infection: evidence, challenges, and way forward. *Lancet* **372**, 585–599 (2008).
83. Lederman, M. M., Offord, R. E. & Hartley, O. Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 371–382 (2006).
84. das Neves, J., Martins, J. P. & Sarmiento, B. Will dapivirine redeem the promises of anti-HIV microbicides? Overview of product design and clinical testing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **103**, 20–32 (2016).
85. Food and Drug Administration. *TRUVADA* ®. (2006).
86. European Medicines Agency. First medicine for HIV pre-exposure prophylaxis recommended for approval in the EU. *www.ema.europa.eu* (2016). at <<https://www.ema.europa.eu/en/news/first-medicine-hiv-pre-exposure-prophylaxis-recommended-approval-eu>>
87. World Health Organization. HIV/AIDS: Pre-exposure prophylaxis. *www.who.int* (2018). at <<https://www.who.int/hiv/topics/prep/en/>>
88. Trang TP, Dong BJ, Kojima N, K. J. Drug safety evaluation of oral tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine for pre-exposure prophylaxis for human immunodeficiency virus infection. *Expert*

- Opin Drug Saf.* **15**, 1287–1294 (2016).
89. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=60877. at <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60877>>
  90. Clay, P. G., Taylor, T. A. H., Glaros, A. G. & Mccandless, D. “ One pill , once daily ”: what clinicians need to know about Atripla <sup>™</sup>. **4**, 291–302 (2008).
  91. Kearney, B. P., Flaherty, J. F. & Shah, J. Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **43**, 595–612 (2004).
  92. Kim, P. S. & Read, S. W. Nanotechnology and HIV: Potential applications for treatment and prevention. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2**, 693–702 (2010).
  93. Tatham, L. M., Rannard, S. P. & Owen, A. Nanoformulation strategies for the enhanced oral bioavailability of antiretroviral therapeutics. *Ther. Deliv.* **6**, 469–490 (2015).
  94. Sosnik, A. & Augustine, R. Challenges in oral drug delivery of antiretrovirals and the innovative strategies to overcome them. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **103**, 105–120 (2016).
  95. O’Neill, M. J., Bourre, L., Melgar, S. & O’Driscoll, C. M. Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: Physiological barriers and preclinical models. *Drug Discov. Today* **16**, 203–218 (2011).
  96. Grant, R. M., Lama, J.R., Anderson, P.L., McMahan, V., Liu, A.Y. *et al.* Preexposure Chemoprophylaxis for HIV Prevention in Men Who Have Sex with Men. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1595–1606 (2011).
  97. Deutsch, M. B., Glidden, D.V., Sevelius, J., Keatley, J., McMahan, V. *et al.* HIV pre-exposure prophylaxis in transgender women: A subgroup analysis of the iPrEx trial. *Lancet HIV* **2**, 512–519 (2015).
  98. Molina, J.-M., Capitant, C., Spire, B., Pialoux, G., Cotte, L. *et al.* On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2237–2246 (2015).
  99. Sheth, A. N., Rolle, C. P. & Gandhi, M. HIV pre-exposure prophylaxis for women. *J. virus Erad.* **2**, 149–55 (2016).
  100. Baeten, J. M., Donnell, D., Ndase, P., Mugo, N.R., Campbell, J.D. *et al.* Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *N. Engl. J. Med.* **367**, 399–410 (2012).
  101. Thigpen, M. C., Kebaabetswe, P.M., Paxton, L.A., Smith, D.K., Rose, C.E. *et al.* Antiretroviral Preexposure Prophylaxis for Heterosexual HIV Transmission in Botswana. *N. Engl. J. Med.* **367**, 423–434 (2012).
  102. Choopanya, K., Martin, M., Suntharasamai, P., Sangkum, U., Mock, P.A. *et al.* Antiretroviral

- prophylaxis for HIV infection in injecting drug users in Bangkok, Thailand (the Bangkok Tenofovir Study): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **381**, 2083–2090 (2013).
103. Van Damme, L., Corneli, A., Ahmed, K., Agot, K., Lombaard, J. *et al.* Preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N. Engl. J. Med.* **367**, 411–22 (2012).
  104. Marrazzo, J. M., Ramjee, G., Richardson, B.A., Gomez, K., Mgodli, N. *et al.* Tenofovir-Based Preexposure Prophylaxis for HIV Infection among African Women. *N. Engl. J. Med.* **372**, 509–518 (2015).
  105. Shattock, R. J., Rosenberg, Z., Wilen, C. B., Tilton, J. C. & Doms, R. W. Microbicides : Topical Prevention against HIV Microbicides : Topical Prevention against HIV. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, 1–17 (2012).
  106. Cottrell, M. L. & Kashuba, A. D. M. Topical microbicides and HIV prevention in the female genital tract. *J. Clin. Pharmacol.* **54**, 603–615 (2014).
  107. das Neves, J. & Sarmento, B. Part II - Delivery Strategies for Specific Mucosal Sites: Vaginal Delivery of Biopharmaceuticals in *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies*. Springer Science. 261–280 (2014).
  108. Lúcio, M., M. Lopes, C., Silva, J. & C.D. Real Oliveira, M. E. Lipid-based colloidal carriers for topical application of antiviral drugs in *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications*. Pharmaceutical Nanotechnology Series. 565–622 (2018).
  109. das Neves, J. & Sarmento, B. Chapter 8: Vaginal Microbicide Films in *Drug Delivery and Development of Anti-HIV Microbicides*. Springer. 291–317 (2014).
  110. Abdool Karim, Q. *et al.* Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science (80-. ).* **329**, 1168–1174 (2011).
  111. Rees, H. *et al.* FACTS 001 Phase III Trial of Pericoital Tenofovir 1% Gel for HIV Prevention in Women. in *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) O-1* (2015). at <<http://www.croiconference.org/sessions/facts-001-phase-iii-trial-pericoital-tenofovir-1-gel-hiv-prevention-women>>
  112. Baeten, J. M. *et al.* Use of a Vaginal Ring Containing Dapivirine for HIV-1 Prevention in Women. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2121–2132 (2016).
  113. Nel, A., Kapiga, S., Bekker, L-G., Devlin, B., Borremans, M. *et al.* Safety and Efficacy of Dapivirine Vaginal Ring for HIV-1 Prevention in African Women. in *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) O-9* (2016).

114. National Science and Technology Council. The National Nanotechnology Initiative - Strategic Plan. *Nanotechnology* (2007).
115. Grand View Research, Inc. Nanomedicine Market Size Worth. (2017). at <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-nanomedicine-market>>
116. das Neves, J. & Sarmiento, B. Part I - Biology of Mucosal Sites: Mucus as a Barrier for Biopharmaceuticals and Drug Delivery Systems in *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies*. Springer. 59–97 (2014).
117. du Toit, L. C., Pillay, V. & Choonara, Y. E. Nano-microbicides: Challenges in drug delivery, patient ethics and intellectual property in the war against HIV/AIDS. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 532–546 (2010).
118. Kalepu, S., Manthina, M. & Padavala, V. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm. Sin. B* **3**, 361–372 (2013).
119. Attama, A. a, Momoh, M. A. & Builders, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. *Recent Adv. Nov. Drug Carr. Syst.* 107–140 (2012). doi:10.5772/50486
120. Kim, S., Scheerer, S., Geyer, M. A. & Howell, S. B. Direct cerebrospinal fluid delivery of an antiretroviral agent using multivesicular liposomes. *J. Infect. Dis.* **162**, 750–752 (1990).
121. Philips, N. C., Skamene, E. & Tsoukas, C. Liposomal Encapsulation of 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) Results in Decreased Bone Marrow Toxicity and Enhanced Activity Against Murine AIDS-Induced Immunosuppression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **4**, 959–966 (1991).
122. Phillips, N. C. & Tsoukas, C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **79**, 1137–1143 (1992).
123. Désormeaux, A., Harvie, P., Perron, S., Makabi-Panzu, B., Beauchamp, D. *et al.* Antiviral efficacy, intracellular uptake and pharmacokinetics of free and liposome-encapsulated 2',3'-dideoxyinosine. *AIDS (London, England)* **8**, 1545–53 (1994).
124. Makabi-Panzu, B., Lessard, C., Beauchamp, D., Désormeaux, A., Poulin, L. *et al.* Uptake and binding of Liposomal 2', 3'-Dideoxycytidine by RAW 264.7 Cells: A Three-Step Process. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology* **8**, 227–235 (1995).
125. Harvie, P., Désormeaux, A., Bergeron, M.C., Tremblay, M., Beauchamp, D. *et al.* Comparative pharmacokinetics, distributions in tissue, and interactions with blood proteins of conventional and sterically stabilized liposomes containing 2',3'-dideoxyinosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**,

