



Desenvolvimento e otimização de uma formulação tópica contendo ómega  
3 encapsulado em dispersões coloidais lipídicas

Ana Rita Pereira Caldas

UMinho | 2019



Universidade do Minho  
Escola de Ciências

Ana Rita Pereira Caldas

Desenvolvimento e otimização de uma formulação  
tópica contendo ómega 3 encapsulado em  
dispersões coloidais lipídicas

Janeiro de 2019



Universidade do Minho  
Escola de Ciências

Ana Rita Pereira Caldas

Desenvolvimento e otimização de uma formulação  
tópica contendo ómega 3 encapsulado em  
dispersões coloidais lipídicas

Tese de mestrado em  
Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob orientação de:  
**Professora Doutora Marlene Lúcio**

**Professora Doutora Carla Martins Lopes**

**Nome:** Ana Rita Pereira Caldas

**Endereço eletrónico:** anaritapc1@gmail.com      **Telefone:** 914677253

**Cartão do Cidadão:** 14906019

**Título da dissertação:** Desenvolvimento e otimização de uma formulação tópica contendo ómega 3 encapsulado em dispersões coloidais lipídicas

**Orientadores:**

Professora Doutora Marlene Lúcio

Professora Doutora Carla Martins Lopes

**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, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura

## Agradecimentos

A realização de todo este trabalho não seria possível sem a dedicação, o apoio, o incentivo, a amizade e o amor das pessoas certas. A elas serei eternamente grata.

À Professora Doutora Marlene, quero agradecer por todos os ensinamentos que me passou ao longo de todo este percurso. Serei sempre grata pela confiança que sempre depositou em mim, por toda a dedicação, paciência, apoio e carinho. Muito obrigada também por sempre me corrigir quando necessário e, desta forma, me mostrar que é assim que melhoramos e crescemos todos os dias, pessoal e profissionalmente. Muito obrigada por tudo, professora!

À Professora Doutora Carla Lopes, por me ter recebido sempre tão bem e com um sentimento de motivação, dedicação, empenho e carinho. Muito obrigada pelas experiências trocadas, pelo apoio e por se mostrar sempre disponível para me ajudar.

Às minhas amigas e companheiras de mestrado, de laboratório e da vida, a Sarah Brito e a Maria Faria. A vocês tenho a agradecer todo o companheirismo, amizade, ajuda e paciência que tiveram comigo. Obrigada também por todos os momentos que partilhamos juntas, pelos sorrisos e até mesmo pelas lágrimas. Sem vocês isto não seria mesmo possível, não teria tanta força para chegar até ao fim. Obrigada, amigas!

À Professora Doutora Teresa Viseu, por se mostrar sempre disponível, por toda a ajuda prestada e pelos conhecimentos que me transmitiu.

Ao Professor Doutor Artur Ribeiro e ao Professor Doutor Raul Machado, por serem sempre tão prestáveis e por, gentilmente, terem efetuado análises essenciais para a complementação deste trabalho.

Ao grupo de investigação do Centro de Investigação em Biomedicina (CEBIMED) da Unidade de Investigação Fernando Pessoa em Energia Ambiente e Saúde (FP-ENAS) da Universidade Fernando Pessoa, pela realização dos ensaios em macrófagos. Adicionalmente, agradeço à Professora Doutora Fátima Cerqueira, ao Mestre Bruno Horta e ao Professor Doutor Rui Medeiros.

Ao Rui e à Juliana, quero agradecer pela amizade que criamos, por toda a ajuda, pela troca de conhecimentos e por serem sempre tão prestáveis e amigos.

À Li, a amiga de todas as horas, por nunca me deixar sozinha, por estar sempre na primeira fila a ver todas as minhas conquistas. Obrigada por acreditares sempre em mim, às vezes

até mais do que eu mesma. Obrigada por todas as palavras e atitudes de incentivo para que desse um passo de cada vez e chegasse ao fim deste projeto com um sorriso no rosto. Obrigada, irmã!

À Yuri, à Sónia, à Ana Luísa, à Zé, à Souto, à Pinto, à Bacs e à Débora, por toda a paciência e força que me deram e por serem daquelas amigas incríveis, que levarei para a vida. Muito obrigada a cada uma de vocês!

Ao meu irmão, por ser ele a aturar grande parte das minhas mudanças de humor em casa e por ter ficado sempre ali para me ouvir.

Sem dúvida que o meu maior agradecimento vai para a minha mãe, por todo o amor, carinho e dedicação. Obrigada por todo o teu esforço para que o meu percurso académico fosse possível. Obrigada pela educação que me deste, por me ensinares a lutar pelos meus objetivos, por nunca dizeres “não” aos meus sonhos e por me dares sempre a mão em todas as etapas. O que sou hoje devo-o a ti! Um “obrigada” será sempre pouco por tudo o que és e por tudo o que fazes por mim!

Por último, quero agradecer ao meu amor de sempre, ao meu anjo da guarda, o meu pai. É ele que todos os dias me guia e me dá forças para ultrapassar todos os obstáculos e é por ele que tento sempre chegar mais longe, para o deixar orgulhoso de onde me está a ver. A ele agradeço muito por tudo o que me ensinou e que, de certa forma, continua a ensinar. Muito do que sou hoje também o devo ao homem e pai incrível que foi! Estarás para sempre no meu coração, obrigada papá!

# Desenvolvimento e otimização de uma formulação tópica contendo ómega 3 encapsulado em dispersões coloidais lipídicas

## Resumo

Das doenças de pele de cariz inflamatório e autoimune destaca-se a psoríase, que afeta cerca de 2% da população mundial. Esta é uma doença crónica inflamatória que se manifesta principalmente nas zonas de fricção (e.g. joelhos, cotovelos, umbigo e região lombar) sob a forma de placas escamosas eritematosas típicas e pápulas, podendo ser pruriginosas ou até mesmo dolorosas. O principal objetivo da terapêutica é melhorar a qualidade de vida dos doentes. No entanto, as terapias convencionais usadas para o tratamento da psoríase apresentam uma série de limitações clínicas, tornando-se um desafio a procura de novas estratégias para veiculação de fármacos e/ou compostos bioativos com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica e reduzir as reações adversas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar uma formulação tópica contendo ómega 3 encapsulado em nanossistemas lipídicos (nanopartículas lipídicas e lipossomas) para a psoríase. Utilizou-se um fármaco anti-inflamatório, o resveratrol, o qual foi encapsulado apenas nos lipossomas. Os vetores lipídicos nanoestruturados e os lipossomas foram desenvolvidos recorrendo às técnicas da ultra-sonicação e da hidratação do filme lipídico, respetivamente. Após o seu desenvolvimento, as formulações foram caracterizadas quanto à estabilidade e à estabilidade acelerada, o que permitiu selecionar aquelas que seriam mais promissoras. De seguida, foram então realizados ensaios para prever a performance terapêutica e para avaliar o efeito anti-inflamatório do resveratrol. Posteriormente, as formulações selecionadas foram incorporadas numa base semissólida e sujeitas a ensaios de reologia, oclusividade e permeação.

A caracterização das formulações desenvolvidas permitiu verificar que nanossistemas lipídicos foram estáveis a longo prazo e mostraram ser aptos para a aplicação tópica cutânea. Os ensaios de performance terapêutica destacaram propriedades terapêuticas relevantes para o tratamento da psoríase (e.g. características anti-inflamatórias, por inibição da COX-1 e da produção de NO e capacidades antioxidantes). De forma a permitir uma melhor aplicabilidade tópica, as formulações foram incorporadas numa base semissólida (hidrogel), que apresentou um comportamento pseudoplástico, favorável para a administração pretendida.

**Palavras-Chave:** Psoríase; ómega 3; resveratrol; lipossomas; vetores lipídicos nanoestruturados; base semissólida



# Development and optimization of a topical formulation containing omega 3 encapsulated in lipid colloidal dispersions

## Abstract

From inflammatory and autoimmune skin diseases psoriasis stands out with an incidence of 2% of the world's population. This is a chronic inflammatory disease that manifests itself mainly in areas of friction (e.g., knees, elbows, navel and lower back) in the form of typical erythematous squamous plaques and papules, which may be pruritic or even painful. The main goal of therapy is to improve the life quality of patients. However, the conventional therapies used for the treatment of psoriasis have a series of clinical limitations, therefore the research for new strategies relatively to drugs delivery mechanisms and/or bioactive compounds that increase the therapeutic efficacy and reduce the adverse effects is important.

The objective of this work was to develop and optimize a topical formulation containing omega 3 encapsulated in lipid nanosystems (lipid nanoparticles and liposomes) for psoriasis. Moreover, an anti-inflammatory drug, resveratrol, encapsulated only in liposomes was used. Ultrasound and hydration of the lipid film techniques were used to develop our nanostructured lipid vectors and liposomes, respectively. After their development, the formulations were characterized for stability and accelerated stability, to select the ones that would be more promising. Subsequently, trials were performed to predict therapeutic performance and to evaluate the anti-inflammatory effect of resveratrol. Finally, the selected formulations were incorporated into a semi-solid base and subjected to rheology, occlusion and permeation assays.

The characterization of the developed formulations allowed to prove that lipid nanosystems were stable in the long term and showed to be appropriate for the topical cutaneous application. Therapeutic performance trials have highlighted therapeutic properties relevant to the psoriasis treatment (e.g. anti-inflammatory features, COX-1 inhibition and NO production and antioxidant capabilities). In order to allow better topical applicability, the formulations were incorporated into a semi-solid base (hydrogel), which exhibited a pseudoplastic behaviour, favourable for the intentional administration.

**Key words:** Psoriasis; omega 3; resveratrol; liposomes; nanostructured lipid vectors; semi-solid base.



## Índice geral

AGRADECIMENTOS .....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIV
ÍNDICE DE TABELAS .....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XX
CAPÍTULO 1 .....	1
CAPÍTULO 2 .....	5
2.1. DOENÇAS DE PELE COM CARIZ INFLAMATÓRIO E AUTOIMUNE: PSORÍASE .....	7
2.2. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA A PSORÍASE .....	11
2.2.1. Tratamentos clássicos .....	11
2.2.2. Tratamentos inovadores baseados em sistemas de entrega de fármacos .....	15
2.3. PAPEL DOS NUTRACÊUTICOS NA TERAPÊUTICA .....	16
2.3.1. Papel dos ácidos gordos ômega 3 no processo inflamatório, no sistema imunitário e a sua ação na psoríase .....	17
2.3.2. Papel do resveratrol no processo inflamatório, no sistema imunitário e na psoríase .....	21
2.4. NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS: LIPOSSOMAS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS .....	23
2.4.1. Nanossistemas lipídicos contendo resveratrol e/ou ácidos gordos ômega 3 .....	27
2.4.2. Nanossistemas lipídicos com aplicação na psoríase .....	29
CAPÍTULO 3 .....	31
3.1. MATERIAIS E REAGENTES .....	33
3.2. QUANTIFICAÇÃO DO RESVERATROL POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV/Vis .....	34
3.2.1. Preparação de soluções padrão de resveratrol .....	36
3.2.2. Determinação do espectro de absorção (UV/Vis) do resveratrol .....	36
3.2.3. Curva de calibração .....	37
3.3. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO .....	38

3.3.1. Estudo in silico das características físico-químicas do resveratrol e descritores moleculares .....	38
Previsão da lipofilicidade do resveratrol .....	39
Determinação da constante de partição do resveratrol em modelos miméticos de membrana do tipo lipossoma/água ( $K_{lipossoma/água}$ ).....	40
3.3.2. Estudo de solubilidade lipídica do resveratrol.....	40
3.4. PREPARAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS (LIPOSSOMAS E NLC) .....	41
3.4.1. Preparação dos vetores lipídicos nanoestruturados (NLC) .....	41
3.4.2. Preparação dos lipossomas .....	42
3.4.3. Formulações desenvolvidas.....	43
3.5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS.....	44
3.5.1. Tamanho, índice de polidispersão e carga de superfície (potencial zeta) .....	44
3.5.2. Estabilidade em condições de armazenamento e estabilidade acelerada .....	47
3.5.3. Composição química .....	48
3.5.4. Avaliação das propriedades biofísicas dos nanossistemas.....	49
3.6. ENSAIOS DE PERFORMANCE TERAPÊUTICA .....	50
3.6.1. Eficiência de encapsulamento do resveratrol .....	50
3.6.2. Incorporação dos nanossistemas lipídicos numa base semissólida .....	51
3.6.3. Ensaio de permeação cutânea .....	51
3.6.3.1. Preparação da solução tampão (pH=5,5) .....	51
3.6.3.2. Preparação da solução micelar .....	51
3.6.3.3. Estudos de permeação cutânea do resveratrol.....	52
3.6.4. Estudos de libertação in vitro do resveratrol.....	52
3.6.5. Análise reológica das formulações dermatológicas em base semissólida.....	53
3.6.6. Ensaio de oclusão .....	55
3.6.7. Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do resveratrol e ómega 3.....	56
CAPÍTULO 4.....	59
4.1. DOSEAMENTO ESPETROFOTOMÉTRICO DO RESVERATROL PELO MÉTODO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	61
4.1.1. Parâmetros de validação do método analítico .....	61
Especificidade.....	61
Linearidade.....	62
Precisão .....	63

Limite de detecção e limite de quantificação .....	63
4.2. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO .....	64
4.2.1. Estudo in silico das características físico-químicas do resveratrol e descritores moleculares relevantes.....	64
Ionização do resveratrol .....	64
Lipofilicidade do resveratrol.....	66
Solubilidade do resveratrol .....	67
Classificação biofarmacêutica do resveratrol.....	67
Permeabilidade cutânea ao resveratrol .....	68
4.2.2. Testes de triagem para avaliação da lipossolubilidade do resveratrol.....	69
Estudo da solubilidade lipídica do resveratrol.....	69
Determinação do coeficiente de distribuição do resveratrol .....	69
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS .....	71
4.3.1. Avaliação do tamanho e polidispersão.....	71
4.3.2. Avaliação da carga superficial dos nanossistemas lipídicos por determinação do potencial zeta .....	76
4.3.3. Composição química estudada por Espectroscopia de infravermelho de reflexão total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	77
4.3.4. Avaliação do efeito do RSV nas propriedades biofísicas dos lipossomas estudada por dispersão de luz dinâmica (DLS) .....	83
4.3.5. Avaliação da estabilidade dos nanossistemas lipídicos durante o tempo de armazenamento.....	86
4.3.6. Avaliação da estabilidade acelerada dos nanossistemas lipídicos durante o tempo de armazenamento.....	90
4.4.1. Eficiência de encapsulamento.....	92
4.4.2. Estudos de liberação do resveratrol em condições in vitro .....	93
4.4.3. Análise reológica das formulações incorporadas em base semissólida .....	94
4.4.4. Ensaio de permeação das formulações.....	96
4.4.5. Avaliação da oclusividade.....	98
4.4.6. Efeito anti-inflamatório dos bioativos resveratrol e ômega 3 .....	100
4.4.7. Efeito antioxidante do resveratrol e do ômega-3.....	103
CAPÍTULO 5.....	107

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS .....	125



## Índice de figuras

<b>FIGURA 1</b> – MECANISMOS DE DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE. ESTRATIFICAÇÃO DA EPIDERME SAUDÁVEL (ESQUERDA) E DA EPIDERME PSORIÁTICA (DIREITA). NA PARTE CENTRAL DA IMAGEM ENCONTRA-SE A VIA PATOLÓGICA: CÉLULAS RESIDENTES DA PELE, RESULTANTES DA DESREGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO, LIBERTAM LL-37 QUE SE ACOPLA AO DNA E, ASSIM, ATIVAM CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITÓIDES (PDC) QUE, POR SUA VEZ, ATIVAM AS CÉLULAS DENDRÍTICAS DÉRMICAS (Ddc) ATRAVÉS DA LIBERTAÇÃO DO IFN- $\gamma$ . NOS GÂNGLIOS LINFÁTICOS, AS CÉLULAS DENDRÍTICAS (Dc) ATIVAM OS LINFÓCITOS T (CÉLULAS T). ESTAS LIBERTAM IL-12 E IL-23, QUE ATIVAM AS CÉLULAS T AUXILIARES (Th1 E Th17, RESPETIVAMENTE). ESTAS CÉLULAS Th, UMA VEZ NA CORRENTE SANGUÍNEA, LIBERTAM IFN- $\gamma$ , IL-17 E IL-22, QUE ATIVAM A MODIFICAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS, RESULTANDO NUMA EPIDERME MAIS ESPESSE (TÍPICA DA PSORÍASE). AÇÃO DA TERAPIA CONVENCIONAL (ROSA) E DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS (VERDE). ADAPTADO DE [16].	8
<b>FIGURA 2</b> – ESQUEMATIZAÇÃO DAS ZONAS MAIS AFETADAS NUM DOENTE COM PSORÍASE (A) E O ASPETO DE UMA PLACA PSORIÁTICA (B).	10
<b>FIGURA 3</b> – ESQUEMATIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GORDOS DAS FAMÍLIAS ÔMEGA 3, 6 E 9 E A CONVERSÃO DE ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS (PUFA) EM ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS DE CADEIA LONGA (LCPUFA). O PRIMEIRO NÚMERO IDENTIFICA O NÚMERO DE CARBONOS PRESENTES NA CADEIA HIDROCARBONADA E O SEGUNDO IDENTIFICA O NÚMERO DE LIGAÇÕES DUPLAS DO COMPOSTO. ADAPTADO DE [52].	18
<b>FIGURA 4</b> – TIPOS DE EICOSANÓIDES DERIVADOS DO AA E DO EPA, E O SEU PODER INFLAMATÓRIO. ADAPTADO DE [57].	19
<b>FIGURA 5</b> – MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA 3. ADAPTADO DE [37].	20
<b>FIGURA 6</b> – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO RESVERATROL: A) ISÓMERO TRANS (TRANS-3,5,4'-TRIHIDROXESTILBENO) E B) ISÓMERO CIS (CIS-3,5,4'-TRIHIDROXESTILBENO).	22
<b>FIGURA 7</b> – TIPOS DE NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS. SLN – NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (DO INGLÊS, <i>SOLID LIPID NANOPARTICLES</i> ); NLC – VETORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (DO INGLÊS, <i>NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS</i> ). ADAPTADO DE [91].	26
<b>FIGURA 8</b> - ESTRUTURA CRISTALINA DA MATRIZ LIPÍDICA. A) MATRIZ PERFEITA DAS SLN; B) MATRIZ IMPERFEITA DOS NLC. ADAPTADO DE [92].	26
<b>FIGURA 9</b> – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREPARAÇÃO DE NLC PELO MÉTODO DE SONICAÇÃO.	42
<b>FIGURA 10</b> – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS PELO MÉTODO DE HIDRATAÇÃO DO FILME LIPÍDICO SEGUIDO DE EXTRUSÃO.	43
<b>FIGURA 11</b> – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DUPLA CAMADA ELÉTRICA EM TORNA DE UMA PARTÍCULA EM SUSPENSÃO. ADAPTADO DE [126].	46