- 225–229 (1996).
126. Katragadda, A., Bridgman, R. & Betageri, G. Effect of Liposome Composition and Cholesterol on the Cellular Uptake of Stavudine by Human Monocyte/Macrophages. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **5**, 483–493 (2000).
  127. Kinman, L., Brodie, S.J., Tsai, C.C., Bui, T., Larsen, K. *et al.* Lipid-drug association enhanced HIV-1 protease inhibitor indinavir localization in lymphoid tissues and viral load reduction: a proof of concept study in HIV-2287-infected macaques. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **34**, 387–397 (2003).
  128. Jin, S. X., Bi, D.Z., Wang, J., Wang, Y.Z., Hu, H.G. *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of zidovudine in rats following intravenous administration of zidovudine myristate loaded liposomes. *Pharmazie* **60**, 840–843 (2005).
  129. Garg, M., Asthana, A., Agashe, H. B., Agrawal, G. P. & Jain, N. K. Stavudine-loaded mannosylated liposomes: in-vitro anti-HIV-I activity, tissue distribution and pharmacokinetics. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 605–616 (2006).
  130. Garg, M. & Jain, N. K. Reduced hematopoietic toxicity, enhanced cellular uptake and altered pharmacokinetics of azidothymidine loaded galactosylated liposomes. *J. Drug Target.* **14**, 1–11 (2006).
  131. Jain, S., Tiwary, a K. & Jain, N. K. Sustained and targeted delivery of an anti-HIV agent using elastic liposomal formulation: mechanism of action. *Curr. Drug Deliv.* **3**, 157–166 (2006).
  132. Garg, M., Dutta, T. & Jain, N. K. Reduced hepatic toxicity, enhanced cellular uptake and altered pharmacokinetics of stavudine loaded galactosylated liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **67**, 76–85 (2007).
  133. Lalanne, M., Paci, A., Andrieux, K., Dereuddre-Bosquet, N., Clayette, P. *et al.* Synthesis and biological evaluation of two glycerolipidic prodrugs of didanosine for direct lymphatic delivery against HIV. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **17**, 2237–2240 (2007).
  134. Kapitza, S. B., Michel, B. R., van Hoogevest, P., Leigh, M. L. S. & Imanidis, G. Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 146–158 (2007).
  135. Jain, S., Tiwary, a K. & Jain, N. K. PEGylated elastic liposomal formulation for lymphatic targeting of zidovudine. *Curr. Drug Deliv.* **5**, 275–281 (2008).
  136. Kaur, C. D., Nahar, M. & Jain, N. K. Lymphatic targeting of zidovudine using surface-engineered liposomes. *J. Drug Target.* **16**, 798–805 (2008).

137. Nayak, D., Boxi, A., Ashe, S., Thathapudi, N. C. & Nayak, B. Stavudine loaded gelatin liposomes for HIV therapy: Preparation, characterization and in vitro cytotoxic evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **73**, 406–416 (2017).
138. Spinks, C. B., Zidan, A. S. & Faustino, P. J. Pharmaceutical characterization of novel tenofovir liposomal formulations for enhanced oral drug delivery : in vitro pharmaceutics and Caco-2 permeability investigations. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **9**, 29–38 (2017).
139. Jain, S., Tiwary, A. K., Sapra, B. & Jain, N. K. Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine. *AAPS PharmSciTech* **8**, 249–257 (2007).
140. Ramana, L. N., Sharma, S., Sethuraman, S., Ranga, U. & Krishnan, U. M. Stealth anti-CD4 conjugated immunoliposomes with dual antiretroviral drugs - Modern Trojan horses to combat HIV. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **89**, 300–311 (2015).
141. Ahammed, V., Narayan, R., Paul, J., Nayak, Y., Roy, B. *et al.* Development and in vivo evaluation of functionalized ritonavir proliposomes for lymphatic targeting. *Life Sci.* **183**, 11–20 (2017).
142. Heiati, H., Tawashi, R. & Phillips, N. C. Solid lipid nanoparticles as drug carriers II. Plasma stability and biodistribution of solid lipid nanoparticles containing the lipophilic prodrug 3%-azido-3%-deoxythymidine palmitate in mice. *Int. J. Pharm.* **174**, 71–80 (1998).
143. Kuo, Y. C. & Chung, C. Y. Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **88**, 682–690 (2011).
144. Aji Alex, M. R., Chacko, A. J., Jose, S. & Souto, E. B. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* **42**, 11–18 (2011).
145. Alukda, D., Sturgis, T. & Youan, B.-B. C. Formulation of Tenofovir-Loaded Functionalized Solid Lipid Nanoparticles Intended for HIV Prevention. *Pharm. Nanotechnol.* **100**, 3345–3356 (2011).
146. Kuo, Y.-C. & Chung, J.-F. Physicochemical properties of nevirapine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **83**, 299–306 (2011).
147. Tiwari, R. & Pathak, K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int. J. Pharm.* **415**, 232–243 (2011).
148. Kuo, Y. C. & Ko, H. F. Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 4818–4830 (2013).
149. Vyas, A., Jain, A., Hurkat, P., Jain, A. & Jain, S. K. Targeting of AIDS related encephalopathy using phenylalanine anchored lipidic nanocarrier. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **131**, 155–161

- (2015).
150. Makwana, V., Jain, R., Patel, K., Nivsarkar, M. & Joshi, A. Solid lipid nanoparticles (SLN) of Efavirenz as lymph targeting drug delivery system: Elucidation of mechanism of uptake using chylomicron flow blocking approach. *Int. J. Pharm.* **495**, 439–446 (2015).
  151. Joshy, K. S., Sharma, C.P., Kalarikkal, N., Sandeep, K., Thomas, S. *et al.* Evaluation of in-vitro cytotoxicity and cellular uptake efficiency of zidovudine-loaded solid lipid nanoparticles modified with Aloe Vera in glioma cells. *Mater. Sci. Eng. C* **66**, 40–50 (2016).
  152. Agarwal, G. & Bhargava, S. Development of engineered nanocarrier for controlled delivery of a protease inhibitor. *Int. J. Infect. Dis.* **45**, 253–254 (2016).
  153. Löbenberg, R. & Kreuter, J. Macrophage targeting of azidothymidine: a promising strategy for AIDS therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1709–1715 (1996).
  154. Jindal, A. B., Bachhav, S. S. & Devarajan, P. V. In situ hybrid nano drug delivery system (IHN-DDS) of antiretroviral drug for simultaneous targeting to multiple viral reservoirs: An in vivo proof of concept. *Int. J. Pharm.* **521**, 196–203 (2017).
  155. Vyas, S. P., Subhedar, R. & Jain, S. Development and characterization of emulsomes for sustained and targeted delivery of an antiviral agent to liver. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 321–326 (2006).
  156. Vyas, T. K., Shahiwala, A. & Amiji, M. M. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int. J. Pharm.* **347**, 93–101 (2008).
  157. Bangham, A. D. & Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **8**, 2-10 (1964).
  158. He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z. *et al.* Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B.* **9**, 36-48 (2018).
  159. Lúcio, M., Lima, J. L. F. C. & Reis, S. Drug-Membrane Interactions : Significance for Medicinal Chemistry. *Current Medicinal Chemistry.* **17**, 1795–1809 (2010).
  160. Bezerra, T., Loureiro, L., Carvalho, A., Oliveira, M. E.C.D.Real, Sarmiento, B. *et al.* Progress in Neurobiology Lipid nanocarriers loaded with natural compounds : Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases ? *Prog. Neurobiol.* **168**, 21–41 (2018).
  161. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 26-27 (1965).
  162. Gregoriadis, G., Leathwood, P. D. & Ryman, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* **14**, 95–99 (1971).

163. Gregoriadis, G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* **36**, 292–296 (1973).
164. Gregoriadis, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. *N. Engl. J. Med.* **295**, 765–770 (1976).
165. Weissig, V., Pettinger, T. & Murdock, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4357–4373 (2014).
166. Witten, J., Samad, T. & Ribbeck, K. Selective permeability of mucus barriers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **52**, 124–133 (2018).
167. Li, L. D., Crouzier, T., Sarkar, A., Dunphy, L., Han, J. *et al.* Spatial configuration and composition of charge modulates transport into a mucin hydrogel barrier. *Biophys. J.* **105**, 1357–1365 (2013).
168. Lai, S. K., Wang, Y. Y. & Hanes, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 158–171 (2009).
169. das Neves, J., Bahia, M. F., Amiji, M. M. & Sarmiento, B. Mucoadhesive nanomedicines: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 1085–1104 (2011).
170. Berardi, A. & Bisharat, L. Nanotechnology systems for oral drug delivery: challenges and opportunities in *Nanotechnology in Drug Delivery*. One Central Press (UK). 52–84 (2014).
171. Lai, S. K., O'Hanlon, D.E., Harrold, S., Man, S.T., Wang, Y.-Y. *et al.* Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1482–1487 (2007).
172. Ensign, L. M., Schneider, C., Soo Suk, J., Cone, R. & Hanes, J. Mucus Penetrating Nanoparticles: Biophysical Tool and Method of Drug and Gene Delivery. *Adv. Mater.* **24**, 3887–3894 (2012).
173. das Neves, J. & Bahia, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **318**, 1–14 (2006).
174. Antimisiaris, S. G. & Mourtas, S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **92**, 123–145 (2015).
175. Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J.P., Abriata Lee, R.J. *et al.* Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123**, 345–363 (2014).
176. McKenzie, M., Betts, D., Suh, A., Bui, K., Kim, L.D. *et al.* Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-soluble drugs. *Molecules* **20**, 20397–20408 (2015).
177. Simões, A., Veiga, F., Vitorino, C. & Figueiras, A. A Tutorial for Developing a Topical Cream Formulation Based on the Quality by Design Approach. *J. Pharm. Sci.* **107**, 2653–2662 (2018).

178. Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M.A., Hoag, S.W., Polli, J. *et al.* Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J.* **16**, 771–783 (2014).
179. Yu, L. X. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. *Pharm. Res.* **25**, 781–791 (2008).
180. Avdeef, A. Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State). *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 277–351 (2001).
181. H. Kerns, E. & Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to toxicity optimization. Journal of Experimental Psychology: General* **136**, (2008).
182. van de Waterbeemd, H. & Gifford, E. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 192–204 (2003).
183. Kerns, E. H. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *J. Pharm. Sci.* **90**, 1838–1858 (2001).
184. Buckingham, A. D., Del Bene, J. E. & McDowell, S. A. C. The hydrogen bond. *Chem. Phys. Lett.* **463**, 1–10 (2008).
185. Clark, D. E. In silico prediction of blood–brain barrier permeation. *Drug Discov. Today* **8**, 927–933 (2003).
186. Krämer, S. D. Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2**, 373–380 (1999).
187. Palm, K., Stenberg, P., Luthman, K. & Artursson, P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* **14**, 568–571 (1997).
188. Stenberg, P. *et al.* Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity. *Pharm. Res.* **16**, 1520–1526 (1999).
189. Palm, K., Luthman, K., Ungell, A. L., Strandlund, G. & Artursson, P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J. Pharm. Sci.* **85**, 32–39 (1996).
190. Palm, K., Luthman, K., Ungell, A.L., Strandlund, G., Beigi, F. *et al.* Evaluation of dynamic polar molecular surface area as predictor of drug absorption: Comparison with other computational and experimental predictors. *J. Med. Chem.* **41**, 5382–5392 (1998).
191. Stenberg, P., Luthman, K. & Artursson, P. Prediction of membrane permeability to peptides from calculated dynamic molecular surface properties. *Pharm. Res.* **16**, 205–212 (1999).
192. Clark, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* **88**, 815–821 (1999).

193. Kelder, J., Grootenhuis, P. D. J., Bayada, D. M., Delbressine, L. P. C. & Ploemen, J. P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* **16**, 1514–1519 (1999).
194. Van De Waterbeemd, H., Camenisch, G., Folkers, G., Chretien, J. R. & Raevsky, O. A. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J. Drug Target.* **6**, 151–165 (1998).
195. Liu, X., Tu, M., Kelly, R. S., Chen, C. & Smith, B. J. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 132–139 (2004).
196. Di, L. & Kerns, E. H. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 402–408 (2003).
197. Silvina, M., Tomás, J. & Nader-macias, M. E. Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 732–739 (2007).
198. Hollmann, A., Matos, P. M., Augusto, M. T., Castanho, M. A. R. B. & Santos, N. C. Conjugation of Cholesterol to HIV-1 Fusion Inhibitor C34 Increases Peptide-Membrane Interactions Potentiating Its Action. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
199. Fernandes, E., Soares, T. B., Gonçalves, H. & Lúcio, M. Spectroscopic Studies as a Toolbox for Biophysical and Chemical Characterization of Lipid-Based Nanotherapeutics. *Front. Chem.* **6**, 1–20 (2018).
200. Perkampus, H.-H. *UV/VIS Spectroscopy and Its Applications*. 1st Editon, Springer Laboratory. (1992).
201. Weckhuysen, B. M. Chapter 12: Ultraviolet-Visible Spectroscopy in *In-situ Spectroscopy of Catalysts*. American Scientific Publishers. 255–270 (2004).
202. Rene Albani, J. Chapter 1: Absorption Spectroscopy Theory in *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Blackwell Publishing. 1–12 (2008).
203. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **8**, 409–427 (2016).
204. Hupfeld, S., Holsæter, A. M., Skar, M., Frantzen, C. B. & Brandl, M. Liposome Size Analysis by Dynamic/Static Light Scattering upon Size Exclusion-/Field Flow-Fractionation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 3025–3031 (2006).
205. Malvern Instruments Ltd Worcs. *Zetasizer Nano Series User Manual*. (2004).
206. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R. *et al.* Impact

- of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* **10**, 1–17 (2018).
207. Chen, M., Liu, X. & Fahr, A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int. J. Pharm.* **408**, 223–234 (2011).
208. Simões, A., Veiga, F., Figueiras, A. & Vitorino, C. A practical framework for implementing Quality by Design to the development of topical drug products: Nanosystem-based dosage forms. *Int. J. Pharm.* **548**, 385–399 (2018).
209. Lúcio, M., Lima, J. L. F. C. & Reis, S. Drug-Membrane Interactions: Molecular Mechanisms Underlying Therapeutic and Toxic Effects of Drugs in Ideas in *Chemistry and Molecular Sciences: Where Chemistry Meets Life*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 191–214 (2010).
210. Michel, N., Fabiano, A. S., Polidori, A., Jack, R. & Pucci, B. Determination of phase transition temperatures of lipids by light scattering. *Chem. Phys. Lipids* **139**, 11–19 (2006).
211. Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M. & Jones, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 4439–4451 (2010).
212. Dendisová, M., Jenišťová, A., Parchaňská-Kokaislová, A., Matějka, P., Prokopec, V. *et al.* The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Anal. Chim. Acta* **1031**, 1–14 (2018).
213. Gaffney, J. S., Marley, N. A. & Jones, D. E. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in *Characterization of Materials*. John Wiley & Sons, Ltd. (2012).
214. Alvarez-Ordóñez, A., Mouwen, D. J. M., López, M. & Prieto, M. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* **84**, 369–378 (2011).
215. Ramer, G. & Lendl, B. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. 1–27 (2013).
216. Mudunkotuwa, I. A., Minshid, A. Al & Grassian, V. H. ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid-solid interface in environmentally and biologically relevant media. *Analyst* **139**, 870–881 (2014).
217. Nirschl, H. & Guo, X. Characterisation of structured and functionalised particles by small-angle X-ray scattering (SAXS). *Chem. Eng. Res. Des.* **136**, 431–446 (2018).
218. Tyler, A. I. I., V. Law, R. & M. Seddon, J. X-Ray Diffraction of Lipid Model Membranes in *Methods*