<b>FIGURA 12</b> – ESQUEMATIZAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO E DA RELAÇÃO EXISTENTE ENTRE A TENSÃO DE CORTE E A VELOCIDADE DE CORTE, NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE FLUIDOS. ....	54
<b>FIGURA 13</b> – FOTOGRAFIA E LEGENDA DO SISTEMA UTILIZADO NO TESTE DE OCLUSÃO. ....	56
<b>FIGURA 14</b> – ESQUEMA DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA. ....	57
<b>FIGURA 15</b> - ESPETRO DE ABSORVÂNCIA UV/VIS DE SOLUÇÕES PADRÃO DE RSV. ....	61
<b>FIGURA 16</b> – COMPARAÇÃO DO ESPETRO DE ABSORÇÃO DAS DISPERSÕES LIPÍDICAS DE NANOSSISTEMAS COM UMA SOLUÇÃO PADRÃO DE RSV (40 mM). ....	62
<b>FIGURA 17</b> – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO RSV EM ÁGUA ULTRAPURA AO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DE 305 NM. ....	62
<b>FIGURA 18</b> - ESCALA DE PH COM A REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE MICROESPÉCIES DE RSV (NEUTRA E NEGATIVA), E AINDA OS VALORES DE PKA DO RSV E OS VALORES DE PH DA PELE. ....	65
<b>FIGURA 19</b> - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO LOGD DA MOLÉCULA RSV NUM SISTEMA BIFÁSICO OCTANOL:ÁGUA EM FUNÇÃO DO PH E REPRESENTAÇÃO DO LOGP DO RSV NO MESMO SISTEMA. ELABORADA COM RECURSO AO SOFTWARE MARVINSKETCH®. ....	66
<b>FIGURA 20</b> – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO LOGS DO RSV EM FUNÇÃO DO PH. ELABORADA COM RECURSO AO SOFTWARE MARVINSKETCH®. ....	67
<b>FIGURA 21</b> - (A) ESPETROS DE ABSORVÂNCIA USADOS PARA A DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DO RSV NO SISTEMA BIFÁSICO LIPOSSOMA/ ÁGUA. SETA VERTICAL MOSTRA DISPERSÃO DA LUZ NOS ESPETROS DOS LIPOSSOMAS SEM RESVERATROL; (B) ESPETRO DA 3ª DERIVADA DE ABSORÇÃO DO RSV NO SISTEMA BIFÁSICO LIPOSSOMA/ ÁGUA. SETAS VERTICAIS MOSTRAM BANDAS ONDE HÁ BOA RESOLUÇÃO DO SINAL ANALÍTICO E ANULAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA DISPERSÃO DE LUZ; (C) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DA 3ª DERIVADA DOS ESPETROS DE ABSORÇÃO DO RSV NUM SISTEMA BIFÁSICO LIPOSSOMA/ÁGUA A 353 NM, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIPOSSOMAS. A LINHA REPRESENTA O AJUSTE PELO MÉTODO DE REGRESSÃO NÃO LINEAR REPORTADO EM [157]. ESPETROS A VERMELHO: RSV NA AUSÊNCIA DE LIPOSSOMAS; ESPETROS A CINZA: REFERÊNCIAS (LIPOSSOMAS NA AUSÊNCIA DE RSV); ESPETROS A NEGRO: ESPETROS DE RSV COM LIPOSSOMAS (CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE LIPOSSOMAS: 0 M; 4,7x10 <sup>-5</sup> M; 9,3x10 <sup>-5</sup> M; 2,3x10 <sup>-4</sup> M; 3,0x10 <sup>-4</sup> M; 4,2x10 <sup>-4</sup> M; 5,1x10 <sup>-4</sup> M; 1,0x10 <sup>-3</sup> M). ....	70
<b>FIGURA 22</b> – TAMANHO MÉDIO E PDI DOS NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS. A AMARELO ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM APENAS ÓLEOS DE PEIXE RICOS EM ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA 3 ( $\Omega$ 3); A AZUL ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM APENAS RSV; E A VERDE ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM SIMULTANEAMENTE RSV E $\Omega$ 3. A CINZA SÃO FORMULAÇÕES PLACEBO SEM RSV E SEM $\Omega$ 3. OS VALORES SÃO APRESENTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS 3 MEDIÇÕES. AS MEDIDAS FORAM REALIZADAS IMEDIATAMENTE APÓS A PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES. ....	72
<b>FIGURA 23</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EMPACOTAMENTO LIPÍDICO NAS FORMULAÇÕES DE LUV'S DE DSPC:DOPE SEM E COM $\Omega$ 3. ....	73
<b>FIGURA 24</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FORMULAÇÕES NLC. ....	74

- FIGURA 25** – POTENCIAL ZETA DAS NANOSSISTEMAS LIPÍDICOS. A AMARELO ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM APENAS ÓLEOS DE PEIXE RICOS EM ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA-3 ( $\Omega 3$ ); A AZUL ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM APENAS RSV; E A VERDE ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM SIMULTANEAMENTE RSV E  $\Omega 3$ . A CINZA SÃO FORMULAÇÕES PLACEBO SEM RSV E SEM  $\Omega 3$ . OS VALORES SÃO APRESENTADOS EM VALORES MÉDIOS  $\pm$  DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS 3 MEDIÇÕES. AS MEDIDAS FORAM REALIZADAS IMEDIATAMENTE APÓS A PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES. O TRACEJADO INDICA O VALOR DE POTENCIAL ZETA A PARTIR DO QUAL AS DISPERSÕES POSSUEM MAIOR ESTABILIDADE. ....76
- FIGURA 26** - ESPETROS DE TRANSMITÂNCIA DE ATR-FTIR OBTIDOS A PARTIR DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, SEM BIOATIVOS ENCAPSULADOS (COR PRETA) E DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, COM RSV ENCAPSULADO. NAS ZONAS SOMBREADAS DESTACAM-SE OS GRUPOS FUNCIONAIS CARACTERÍSTICOS DOS FOSFOLÍPIDOS. ....78
- FIGURA 27** – ESPETROS DE TRANSMITÂNCIA DE ATR-FTIR OBTIDOS A PARTIR DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, SEM BIOATIVOS ENCAPSULADOS (COR PRETA) E DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, COM RSV ENCAPSULADO SEPARADOS EM DUAS REGIÕES (A) E (B). NAS ZONAS CIRCUNDADAS A TRAÇO CHEIO VERMELHO DESTACAM-SE PEQUENAS DIFERENÇAS ESPETRAIS E NA ZONA CIRCUNDADA A TRACEJADO ASSINALA-SE A ZONA ONDE SE ESPERARIA ENCONTRAR AS BANDAS TRANS-OLEFINICAS. ....79
- FIGURA 28** – ESPETROS DE TRANSMITÂNCIA DE ATR-FTIR OBTIDOS A PARTIR DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, SEM BIOATIVOS ENCAPSULADOS (COR PRETA) E DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, COM  $\Omega 3$  E COM  $\Omega 3$  E RSV ENCAPSULADO SEPARADOS EM DUAS REGIÕES (A) E (B). NAS ZONAS CIRCUNDADAS A TRAÇO CHEIO VERMELHO DESTACAM-SE PEQUENAS DIFERENÇAS ESPETRAIS. ....81
- FIGURA 29** – 2ª DERIVADA DOS ESPETROS DE TRANSMITÂNCIA DE ATR-FTIR OBTIDOS A PARTIR DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, SEM BIOATIVOS ENCAPSULADOS (COR PRETA) E DE LIPOSSOMAS DE DPPC:DOPE, COM  $\Omega 3$  E COM  $\Omega 3$  E RSV ENCAPSULADOS. PARA CADA AMOSTRA CALCULAM-SE AS ÁREAS DA BANDA 1 E 2 QUE CORRESPONDEM ÀS ( $N_{as}$ ) DOS GRUPOS  $PO_2$  E A RAZÃO (ÁREA DA BANDA 2/ÁREA DA BANDA 1). ....82
- FIGURA 30** - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS PERFIS SIGMOIDES DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE LIPÍDICA DA FORMULAÇÃO DSPC:DOPE: $\Omega 3$  NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE RSV. OS VALORES OBTIDOS CORRESPONDEM À MÉDIA E RESPECTIVO DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS TRÊS DETERMINAÇÕES.....84
- FIGURA 31** – TAMANHO E POTENCIAL ZETA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS DPPC:DOPE (ESQUERDA) E DSPC:DOPE (DIREITA) AO LONGO DE 8 SEMANAS. A TRACEJADO ASSINALA-SE O VALOR DE POTENCIAL ZETA DESEJÁVEL PARA ASSEGURAR UMA MAIOR ESTABILIDADE. OS RESULTADOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO  $\pm$ DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS TRÊS ENSAIOS.....87
- FIGURA 32** – TAMANHO (ESQUERDA) E POTENCIAL ZETA (DIREITA) DOS NLC (PREC: $\Omega 3$ ) AO LONGO DE 8 SEMANAS. A TRACEJADO ASSINALA-SE O VALOR DE POTENCIAL ZETA DESEJÁVEL PARA ASSEGURAR UMA MAIOR ESTABILIDADE. OS RESULTADOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO  $\pm$ DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS TRÊS ENSAIOS.....88
- FIGURA 33** – TAMANHO (EM CIMA, LADO ESQUERDO), PDI (EM CIMA, LADO DIREITO) E POTENCIAL ZETA (EM BAIXO) DAS FORMULAÇÕES DSPC:DOPE: $\Omega 3$ +RSV(10%) (VERDE CLARO), DSPC:DOPE: $\Omega 3$ +RSV(20%) (VERDE ESCURO) E

DSPC:DOPE:Ω3+RSV(40%) (VERDE MAIS ESCURO) ARMAZENADAS À TEMPERATURA AMBIENTE AO LONGO DE 8 SEMANAS. A TRACEJADO ASSINALA-SE O VALOR DE POTENCIAL ZETA DESEJÁVEL PARA ASSEGURAR UMA MAIOR ESTABILIDADE. OS RESULTADOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO ±DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS TRÊS ENSAIOS.....	91
<b>FIGURA 34</b> – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO RSV, ALCANÇADA PARA AS FORMULAÇÕES DSPC:DOPE:Ω3+RSV(10%); DSPC:DOPE:Ω3+RSV(20%) E DSPC:DOPE:Ω3+RSV(40%). OS RESULTADOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO ±DESVIO PADRÃO DE PELO MENOS TRÊS ENSAIOS. ....	92
<b>FIGURA 35</b> – PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO CUMULATIVA DE RSV DA FORMULAÇÃO DSPC:DOPE:Ω3 EM TAMPÃO (T) OU MEIO MICELAR (M), AMBOS A PH≈5.5, EM FUNÇÃO DO TEMPO (32 HORAS). AS LINHAS REPRESENTAM O MELHOR AJUSTE CINÉTICO OBTIDO DE ACORDO COM O MODELO DE WEIBULL. ....	93
<b>FIGURA 36</b> - REOGRAMA DAS BASES SEMISSÓLIDAS COM A FORMULAÇÃO DSPC:DOPE:Ω3+RSV E COM CONCENTRAÇÕES DE GELIFICANTE PCF CRESCENTES (0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,75 % E 1 %). ....	94
<b>FIGURA 37</b> – REOGRAMA DAS BASES SEMISSÓLIDAS COM A FORMULAÇÃO NLC (PREC Ω3) E COM CONCENTRAÇÕES DE GELIFICANTE PCF CRESCENTES (0,1 %, 0,2 %, 0,3 % E 0,5 %). ....	95
<b>FIGURA 38</b> – COMPARAÇÃO ENTRE O REOGRAMA DA BASE SEMISSÓLIDA (0,5% DE PFC) QUE CONTÉM A MISTURA DAS FORMULAÇÕES NLC (PREC Ω3) E LIPOSSOMAS DE DSPC:DOPE:Ω3+RSV E OS REOGRAMAS DE CADA UMA DAS BASES SEMISSÓLIDAS COM AS FORMULAÇÕES NLC E AS BASES SEMISSÓLIDAS COM AS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS. ....	95
<b>FIGURA 39</b> - PERFIS DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO RSV A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DSPC:DOPE:Ω3+RSV OU DE FORMULAÇÕES INCORPORADAS NA BASE SEMISSÓLIDA (HG), NUM MEIO MICELAR (M) OU EM TAMPÃO (M). ....	97
<b>FIGURA 40</b> – REPRESENTAÇÃO DA MÉDIA DAS RÉPLICAS DO FATOR DE OCLUSIVIDADE (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE TODAS AS FORMULAÇÕES TESTADAS. REPRESENTAÇÃO DO FATOR DE OCLUSIVIDADE (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE TODAS AS FORMULAÇÕES TESTADAS. OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES PARA 3 RÉPLICAS. ....	99
<b>FIGURA 41</b> – ESPETROS DE EMISSÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE RESORUFINA. ....	101
<b>FIGURA 42</b> – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA RESORUFINA AO COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DE 585 NM. ....	101
<b>FIGURA 43</b> - ESPETROS DE EMISSÃO DAS AMOSTRAS A TESTAR ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA. RSV REPRESENTA O COMPOSTO LIVRE, COX + REPRESENTA O MÁXIMO DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E CONTROLO INIBIÇÃO REPRESENTA UM INIBIDOR DA COX-1. ....	102
<b>FIGURA 44</b> - 2ª DERIVADA DOS ESPETROS ATR-FTIR DAS FORMULAÇÕES LIPÍDICAS REPRESENTANDO AS BANDAS N <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ) A 2960 CM <sup>-1</sup> E N (C = O) A 1740 CM <sup>-1</sup> PARA CALCULO DA RAZÃO DAS SUAS ÁREAS: ÁREA 1740/ÁREA 2960. ....	104
<b>FIGURA 45</b> - ÁREA 1740/ÁREA 2960 PARA CADA UMA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS DESENVOLVIDAS. A AMARELO ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM APENAS ÓLEOS DE PEIXE RICOS EM ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA 3 (Ω3); A AZUL	

ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM APENAS RSV; E A VERDE ESTÃO AS FORMULAÇÕES QUE CONTÊM  
SIMULTANEAMENTE RSV E  $\Omega 3$ . A CINZA SÃO FORMULAÇÕES PLACEBO SEM RSV E SEM  $\Omega 3$ . ..... 105

## Índice de tabelas

<b>TABELA 1</b> - FORMULAÇÕES DE NLC, SLN E LIPOSSOMAS PARA A ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA 3 E/OU RSV, REPORTADAS NA LITERATURA.....	28
<b>TABELA 2</b> - FORMULAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E LIPOSSOMAS PARA A APLICAÇÃO EM CASOS CLÍNICOS DE PSORÍASE, REPORTADAS NA LITERATURA.....	29
<b>TABELA 3</b> – PRINCIPAIS MATERIAIS, REAGENTES E APARELHOS UTILIZADOS AO LONGO DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	33, 34
<b>TABELA 4</b> - SOLUÇÕES STOCK PARA A PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	41
<b>TABELA 5</b> - PREVISÃO IN SILICO DE ALGUNS PARÂMETROS OBTIDOS ATRAVÉS DO SOFTWARE CHEMAXON® E DO MARVINSKETCH® PARA O RSV.....	64
<b>TABELA 6</b> - RAZÃO DAS ÁREAS DAS BANDAS QUE CORRESPONDEM ÀS ( $N_{\nu}$ ) DOS GRUPOS $PO_2$ .....	83
<b>TABELA 7</b> - DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE AJUSTES NÃO LINEARES (RECORRENDO À EQUAÇÃO 11) DAS CURVAS DE PERFIL SIGMOIDE, EM QUE B REPRESENTA O VALOR DE COOPERATIVIDADE DA TRANSIÇÃO DE FASE E $T_m$ É A TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE LIPÍDICA.....	85
<b>TABELA 8</b> - VALORES DO PDI DAS FORMULAÇÕES AO LONGO DE 8 SEMANAS.....	89
<b>TABELA 9</b> - AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO ATRAVÉS DA QUANTIDADE DE RESORUFINA PRODUZIDA.....	102

## Lista de Abreviaturas

AA	Ácido araquidônico
ADAMTS 5	<i>A Disintegrin An Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-like-5</i>
ADHP	10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ALA	Ácido $\alpha$ -linolênico, do inglês <i>Alpha Linolenic Acid</i>
ATR	Refletância total atenuada, do inglês <i>Attenuated Total Reflectance</i>
BB-UVB	UVB de banda larga, do inglês <i>Broad-Band UVB</i>
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica, do inglês <i>Biopharmaceutical Classification System</i>
COX	Ciclooxigenase
Dc	Células dendríticas
DCP	Dicetil fosfato, do inglês <i>Dicetyl Phosphate</i>
Ddc	Células dendríticas dérmicas
DHA	Ácido docosahexaenóico, do inglês <i>Docosahexaenoic Acid</i>
DL	Limite de detecção, do inglês <i>Detection Limit</i>
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, do inglês <i>1,2-dihexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DOPE	1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina, do inglês <i>Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfocolina, do inglês <i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo, do inglês <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento, do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, do inglês <i>Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
EE	Eficiência de Encapsulamento
ELS	Eletroforese de Luz Dinâmica, do inglês <i>Electrophoretic Light Scattering</i>
EPA	Ácido eicosapentaenóico, do inglês <i>Eicosapentaenoic Acid</i>
FT	Transformadas de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
HPA	Eixo Hipotalâmico-hipofisário-adrenal, do inglês <i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis</i>

HPC	Fosfatidilcolina hidrogenada, do inglês <i>Hydrogenated Phosphatidylcholine</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IKK $\alpha/\beta$	Cinase inibidora do factor nuclear kappa B
IL	Interleucina
IR	Infravermelho, do inglês <i>Infrared</i>
K16	Queratina 16
KG	Glicirrizinato de potássio, do inglês <i>Dipotassium Glycyrrhizinate</i>
Kp	Coefficiente de partição
LCPUFA	Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, do inglês <i>Long Chain PolyUnsaturated Fatty Acids</i>
LOX-5	5-Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes, do inglês <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MLV	Vesículas Multilamelares, do inglês <i>Multilamellar Vesicles</i>
MTX	Metotrexato
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados, do inglês <i>MonoUnsaturated Fatty Acids</i>
NB-UVB	UVB de banda estreita, do inglês <i>Narrowband UVB</i>
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B, do inglês <i>Nuclear Transcription Factor kappa B</i>
NLC	Vetores Lipídicos Nanoestruturados, do inglês <i>Nanostructured Lipid Carriers</i>
NO	Óxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
P188	Poloxamer 188
P90G	Phospholipon90G
PC	Fosfatidilcolina, do inglês <i>Phosphatidylcholin</i>
Pdc	Células dendríticas plasmocitóides
PDI	Índice de Polidispersão, do inglês <i>Polydispersity Index</i>
PG	Prostaglandina
PGHS	Prostaglandina H sintase
PSA	Área de Superfície Polar, do inglês <i>Polar Surface Area</i>
PSO	Polissulfona
PTK	Proteína tirosina quinase, do inglês <i>Protein Tyrosine Kinases</i>
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados, do inglês <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
PUVA	Psoraleno+UVA
PVP	Polivinil pirrolidona, do inglês <i>Polyvinyl Pyrrolidon</i>
QL	Limite de Quantificação, do inglês <i>Quantification Limit</i>
R	Coefficiente de Correlação

<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de Determinação
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RSV</b>	Resveratrol
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SIRT1</b>	Gene Sirtuin 1
<b>SLN</b>	Nanopartículas de Lípidos Sólidos, do inglês <i>Solid Lipid Nanoparticles</i>
<b>SLS</b>	Laurel Sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>
<b>SMILLES</b>	Simplified Molecular-Input Line-Entry System
<b>SUV</b>	Vesículas Unilamelares Pequenas, do inglês <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
<b>Th</b>	Células T auxiliares, do inglês <i>T helper cells</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de Fusão, do inglês <i>Melting Temperature</i>
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVA</b>	Ultravioleta A
<b>UVB</b>	Ultravioleta B
<b>Vis</b>	Visível
<b>WWSA</b>	Volume de Van der Waals, do inglês <i>Van der Waals Surface Area</i>
<b>λ</b>	Comprimento de onda
<b>ZP</b>	Potencial zeta, do inglês <i>Zeta Potential</i>

# Capítulo 1

---

Introdução



Diversos estudos realizados ao longo dos últimos anos comprovam que compostos bioativos, como o resveratrol ou óleos de peixe ricos em ácidos gordos ômega 3, apresentam efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, o que justifica o seu uso em doenças de cariz inflamatório e/ou imunológico, como é o caso da psoríase, que afeta de diversas formas a qualidade de vida dos doentes [1-3].

Os nanossistemas lipídicos, como as nanopartículas lipídicas ou os lipossomas, têm sido investigados para possíveis aplicações terapêuticas em patologias da pele, com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica das substâncias que veiculam. Das inúmeras vantagens que estes nanossistemas apresentam é de destacar [4-6]: (i) a possibilidade de controlar a libertação dos compostos bioativos; (ii) a proteção que os nanossistemas conferem aos agentes ativos encapsulados, que ficarão menos sujeitos à degradação oxidativa e à ação de outros agentes externos (e.g. luz) e internos (e.g. pH) aumentando a sua estabilidade; (iii) a melhoria da penetração cutânea, propriedade que tem sido atribuída aos nanossistemas lipídicos pela sua capacidade de ultrapassar as barreiras do estrato córneo; (iv) a melhoria de características galénicas da formulação, com a possibilidade de, por exemplo, atenuar odores desagradáveis dos óleos de peixe; (v) a diminuição da irritação cutânea por evitarem que os componentes bioativos estejam em contacto direto com a pele; (vi) a possibilidade de melhoria da hidratação cutânea, quer por um possível efeito oclusivo, quer pela reposição do filme hidrolipídico em consequência da composição lipídica dos nanossistemas.

No entanto, apesar de todas as vantagens enumeradas, as dispersões de nanossistemas lipídicos apresentam uma viscosidade reduzida, o que constitui uma das limitações para a aplicação direta destas formulações ao nível tópico. Por este motivo, e para melhorar a estabilidade e as propriedades reológicas, vários autores têm incorporado estas formulações em bases semissólidas clássicas, como os cremes ou hidrogéis [7-10].

Pelo exposto, o principal objetivo deste trabalho de investigação consistiu no desenvolvimento e otimização de uma formulação tópica contendo óleos de peixe ricos em ômega 3 e resveratrol. Pretende-se a encapsulação destes bioativos em nanossistemas lipídicos e a sua incorporação num hidrogel para possível aplicação em lesões cutâneas psoriáticas ou inflamatórias. Para alcançar este objetivo, foi necessário delinear objetivos mais específicos que conduzissem a um desenvolvimento racional da formulação. Estes objetivos específicos encontram-se reunidos em três etapas do desenvolvimento da formulação:

1) Estudos de pré-formulação: avaliação *in silico* das características físico-químicas do resveratrol e descritores moleculares relevantes, bem como a avaliação da solubilidade lipídica do resveratrol;

2) Estudos de formulação: desenvolvimento e caracterização física de dispersões aquosas de vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês, *Nanostructure Lipid Carriers*) contendo ácidos gordos ômega-3 ou lipossomas contendo ácidos gordos ômega-3 e resveratrol; avaliação da estabilidade dos nanossistemas lipídicos; incorporação numa base semissólida e avaliação das características reológicas da formulação final;

3) Estudos de desempenho terapêutico: avaliação dos perfis cinéticos de liberação; avaliação da permeação cutânea e avaliação do efeito anti-inflamatório.