- in Membrane Lipids Series Editor*, 199–224 (2015).
219. Mourtas, S., Haikou, M., Theodoropoulou, M., Tsakiroglou, C. & Antimisiaris, S. G. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: A systematic study. *J. Colloid Interface Sci.* **317**, 611–619 (2008).
  220. U.S. Department of Health and Human Services. In vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. *Guid. Ind. SUPAC-SS Non-sterile Semisolid Dos. Forms. Scale-up Postapproval Chang. Chem. Manuf. Control.* 19–24 (1997).
  221. Ng, S.-F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., Meidan, V. & Eccleston, G. M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* **11**, 1432–1441 (2010).
  222. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
  223. Di, L. & Kerns, E. H. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. Elsevier. 1-526 (2008).
  224. Ferguson, L. M. & Rohan, L. C. The importance of the vaginal delivery route for antiretrovirals in HIV prevention. *Ther. Deliv.* **2**, 1535–50 (2011).
  225. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3–25 (1997).
  226. Van Der Bijl, P. & Van Eyk, A. D. Comparative in vitro permeability of human vaginal, small intestinal and colonic mucosa. *Int. J. Pharm.* **261**, 147–152 (2003).
  227. Berginc, K., Škalko-Basnet, N., Basnet, P. & Kristl, A. Development and Evaluation of an In Vitro Vaginal Model for Assessment of Drug's Biopharmaceutical Properties: Curcumin. *AAPS PharmSciTech* **13**, 1045–1053 (2012).
  228. European Medicines Agency. *Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Product-Specific Bioequivalence Guidance*. (2013).
  229. Center For Drug Evaluation and Research. *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(S)*. (2011).
  230. Benet, L. Z., Broccatelli, F. & Oprea, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. *AAPS J.* **13**, 519–547 (2011).
  231. Acarturk, F. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **3**, 193–205 (2009).

232. Chen, E. Y. T., Wang, Y. C., Chen, C. S. & Chin, W. C. Functionalized positive nanoparticles reduce mucin swelling and dispersion. *PLoS One* **5**, 1–9 (2010).
233. Oliveira, A. C. N., Nogueira, S.S., Gonçalves, O., Cerqueira, M.F., Alpuim, P. *et al.* Role of counterion and: Helper lipid content in the design and properties of nanocarrier systems: A biophysical study in 2D and 3D lipid assemblies. *RSC Adv.* **6**, 47730–47740 (2016).
234. Feitosa, E., Barreleiro, P. C. A. & Olofsson, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. *Chem. Phys. Lipids* **105**, 201–213 (2000).
235. Lewis, R. N. A. H., Zhang, Y. P. & McElhaney, R. N. Calorimetric and spectroscopic studies of the phase behavior and organization of lipid bilayer model membranes composed of binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1668**, 203–214 (2005).
236. Klemetsrud, T., Jonassen, H., Hiorth, M., Kjøniksen, A. L. & Smistad, G. Studies on pectin-coated liposomes and their interaction with mucin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **103**, 158–165 (2013).
237. Brandão, E., Santos Silva, M., Garcia-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V. *et al.* Molecular Study of Mucin-Procyanidin Interaction by Fluorescence Quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chem.* **228**, 427–434 (2017).
238. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006).
239. Ghica, M. V., Hîrjău, M., Lupuleasa, D. & Dinu-Pîrvu, C. E. Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels. *Molecules* **21**, 1–17 (2016).
240. Lee, C. H., Moturi, V. & Lee, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J. Control. Release* **136**, 88–98 (2009).
241. Zidan, A. S., Spinks, C., Fortunak, J., Habib, M. & Khan, M. A. Near-Infrared Investigations of Novel Anti-HIV Tenofovir Liposomes. *AAPS J.* **12**, 202–214 (2010).
242. Zidan, A. S., Spinks, C. B., Habib, M. J. & Khan, M. A. Formulation and transport properties of tenofovir loaded liposomes through Caco-2 cell model. *J. Liposome Res.* **23**, 318–326 (2013).
243. Jain, M. K. & Wu, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. *J. Membr. Biol.* **34**, 157–201 (1977).
244. Susan, M. & Sturtevant, J. M. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 3862–3866 (1976).

245. da Rocha, M. E. B. Desenvolvimento de uma formulação lipossomal para entrega de um fármaco anticancerígeno [Tese de Mestrado]. (Universidade do Minho, 2014).
246. Kiselev, M. A. & Lombardo, D. Structural characterization in mixed lipid membrane systems by neutron and X-ray scattering. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 3700–3717 (2017).
247. Lúcio, M., Bringezu, F., Reis, S., Lima, J. L. F. C. & Brezesinski, G. Binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to DPPC: Structure and thermodynamic aspects. *Langmuir* **24**, 4132–4139 (2008).
248. Arrondo, J. L. R., Goñi, F. M. & Macarulla, J. M. Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **794**, 165–168 (1984).
249. Hübner, W. & Blume, A. Interactions at the lipid-water interface. *Chem. Phys. Lipids* **96**, 99–123 (1998).
250. Belletti, D., Tosi, G., Forni, F., Gamberini, M.C., Baraldi, C. *et al.* Chemico-physical investigation of tenofovir loaded polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **436**, 753–763 (2012).
251. Patil, S., Kadam, C. & Pokharkar, V. QbD based approach for optimization of Tenofovir disoproxil fumarate loaded liquid crystal precursor with improved permeability. *J. Adv. Res.* **8**, 607–616 (2017).
252. Shailender, J., Ravi, P. R., Saha, P., Dalvi, A. & Myneni, S. Tenofovir disoproxil fumarate loaded PLGA nanoparticles for enhanced oral absorption: Effect of experimental variables and in vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **158**, 1-32 (2017).
253. Xu, X., Khan, M. A. & Burgess, D. J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int. J. Pharm.* **426**, 211–218 (2012).
254. Bhardwaj, U. & Burgess, D. J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *Int. J. Pharm.* **388**, 181–189 (2010).
255. Cautela, M. P., Moshe, H., Sosnik, A., Sarmiento, B. & das Neves, J. Composite films for vaginal delivery of tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **17**, 1–8 (2018).
256. International Organization for Standardization. *ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity.* (2009).
257. Melorose, J., Perroy, R. & Careas, S. *Nanocosmetics and Nanomedicines New Approaches for Skin Care. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (2011).



# ANEXOS



## ANEXO 1

### Construção das curvas de Calibração de TDF e FTC

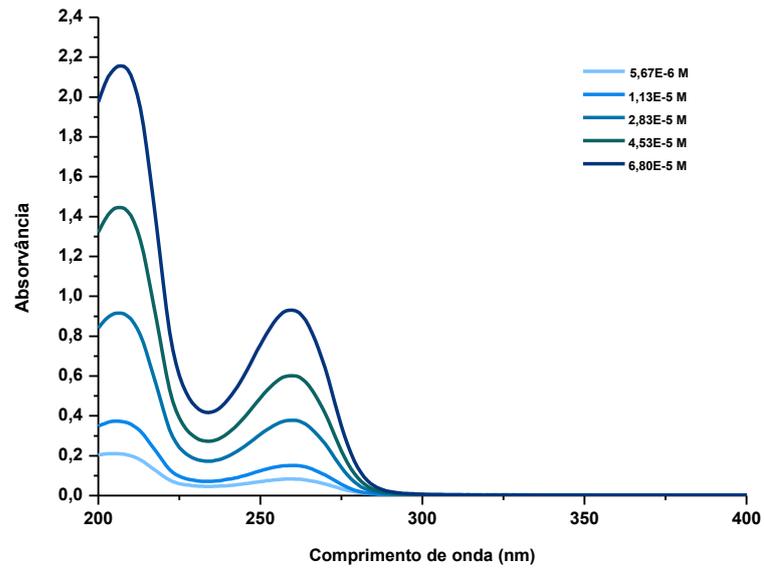


Figura A1.1-- Espectros de absorção do tenofovir disoproxil fumarato em água.