Esta dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos. Neste **primeiro capítulo de introdução** são apresentadas as motivações para a realização e desenvolvimento da presente dissertação, bem como os seus objetivos e a organização da mesma.

O **capítulo 2** tem como objetivo contextualizar todo o trabalho desenvolvido e para tal, é feita uma revisão da literatura acerca das doenças de pele com cariz inflamatório, dando-se particular ênfase à psoríase, e os tipos de tratamentos existentes para esta doença. Adicionalmente é apresentada uma revisão sobre os ácidos gordos ômega 3, sobre o composto bioativo resveratrol e ainda sobre os nanossistemas lipídicos para veiculação.

No **capítulo 3** são descritos os materiais e os métodos utilizados ao longo do trabalho experimental.

No **capítulo 4** são apresentados os resultados obtidos a partir dos procedimentos experimentais, bem como a discussão dos mesmos.

Por último, no **capítulo 5** são apresentadas as principais conclusões retiradas do trabalho desenvolvido e são feitas ainda considerações sobre as perspetivas futuras.

## **Capítulo 2**

---

Estado da Arte

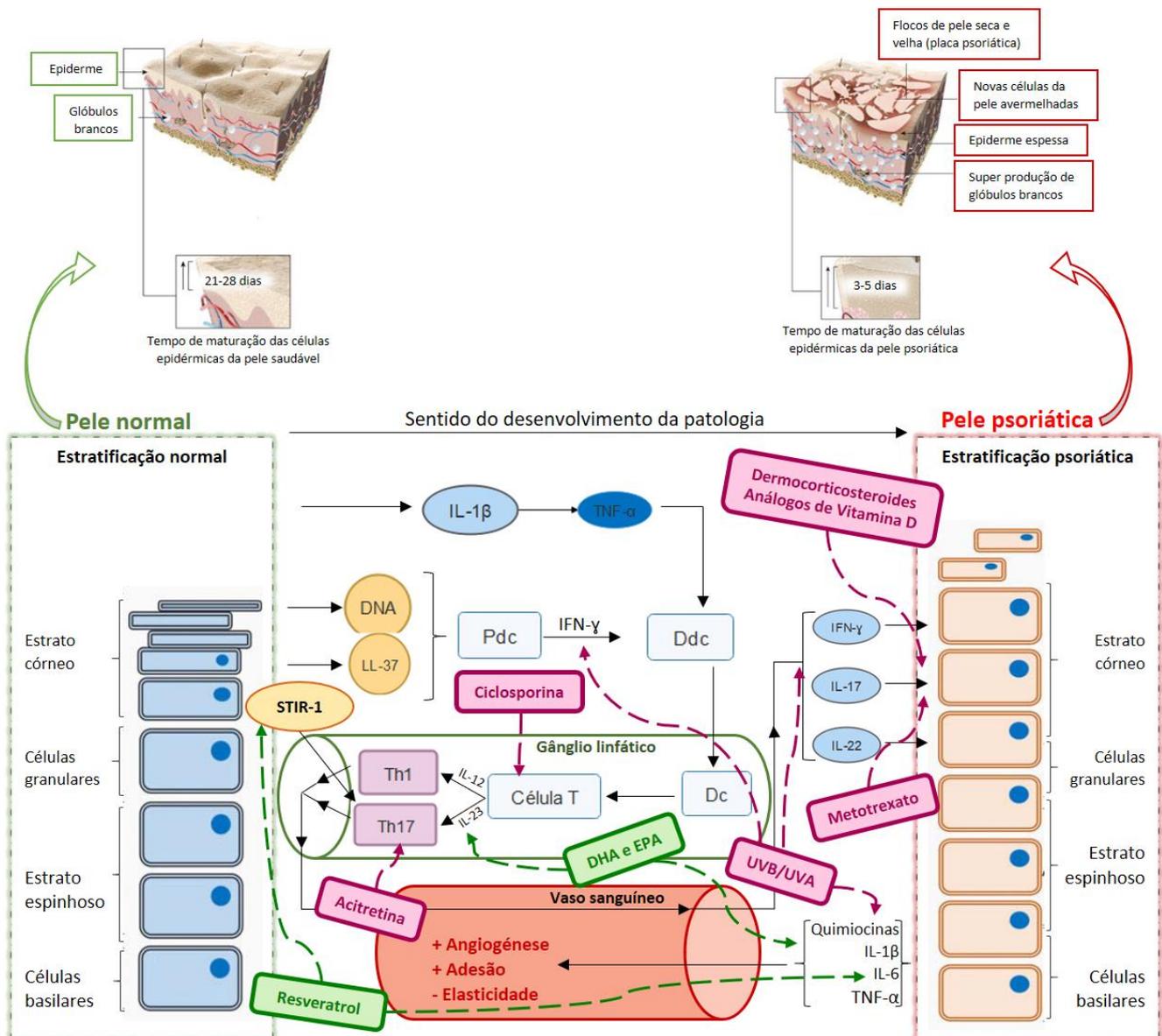


## 2.1. Doenças de pele com cariz inflamatório e autoimune: Psoríase

As doenças autoimunes caracterizam-se por um funcionamento anómalo do sistema imunitário, que considera os próprios tecidos do organismo como elementos estranhos, estimulando a produção de autoanticorpos ou células imunológicas. Esta resposta iniciada sem um elemento agressor externo ao organismo é denominada reação autoimune e resulta em danos teciduais que, quando se tornam crónicos, se designam por doença autoimune. Desta forma, as reações autoimunes podem afetar diversas partes do corpo, como o coração, cérebro, nervos, músculos, pele, olhos, articulações, pulmões, rins, glândulas, trato digestivo e vasos sanguíneos, manifestando-se classicamente pelo aparecimento de um processo inflamatório [11]. As doenças cutâneas do tipo autoimune podem manifestar-se clinicamente pelo aparecimento de diferentes lesões na pele, como por exemplo erupções cutâneas, pápulas, vesículas, alteração da cor e erosões nas mucosas. São exemplos deste tipo de doenças, a dermatomiosite, a psoríase, o vitiligo e o lúpus eritematoso cutâneo [11, 12].

Dermatologicamente, as doenças inflamatórias são as que mais afetam a pele, podendo apresentar uma evolução aguda, subaguda ou crónica, manifestando-se através de erupções cutâneas, lesões pruriginosas ou vermelhidão na pele [13]. A inflamação aguda é a que provoca danos menores nos tecidos, uma vez que resulta da exposição à radiação ultravioleta (UV), da exposição a alérgenos ou do contacto com produtos químicos irritantes (e.g. sabonetes, corantes capilares). Este tipo de inflamação pode ser tratado entre uma a duas semanas ou, por vezes, é autorresolutiva sem ser necessário recorrer a uma intervenção terapêutica. Por outro lado, as inflamações crónicas podem ser bastante duradouras e podem levar à destruição de porções significativas dos tecidos da pele, pois decorrem de uma resposta inflamatória por parte das células imunológicas. Este tipo de doença tem, geralmente, um grande impacto negativo na qualidade de vida das pessoas decorrente da sintomatologia característica. A psoríase, o eczema, a dermatite seborreica, a neurodermatite, a miliária, são exemplos de doenças inflamatórias da pele [13, 14].

A patogénese da psoríase é um processo bastante complexo, uma vez que se trata simultaneamente de uma doença autoimune e inflamatória crónica [15]. Na Figura 1 está representado o resumo da fisiopatologia da doença [16].

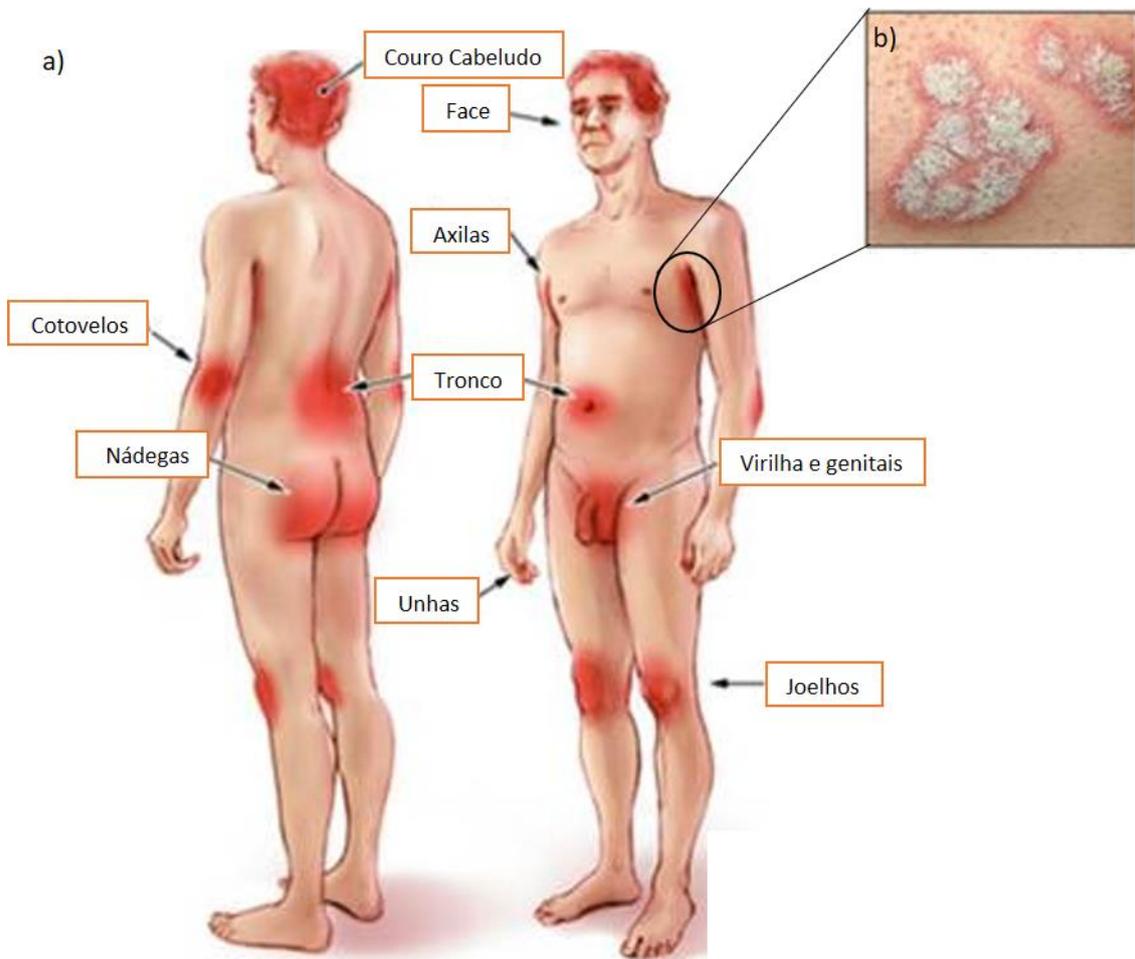


**Figura 1** – Mecanismos de desenvolvimento da psoríase. Estratificação da epiderme saudável (esquerda) e da epiderme psoriática (direita). Na parte central da imagem encontra-se a via patológica: células residentes da pele, resultantes da desregulação do sistema imunológico, libertam LL-37 que se acopla ao DNA e, assim, ativam células dendríticas plasmocitoides (Pdc) que, por sua vez, ativam as células dendríticas dérmicas (Ddc) através da libertação do IFN- $\gamma$ . Nos gânglios linfáticos, as células dendríticas (Dc) ativam os linfócitos T (células T). Estas libertam IL-12 e IL-23, que ativam as células T auxiliares (Th1 e Th17, respetivamente). Estas células Th, uma vez na corrente sanguínea, libertam IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22, que ativam a modificação e proliferação de queratinócitos, resultando numa epiderme mais espessa (típica da psoríase). Ação da terapia convencional (rosa) e de compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias (verde). Adaptado de [16].

Durante as fases ativas da doença, a qual se manifesta pela ocorrência de lesões psoriáticas, ocorre uma desregulação do sistema imunitário, com consequente produção de

autoantígenos específicos, tais como o péptido antimicrobiano LL-37, também designado por catelicidina, produzido pelos queratinócitos e a ADAMTS 5 (do inglês, *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin MotifS-like-5*) produzida pelos melanócitos. Estes autoantígenos acoplam-se ao DNA e ativam as células dendríticas cutâneas através da libertação do interferão gama (IFN- $\gamma$ ). Nos gânglios linfáticos, as células dendríticas ativam os linfócitos T, que, por sua vez, libertam interleucinas (IL), IL-12 e IL-23, que ativam as células T auxiliares (Th, do inglês, *T helpers*). Estas células Th, uma vez na corrente sanguínea, libertam IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22, que ativam a modificação e proliferação de queratinócitos, resultando: (i) num aumento da expressão da queratina 16 (K16); (ii) num aumento da espessura da epiderme nas células acima da camada basal; (iii) numa redução da diferenciação terminal dos queratinócitos; e (iv) na infiltração de linfócitos T na epiderme e na derme das lesões. As IL e os péptidos antimicrobianos ativam ainda os macrófagos presentes na camada basal da epiderme levando à produção de fatores pró-inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ , do inglês, *Tumor Necrosis Factor*), e as interleucinas IL-6 e IL-1 $\beta$  [12].

Em suma, através do mecanismo fisiopatológico descrito, é possível constatar que a psoríase é imunomediada por células da pele (células T ativas) que provocam uma hiperproliferação de queratinócitos cutâneos e a componente inflamatória deve-se à infiltração de macrófagos e a respostas vasculares. Consequentemente, esta doença ao nível da sintomatologia manifesta-se principalmente por lesões ao nível cutâneo, podendo apresentar manifestações sistémicas. Normalmente, o diagnóstico da psoríase é clínico e feito com base na observação de placas escamosas (devido à proliferação dos queratinócitos) e eritematosas (devido ao processo inflamatório) típicas e pápulas, que podem ser pruriginosas ou até mesmo dolorosas [17]. Estes sintomas são diagnosticados com mais frequência ao nível das zonas de fricção (Figura 2), nomeadamente nos joelhos, cotovelos, umbigo e região lombar, embora possam aparecer em qualquer região do corpo, como no couro cabeludo, nas unhas e nas mucosas [18].



**Figura 2** – Esquemática das zonas mais afetadas num doente com psoríase (a) e o aspeto de uma placa psoriática (b).

A psoríase afeta 125 milhões de pessoas em todo mundo e em Portugal mais de 200 mil sofrem desta patologia, sendo uma doença muito debilitante que merece uma atenção global, dado o seu elevado impacto [19]. O impacto desta patologia na qualidade de vida dos doentes é comparável a outras doenças crónicas, como o cancro, e pode manifestar-se sobre a forma de perturbações psicológicas, tais como baixa autoestima, disfunção sexual, ansiedade e depressão, que podem conduzir, em casos mais graves, ao suicídio [19]. Para além do impacto na saúde, a psoríase tem um peso económico substancial, estando na origem de um elevado absentismo laboral e de gastos anuais com os cuidados de saúde, que equivalem ao dobro dos gastos em cuidados de saúde com a população em geral [19].

Apesar de a etiologia da psoríase não ser completamente conhecida, esta parece ser multifatorial, envolvendo uma interação complexa de fatores genéticos, bioquímicos, imunológicos e ambientais [17, 18, 20, 21]. Entre os fatores de risco que podem desencadear esta doença incluem-se o tabagismo, o stress, a obesidade, o consumo de álcool e de alguns medicamentos

[21]. Para além de condicionarem o início da doença, fatores como a predisposição genética e a presença de infeção, lesão e irritação cutânea influenciam e condicionam o seu grau de gravidade [22, 23].

## **2.2. Estratégias terapêuticas para a psoríase**

A terapêutica da psoríase tem como objetivo tratar as lesões da pele, unhas e, possivelmente, das articulações, sendo que o principal objetivo é melhorar a qualidade de vida do doente. No entanto, é necessário ter em conta os possíveis benefícios e/ou desvantagens das terapias para que estas sejam direcionadas e individualizadas para cada doente [17].

Tradicionalmente, a gravidade da psoríase tem sido avaliada pela medida objetiva da extensão da superfície corporal afetada e pela eficiência e viabilidade da terapia tópica. Desta forma, esta doença cutânea pode ser classificada como sendo leve/moderada ou grave. Para a psoríase leve/moderada, em que menos de 10% da superfície corporal apresenta lesões, geralmente a terapia tópica é suficiente. Por outro lado, para a psoríase considerada grave, na qual 10% ou mais da superfície corporal apresenta lesões, o recurso a outras terapêuticas, como por exemplo a fototerapia com radiação ultravioleta B, a fotoquimioterapia (psoraleno oral e radiação ultravioleta A), a terapia sistémica (ciclosporina, metotrexato, acitretina) e, mais recentemente, a terapia biológica, serão as opções mais eficazes [15, 17, 24, 25].

### **2.2.1. Tratamentos clássicos**

#### **Terapia tópica**

Como referido anteriormente, a terapia tópica é a mais indicada para os doentes que apresentam lesões cutâneas mais localizadas, por exemplo nos cotovelos e joelhos. Esta terapia pode ser conjugada com outro regime terapêutico, uma vez que os doentes tratados com fototerapia, por exemplo, podem apresentar lesões residuais que necessitem da aplicação de formas farmacêuticas tópicas [26].

Atualmente, alguns dos tratamentos tópicos mais antigos ainda são usados no tratamento da psoríase. O alcatrão da hulha é um dos exemplos, no entanto a sua aplicação torna-se desagradável para o doente devido, principalmente, ao odor e à irritação que provoca no local da lesão [26].

Os tratamentos tópicos da psoríase incluem ainda a aplicação de diferentes formas farmacêuticas (pomadas, loções, cremes e géis) e diferentes compostos ativos com propriedades diversas (e.g., emolientes, agentes queratolíticos, análogos da vitamina D, retinoides), no entanto, as formulações contendo corticosteroides tópicos ou dermocorticosteroides continuam a ser preferencialmente prescritas. [16].

Os dermocorticosteroides, disponíveis nas formas farmacêuticas cremes e loções, são usados para todos os graus de psoríase, contudo, nos casos mais graves a sua utilização deve ser complementada com outras estratégias, como por exemplo a terapia sistêmica. A sua eficácia pode ser atribuída a múltiplos mecanismos de ação, incluindo aos seus efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores e ação anti-proliferativa sobre os queratinócitos [16]. Apesar da indicação, estes fármacos não são recomendados para tratamentos terapêuticos longos (duração máxima de um mês de tratamento), podendo causar alguns efeitos adversos, como por exemplo infecção e atrofia cutânea, desenvolvimento de estrias, rosácea esteroide, dermatite perioral e supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA, do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*). Outra desvantagem do uso de dermocorticosteroides é que, após uma redução da continuidade ou uma interrupção abrupta do tratamento, pode ocorrer uma recorrência dos sintomas, podendo ser, por vezes, mais agressivos do que os sintomas antes do início do tratamento [15, 16, 26, 27].

O segundo grupo de compostos ativos mais utilizados para o tratamento da psoríase são os que contêm análogos da vitamina D. Comparativamente com os dermocorticosteroides, os análogos da vitamina D podem ser usados continuamente sem causarem efeitos adversos graves, sendo que o efeito colateral mais comum destes análogos é a irritação cutânea. Geralmente, estes compostos são veiculados em pomadas e cremes [26, 28].

Por último, o tazaroteno é um retinoide tópico, disponível nas formas farmacêuticas gel e creme. Os retinoides tópicos são capazes de reverter alguma da atrofia cutânea causada pelos dermocorticosteroides, podendo, por isso, ser prescritos em associação a estes. Apresentam também desvantagens, como a irritação local da pele [26].

### **Fototerapia com radiação ultravioleta B**

O recurso à fototerapia para o tratamento de doenças de pele, como a psoríase, é eficaz e seguro, e pode ainda ser menos dispendiosa do que outros tratamentos [29, 30]. No entanto, para que seja o mais eficaz possível, é necessário que o tratamento seja efetuado pelo menos três vezes por semana e recomendado antes da administração de agentes sistémicos [26, 30].

Os comprimentos de onda da radiação mais eficientes para esta terapia encontram-se numa faixa muito estreita do espectro ultravioleta: dos 311 nm aos 316 nm. Atendendo a este aspeto, desenvolveu-se a fototerapia UVB de banda estreita (NB-UVB, do inglês, *narrowband UVB*), que tem provado ser mais benéfica do que a fototerapia UVB de banda larga (BB-UVB, do inglês, *broad-band UVB*) [26].

### **Fotoquimioterapia**

A fotoquimioterapia baseia-se na combinação de uma molécula de psoraleno (P), que pertence um grupo de compostos derivados de plantas que tornam a pele mais sensível à luz, e da radiação ultravioleta A (UVA), sendo abreviadamente designada por PUVA (Psoraleno+UVA). Esta terapia é particularmente útil como agente de segunda linha quando a medicação tópica ou a fototerapia com radiação UVB não alcançam os resultados terapêuticos pretendidos. Uma vez que não afeta o sistema imunológico, a fotoquimioterapia, pode ser também uma alternativa para alguns tratamentos orais e sistémicos causadores de supressão imunológica [31, 32].

Geralmente, os efeitos colaterais da PUVA são menores do que os de outros tipos de fototerapia, sendo os mais comuns: hiperpigmentação e vermelhidão cutâneas, pele seca e prurido. A longo prazo, os riscos da utilização desta terapia podem ser o fotoenvelhecimento e o cancro de pele [33].

### **Terapia sistémica**

Os principais tratamentos sistémicos para a psoríase incluem: metotrexato, acitretina e ciclosporina [26].

O mecanismo de ação do metotrexato ainda não é totalmente conhecido, contudo pressupõe-se que atue primeiramente como um imunossupressor. Deste modo, a terapia com metotrexato deve ser ajustada para cada doente, a fim de controlar os sintomas da psoríase com a menor dose possível e, assim, minimizar a toxicidade do fármaco. Os efeitos colaterais mais comuns desta terapia incluem náuseas, anorexia, estomatite e fadiga, que ocorrem com mais frequência no momento da administração do metotrexato. Dada a toxicidade potencialmente grave associada ao metotrexato e a necessidade de uma monitorização regular, os benefícios e riscos desta terapia para a psoríase devem ser cuidadosamente avaliados para cada doente [24, 34].

A acitretina é considerada um retinóide sistémico, podendo apresentar uma eficácia reduzida, quando utilizada como monoterapia. Como tal, é frequentemente usada em associação

com outras terapias, como por exemplo a fototerapia com radiação UVB ou fotoquimioterapia, com o objetivo de aumentar a eficácia no tratamento da psoríase e de a minimizar a toxicidade. Os efeitos colaterais mais comuns são os efeitos mucocutâneos, como por exemplo infecções labiais e queda de cabelo, que são dose-dependentes [35].

A ciclosporina é um agente sistêmico imunossupressor, altamente eficaz e de ação rápida no tratamento da psoríase. Este agente é indicado em tratamentos de curta duração de forma a minimizar a sua toxicidade. No entanto, estão descritos efeitos tóxicos associados a esta terapia como a nefrotoxicidade e a hipertensão, sendo a toxicidade renal a que provoca maior preocupação para os doentes com psoríase. Em geral, a incidência e a gravidade dos efeitos adversos parecem estar relacionadas com a dose cumulativa e com a duração do tratamento com ciclosporina. De acordo com estas considerações, a terapia com ciclosporina deve ser cuidadosamente adaptada para cada doente [24, 34].

### **Terapia biológica**

A terapia biológica é uma estratégia bem estabelecida no tratamento da psoríase e é projetada para bloquear alvos moleculares específicos que intervêm na patogénese desta doença, usando agentes biológicos. Estes agentes são, geralmente, anticorpos ou proteínas de fusão que têm como alvo marcadores específicos que estão envolvidos na ativação e/ou proliferação das células T responsáveis pelas lesões psoriáticas. Este tipo de tratamento é efetuado em duas fases: a fase da indução, que pode durar entre 16 a 24 semanas (tempo que os agentes biológicos levam para estabilizarem a sua eficácia) e a fase da manutenção, que é iniciada quando a indução está completa [16, 36, 37].

Como referido anteriormente, as IL-23 e IL-17 são importantes no desencadeamento da patogénese da psoríase. Deste modo, os agentes biológicos anti-IL-17 e anti-IL-12/23 parecem ser particularmente eficazes nesta doença. Em doentes com psoríase, os níveis de Th17, IL-17, IL-23, IL-22 e IL-23 são superiores comparando com indivíduos saudáveis. Assim, o bloqueio da ativação de células T patogénicas, permite reverter lesões clínicas e histopatológicas da psoríase, incluindo a expressão anormal da K16 e o excesso de infiltrações de células T. Deste modo, após o tratamento das lesões psoriáticas, a pele adquire o fenótipo tecidual e a sua função normal. Contudo, a pele é um órgão imunológico com células T residentes e, por esta razão, nem todas as células T são excluídas da pele através do tratamento biológico da psoríase [16].

O elevado custo, a oferta de tratamento insuficiente, a incerteza de segurança a longo prazo, a perda de eficácia ao longo do tempo e o aumento de risco de infeções, são algumas das limitações apresentadas pela terapia biológica. Adicionalmente, existe ainda uma preocupação da utilização de agentes biológicos durante a gravidez. A combinação destes agentes com os tratamentos convencionais pode ter especial interesse na melhoria da eficácia, na limitação da toxicidade e na redução do custo da terapia [37-39].

### **2.2.2. Tratamentos inovadores baseados em sistemas de entrega de fármacos**

Atualmente, os avanços nas formulações para o tratamento da psoríase permitem considerar diferentes estratégias de micro/nanoencapsulação de fármacos e/ou compostos bioativos para administração de acordo com as necessidades terapêuticas. Estas novas estratégias possibilitam uma melhor distribuição do fármaco/bioativo na pele, uma vez que são projetadas para apresentarem características específicas de libertação e absorção através do estrato córneo sem danificarem as funções desta barreira cutânea, e para melhorarem a permeação epidérmica, dérmica e/ou transdérmica de fármacos ou compostos bioativos já conhecidos [16, 25].

A micro/nanoencapsulação consiste na incorporação de fármacos e/ou compostos bioativos em sistemas de entrega com dimensões micro/nanométricas, que podem ser compostos por diferentes materiais (e.g. polímeros, lípidos e polissacarídeos). A utilização de micro/nanossistemas para o tratamento de lesões psoriáticas proporciona algumas vantagens, como [16]: proteção dos fármacos e/ou compostos bioativos contra a degradação (e.g. por oxidação); melhoria do direcionamento dos fármacos e/ou compostos bioativos para as camadas da pele; alteração no perfil de libertação dos fármacos e/ou compostos bioativos; melhoria da adesão do doente a abordagens terapêuticas de administração não invasiva, especialmente se for um caso de patologia crónica e redução do risco de efeitos colaterais, melhorando a relação risco/benefício da terapia.

São diversos os micro/nanossistemas desenvolvidos para a veiculação de fármacos e/ou compostos bioativos para o tratamento de patologias da pele, apresentando-se alguns exemplos nas tabelas 1 e 2 das secções 2.4.1 e 2.4.2, respetivamente. O foco desta dissertação são os nanossistemas lipídicos, em especial os lipossomas e as nanopartículas lipídicas, nas quais se incluem as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, do inglês, *Solid Lipid Nanoparticles*) e os NLC

(NLC, do inglês, Nanostructure Lipid Carriers). Os nanossistemas lipídicos são abordados com mais detalhe na secção 2.4.

### 2.3. Papel dos nutracêuticos na terapêutica

Apresentado pela primeira vez, em 1989, por Stephen DeFelice, fundador da Fundação para a Inovação em Medicina, o termo “nutracêutico” surge da junção das palavras “nutrição” e “farmacêutico”. DeFelice definiu nutracêutico como sendo um alimento, ou parte de um alimento, que apresenta benefícios para a saúde, incluindo na prevenção e no tratamento de doenças [40]. Depois desta primeira definição, têm sido propostas muitas outras definições para os nutracêuticos. Desde definições que os classificam como produtos produzidos a partir de alimentos, que se apresentam numa forma farmacêutica (e.g. cápsulas, comprimidos ou soluções) [41] a definições que os consideram suplementos alimentares que contêm a forma concentrada de um composto bioativo derivado de um alimento, utilizado com a finalidade de melhorar a saúde e em doses que excedem as que poderiam ser obtidas numa dieta normal [42]. A Food Directorate of Health Canada definiu-os ainda como produtos alimentares isolados ou purificados, geralmente vendidos sob a forma de produtos farmacêuticos não associados com alimentos, e que devem ter benefícios fisiológicos comprovados ou fornecer proteção contra doenças crónicas [43].

Em suma, os nutracêuticos podem incluir desde nutrientes isolados, suplementos dietéticos e substâncias que ocorrem naturalmente, a produtos processados, como cereais, sopas e bebidas [44]. Embora possam existir muitas propostas para a definição de nutracêuticos, existem duas características importantes para que se possa considerar determinado produto um nutracêutico: contribuição na prevenção e/ou tratamento de uma determinada doença e redução do aparecimento de doenças crónicas.

Neste trabalho foram usados dois nutracêuticos, óleos de peixe ricos em ácidos gordos ómega 3 e resveratrol, que apresentam propriedades benéficas para a saúde e que, usados como bioativos nas formulações desenvolvidas, poderão contribuir para a prevenção e/ou tratamento das lesões psoriáticas.

### 2.3.1. Papel dos ácidos gordos ómega 3 no processo inflamatório, no sistema imunitário e a sua ação na psoríase

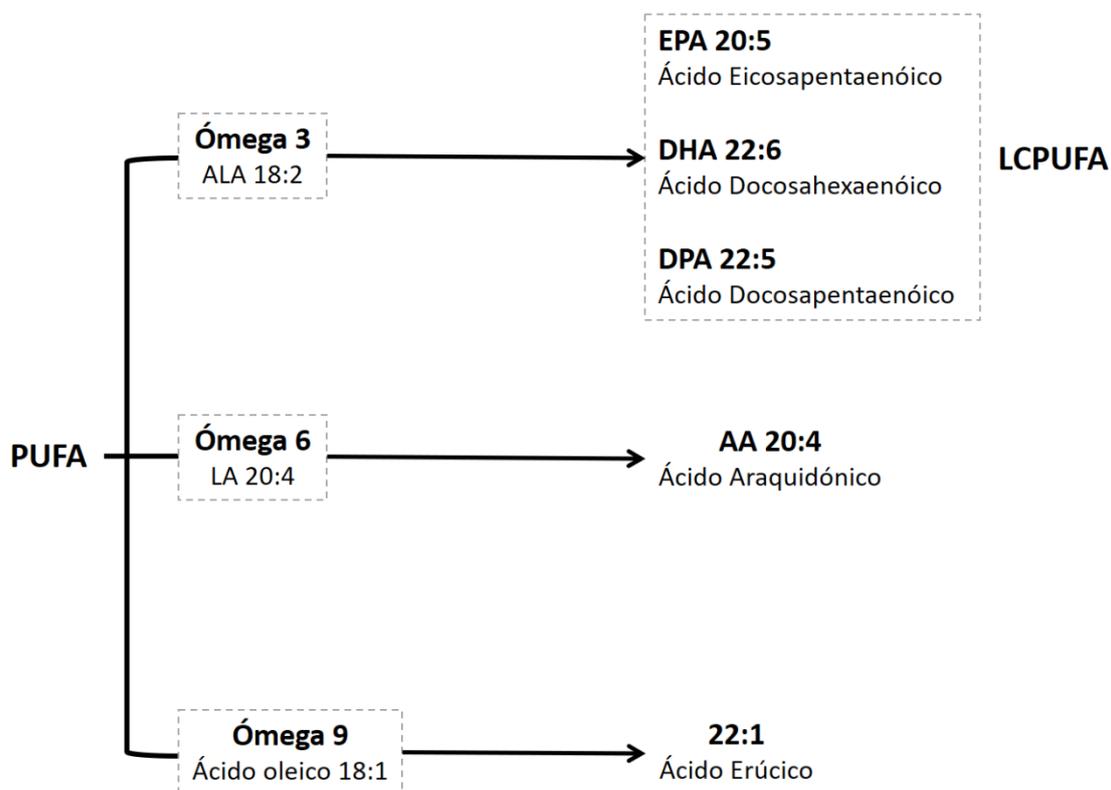
Os ácidos gordos representam um amplo grupo de compostos orgânicos formados por cadeias de hidrocarbonetos, podendo conter entre 2 a 40 átomos de carbono e que podem ser classificados quanto ao grau de insaturação (e.g. presença de ligações duplas) em: (i) saturados, se não contêm ligações duplas entres os pares de átomos de carbono adjacentes; (ii) monoinsaturados (MUFA, do inglês *MonoUnsaturated Fatty Acid*) se apenas contêm uma ligação dupla na cadeia hidrocarbonada e (iii) polinsaturados (PUFA, do inglês *PoliUnsaturated Fatty Acid*) se contêm mais do que uma ligação dupla na cadeia hidrocarbonada. Os ácidos gordos são nutrientes que existem nos alimentos sob a forma de triglicéridos e que devem constar numa dieta saudável já que apresentam diversas funções fundamentais no metabolismo: têm um papel essencial no armazenamento e transporte de energia; são os constituintes principais de todas as membranas celulares; têm um papel importante como reguladores de genes e, tal como outras gorduras, têm funções de isolamento térmico e proteção mecânica [45, 46]. De entre os ácidos gordos, os PUFA são os que possuem um papel mais relevante na promoção da saúde. Estes podem ser subdivididos em três famílias, classificadas de acordo com o ácido gordo que as constitui, que difere na posição da primeira ligação dupla relativamente ao grupo metilo terminal do ácido gordo [45, 47]:

- (i) PUFA n-3 (também designada por ómega 3) e que corresponde ao ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, do inglês, *Alpha Linolenic Acid*);
- (ii) PUFA n-6 (também designada por ómega 6) e que corresponde ao ácido linoleico (LA, do inglês *Linolenic Acid*);
- (iii) PUFA n-9 (também designad por ómega 9) e que corresponde ao ácido oleico (OA, do inglês *Olenic Acid*).

Estes ácidos gordos são designados ácidos gordos essenciais, uma vez que o organismo não os consegue sintetizar, sendo por isso obtidos através da dieta. Os ácidos gordos ómega 3 são obtidos através do consumo de peixes, como o salmão, o atum, de alguns frutos do mar (algas) e ainda de plantas e óleos de nozes [48]. Os ácidos gordos ómega 6 são obtidos através do consumo da maioria dos grãos e sementes, tais como o milho, o cártamo, o girassol e o algodão, assim como através do consumo de óleos vegetais [49]. Finalmente, os ácidos gordos ómega 9 estão presentes nos frutos secos (nozes, avelãs, amêndoas), azeite e na pêra abacate [50].

A partir destes ácidos gordos essenciais são sintetizados os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LCPUFA, do inglês *Long Chain PoliUnsaturated Fatty Acid*), que incluem o ácido eicosapentaenóico (EPA, do inglês *Eicosapentaenoic Acid*), o ácido docosahexaenóico (DHA, do inglês *Docosahexaenoic Acid*) e o ácido docosapentaenóico (DPA, do inglês *Docosapentaenoic Acid*), conforme representado no esquema da Figura 3.

Apesar de, teoricamente, os humanos serem capazes de sintetizar LCPUFA ou o ácido araquidónico (AA), a partir dos ácidos gordos ALA e LA por via de uma série de reações de insaturação e alongação, algumas evidências sugerem que esta conversão é extremamente limitada, pelo que os LCPUFA podem também ser classificados, condicionalmente, como essenciais [51].



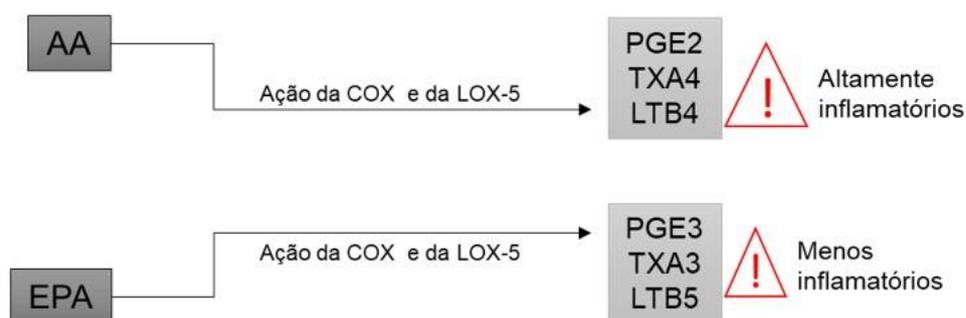
**Figura 3** – Esquematização dos principais ácidos gordos das famílias ómega 3, 6 e 9 e a conversão de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LCPUFA). O primeiro número identifica o número de carbonos presentes na cadeia hidrocarbonada e o segundo identifica o número de ligações duplas do composto. Adaptado de [52].

O AA é um ácido gordo ómega 6 produzido, como resposta a um processo inflamatório através da ativação da fosfolipase A2. A fosfolipase A2 hidrolisa os fosfolípidos das membranas celulares, produzindo AA que atua como substrato das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX-5) para a produção dos eicosanóides. Por sua vez os eicosanóides, como por exemplo a

prostaglandina (PG) E2, o tromboxano (TX) A2 ou o leucotrieno (LT) B4, são mediadores químicos altamente inflamatórios e pró-agregantes [53].

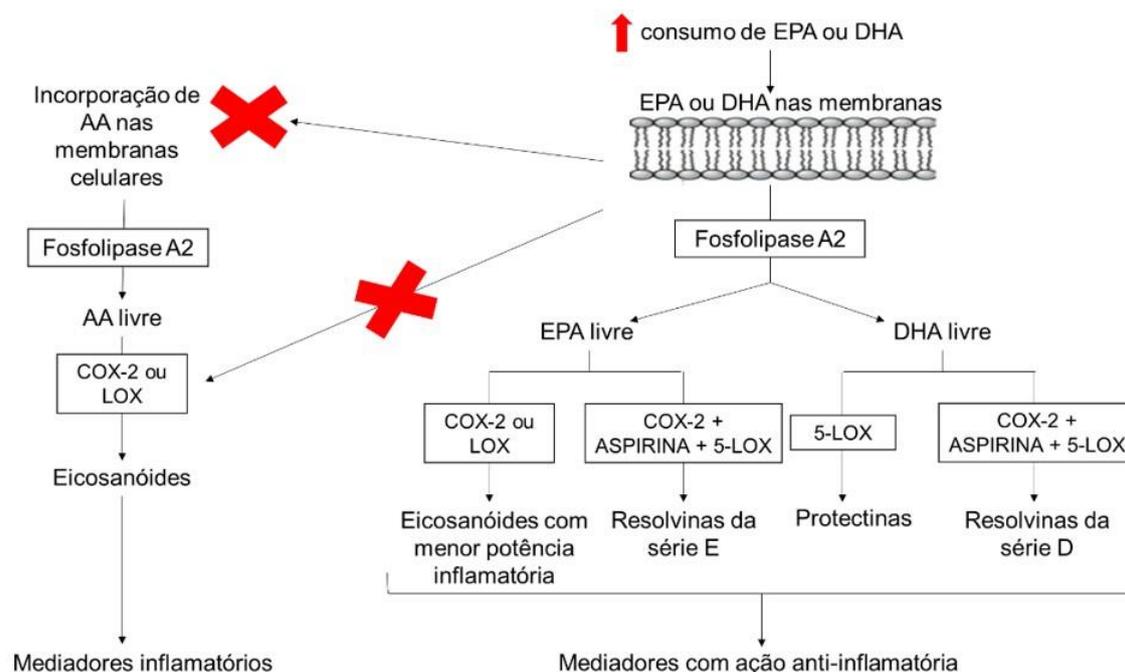
Quando há um grande consumo de EPA e DHA, ocorre uma substituição do AA por ácidos gordos ômega 3 na membrana fosfolipídica das células, verificando-se uma diminuição da quantidade de AA disponível para ser incorporado e libertado da membrana celular e, posteriormente, ser utilizado como substrato para a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios [54, 55].

Por outro lado, como o EPA é estruturalmente idêntico ao AA, é capaz de bloquear o seu metabolismo, tornando-se o substrato preferencial da COX e da LOX-5 e atuando como inibidor competitivo destas enzimas. Comparativamente aos eicosanóides resultantes da conversão do AA, os produtos da conversão do EPA (como por exemplo, o TXA<sub>3</sub>, as PG I<sub>3</sub> e E<sub>3</sub>, e o LTB<sub>5</sub>) têm um poder na estimulação da inflamação muito menor (Figura 4). Também o DHA tem esta capacidade de interferir no metabolismo do AA [53, 54, 56].



**Figura 4** – Tipos de eicosanóides derivados do AA e do EPA, e o seu poder inflamatório. Adaptado de [57].

Por último, a metabolização do EPA e do DHA origina a formação de mediadores com propriedades anti-inflamatórias importantes, como as resolvinas e as protectinas (Figura 5) [54, 57].



**Figura 5** – Mecanismo de ação anti-inflamatória dos ácidos gordos ômega 3. Adaptado de [37].

Pelo exposto se depreende que os ácidos gordos ômega 3, como o EPA e o DHA, apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras [1, 58, 59]. Os efeitos dos ácidos gordos ômega 3 na inflamação e na imunidade têm inclusivamente vindo a ser alvo de inúmeros estudos que demonstraram que estes nutracêuticos são potenciais agentes terapêuticos para doenças inflamatórias e autoimunes [1]. Adicionalmente, os ácidos gordos ômega 3 podem ter outros efeitos biológicos (e.g. melhoria da pressão arterial, melhoria da função endotelial e da reatividade vascular, formação reduzida de neutrófilos e citocinas), desempenhando um papel importante na função cerebral e na redução do risco de doenças cardiovasculares [48, 58, 60].