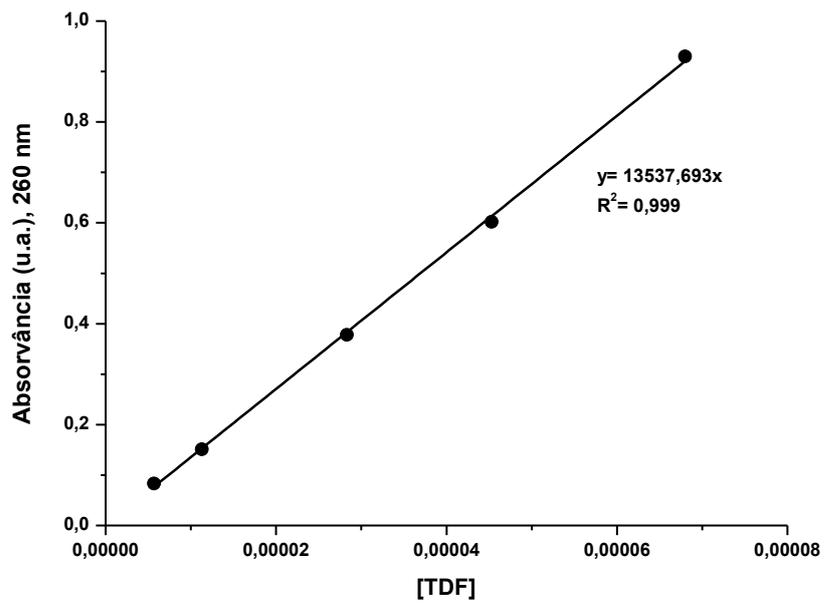


Figura A1.2 - Reta de calibração do TDF em água, num comprimento de onda máximo de 260 nm.

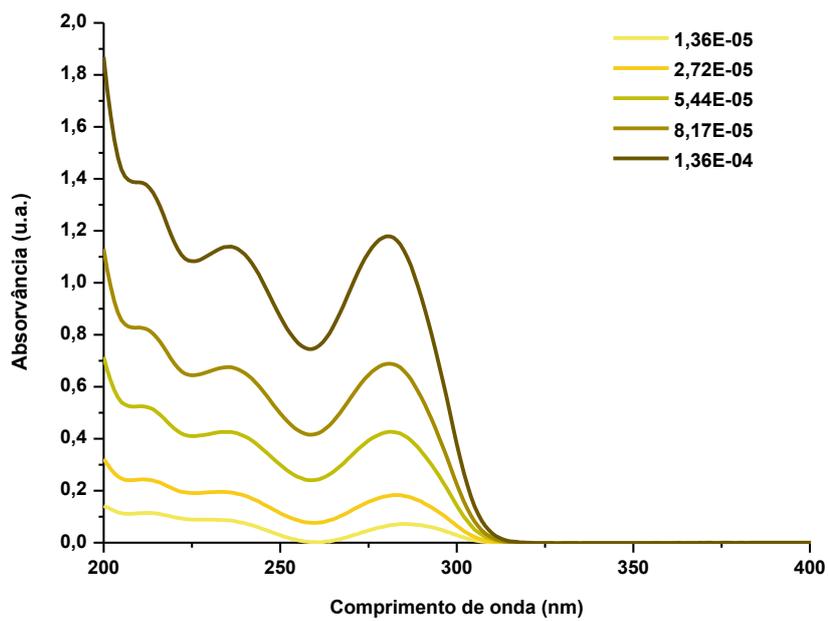


Figura A1.3 - Espectros de absorção da emtricitabina em água

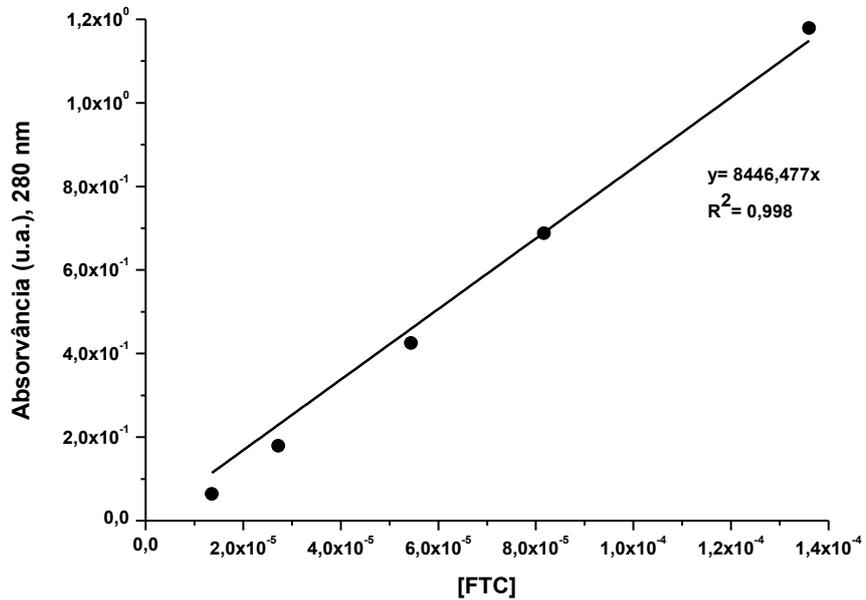


Figura A1.4 - Retas de calibração da FTC em água, num comprimento de onda máximo de 280 nm.

**ANEXO 2**  
**ESTUDO DE EFICÁCIA DE ENCAPSULAMENTO**

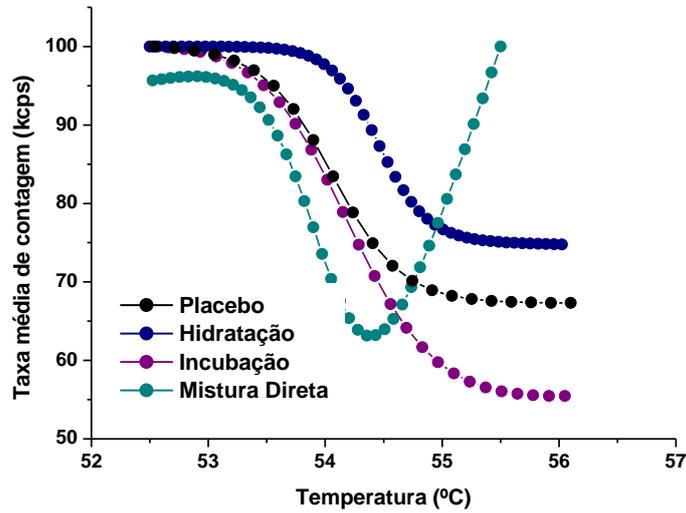
**Tabela A2.1-** Valores detalhados das eficácias de encapsulamento do TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M) em nanossistemas com crescentes graus de rigidez (4 mM) através de três metodologias distintas: hidratação, mistura direta e incubação.

<b>Eficácia Encapsulamento (%)</b>			
	<b>HIDRATAÇÃO</b>	<b>MISTURA DIRETA</b>	<b>INCUBAÇÃO</b>
DOPC	82,313	88,111	87,407
DOPC:CHOL (7:3)	87,764	79,074	85,741
DOPC:CHOL (6:4)	87,677	87,593	88,519
DMPC	76,253	77,887	84,444
DMPC:CHOL (7:3)	83,168	84,074	87,778
DMPC:CHOL (6:4)	86,726	85,370	81,111
DPPC	87,305	84,790	84,630
DPPC:CHOL (7:3)	85,037	83,137	87,037
DPPC:CHOL (6:4)	79,192	88,889	83,704
DSPC	79,482	88,024	
DSPC:CHOL (7:3)	83,469	86,111	75,185
DSPC:CHOL (6:4)	82,151	87,963	83,889
Modelo Membranar HIV	76,923	86,941	(A faltar)