Existem ainda vários estudos que sugerem a existência de benefícios no uso de ácidos gordos ômega 3 como complementos no tratamento tópico da psoríase, como por exemplo a diminuição do processo inflamatório e o aumento da resolução das lesões da pele [59, 61, 62]. Tais benefícios resultam das propriedades do EPA e do DHA já referidas anteriormente, como a capacidade de bloquear o metabolismo do AA, limitando a síntese de PG e LT com um papel pró-inflamatório, e das propriedades anti-inflamatórias das resolvinas e das protectinas.

Adicionalmente, estes mediadores exercem ações imunoreguladoras que, geralmente, auxiliam na redução da hiperplasia e na hiperproliferação de queratinócitos, como por exemplo [63-66]: inibição da secreção de várias citocinas, incluindo IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ;

fagocitose de células polimorfonucleares apoptóticas; diminuição do processo de quimiotaxia e inibição da migração transendotelial de neutrófilos.

No entanto, existem alguns problemas associados ao uso de ácidos gordos ômega 3 para o tratamento da psoríase, como por exemplo a elevada suscetibilidade à peroxidação lipídica devido às ligações insaturadas destes ácidos gordos e a limitada capacidade de penetração cutânea. No sentido de tentar ultrapassar estas limitações, o desenvolvimento de nanossistemas para a veiculação de nutracêuticos, como os ácidos gordos ômega 3, poderá constituir uma estratégia terapêutica mais eficaz, melhorando a estabilidade e biodisponibilidade das formulações [18, 67, 68].

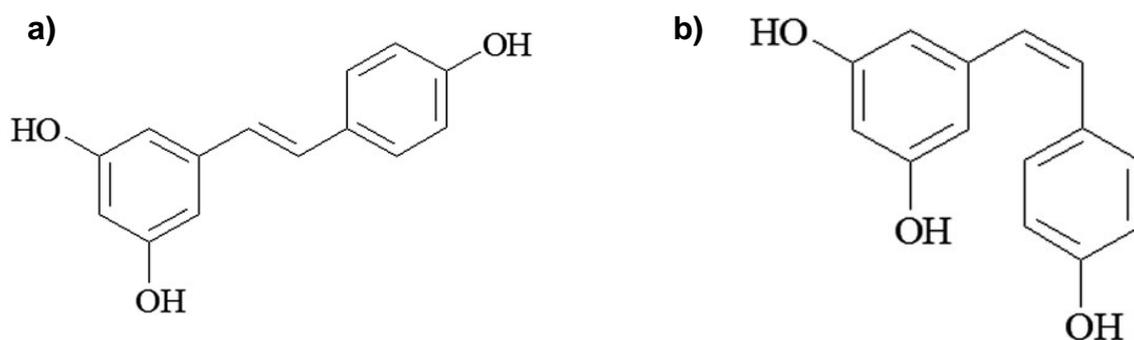
### **2.3.2. Papel do resveratrol no processo inflamatório, no sistema imunitário e na psoríase**

O resveratrol (RSV) é um polifenol vegetal que ocorre naturalmente e que pode estar presente numa variedade de plantas, como por exemplo em uvas e bagas. Este composto é ainda classificado como uma fitoalexina natural, uma vez que é sintetizado pelas plantas em resposta ao stress provocado por lesões, radiação ultravioleta e ataques de agentes patogénicos [69-72].

Nas uvas, o RSV está presente na casca e, por consequência, é encontrado no vinho tinto, pelo que se diz que este nutracêutico contribui para o chamado “paradoxo francês” [73]. Segundo este paradoxo, o risco de doenças e de mortalidade cardiovascular é relativamente baixo na comunidade francesa, apesar de em França o consumo de gorduras saturadas ser elevado (por exemplo através do consumo elevado de queijo) em relação ao consumo moderado de vinho tinto. Assim, coloca-se a hipótese de que o RSV possa ser um agente protetor contra doenças cardiovasculares, pelo que o seu consumo através do consumo de vinho tinto poderá contrariar os efeitos nefastos decorrentes do consumo de gorduras saturadas [74]. Além desta proteção contra doenças cardiovasculares, são inúmeros os benefícios que o RSV tem vindo a desempenhar para a saúde [69-71]: atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, analgésicas, neuro-protetoras, antienvhecimento, anticancerígenas e antivirais, sendo também, pelas suas propriedades neuro-protetoras, anti-inflamatórias e antioxidantes, capaz de retardar a progressão da doença de Alzheimer [74].

Na estrutura química do RSV existem dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de etileno. Por sua vez, os anéis aromáticos possuem três grupos hidroxilo ligados aos seus átomos

de carbono, como observado na maioria dos compostos polifenólicos (Figura 6). Assim, dentro da subclasse de estilbenos, o RSV é o termo comum usado para designar o 3,5,4-trihidroxiestilbeno e pode ser encontrado nas formas isoméricas *trans* e *cis* (Figura 6) [75, 76]. O isômero *trans* é o mais conhecido e utilizado por ser mais bioativo e por possuir diferentes efeitos biológicos. Por atuar como uma fitoalexina, o RSV é altamente suscetível à isomerização por efeitos da radiação ultravioleta e, portanto, 80% do isômero *trans* é convertido na forma isômero *cis* após exposição prolongada à luz [77].



**Figura 6** – Estruturas químicas do resveratrol: a) isômero *trans* (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e b) isômero *cis* (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno).

As propriedades anti-inflamatórias do RSV têm sido atribuídas a diversos mecanismos que incluem [76, 78]: (i) inibição da transcrição da COX-2; (ii) inibição da atividade da COX-1, através de um mecanismo mediado pela peroxidase; (iii) a inibição de algumas células imunes ativadas e (iv) a inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês, *nuclear transcription factor kappa B*) que, por sua vez, pode ser mediada pela inibição da IKK (do inglês, *I kappa B kinase*). Considerando que a ativação do NF- $\kappa$ B é necessária para a expressão de inúmeras proteínas inflamatórias, a inibição deste fator de transcrição pode reduzir a expressão de genes inflamatórios, a produção da prostaglandina E<sub>2</sub> e a formação de ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) [76, 78]. Além disto, o RSV inibe a proteína tirosina quinase (PTK, do inglês *Protein Tyrosine Kinases*) que modula a proliferação e diferenciação celular, os processos de sinalização nas células do sistema imunológico e ainda os processos biológicos envolvidos na resposta inflamatória e em doenças como o cancro, arteriosclerose e psoríase [2].

O RSV apresenta também um papel importante na regulação da expressão do gene SIRT1, regulando a produção da proteína SIRT1. Esta proteína é responsável pela ativação de células Th17, as quais são importantes no processo inflamatório da psoríase [79]. Assim, O RSV ao regular

a expressão do gene SIRT1 reduz a produção de citocinas inflamatórias que ocorre durante as fases ativas da psoríase. A regulação da expressão do gene SIRT1 pelo RSV também é responsável pela inibição da PTK que modula a proliferação e diferenciação celular [80] e pelo bloqueio da proteína aquaporina 3, a qual é importante na regulação da sobrevivência celular [81]. Consequentemente, o RSV inibe a proliferação de queratinócitos da epiderme e promove a morte celular destas células, apresentando uma ação benéfica na eliminação das lesões psoriáticas.

A partir do testemunho de pessoas que já utilizaram o RSV para o tratamento da psoríase é possível assegurar alguns dos seus benefícios e a sua eficácia. É o caso de uma doente que apresentava 80% do couro cabeludo coberto por placas psoriáticas há mais de 20 anos e que decidiu iniciar um tratamento com a toma oral de um suplemento de RSV. Após três meses do início do tratamento, a doente refere que o seu couro cabeludo não apresentava lesões psoriáticas e que não tinha qualquer sensação de prurido na cabeça. Uma outra testemunha, que sofre de psoríase moderada em placas há mais de 40 anos, experimentou inúmeros tratamentos com sucesso a curto prazo. Na tentativa de obter melhores resultados a longo prazo recorreu à terapia com vitamina B7 combinada com RSV e declara que, após seis meses deste processo, não apresentou recidivas das lesões psoriáticas e refere ainda que as suas unhas ficaram muito mais fortes [3].

## **2.4. Nanossistemas lipídicos: lipossomas e nanopartículas lipídicas**

A pele é um órgão de fácil acesso para a administração tópica de fármacos e/ou compostos ativos, podendo desta administração resultar um efeito local (se não há penetração cutânea para além das camadas da epiderme) ou sistémico (se ocorre penetração cutânea até às camadas da derme e o fármaco e/ou compostos bioativos atingem os vasos sanguíneos passando para a circulação sistémica). Esta via de administração apresenta várias vantagens em comparação com a administração oral ou intravenosa, tais como: evitar as barreiras fisiológicas presentes no trato gastrointestinal (como por exemplo, as variações de pH, a camada mucosa e a atividade enzimática); proporcionar facilidade de aplicação e, no caso da terapia ser destinada a tratar lesões cutâneas, a administração tópica tem a vantagem de permitir um tratamento mais direcionado e de reduzir possíveis efeitos colaterais que poderiam ocorrer por toma oral e distribuição inespecífica do fármaco e/ou compostos bioativos em tecidos não alvo. No entanto, o estrato córneo é a principal barreira que a via de administração tópica enfrenta, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias, como por exemplo o uso de nanossistemas lipídicos, para

veiculação e entrega de fármacos e/ou compostos bioativos, que sejam capazes de ultrapassar esta barreira [82, 83].

Alguns exemplos de nanossistemas lipídicos utilizados para a veiculação de fármacos para a administração tópica incluem lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas [82, 84].

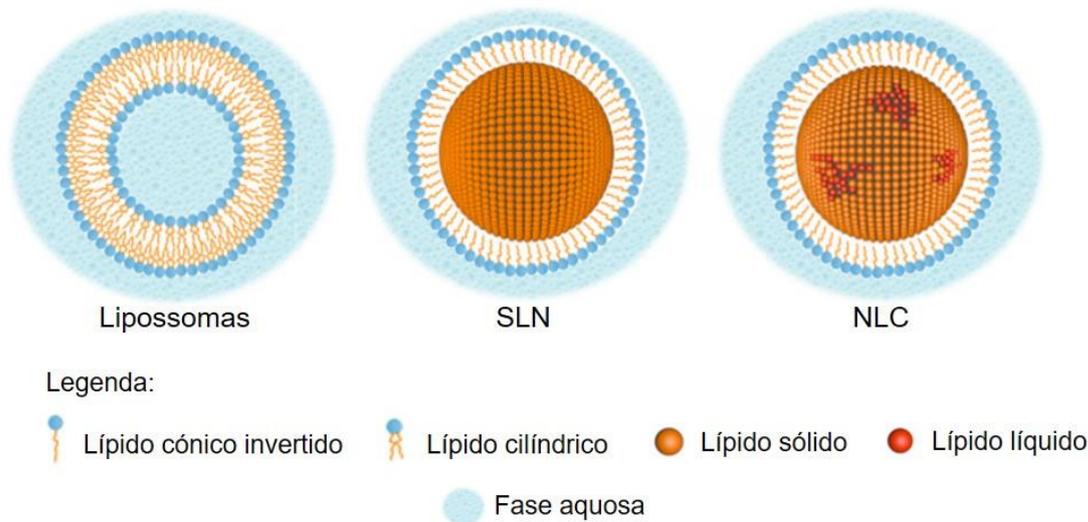
Os lipossomas são um dos sistemas de veiculação de fármacos mais utilizado para a administração tópica. Estes vetores lipídicos são termodinamicamente estáveis e formam-se espontaneamente devido a fatores entrópicos quando um agente anfifílico é colocado em contacto com a água. Quando colocados em solução aquosa, os agentes anfifílicos compostos por uma “cabeça” hidrofílica ligada a duas cadeias hidrofóbicas de ácidos gordos possuem a capacidade de, espontaneamente, formar agregados em bicamada lipídica. Para reduzir a exposição das faces laterais hidrofóbicas à água, as bicamadas dobram-se sobre si próprias formando bicamadas concêntricas. Estas estruturas esféricas constituídas por bicamadas concêntricas designam-se por vesículas lipídicas. Durante a sua formação, as vesículas sequestram no seu interior parte do solvente aquoso onde estão suspensas. Quando o agente anfifílico é um fosfolípido, as vesículas resultantes são usualmente denominadas lipossomas [83, 85, 86]. Os lipossomas são nanossistemas versáteis na medida em que podem veicular tanto compostos lipofílicos como compostos hidrofílicos. No caso de o objetivo ser o transporte de fármacos lipossolúveis, a incorporação destes fármacos ocorre essencialmente ao nível das cadeias hidrocarbonadas da bicamada. No caso de o objetivo ser o transporte de fármacos hidrossolúveis, a incorporação destes fármacos ocorre na superfície membranar, ao nível das “cabeças” hidrofílicas ou ao nível do compartimento aquoso dos lipossomas.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e número de bicamadas fosfolipídicas, em [83]: (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *Small Unilamellar Vesicles*) que apresentam apenas uma bicamada lipídica e um diâmetro entre 20 e 50 nm; (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*) que apresentam apenas uma bicamada lipídica e um diâmetro superior a 100 nm e (iii) vesículas multilamelares (MLV, do inglês *Multilamellar Vesicles*) que apresentam múltiplas bicamadas lipídicas podendo o seu tamanho variar entre os 400 e os 3500 nm.

Os lipossomas quando utilizados como sistemas de veiculação de fármacos pelas vias dérmicas ou transdérmicas apresentam várias vantagens, tais como [83]: a diminuição da dosagem dos fármacos, a libertação controlada dos fármacos e a diminuição de efeitos colaterais devido a um efeito reservatório resultante do facto de os lipossomas permitirem depósitos locais

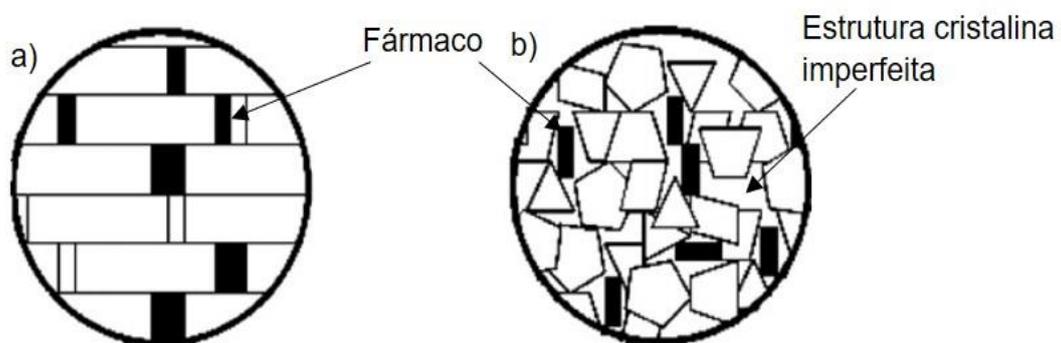
dos fármacos. No entanto, os lipossomas como sistemas de veiculação apresentam também alguns inconvenientes, nomeadamente [83]: o alto custo de produção e a dificuldade de transposição para a escala industrial; a estabilidade físico-química reduzida, a limitada capacidade de encapsulação e a eventual presença de contaminantes resultantes dos métodos de produção (e.g. solventes orgânicos).

Outros sistemas de veiculação promissores são as nanopartículas lipídicas. As nanopartículas lipídicas são sólidas às temperaturas ambiente e corporal e são constituídas por um único componente lipídico ou por uma mistura de componentes lipídicos, como os triglicéridos ou os ácidos gordos e por um ou mais agentes tensioativos que permitem a sua estabilização na dispersão aquosa [82, 84]. A primeira geração de nanopartículas lipídicas, designadas por nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, do inglês, *Solid Lipid Nanoparticles*), começa a ser desenvolvida no início da década de 90 com base nas vantagens e nos conceitos das nanopartículas poliméricas e nas nanoemulsões [87]. A constituição das SLN baseia-se na substituição do lípido líquido (óleo) de uma nanoemulsão do tipo Óleo/Água por um lípido sólido (Figura 7), que seja capaz de permanecer sólido às temperaturas ambiente e corporal [88]. Quando comparadas com os lipossomas, as SLN apresentam algumas vantagens, como a melhoria da estabilidade química, o baixo custo e ainda a facilidade com que podem ser fabricadas e com que se pode transpor o seu processo de fabrico para a escala industrial [89]. No entanto, a limitada capacidade de encapsulação das moléculas na matriz lipídica sólida e a possibilidade de estas moléculas serem expulsas durante o período de armazenamento são desvantagens das SLN que devem ser consideradas [90].



**Figura 7** – Tipos de nanossistemas lipídicos. SLN – nanopartículas lipídicas sólidas (do inglês, *Solid Lipid Nanoparticles*); NLC – vetores lipídicos nanoestruturados (do inglês, *Nanostructured Lipid Carriers*). Adaptado de [91].

Uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os NLC, surgiu de modo a ultrapassar os problemas anteriormente referidos das SLN [82]. A matriz lipídica dos NLC corresponde a uma mistura de um lipídio sólido com um lipídio líquido dispersa numa fase aquosa contendo um ou mais agentes tensioativos [85, 86]. Esta mistura de lipídios proporciona uma estrutura cristalina imperfeita, aumentando o espaço disponível para veicular os fármacos e/ou compostos bioativos [85]. No entanto, a veiculação de compostos anfífilos ou hidrófilos é difícil, uma vez que a matriz destas partículas é uma matriz lipídica que favorece a encapsulação de compostos lipossolúveis.



**Figura 8** - Estrutura cristalina da matriz lipídica. a) Matriz perfeita das SLN; b) Matriz imperfeita dos NLC. Adaptado de [92].

Tanto as SLN como os NLC podem ser aplicados nas áreas farmacêuticas e cosméticas e apresentam vantagens quando comparadas com outros vetores como os lipossomas, ou seja, têm maior estabilidade físico-química e são capazes de formar um filme lipídico sobre a pele, promovendo um efeito oclusivo e emoliente que aumenta a hidratação e a penetração cutânea [84, 88].

As nanopartículas lipídicas são dispersões líquidas com baixa viscosidade, o que dificulta a sua aplicação na pele. Desta forma, para se obter uma preparação com consistência adequada para aplicação cutânea, a dispersão aquosa das nanopartículas pode ser incorporada em diversas bases semissólidas, como por exemplo cremes ou hidrogéis, previamente preparadas ou durante a sua produção [82].

#### **2.4.1. Nanossistemas lipídicos contendo resveratrol e/ou ácidos gordos ómega 3**

Na Tabela 1 são apresentados alguns tipos de nanossistemas lipídicos contendo resveratrol e/ou ácidos gordos ómega 3 encapsulados. Para tal, foi realizada uma pesquisa bibliográfica de todos os trabalhos publicados entre 2000 e 2017 com o objetivo de reunir os vários estudos reportados relativamente a este tipo de formulações, obtendo assim, o conhecimento base necessário para a realização deste projeto.

**Tabela 1** - Formulações de NLC, SLN e lipossomas para a encapsulação de ácidos gordos ômega 3 e/ou RSV, reportadas na literatura.

Tipo de nanossistema	Composto bioativo e/ou fármaco	Composição	Principais resultados	Referências
Lipossomas	Óleo de peixe (DHA e EPA)	- PC; - Óleo de girassol	- Proteção dos PUFA; - ↑ da estabilidade	[93]
	DHA	- DOPC; - DOPE	- ↓ da proliferação celular; - Indução da apoptose; - Regulação de proteínas	[94]
	RSV	- PC; - Quitosano	- EE% > 70%; - ↑ propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias - Liberação prolongada e controlada; - Estabilidade química do RSV	[95]
	RSV	- PC; - CHOL; - DCP; - P90G	- EE% >70%; - Boa estabilidade; - Efeitos proliferativos e fotoprotetores	[96]
NLC	Óleo de peixe e óleo de sementes de pinho	- Dynasan 118 <sup>®</sup> (LS); - Óleo de peixe e de sementes (LL); - Tween 80 <sup>®</sup> e P188 (T)	- Estabilidade física; - ↑ EE% dos PUFA	[97]
	Ômega 3	- Óleo de peixe (LL); - Dynasan 118 <sup>®</sup> (LS); - Tween 80 <sup>®</sup> (T); - SDS; - Vitamina E; - PVP	- ↓ odor e sabor indesejados; - Boa estabilidade; - Absorção favorável no intestino	[98]
NLC e SLN	RSV	- Compritol 888 ATO <sup>®</sup> (LS); - Miglyol <sup>®</sup> (LL); - P188 e Tween 80 <sup>®</sup> (T)	- ↑ biocompatibilidade; - Atividade antioxidante; - Penetração/acumulação de RSV na pele	[99]
	RSV	- Palmitato de cetilo (LS); - Miglyol-812 <sup>®</sup> (LL) - Tween 60 <sup>®</sup> (T)	- EE% > 70%; - Sistemas estáveis; - Liberação controlada do RSV	[100]

**Abreviaturas:** CHOL, Colesterol; DCP, Dicetil fosfato; PC, lecitina ou fosfatidilcolina; DOPC, 1,2-dihexadecil-*sn*-glicero-3-fosfolina; DOPE, 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina; EE%, eficiência de encapsulamento; LL, lípido líquido; LS, lípido sólido; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; PVP, polivinilpirrolidona; P188, Poloxamer 188<sup>®</sup>; P90G, Phospholipon90G<sup>®</sup>; SDS, Dodecil sulfato de sódio; T, tensoativo.

## 2.4.2. Nanossistemas lipídicos com aplicação na psoríase

Na Tabela 2 são apresentados alguns tipos de nanossistemas lipídicos com compostos bioativos e/ou fármacos encapsulados, assim como a sua composição. Para tal, realizou-se uma pesquisa bibliográfica em que todos os artigos pesquisados e citados foram limitados no tempo (entre 2000 e 2017). A concretização desta tabela tem como objetivo sintetizar alguns dos estudos já reportados relativamente a este tipo de formulações para o tratamento da psoríase, obtendo o conhecimento necessário para a realização deste projeto.

**Tabela 2** - Formulações de nanopartículas lipídicas e lipossomas para a aplicação em casos clínicos de psoríase, reportadas na literatura.

Tipo de nanossistema	Composto bioativo e/ou fármaco	Composição	Principais resultados	Referências
Lipossomas	Tamoxifeno	- PC ou HPC; - KG	- ↑ Permeação cutânea; - Retenção do fármaco na pele	[101]
	Ditranol	- PC; - Colesterol (CHOL)	- Pele mais clara em comparação com o tratamento convencional	[102]
	Calcipotriol dipropionato de betametasona	- Precirol ATO5® (LS); - Pluronic F-68 (T)	- Retenção do fármaco na pele; - ↓ <i>in vivo</i> da espessura epidérmica	[103]
SLN	Antralina	- Precirol ATO5® (LS); - OA (LL); - Tween 60® (T)	- ↓ da taxa de degradação do fármaco; - ↑ da estabilidade após incorporação dos SLN num hidrogel	[104]
NLC	Metotrexato (MTX)	- Witepsol S51® (LS); - OA (LL); - Tween 60 e 80® (T)	- EE% >60%; - ↑ estabilidade das formulações	[105]
	Acitretina	Precirol ATO 5® (LS) Ácido oleico (LL) Tween 80® (T)	- EE% máxima; - ↑ da adesão do doente	[104]

**Abreviaturas:** CHOL, Colesterol; EE%, eficiência de encapsulamento; HPC, Lecitina hidrogenada; KG, Glicirrizinato dipotássico; LL, lípido líquido; LS, lípido sólido; AO, ácido oleico; T, tensoativo.



# **Capítulo 3**

---

## **Materiais e Métodos**



### 3.1. Materiais e reagentes

Na Tabela 3 apresentados os vários materiais (reagentes, material e equipamento) utilizados ao longo do desenvolvimento do trabalho efetuado.

Tabela 3 – Principais materiais, reagentes e aparelhos utilizados ao longo do trabalho experimental. (continua)

<b>Designação</b>	<b>Empresa</b>
Ácidos gordos ómega 3 (cápsulas gelatinosas)	Myprotein (Portugal)
Água ultrapura	Millipore Corporation
Amicons com filtros de 50 kDa	Merck Millipore Ireland Ltd
ATR-FTIR	FTIR Perkin-Elmer, Spectrum Two Spetrometer
Azoto gasoso	Alphagaz (Portugal).
Balança analítica	Denver
Banho de água termostaticado	Selecta
Célula capilar para avaliação do potencial Zeta	Malvern Instruments Ltd
Células de quartzo	Helma Analytics
Células descartáveis e poliestireno	Sarstedt AG&Co
Centrífuga Hettich Universal 320	Hettich Lab Technology
Cloreto de benzalcónio	Merck Schudart
Clorofórmio	Sigma–Aldrich (Portugal)
Dipcell (ZEN1002)	Malvern Instruments Ltd
DPPC	COATSOME
DSPC	COATSOME
DOPE	COATSOME
Espectrofotómetro de varrimento UV-3101PC UV-Vis-NIR	Shimadzu Corporations
Etanol	Sigma–Aldrich (Portugal)
Extrusor Lipex	Northern Lipids Inc.
Filtros de membrana de policarbonato	Whatman
Glicerina	Cmd Chemicals
Homogeneizador ultrassónico Bandelin Sonopuls	Sigma-Aldrich®
Kit COX	Cayman Chemical
Membranas de polissulfona (tamanho de poro de 450 nm)	Tuffryn®

Tabela 3 – Principais materiais, reagentes e aparelhos utilizados ao longo do trabalho experimental. (continuação)

Designação	Empresa
Microbalança	Sartorius
Gelificante PFC (Carbómero 2001)	Guinama
pHmetro de bancada 691	Metrohm
Precirol ATO5	Gattefossé
RSV	Sigma–Aldrich (Portugal)
Sistema <i>float-a-lyzer</i> com membranas de diálise	VWR
Tween® 80	Acofarma,
Viscosímetro	ST-2001, J.P. Selecta®
Vórtex Lab Dancer	VWR
Ultra-turrax® T25	IKA®
Zetasizer nano ZS	Malvern, Paralab

### 3.2. Quantificação do resveratrol por espectrofotometria de absorção UV/Vis

Com o objetivo de determinar quantitativamente um grande número de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas, a técnica da espectroscopia de absorção molecular nas regiões espectrais Ultravioleta (UV) e Visível (Vis) tem sido bastante utilizada.

Quando um feixe de luz incide num meio absorvente e se a energia desse mesmo feixe de luz for suficiente para promover uma transição entre níveis de energia dos eletrões (por exemplo, do estado fundamental para um estado excitado), os fótons do feixe de luz serão absorvidos pelo meio. A capacidade de absorção de um dado composto pode ser usada para quantificá-lo, medindo a intensidade do feixe de luz, a um comprimento de onda específico, antes e depois da sua interação com a amostra. Estes parâmetros podem ser correlacionados através da seguinte equação:

$$I_{\lambda} = I_0 e^{-\alpha_{\lambda} l} \quad \text{Equação 1}$$

onde  $I_{\lambda}$  é a intensidade da luz transmitida,  $I_0$  é a intensidade da luz incidente,  $\alpha_{\lambda}$  é o coeficiente de absorção e  $l$  é a espessura da amostra.

Quando ocorre absorção, a intensidade da luz transmitida ( $I_{\lambda}$ ) que atinge o detetor será inferior à intensidade da luz incidente ( $I_0$ ). Desta forma, a razão entre a intensidade da luz que atravessa a amostra a um comprimento de onda específico e a intensidade da luz incidente é designada de Transmitância ( $T_{\lambda}$ ) e é dada pela equação:

$$T_{\lambda} = \frac{I_{\lambda}}{I_0} \quad \text{Equação 2}$$

Aplicando a Equação 3, a transmitância ( $T_{\lambda}$ ) está diretamente relacionada com a Absorvância ( $A_{\lambda}$ ):

$$A_{\lambda} = -\log T_{\lambda} \quad \text{Equação 3}$$

Assim, quanto maior for a concentração de uma determinada amostra, maior será a absorvância, uma vez que a concentração está relacionada com o coeficiente de absorção através da Equação 4:

$$\alpha_{\lambda} = 2,303 \varepsilon_{\lambda} c \quad \text{Equação 4}$$

em que,  $\alpha_{\lambda}$  é o coeficiente de absorção,  $\varepsilon_{\lambda}$  é o coeficiente de absorção molar e  $c$  é a concentração da amostra. Além disso, e segundo a lei Lambert-Beer (Equação 5) quando maior a distância percorrida pelo feixe de luz, maior será a absorvância [106]:

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

Deste modo, a lei de Lambert-Beer fornece uma proporcionalidade direta entre a absorvância da luz e a concentração de um composto a um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ). Contudo, esta lei só pode ser aplicada para radiação monocromática, ou seja, para cada comprimento de onda existe um coeficiente de absorção correspondente, e para amostras que apresentem uma única espécie absorvente. Se existir mais do que uma espécie absorvente na mesma amostra, a absorvância irá corresponder à soma da absorvância de cada espécie.

As características do material, da radiação incidente e das estruturas químicas dos compostos envolvidos influenciam a absorção. Portanto, antes de fazer uma leitura de absorvância, é importante escolher um solvente transparente na zona de comprimento de onda

em análise e descontar a absorvância do solvente e do material utilizado, ou seja, é necessário fazer a subtração da linha de base para que a leitura seja relativa à absorvância da amostra [106].

Para a quantificação do resveratrol foi necessário preparar soluções padrão de resveratrol, definir os seus espectros de absorção e, por consequência, a curva de calibração.

### **3.2.1. Preparação de soluções padrão de resveratrol**

Para preparar a solução *stock* de RSV, uma quantidade de 0,2882 g de fármaco foi dissolvida em 10 mL de água ultrapura num balão volumétrico, obtendo-se uma solução de RSV com uma concentração de 1000  $\mu\text{M}$ . Partindo desta solução, foram preparadas, por diluição em eppendorfs, soluções padrão aquosas contendo diferentes concentrações de RSV (0,5  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ).

### **3.2.2. Determinação do espectro de absorção (UV/Vis) do resveratrol**

Para traçar os espectros de absorção do fármaco na região do ultravioleta e visível (200 - 500 nm), utilizou-se um espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC, que emite radiação eletromagnética desde a região espectral UV até à região IR, usando uma lâmpada de deutério para os comprimentos de onda correspondentes à radiação ultravioleta (190 - 350 nm) e uma lâmpada de tungsténio para as regiões do visível e do infravermelho (320 - 2500 nm). As fendas de controlo da largura do feixe de emissão foram definidas para 2 nm, os intervalos de leitura foram definidos como 1 nm, a velocidade de varrimento foi definida como baixa e o espectro foi traçado entre os 200 nm e os 400 nm.

Para garantir que os espectros de absorção correspondem à absorção de luz pelas moléculas do fármaco, procedeu-se à leitura da linha de base ou *baseline*, antes de se efectuar a leitura dos espectros de absorção da amostra. Na linha de base utilizam-se duas células, as quais contêm o solvente, para uma correção do ruído ou dispersão de luz que não constitua um sinal proveniente da absorção do analito. Por outro lado, nas leituras de absorvância, a célula de referência contém o solvente e a célula da amostra contém as soluções de fármaco. Desta forma, a cada leitura do espectro de absorvância do fármaco em solução é automaticamente subtraída, pelo software do equipamento, a contribuição da absorção por parte do solvente.

### 3.2.3. Curva de calibração

Para traçar a curva de calibração analisou-se o espectro de absorção do RSV para determinar o seu  $\lambda$  máx (comprimento de onda no qual a absorção de fármaco é máxima). Seguidamente, procedeu-se à representação gráfica dos valores de absorvância ao  $\lambda$  máx do RSV ( $\lambda$  máx = 305 nm) obtidos para cada concentração de padrões de RSV, construindo a curva de calibração, e ajustou-se a linearidade aplicando a seguinte equação :

$$y = mx + b \quad \text{Equação 6}$$

em que:  $y$  corresponde à intensidade de absorvância obtida ao  $\lambda$  máx (305nm),  $m$  representa o declive da regressão linear e corresponde ao coeficiente de absorvância molar ( $\epsilon\lambda$ ),  $x$  corresponde à concentração das soluções padrão de RSV e  $b$  representa a interceção da regressão linear com o eixo dos  $y$ .

Posteriormente, foram calculados e avaliados outros parâmetros necessários para a validação do método analítico: especificidade, linearidade, precisão e repetibilidade, limite de deteção (*Detection Limit*, DL) e limite de quantificação (*Quantification Limit*, QL) [107].

A especificidade é a capacidade de avaliar, inequivocamente, o analito na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra [107].

A linearidade foi verificada graficamente através da análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. A partir deste método é possível retirar o coeficiente de correlação (R), que deve apresentar um valor o mais próximo de 1 e o interceto com o eixo Y não deve ser significativamente diferente de zero [108, 109]. A análise de regressão linear foi realizada recorrendo-se ao *software* Microsoft Office Excel® 2016.

A precisão avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas a partir de amostragens múltiplas da mesma amostra. A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação em pequeno intervalo de tempo [108] .

O DL é o valor mais baixo de analito numa amostra, que pode ser detetado sem ser necessariamente quantificado. O valor de DL foi determinado segundo a equação 7:

$$DL = \frac{3,3\sigma}{S} \quad \text{Equação 7}$$

em que  $\sigma$  é o desvio padrão da interseção com o eixo do y da regressão linear e  $S$  corresponde ao declive da curva de calibração.

O QL é o valor mais baixo de analito que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. O valor de DL foi determinado segundo a equação 8:

$$QL = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 8}$$

onde  $\sigma$  corresponde ao desvio padrão da interseção com o eixo do y da regressão linear e  $S$  é o declive da curva de calibração.

### 3.3. Estudos de pré-formulação

Com o objetivo de avaliar algumas das características físicas e químicas do fármaco e dos lípidos em estudo, foram realizados alguns estudos preliminares, ou seja, estudos de pré-formulação. Numa fase inicial é necessário considerar determinados fatores referentes ao fármaco e excipientes (neste trabalho, o RSV e os lípidos), como por exemplo as suas propriedades físico-químicas e ainda as compatibilidades ou incompatibilidades entre eles, podendo ser barreiras para a qualidade da formulação final. Deste modo, estes estudos de pré-formulação permitem o desenvolvimento racional das formulações, garantindo a sua estabilidade, eficácia e segurança.

#### 3.3.1. Estudo *in silico* das características físico-químicas do resveratrol e descritores moleculares

Os modelos *in silico* podem basear-se em diferentes abordagens, como por exemplo na relação quantitativa entre estrutura e propriedades e na modelação molecular. A primeira é fundamentada pelas relações entre a estrutura molecular do composto e as propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), não tendo em conta os mecanismos inerentes a essas mesmas propriedades. Por outro lado, a abordagem por modelação molecular investiga esses mesmos mecanismos inerentes a uma propriedade específica a fim de estudar as potenciais interações entre as moléculas e as proteínas envolvidas nos processos ADMET. Com base nestes modelos obtêm-se vários tipos de descritores que permitem concluir relativamente a diversas propriedades do composto em estudo, como a solubilidade, a absorção intestinal, a biodisponibilidade oral e ainda sobre a lipofilicidade [110, 111].

Desta forma, para determinar os descritores moleculares do RSV obteve-se primeiro a notação SMILLES (do inglês, *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) isométrica da molécula

de RSV na base de dados online Pubmed Compound (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta notação pode ser traduzida em representações bidimensionais e tridimensionais das moléculas correspondentes quando são empregues softwares específicos. Posto isto, utilizando a notação SMILES e o software da Chemaxon<sup>®</sup> com o módulo MarvinSketch<sup>®</sup>, procedeu-se ao desenho da estrutura química da molécula de RSV, à sua representação tridimensional e ao cálculo *in silico* de diversos descritores químicos.

### **Previsão da lipofilicidade do resveratrol**

A lipofilicidade de um fármaco ou composto bioativo é uma das propriedades físico-químicas que controla vários processos ao nível biológico, como a absorção, sendo determinada através do coeficiente de partição ( $K_p$ ). Este coeficiente permite avaliar, quantitativamente, a extensão da interação de um soluto com um sistema micro-heterogéneo e constitui uma medida de lipofilia dos fármacos [112, 113]. Deste modo, a lipofilia é uma propriedade importante que influencia quer a farmacocinética quer a farmacodinâmica dos compostos, uma vez que tem sido associada a fenómenos biológicos (por exemplo, o transporte membranar) e ainda aos possíveis efeitos tóxicos e terapêuticos [114]. Os fármacos altamente lipofílicos são muito pouco solúveis em água, como tal apresentam fraca eliminação renal e, por consequência, uma toxicidade elevada devido à bioacumulação. Ou seja, estes fármacos bioacumuláveis têm tendência a ligarem-se às proteínas plasmáticas e a acumularem-se nas reservas lipídicas, o que poderá incrementar a toxicidade provocada pela permanência prolongada do fármaco no organismo. Embora exista esta toxicidade associada à elevada lipofilicidade de um fármaco, não se pode considerar como ideais os fármacos que apresentam uma elevada solubilidade em água, pois estes não conseguem ser distribuídos convenientemente pelo organismo. Atendendo a estas considerações, para que seja possível a penetração nas membranas biológicas é necessário que os fármacos tenham um determinado grau de lipofilicidade. Em suma, a lipofilicidade é um parâmetro fundamental na avaliação do sucesso terapêutico de um fármaco [115, 116].

O  $K_p$  do resveratrol num sistema bifásico meio lipossomal/meio aquoso traduz a afinidade do fármaco para cada meio.

### **Determinação da constante de partição do resveratrol em modelos miméticos de membrana do tipo lipossoma/água ( $K_{lipossoma/água}$ )**

Para determinar a constante de partição ( $K_p$ ) em sistemas lipossoma/água foram preparadas dez suspensões com um volume final de 1800  $\mu$  L em tubos Eppendorf® contendo uma concentração fixa de RSV (50  $\mu$  M) e concentrações crescentes de lipossomas unilamelares (LUVs BW3) (1 - 46,7  $\mu$  M; 2 - 93,3  $\mu$  M; 3 - 233,3  $\mu$  M; 4 - 303,3  $\mu$  M; 5 - 420,0  $\mu$  M; 6 - 513,3  $\mu$  M; 7 - 1026,7  $\mu$  M; 8 - 2006,7  $\mu$  M; 9 - 3966,7  $\mu$  M; 10 - 6906,7  $\mu$  M). A preparação dos LUV BW3 seguiu o mesmo procedimento descrito para a preparação de LUVs pelo método de hidratação do filme lipídico e extrusão na secção 3.4.2. Simultaneamente, foram preparados outros dois conjuntos de tubos Eppendorf® correspondentes aos controlos e referências. As referências apresentavam as mesmas concentrações crescentes de LUVs BW3 referidas anteriormente, mas não continham o RSV. Para os controlos, prepararam-se outras três suspensões, que continham apenas o RSV com uma concentração de 50  $\mu$  M sem a adição de lipossomas. As amostras foram incubadas num banho termostaticado a uma temperatura de 37 °C, durante 30 minutos. Após a incubação, analisaram-se as amostras por espectrofotometria UV/Vis, tendo sido traçado o seu espectro de absorção no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 400 nm, a uma velocidade de varrimento lenta e com um intervalo de amostragem de 1 nm.

### **3.3.2. Estudo de solubilidade lipídica do resveratrol**

A escolha dos lípidos para o desenvolvimento de uma formulação é um parâmetro importante quer para a estabilidade quer para a performance clínica da própria formulação. O estudo da solubilidade lipídica do resveratrol teve como objetivo seleccionar os lípidos mais adequados para preparar as dispersões de NLC capazes de encapsular a maior quantidade de RSV possível. Ou seja, uma seleção de lípidos baseia-se na quantidade máxima de fármaco que é capaz de se dissolver num lípido sólido ou numa mistura de lípido sólido com lípido líquido.

Foram seleccionados lípidos líquidos e lípidos sólidos para avaliar a sua solubilidade com o RSV em diferentes proporções: 1%, 2%, 3%. Em termos experimentais, este estudo consistiu na pesagem dos diferentes lípidos e do RSV numa balança analítica (Acculab Sartorius Group). De seguida, foram colocados numa estufa (Binder, Alemanha) durante 60 minutos, a 90 °C. A

solubilidade foi analisada de 15 em 15 minutos, verificando-se a presença (ou não) dos cristais de RSV no lípido.

Os lípidos sólidos testados foram: Dynasan®114 (trimiristina) com uma temperatura de fusão 55 - 58 °C; Gelucire® 43/01 (ésteres de glicerol de ácidos gordos saturados) com uma temperatura de fusão 42 - 46 °C, Witepsol®E85 (constituído maioritariamente por triglicerídeos) com uma temperatura de fusão 42 - 44 °C, Imwitor 900K (monoestearato de glicerilo) com uma temperatura de fusão 54 - 64 °C, Compritol® 808 ATO (behenato de glicerilo) com uma temperatura de fusão 65 - 77 °C e Suppocire® D (triglicerídeos de ácidos gordos) com uma temperatura de fusão 42 - 46 °C.

Os lípidos líquidos analisados quanto à solubilidade lipídica do RSV foram: Labrafac® lipophile WL (triglicerídeos de cadeia média), Labrafac® lipophile WL 1349 (triglicerídeos de cadeia média), Maisine® (monolinoleato de glicerilo), Peceol® (monoleato de glicerilo), Lauroglycol™ FCC (monolaurato de propilenoglicol tipo I) e Óleo de peixe (Ómega 3).

### 3.4. Preparação dos nanossistemas lipídicos (lipossomas e NLC)

A Tabela 4 apresenta as concentrações das soluções stock necessárias para a preparação dos lipossomas.

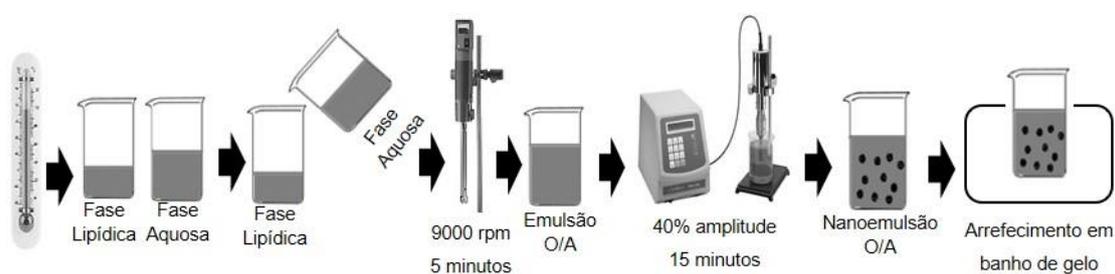
**Tabela 4** - Soluções stock para a preparação dos lipossomas.