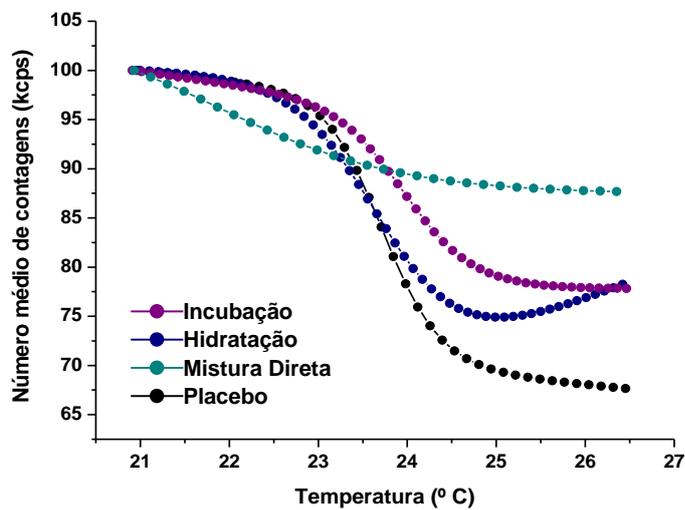
\*sem dados

### ANEXO 3

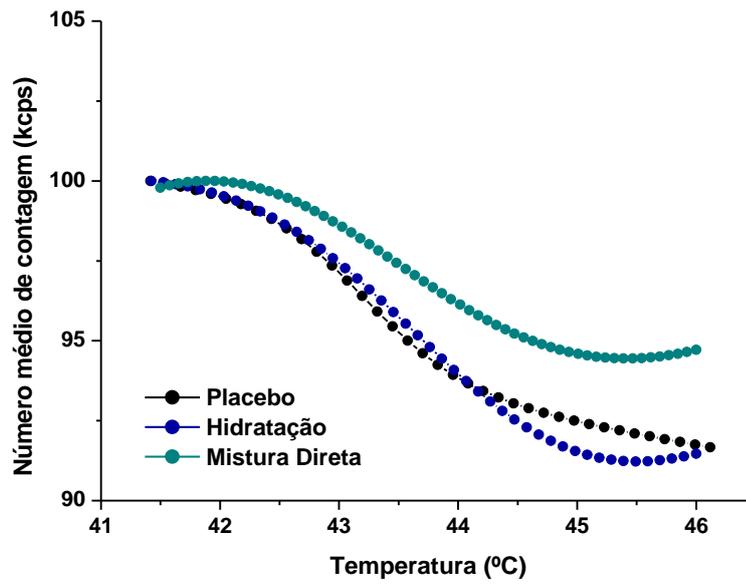
#### ESTUDOS DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE



**Figura A3.1-** Representação gráfica dos perfis sigmóides e respectivos ajustes não lineares da temperatura de transição de fase principal de LUV de DSPC (4 mM) na ausência ou presença de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), encapsulado por incubação, hidratação e mistura direta.



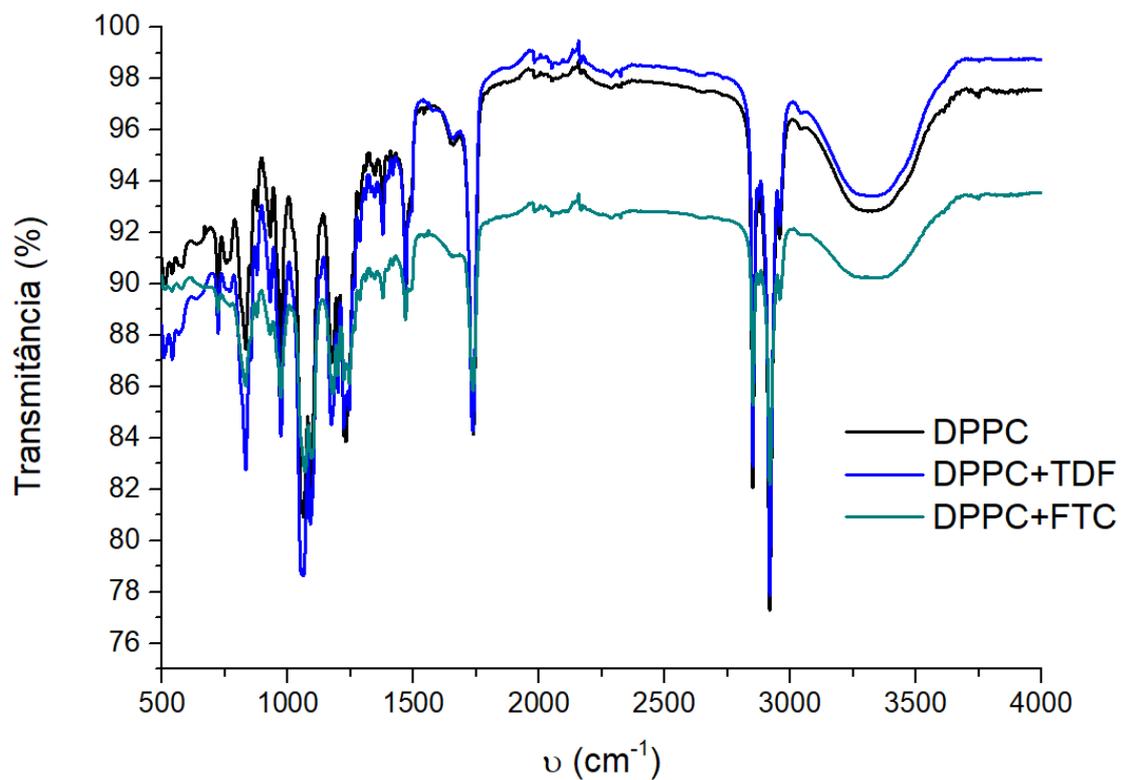
**Figura A3.2 -** Representação gráfica dos perfis sigmóides e respectivos ajustes não lineares da temperatura de transição de fase principal de LUV de DMPC (4 mM) na ausência ou presença de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), encapsulado por incubação, hidratação e mistura direta.



**Figura A3.3.** - Representação gráfica dos perfis sigmóides e respectivos ajustes não lineares da temperatura de transição de fase principal de LUV de DODAB (4 mM) na ausência ou presença de TDF ( $4 \times 10^{-5}$  M), encapsulado por hidratação e mistura direta.