Lípido/Fármaco	Concentração	Massa (mg)	Solvente (10 mL)
DPPC	10 mM	73,40	Clorofórmio
DSPC	10 mM	79,00	Clorofórmio
DOPE	10 mM	74,90	Clorofórmio
Ómega 3	10 (mg/mL)	100	Clorofórmio
RSV	2000 µM	4,56	Etanol

#### 3.4.1. Preparação dos vetores lipídicos nanoestruturados (NLC)

Para a preparação dos NLC recorreu-se à técnica de sonicação (Figura 9). Na fase lipídica adicionou-se o lípido sólido e o lípido líquido, enquanto que a fase aquosa continha água e os agentes tensioativos. Ambas as fases foram aquecidas a uma temperatura 5-10 °C superior à

temperatura do ponto de fusão do lípido sólido (65 °C). Após a fusão deste lípido, adicionou-se a fase aquosa à fase lipídica e homogeneizou-se a mistura com recurso a um Ultra-Turrax® T25 (IKA®, Alemanha), a uma velocidade de 9000 rpm durante 5 minutos. A pré-emulsão O/A obtida foi submetida à ação energética dos ultrassons utilizando uma sonda de sonicação (Bamdelineletronic UW 2200, Berlim, Alemanha), durante 15 minutos com uma potência de 40% de amplitude. A elevada energia levou a que as gotículas lipídicas se fragmentassem e adquirissem tamanhos nanométricos. Por último, transferiu-se a nanoemulsão O/A para frascos de vidro que foram colocados em banho de gelo, de forma a garantir um arrefecimento rápido e a que o lípido sólido solidificasse com formação dos NLC.



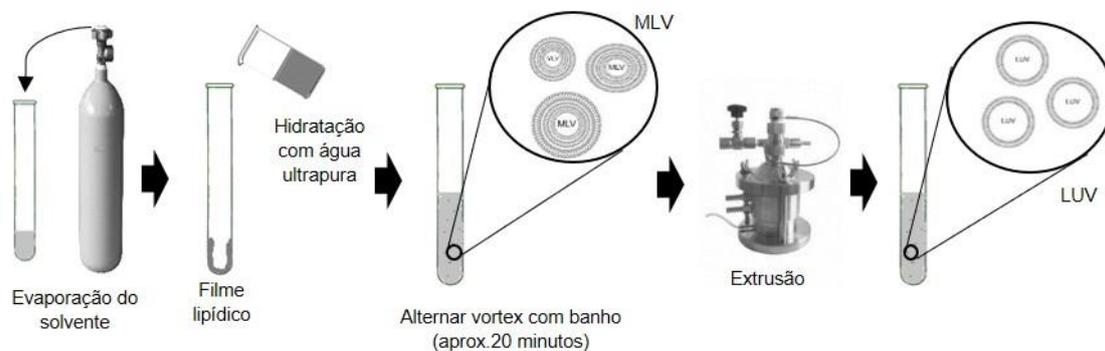
**Figura 9** – Representação esquemática da preparação de NLC pelo método de sonicação.

### 3.4.2. Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram obtidos através do método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão (Figura 10). Para tal, procedeu-se à adição da solução de clorofórmio contendo o lípido a um tubo de vidro de fundo redondo e, de seguida, à evaporação do solvente, sob um fluxo de gás inerte (azoto) até à formação de um filme lipídico seco nas paredes do tubo. Para a hidratação do filme lipídico adicionou-se água ultrapura aquecida a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) dos lípidos e fez-se uma alternância entre o aquecimento em banho de água termostaticado e a agitação em vortex durante, aproximadamente, 20 minutos, para que o filme lipídico fosse removido das paredes do tubo e ocorresse a formação de vesículas multilamelares (MLV, do inglês *Multilamellar Vesicles*).

Para diminuir o tamanho das MLV obtidas pelo método de hidratação do filme lipídico, recorreu-se ao processo de extrusão a pressões entre 6-8 bar. Através deste processo, a preparação contendo os lipossomas é forçada a passar por filtros de policarbonato com tamanhos de poros diferentes (400 nm, 200 nm e 100 nm). Deste modo, efetuaram-se 5 extrusões dos lipossomas através dos filtros com poros de 400 nm de diâmetro, 5 extrusões com filtros com

poros de 200 nm de diâmetro e 10 extrusões com filtros com poros de 100 nm de diâmetro, obtendo-se vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*).



**Figura 10** – Representação esquemática da preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.

Para a encapsulação do resveratrol nos lipossomas, o processo foi semelhante ao descrito anteriormente, sendo o RSV adicionado: adicionaram-se soluções etanólicas de RSV a um tubo de vidro de fundo redondo e seguiu-se para a evaporação do solvente, sob um fluxo de gás inerte (azoto) até à formação de um filme lipídico seco nas paredes do tubo. Para a hidratação deste filme adicionaram-se os LUV aquecidos a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos e de seguida efetuou-se a alternância entre banho e vortex durante, aproximadamente, 20 minutos, de maneira a permitir a remoção do filme lipídico do tudo e a encapsulação do RSV nos lipossomas.

### 3.4.3. Formulações desenvolvidas

As formulações lipossomais desenvolvidas foram: DPPC:DOPE (6:4); DPPC:DOPE (6:4)+ RSV 20%; DPPC:DOPE: $\omega$ 3 (6:3:1); DPPC:DOPE: $\omega$ 3 (6:3:1) + RSV 20%; DSPC:DOPE (6:4); DSPC:DOPE (6:4)+ RSV 20%; DSPC:DOPE: $\omega$ 3 (6:3:1); DSPC:DOPE: $\omega$ 3 (6:3:1) + RSV 20%. As formulações de NLCs foram PREC:  $\omega$ 3 com Tween e cloreto de benzalcónio como tensioativos.

### 3.5. Métodos de caracterização dos nanossistemas lipídicos

#### 3.5.1. Tamanho, índice de polidispersão e carga de superfície (potencial zeta)

A técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) foi utilizada para avaliar o tamanho médio, o índice de polidispersão (PDI, do inglês *polidispersity index*) e a carga de superfície das formulações desenvolvidas, com e sem resveratrol. Esta é uma técnica crucial no estudo das propriedades de suspensões, soluções coloidais, soluções biológicas, macromoléculas e de polímeros, uma vez que é absoluta, não invasiva, não destrutiva e que requer preparações simples e pequenas quantidades da amostra [117, 118].

A técnica de DLS consiste em iluminar a amostra com um feixe de laser e medir a intensidade da luz dispersa que chega ao detetor, em função do tempo. O detetor é colocado, relativamente à amostra, a um ângulo de 173° para dispersões com baixas concentrações de partículas e a um ângulo de 90° para dispersões com altas concentrações de partículas. As flutuações de luz dispersa pelas partículas em suspensão surgem dos seus movimentos no solvente, através de movimentos Brownianos aleatórios [118, 119]. Estas partículas em suspensão, quando presentes num meio líquido, sofrem estes movimentos devido à colisão com as moléculas circundantes.

Para a técnica de DLS é importante ter em conta que nos movimentos Brownianos, as partículas mais pequenas movem-se mais rapidamente, levando a flutuações de intensidade da luz incidente mais rápidas, consequência de apresentarem um coeficiente de difusão elevado. Por outro lado, as partículas maiores movem-se mais lentamente, o que leva a flutuações de intensidade mais lentas. Devido ao movimento Browniano das partículas é possível relacionar o tamanho de uma partícula com a sua velocidade, através da Equação de Stockes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{Equação 9}$$

na qual,  $D$  é o coeficiente de difusão da partícula,  $K_B$  é a constante de Boltzman ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura,  $\eta$  é a viscosidade dinâmica do meio de dispersão e  $R_H$  é o raio hidrodinâmico da partícula. Uma vez que o detetor mede todas as intensidades de luz dispersa pelas partículas, o correlator compara todos os sinais em intervalos de tempo sucessivos para calcular a velocidade à qual a intensidade varia, tornando possível estimar o tamanho das

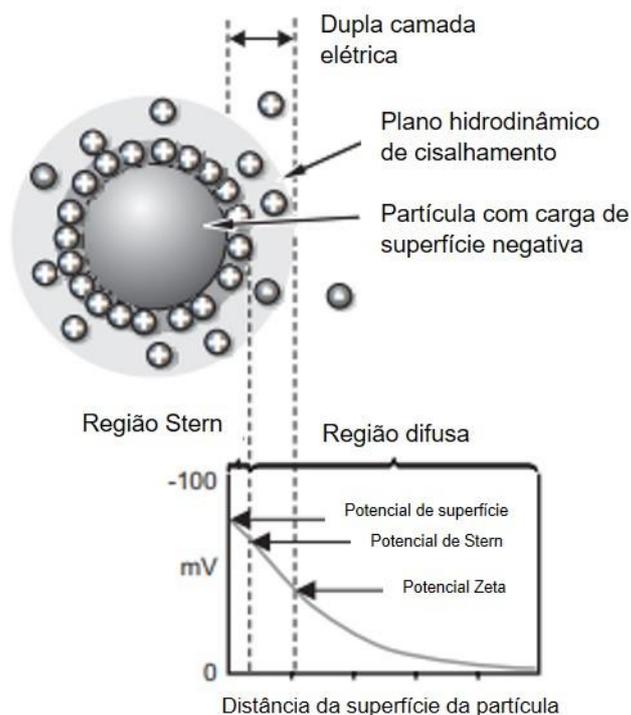
partículas devido às flutuações de intensidades observadas, utilizando algoritmos específicos que associam as taxas de decaimento da função de autocorrelação a um número de classes de tamanho e é produzida assim uma distribuição de tamanhos [119-121].

Outra informação que se pode retirar da técnica de DLS é sobre o PDI da amostra, o qual é calculado a partir de um ajuste de dois parâmetros simples para os dados de correlação (a análise de cumulantes). Nesta análise, é assumido um único modo de tamanho de partícula e é aplicado um único ajuste exponencial à função de autocorrelação e a polidispersão descreve a largura da distribuição gaussiana assumida. O PDI fornece indicação sobre a agregação das partículas em suspensão e é um parâmetro adimensional. Ou seja, se o PDI obtido é elevado, isto indica que na amostra há uma população de partículas polidispersa (e.g. quando ocorre agregação das partículas e a distribuição de tamanhos não é uniforme). Por outro lado, se for obtido um valor de PDI mais baixo, a população de partículas será mais monodispersa [119]. O valor de PDI pode variar entre valores de 0 e 1, sendo que para dispersões monodispersas o valor ideal é um valor  $< 0,300$  quando este valor é igual ou superior a 0,500, as distribuições são consideradas polidispersas [120]. A importância de obter uma população monodispersa varia muito com o objetivo, via de administração e material constituinte dos nanossistemas. Quer para os lipossomas quer para os NLC, valores de PDI inferiores ou iguais a 0,300 têm sido considerados valores aceitáveis, nomeadamente num contexto de uma administração tópica [122-125].

Neste trabalho, mediu-se o tamanho e determinou-se o PDI dos lipossomas, com e sem resveratrol, e dos NLC no dia da preparação, pela técnica de DLS com o aparelho e *software* Zetasizer NanoZS, da Malvern®. Na preparação das amostras para as medições, as dispersões de lipossomas e dos NLC foram diluídas, 1:10 e 1:2, respetivamente, com água ultrapura de maneira a evitar a multidispersão de luz consequente de uma concentração elevada de partículas. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente e os resultados apresentados são valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de três medições. O Z-ave e o PI foram obtidos a partir do correlograma, pelo *software* Zetasizer Nano ZS (Malvern®, Reino Unido), o qual segue a norma ISO 22412:2008.

Posteriormente, utilizando também o aparelho e *software* Zetasizer NanoZS, da Malvern®, foi medido o potencial zeta (ZP, do inglês *Zeta Potencial*) das partículas. As partículas dispersas num sistema aquoso adquirem carga à superfície, isto deve-se, principalmente, à presença de grupos ionizáveis ou à adsorção de espécies iónicas, afetando a distribuição de iões no meio e aumentando a concentração de iões de carga oposta ao da partícula (contra-iões) junto à superfície. Assim, na interface da partícula com o meio da dispersão origina-se uma dupla camada

elétrica com duas regiões: uma região interna, designada de Stern (onde os iões estão firmemente ligados à superfície), e uma região externa, ou difusa (onde os iões não estão fortemente ligados à superfície) (Figura 11). Com o movimento Browniano, alguns iões da camada externa movem-se como parte da partícula e através desta migração eletroforética é possível determinar o ZP pela técnica de eletroforese de luz dinâmica (ELS, do inglês *Eletrophoretic Light Scattering*). Em suma, o potencial zeta refere-se à carga total que a superfície de uma partícula adquire num determinado meio [122, 126].



**Figura 11** – Representação esquemática da dupla camada elétrica em torno de uma partícula em suspensão. Adaptado de [126].

A determinação do ZP é essencial na caracterização dos nanossistemas lipídicos, pois a sua magnitude fornece uma indicação da carga superficial das partículas e da estabilidade potencial do sistema. Se as partículas dispersas apresentarem valores de potencial zeta elevados em módulo, negativo ou positivo, tenderão a sofrer repulsão eletrostática impedindo a tendência para se agregarem. No entanto, se as partículas tiverem valores de potencial zeta baixos, as forças de atração são superiores às formas de repulsão e haverá tendência a formarem agregados. Geralmente, as dispersões com valores de zeta potencial, em termos absolutos, elevados, ou seja, mais positivos que + 30 mV ou mais negativos que -30 mV, são consideradas estáveis [126].

Tal como para as medições do tamanho e do PDI, para as medições do potencial zeta as dispersões de lipossomas e de NLC foram previamente diluídas e realizadas à temperatura ambiente. A mobilidade eletroforética foi convertida em ZP com base na Equação de Helmholtz-von Smoluchowski:

$$v_{eo} = \frac{-\varepsilon_0 \varepsilon_z}{\eta} E \quad \text{Equação 10}$$

onde,  $E$  é o campo elétrico aplicado,  $\varepsilon_0$  corresponde à permissividade do vácuo,  $\varepsilon_z$  é a constante dielétrica e  $\eta$  é a viscosidade da solução eletrolítica.

### 3.5.2. Estabilidade em condições de armazenamento e estabilidade acelerada

A estabilidade é um dos aspetos críticos para garantir, ao longo do tempo, a segurança e a eficácia dos nanossistemas lipídicos como sistemas de administração de fármacos. Esta estabilidade pode ser afetada por vários fatores inerentes à própria formulação, como por exemplo, componentes lipídicos da formulação, o tamanho e a carga superficial das partículas, como por fatores externos (e.g. luz, temperatura).

Relativamente à composição da própria formulação, por exemplo, os lípidos saturados oferecem uma maior estabilidade em termos de oxidação do que os lípidos polinsaturados e, as formulações aquosas de produtos farmacêuticos tendem a ser menos estáveis, pois a presença de água em excesso pode provocar degradação hidrolítica [127, 128].

As partículas com valores de potencial zeta maiores que 30 mV, em termos absolutos, podem ser estáveis durante um longo período, uma vez que a carga superficial permite a repulsão entre as partículas evitando fenómenos de agregação. Caso a carga das partículas não seja suficiente para que haja repulsão, uma estratégia para mantê-las estáveis em dispersão é o revestimento da sua superfície com agentes tensoativos, exercendo um efeito histórico, e evitando também a agregação.

Adicionalmente, através da análise ao longo do tempo do tamanho e do índice de polidispersão das formulações torna-se possível identificar a tendência para fenómenos de agregação e sedimentação. Por exemplo, se ocorrer agregação, ocorre um aumento significativo do raio hidrodinâmico dos nanossistemas. Por outro lado, a diminuição da carga superficial dos

nanossistemas para valores, em termos absolutos, inferiores a 30 mV traduz-se numa maior propensão para ocorrerem fenómenos de fusão e agregação e é correlacionável com um visível aumento da dispersão de tamanhos e da polidispersão dos nanossistemas [128].

Com o objetivo de analisar a estabilidade, em termos físicos, em condições de armazenamento, as formulações foram mantidas a 4°C, durante 8 semanas e foram analisadas por DLS e ELS, utilizando as mesmas condições descritas anteriormetne para a análise do tamanho, índice de polidispersão e ZP. Por fim, para avaliar a estabilidade acelerada, as formulações foram sujeitas a 2 ciclos de centrifugação, a uma velocidade de 3000 rpm, durante 30 minutos, e mantidas à temperatura ambiente, igualmente durante 8 semanas e analisadas por DLS e ELS.

### 3.5.3. Composição química

De forma a comprovar o sucesso do encapsulação do fármaco, foi essencial avaliar a composição química dos nanossistemas lipídicos com e sem RSV. Para tal, recorreu-se à Espectroscopia de absorção no Infravermelho por transformada de Fourier, usando a técnica de refletância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared*).

A espectroscopia de IR baseia-se na absorção de radiação eletromagnética pelas moléculas na região do infravermelho do espectro eletromagnético. As energias absorvidas correspondem a energias de transição entre níveis vibracionais, associadas a deformações nas ligações químicas, resultando numa variação no momento dipolar da molécula. Esta técnica permite identificar os grupos funcionais da amostra, tendo por base o espectro de vibração das ligações químicas [129].

Na técnica de FTIR, faz-se incidir sobre a amostra a gama total de comprimentos de onda da região do infravermelho que se pretende analisar e os sinais, incidente e transmitido, são detetados por um interferómetro. Aplicando transformadas de Fourier (FT, do inglês *Fourier transformed*) ao interferograma obtido, podem-se obter os picos de absorção da amostra em função da frequência da radiação incidente.

Em conjunto com o FTIR, a técnica ATR é muito prática, uma vez que permite medir amostras sólidas com uma preparação mínima ou sem qualquer preparação prévia da amostra, ou seja, a amostra é apenas colocada sobre um pequeno cristal com um índice de refração elevado (superior ao da amostra) e de baixa absorção no IR. O feixe de radiação infravermelha incide, segundo um dado ângulo  $\theta$ , maior do que o ângulo crítico, na interface cristal-amostra e é

refletido internamente. A onda evanescente associada propaga-se na amostra e é absorvida seletivamente por esta, permitindo obter informação sobre os seus níveis vibracionais.

As medidas de ATR-FTIR foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade do Minho, no Campus de Gualtar, num FTIR 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  $\mu$  m). Por fim, os espetros foram medidos na região 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com incrementos de 4  $\text{cm}^{-1}$  e foram realizados 16 varrimentos para cada espetro.

### 3.5.4. Avaliação das propriedades biofísicas dos nanossistemas

Para se perceber de que forma o fármaco poderia afetar as propriedades biofísicas das membranas celulares, como a cooperatividade da transição de fase, a microviscosidade membranar e a temperatura de transição de fase, foram preparados DSPC:DOPE: $\omega$ 3 e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV, como referido anteriormente na secção 3.5.2.

Desta forma, a determinação da temperatura de transição de fase lipídica realizou-se com a presença e na ausência de uma quantidade conhecida de fármaco. Para tal, colocou-se 1 mL de LUVs numa célula descartável de poliestireno e o seu tamanho foi analisado por DLS, em modo automático. A partir desta análise, determinou-se o valor ótimo de ajuste da posição da célula e o valor de atenuador a fixar. Posteriormente, os valores fixos da posição da célula e do atenuador foram inseridos no *software* e procedeu-se às leituras de tamanho e de taxa de contagens da intensidade de luz dispersa pelos LUVs. Estas leituras realizaram-se num intervalo de temperaturas entre os 5  $^{\circ}\text{C}$  e 55  $^{\circ}\text{C}$ , com 1  $^{\circ}\text{C}$  de diferença entre leituras e foram efetuadas 3 medidas em cada temperatura.

Posteriormente, efetuou-se o tratamento dos resultados recorrendo ao *software* Origin 8.0<sup>®</sup>. Aos dados da intensidade média da luz dispersa em função da temperatura ou da taxa de contagens foi aplicado um ajuste sigmoide da equação modificada de Boltzmann (equação 11):

$$IN = r_{s1} + p_1 T + \frac{r_{s2} - r_{s1} + p_2 T - p_1 T}{1 + 10^{B(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}} \quad \text{Equação 11}$$

em que,  $IN$  é a intensidade de luz dispersa normalizada,  $r_{s1}$  e  $p_1$  são, respetivamente, o declive e a ordenada na origem da tendência linear anterior à transição de fase,  $r_{s2}$  e  $p_2$  são,

respetivamente, o declive e a ordenada na origem da tendência linear posterior à transição de fase,  $T$  é a temperatura,  $B$  é a cooperatividade da transição de fase e, por último,  $T_m$  corresponde à transição de fase.