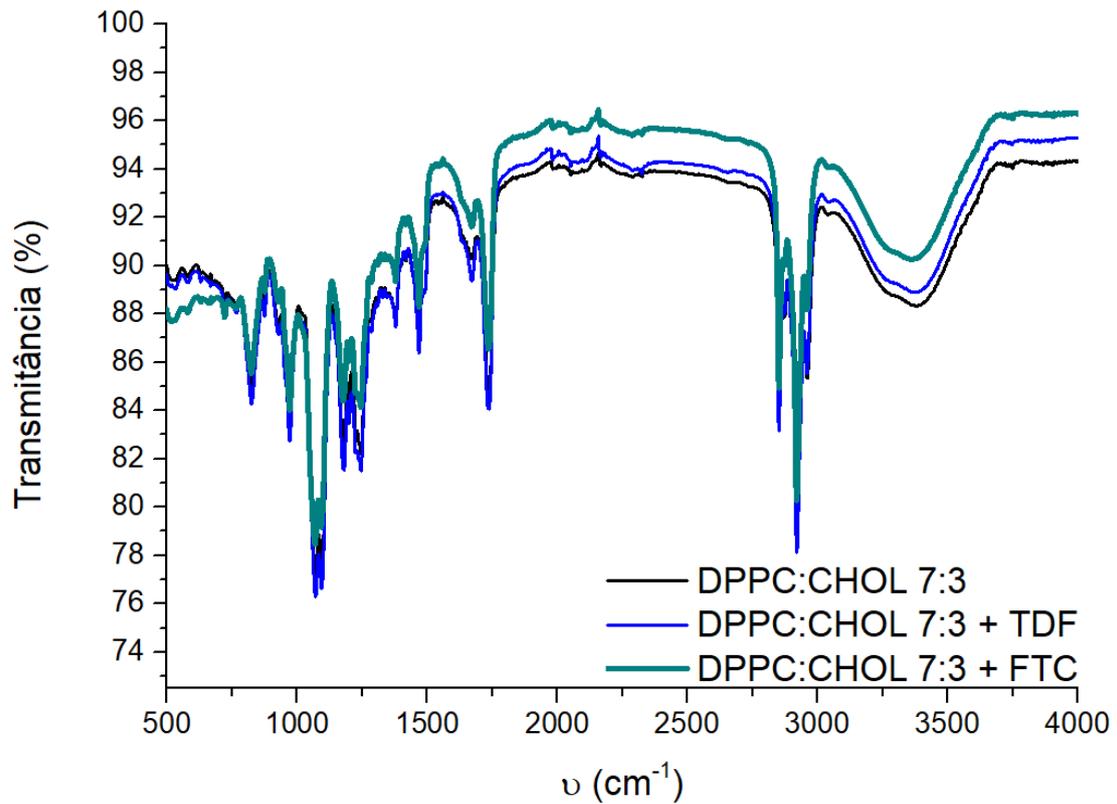
#### Anexo 4

Espetros de ATR-FTIR obtidos para as formulações DPPC, DPPC+FTC, DPPC+TDF



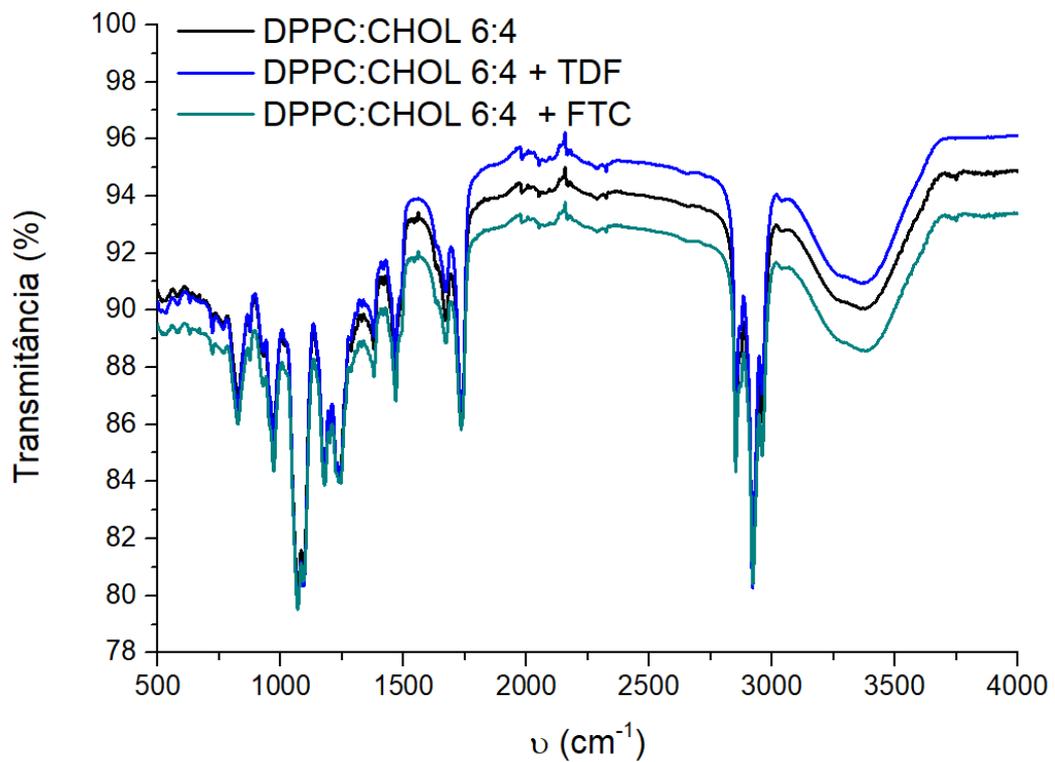
**Figura A4.1** - Espetros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC, sem fármacos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC, com FCT ou TDF encapsulado.

Espetros de ATR-FTIR obtidos para as formulações DPPC:CHOL(7:3), DPPC:CHOL(7:3)+FTC, DPPC:CHOL(7:3)+TDF



**Figura A4.2** Espetros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC:CHOL (7:3), sem fármacos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC:CHOL (7:3), com FCT ou TDF encapsulado.

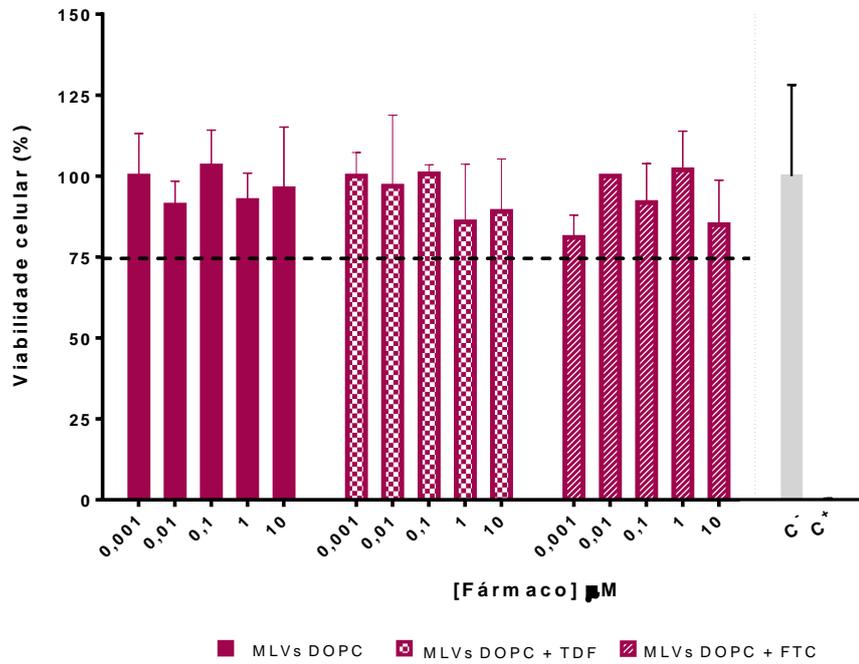
Espetros de ATR-FTIR obtidos para as formulações DPPC:CHOL(6:4), DPPC:CHOL(6:4)+FTC, DPPC:CHOL(6:4)+TDF



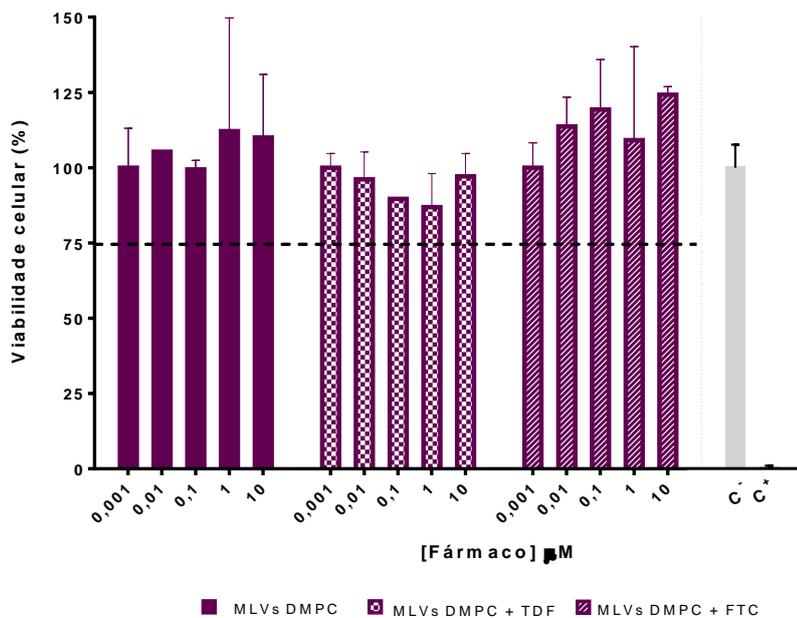
**Figura A4.3** - Espetros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC:CHOL (6:4), sem fármacos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC:CHOL (6:4), com FCT ou TDF encapsulado.

## ANEXO 5

### ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR



**Figura A5.1-** Viabilidade das células CaSki avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com MLV DOPC, MLV DOPC+TDF e MLV DOPC+FTC



**Figura A5.2-** Viabilidade das células CaSki avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com MLV DMPC), MLV DMPC+TDF e MLV DMPC+FTC



## Anexo 6

### Ajuste das cinéticas de liberação de RSV aos modelos matemáticos

#### Cinética de 1ª ordem

**Tabela A6.1** – Ajustes das cinéticas de liberação do TDF não-encapsulado, encapsulado em MLV de DOPC, DPPC e DSPC e encapsulado em MLV de DPPC incorporados no HG e, por fim, da FTC não-encapsulada e incorporada no HG, em meio aquoso (37 °C) através de modelos matemáticos.

Equação matemática	Formulação	Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$F_{max}(1 - e^{-kt})$	TDF	$F_{max} = 61,640 \pm 1,032$ $k = 0,925 \pm 0,058$	0,9916	0,9909
	DOPC+TDF	$F_{max} = 58,580 \pm 0,821$ $k = 0,725 \pm 0,036$	0,9955	0,9951
	DPPC+TDF	$F_{max} = 66,920 \pm 1,276$ $k = 1,042 \pm 0,076$	0,9880	0,9870
	DSPC+TDF	$F_{max} = 58,980 \pm 0,998$ $k = 1,021 \pm 0,066$	0,9907	0,9899
	HG com DPPC+TDF	$F_{max} = 72,550 \pm 3,913$ $k = 0,287 \pm 0,036$	0,9696	0,9671
	FTC	$F_{max} = 67,210 \pm 1,276$ $k = 3,518 \pm 0,325$	0,9754	0,9734
	HG+FTC	$F_{max} = 56,71 \pm 2,741$ $k = 1,351 \pm 0,260$	0,9014	0,8932

$F_{max}$  é a quantidade total de fármaco libertada e  $k$  é a constante de liberação de primeira ordem.

### Modelo Korsmeyer–Peppas

**Tabela A6.2** – Ajustes das cinéticas de liberação do TDF não-encapsulado, encapsulado em MLV de DOPC, DPPC e DSPC e encapsulado em MLV de DPPC incorporados no HG e, por fim, da FTC não-encapsulada e incorporada no HG, em meio aquoso (37 °C) através de modelos matemáticos.

Equação matemática	Formulação	Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$at^n$	TDF	$a = 34,610 \pm 3,062$ $n = 0,2695 \pm 0,0436$	0,8588	0,8470
	DOPC+TDF	$a = 30,490 \pm 3,390$ $n = 0,2854 \pm 0,0540$	0,8175	0,8023
	DPPC+TDF	$a = 39,510 \pm 3,831$ $n = 0,2442 \pm 0,0488$	0,8068	0,7907
	DSPC+TDF	$a = 34,580 \pm 3,302$ $n = 0,2476 \pm 0,0480$	0,8157	0,8003
	HG com DPPC+TDF	$a = 25,190 \pm 1,630$ $n = 0,3889 \pm 0,0289$	0,9620	0,9588
	FTC	$a = 53,650 \pm 3,368$ $n = 0,1219 \pm 0,0352$	0,7691	0,7499
	HG+FTC	$a = 35,530 \pm 1,332$ $n = 0,2484 \pm 0,0188$	0,9636	0,9606

$a$  é constante de incorporação geométrica e estrutural que tem em conta a forma farmacêutica;  $n$  é um de liberação que representa o mecanismo de difusão do fármaco, sendo baseado na lei de Fick, (um valor de  $n$  igual ou menor que 0,5 indica uma difusão Fickiana, para valores entre 0,5 e 1 indica um transporte não Fickiano).

### Modelo Korsmeyer–Peppas com burst

**Tabela A6.3** – Ajustes das cinéticas de liberação do TDF não-encapsulado, encapsulado em MLV de DOPC, DPPC e DSPC e encapsulado em MLV de DPPC incorporados no HG e, por fim, da FTC não-encapsulada e incorporada no HG, em meio aquoso (37 °C) através de modelos matemáticos.

Equação matemática	Formulação	Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$at^n + b$	TDF	$a = 41,670 \pm 9,901$ $n = 0,2373 \pm 0,0571$ $b = -7,187 \pm 9,079$	0,8683	0,8444
	DOPC+TDF	$a = 38,380 \pm 10,830$ $n = 0,2454 \pm 0,0686$ $b = -8,138 \pm 9,917$	0,8313	0,80062
	DPPC+TDF	$a = 46,960 \pm 12,720$ $n = 0,2168 \pm 0,0630$ $b = -7,589 \pm 11,71$	0,8156	0,7821
	DSPC+TDF	$a = 41,250 \pm 10,920$ $n = 0,2193 \pm 0,0618$ $b = -6,798 \pm 10,050$	0,8249	0,7931
	HG com DPPC+TDF	$a = 31,060 \pm 4,460$ $n = 0,3416 \pm 0,0391$ $b = -6,044 \pm 4,059$	0,9697	0,9642
	FTC	$a = 56,020 \pm 12,180$	0,7700	0,7282

	$n = 0,1178 \pm 0,0419$		
	$b = -2,372 \pm 11,490$		
	<hr/>		
	$a = 38,270 \pm 4,399$		
HG+FTC	$n = 0,2347 \pm 0,0275$	0,9652	0,9589
	$b = -2,700 \pm 4,035$		
<hr/>			

*b* representa o efeito do *burst*.

### Modelo Weibull

**Tabela A6.4** Ajustes das cinéticas de liberação do TDF não-encapsulado, encapsulado em MLV de DOPC, DPPC e DSPC e encapsulado em MLV de DPPC incorporados no HG e, por fim, da FTC não-encapsulada e incorporada no HG, em meio aquoso (37 °C) através de modelos matemáticos.

Equação matemática	Formulação	Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$F_{max} \left(1 - e^{(-at^b)}\right)$	TDF	$a = 0,901 \pm 0,063$ $F_{max} = 62,190 \pm 1,278$ $b = 0,9302 \pm 0,0704$	0,9922	0,9908
	DOPC+TDF	$a = 0,7284 \pm 0,0376$ $F_{max} = 58,220 \pm 0,921$ $b = 1,050 \pm 0,060$	0,9958	0,9950
	DPPC+TDF	$a = 1,044 \pm 0,093$ $F_{max} = 66,890 \pm 1,457$ $b = 1,006 \pm 0,097$	0,9881	0,9859
	DSPC+TDF	$a = 1,011 \pm 0,078$ $F_{max} = 59,12 \pm 1,175$ $b = 0,971 \pm 0,081$	0,9908	0,9891
	HG com DPPC+TDF	$a = 0,323 \pm 0,011$ $F_{max} = 83,250 \pm 2,093$ $b = 0,688 \pm 0,021$	0,9981	0,9978

	$a = 2,918 \pm 0,507$		
FTC	$F_{max} = 67,640 \pm 1,341$	0,9786	0,9747
	$b = 0,864 \pm 0,209$		
	$a = 0,600 \pm 0,099$		
HG+FTC	$F_{max} = 80,110 \pm 8,811$	0,9817	0,9784
	$b = 0,420 \pm 0,048$		

$F_{max}$  é a quantidade total de fármaco libertada e  $a$  é um parâmetro de escala a define que a escala temporal. O parâmetro  $b$ , caracteriza a a forma da curva. Para ( $b=1$ ) (Caso 1), sigmoide, para ( $b>1$ ) (Caso 2) em forma de S, com curvatura para cima seguida de um ponto de viragem, para ( $b<1$ ) (Caso 3) parabólica, com maior inclinação inicial e depois exponencial

## Modelo Higuchi

**Tabela A6.5** - Ajustes das cinéticas de liberação do TDF não-encapsulado, encapsulado em MLV de DOPC, DPPC e DSPC e encapsulado em MLV de DPPC incorporados no HG e, por fim, da FTC não-encapsulada e incorporada no HG, em meio aquoso (37 °C) através de modelos matemáticos.

Equação matemática	Formulação	Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$kt^{0,5}$	TDF	$k = 21,360 \pm 2,203$	0,5403	0,5403
	DOPC+TDF	$k = 19,390 \pm 2,071$	0,5676	0,5676
	DPPC+TDF	$k = 23,160 \pm 2,752$	0,3841	0,3841
	DSPC+TDF	$k = 20,40 \pm 2,380$	0,4068	0,4068
	HG com DPPC+TDF	$k = 19,870 \pm 0,973$	0,9134	0,9134
	FTC	$k = 25,000 \pm 4,167$	-0,9113	-0,9113
	HG+FTC	$k = 21,190 \pm 1,939$	0,5220	0,5220

*K* é a constante de dissolução de Higuchi.