### 3.6. Ensaio de performance terapêutica

#### 3.6.1. Eficiência de encapsulamento do resveratrol

Uma formulação de nanossistemas lipídicos contendo um fármaco encapsulado, só terá interesse na prática clínica se a eficiência de encapsulação (EE) for tal que doses terapêuticas possam ser administradas numa quantidade razoável de lípidos, uma vez que os lípidos em quantidades elevadas podem ser tóxicos [130]. Além disso, valores elevados de EE permitem reduzir a dose de fármaco necessária para alcançar o efeito terapêutico desejado, minimizando os efeitos adversos e o número de tomas necessárias. Atendendo a estas considerações, o sucesso do uso de dispersões de nanossistemas lipídicos como sistemas de veiculação de fármacos depende dos parâmetros de encapsulação de fármaco, nomeadamente a eficiência de encapsulação. A EE é determinada através da seguinte equação:

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade total de fármaco} - \text{Fármaco livre}}{\text{Quantidade total de fármaco}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Para avaliar a EE do RSV, foram preparadas formulações com três percentagens diferentes de RSV (10%, 20% e 40%). De cada formulação foram retirados 500  $\mu\text{L}$  e transferidos para um tubo Amicon<sup>®</sup>, Merck Milipore Ireland Ltd, contendo uma unidade filtrante. Posteriormente, estes tubos Amicon<sup>®</sup> foram submetidos a uma centrifugação a uma velocidade de 3000 rpm durante 15 minutos. Depois desta centrifugação, realizou-se uma separação, para eppendorfs, do conteúdo dos tubos em: filtro, contendo o *pellet* com os nanossistemas lipídicos, e o filtrado aquoso com o fármaco não encapsulado. Após a separação, o filtrado foi diluído até obter um volume suficiente para realizar as leituras. A quantidade de RSV encapsulada foi determinada através da leitura das absorvâncias do filtrado no comprimento de onda de máxima absorção do RSV ( $\lambda_{\text{máx}} = 305$  nm). As leituras efetuaram-se num espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501, e o doseamento foi feito recorrendo ao método analítico previamente validado e que relaciona a absorvância medida com

a concentração de RSV. As análises da EE foram realizadas em triplicado para cada formulação e os resultados apresentados em valores médios  $\pm$  desvio padrão.

### **3.6.2. Incorporação dos nanossistemas lipídicos numa base semissólida**

Para preparar a base semissólida (um hidrogel), o gelificante PFC<sup>®</sup> foi disperso na dispersão dos nanossistemas lipídicos contendo glicerina. Posteriormente, esta preparação foi neutralizada com trietanolamina a um pH  $\approx$  6,5 para obter a consistência de gel. Com o objetivo de analisar a viscosidade das preparações em função da concentração de agente gelificante (0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0 % m/m), este foi utilizado em diferentes concentrações de agente gelificante. Foram ainda preparadas bases semissólidas incorporando uma mistura de lipossomas e NLC, com uma concentração de PFC<sup>®</sup> de 0,5% (m/m).

### **3.6.3. Ensaio de permeação cutânea**

#### **3.6.3.1. Preparação da solução tampão (pH=5,5)**

A preparação da solução tampão resultou da mistura das seguintes soluções:

- a) Solução de fosfato de sódio 0,1 M (solução básica) – pesar 38,012 g fosfato de sódio para um balão volumétrico de 1 L e perfazer o volume com água destilada;
- b) Solução de ácido Bórico 0,02 M e ácido cítrico 0,05 M (solução ácida) – pesar 1,2366 g de ácido bórico e 10,507 g de ácido cítrico para um balão volumétrico de 1 L e perfazer o volume com água destilada.

Após a preparação prévias destas soluções, num balão volumétrico de 1 L, adicionaram-se 370 mL da solução básica e 630 mL da solução ácida e agitou-se para homogeneizar a mistura. Posteriormente, mediu-se o pH da solução com auxílio de um potenciômetro, ajustando-se, se necessário, o valor de pH para 5,5, por adição de ácido ou base.

#### **3.6.3.2. Preparação da solução micelar**

Para preparar a solução micelar pesou-se, em balança analítica, 4,61 g de lauril sulfato de sódio 16 mM (SLS, do inglês *sodium lauryl sulfate*), e adicionou-se a 1 L da solução tampão preparada anteriormente.

### 3.6.3.3. Estudos de permeação cutânea do resveratrol

Os ensaios de permeação cutânea têm como objetivo avaliar como é que um determinado fármaco ou composto bioativo sofre difusão através da pele. Estes estudos podem ser feitos *in vitro* ou *ex vivo*. Neste trabalho foram realizados estudos *in vitro*, nos quais se usa uma célula de difusão, designada de célula de Franz, e mede-se a cinética de difusão do composto bioativo para um reservatório, usando pele não viável ou membranas sintéticas simuladoras de pele. A célula de Franz é um sistema composto por duas câmaras, separadas pela membrana utilizada no ensaio[131, 132].

A avaliação da difusão do fármaco foi realizada através de uma membrana de polissulfona (PSO, do inglês *Polysulfone*). Para tal, colocou-se uma amostra dos lipossomas com RSV e das bases semissólidas na câmara superior da célula de Franz e na câmara inferior colocaram-se 5 mL do meio recetor (solução tampão pH 5.5 – para mimetizar o pH cutâneo e meio micelar). Durante um período de 24 horas foram retiradas alíquotas do meio recetor (400 µL) em diferentes períodos de tempo: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h. A partir destas alíquotas, o RSV foi quantificado por espectrofotometria de absorção UV/Vis utilizando o método analítico validado anteriormente

### 3.6.4. Estudos de libertação *in vitro* do resveratrol

A cinética de libertação *in vitro* do fármaco a partir de lipossomas deve ser determinada, uma vez que é uma característica que define a qualidade da formulação e o seu potencial desempenho *in vivo*.

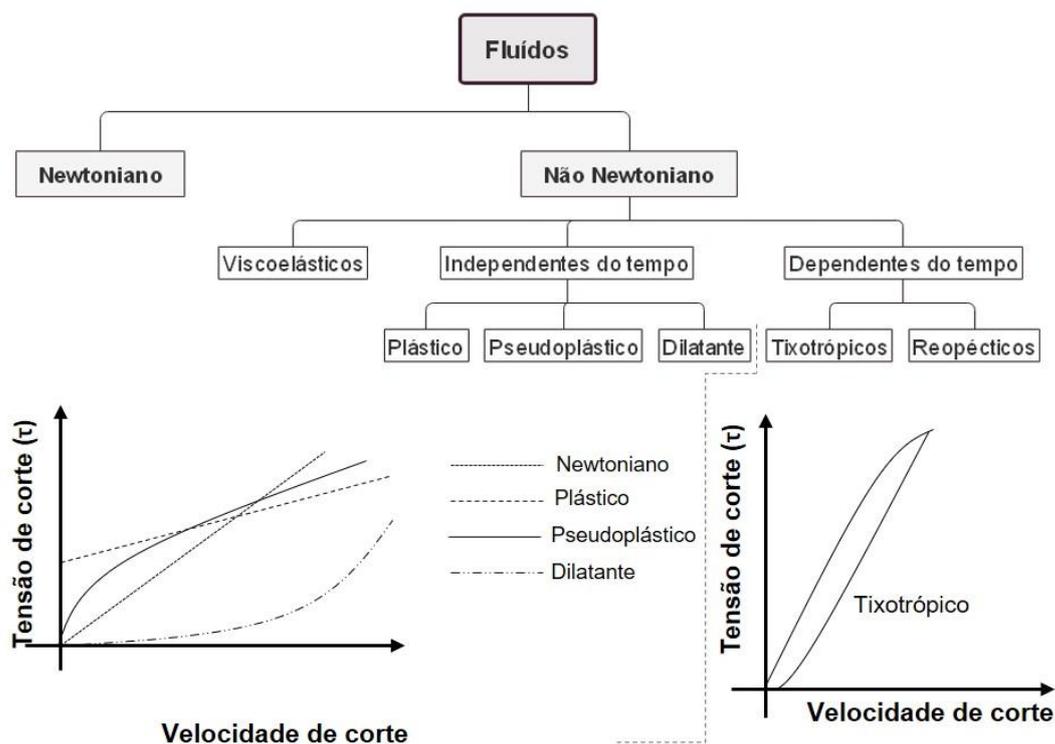
Idealmente, enquanto os lipossomas não chegam ao local de ação, a libertação do fármaco deve ser a mais lenta possível, de forma a evitar perdas significativas de fármaco no organismo e, assim, reduzir a sua toxicidade [133]. Por outro lado, após a acumulação dos lipossomas no local alvo, estes devem libertar o fármaco de forma controlada, isto pode ser alcançado através das características da formulação e/ou através de estratégias químicas ou físicas. Em suma, a capacidade de controlar e alcançar um perfil de libertação adequado é uma característica extremamente vantajosa na prática clínica [134, 135].

Os estudos de libertação *in vitro* do RSV foram realizados a partir de lipossomas (MLVs) contendo 20% de RSV. O método utilizado para a libertação *in vitro* do RSV foi o de difusão por membrana de diálise. Desta forma, colocou-se 1,0 mL das preparações dos lipossomas com RSV

ou uma preparação de resveratrol em água ultrapura, nas membranas de diálise. Posteriormente, as membranas foram imersas num recipiente contendo 6,0 mL da solução tampão pH 5,5 e solução micelar (preparadas como descrito na secção 3.6.3.). Este sistema foi mantido sob agitação magnética, a uma temperatura de 37 °C. Pipetou-se 1,0 mL de cada amostra, que foi repostado por 1,0 mL do meio de dissolução fresco, em intervalos predefinidos até perfazerem 32 horas de ensaio. De forma a medir a quantidade de RSV libertada, as amostras recolhidas foram analisadas por espectrofotometria, no  $\lambda_{\text{máx}}$  do RSV e foram realizadas em triplicado.

### **3.6.5. Análise reológica das formulações dermatológicas em base semissólida**

A reologia refere-se ao estudo das propriedades de fluxo, fluidez e deformação da matéria [136, 137]. Os conceitos fundamentais da reologia estão relacionados com o comportamento do fluxo, que é descrito através da viscosidade, elasticidade e plasticidade dos materiais (líquidos, sólidos e semissólidos), quando sujeitos a deformações físicas [137]. É de salientar que a viscosidade é uma medida de resistência interna de uma substância a fluir quando sujeita a tensão. Assim, a relação entre a viscosidade e a tensão de corte é importante, uma vez que esta relação revela a natureza do comportamento reológico, que pode ser newtoniano ou não newtoniano (Figura 12).



**Figura 12**– Esquemática da classificação e da relação existente entre a tensão de corte e a velocidade de corte, no comportamento reológico de fluidos.

À diferença entre as curvas ascendente e descendente de um reograma dá-se o nome de tixotropia, uma classificação importante quando se pretende uma aplicação percutânea de um fármaco. Este tipo de comportamento acontece quando uma preparação é sujeita a uma tensão de corte e a sua estrutura quebra, levando a uma diminuição gradual da viscosidade, o que ajuda a sua propagação na pele. No entanto, quando a tensão de corte é removida, a viscosidade recupera-se lentamente e aumenta, proporcionando a manutenção da preparação sobre a pele. Posto isto, a análise reológica é fundamental na otimização da administração tópica de preparações, pois é usada para prever o comportamento *in vivo* de um material, além de que é um parâmetro importante no desenvolvimento, caracterização físico-química e no controlo da qualidade das formulações dermatológicas. Uma vez que as propriedades reológicas intervêm nas propriedades galénicas das formulações, esta análise torna-se bastante útil, considerando que as formulações para aplicação tópica devem ter boas propriedades de espalhamento e aderência na pele. Os sistemas mais comuns para formulações dermocosméticas são os pseudoplásticos [137, 138].

Neste trabalho, a análise da reologia realizou-se com o auxílio do viscosímetro rotacional ST-2001, J.P. Selecta<sup>®</sup> (I.C.T, S.L., Espanha) e o estudo do comportamento das bases semissólidas através da análise da variação da tensão de corte (Pa) em função da velocidade de corte (rpm).

### 3.6.6. Ensaio de oclusão

O efeito oclusivo consiste na formação de um filme sobre o estrato córneo, quer por deposição de alguns excipientes emolientes, como por exemplo óleos e vaselina, quer por deposição de partículas de tamanhos reduzidos, de que são exemplos os nanofilmes, as nanofibras e as nanopartículas. A formação deste filme impedirá a perda de água da pele, o que se torna um importante fator para a sua hidratação. Além disso, um aumento de água ao nível cutâneo poderá também favorecer a difusão de compostos bioativos através do estrato córneo, uma vez que a água retida na camada lipídica irá proporcionar uma hidratação dos grupos polares das membranas lipídicas deste estrato, auxiliando a sua permeação. Desta forma, nos ensaios de oclusão efetuados pretendeu-se verificar se o revestimento da pele com os nanossistemas lipídicos desenvolvidos originariam um efeito oclusivo adequado.

Neste ensaio utilizaram-se copos de vidro contendo 50 g de água ultrapura. A boca de cada copo foi tapada, apenas com um filtro de microfibras de celulose Whatman<sup>®</sup> com poro de 0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$  (controlo) ou colocando por cima do filtro o sistema terapêutico em estudo. Selou-se a união dos dois recipientes com teflon (Figura 13) e estes sistemas foram colocados dentro de uma estufa a 37 °C. A intervalos de tempo pré-definidos mediu-se rigorosamente a massa de cada sistema. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Testou-se a oclusividade das formulações DSPC:DOPE: $\omega$ 3, DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV e PREC: $\omega$ 3 e destas formulações incorporadas na base semissólida.



Figura 13 – Fotografia e legenda do sistema utilizado no teste de oclusão.

O fator de oclusividade (F) foi calculado segunda a equação 13:

$$F = \frac{R - S}{R} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

em que, R é a perda de água no controlo e S é a perda de água no sistema com a amostra. Ou seja, F=0 é indicativo de que não ocorreu efeito oclusivo e F=100 de que a oclusividade foi máxima.

### 3.6.7. Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do resveratrol e ómega 3

O efeito anti-inflamatório do RSV foi avaliado utilizando um kit comercial da Cayman Chemical: Ensaios da atividade fluorescente da COX.

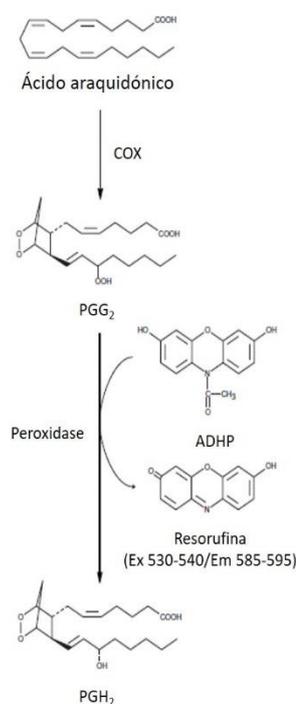
A COX, também conhecida como prostaglandina H sintase (PGHS), é uma enzima bifuncional que exhibe atividades de cicloxigenase e peroxidase. Assim, a componente de COX converte o ácido araquidónico em prostaglandina endoperóxido (PGG<sub>2</sub>) e a componente peroxidase

reduz o PGG<sub>2</sub> no álcool correspondente PGH<sub>2</sub>, o precursor das prostaglandinas (PG), tromboxanos e prostaciclinas [139, 140].

Existem duas isoformas de COX, COX-1 e COX-2. A COX-1 encontra-se expressa numa variedade de tipos de células e está envolvida na homeostase celular normal. Uma variedade de estímulos mitogénicos (e.g. ésteres de forbol, lipopolissacarídeos e citocinas) levam à indução da expressão da segunda isoforma da COX, a COX-2. Esta é responsável pela biossíntese de PG em condições inflamatórias agudas [141, 142]. Acredita-se ainda que a COX-2 é a enzima alvo para a atividade anti-inflamatória de fármacos anti-inflamatórios não esteroides [142].

Atendendo a estas considerações, este kit fornece um método à base de fluorescência para detetar a atividade da COX-1 ou da COX-2. O ensaio utiliza a componente de peroxidase da COX. A reação entre PGG<sub>2</sub> e ADHP (do inglês, *10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*) produz um composto altamente fluorescente, a resorufina. A fluorescência deste composto pode ser facilmente analisada com um comprimento de onda de excitação entre 530-540 nm e um comprimento de onda de emissão entre 585-595 nm (Figura 14).

A atividade antioxidante foi avaliada por análise dos espectros da ATR-FTIR das formulações conforme o detalhado nos resultados.



**Figura 14** – Esquema do ensaio de avaliação da atividade anti-inflamatória.



# **Capítulo 4**

---

## **Resultados e Discussão**



## 4.1. Doseamento espectrofotométrico do resveratrol pelo método da curva de calibração

O espectro de absorção UV/Vis do RSV apresenta três comprimentos de onda ( $\lambda$ ) onde a absorção é máxima,  $\lambda_{\text{máx}} = 216 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{máx}} = 305 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{máx}} = 317 \text{ nm}$ , sendo possível o seu doseamento em qualquer um destes máximos. O  $\lambda_{\text{máx}} = 305 \text{ nm}$  foi o comprimento de onda selecionado para o doseamento espectrofotométrico do RSV. A Figura 15 apresenta os espectros de absorção UV/Vis obtidos para soluções padrão de RSV com concentrações de 0,5 - 100  $\mu\text{M}$ .

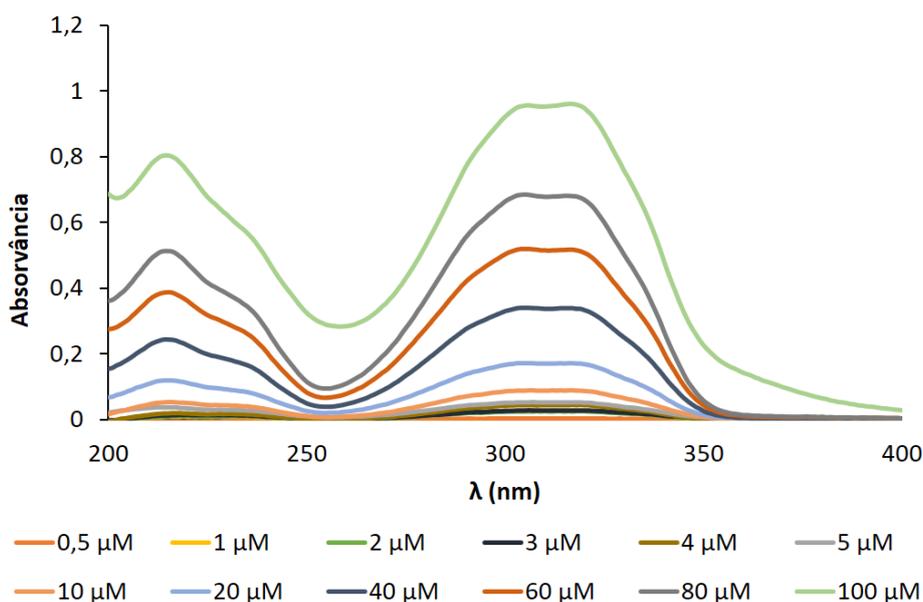


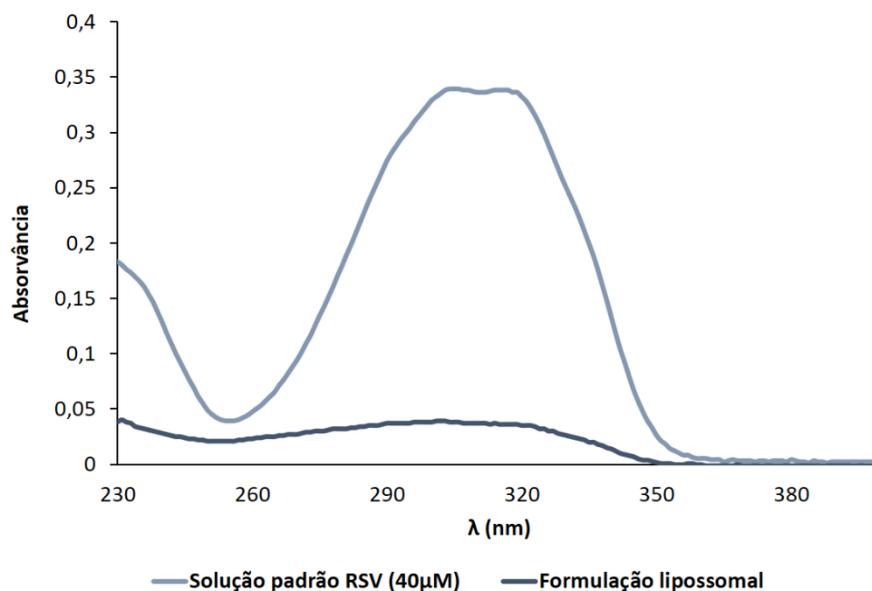
Figura 15 - Espectro de absorvância UV/Vis de soluções padrão de RSV.

### 4.1.1. Parâmetros de validação do método analítico

#### Especificidade

A análise da especificidade do método analítico permite verificar se existem interferências entre a quantificação do RSV e os restantes componentes presentes nas dispersões lipídicas de nanossistemas, nomeadamente dos lípidos e dos agentes tensoativos. O espectro de absorção das formulações foi registado entre os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 200 nm a 400 nm. Assim, comparando o espectro de absorção das dispersões lipídicas de nanossistemas com uma solução padrão de RSV (40  $\mu\text{M}$ ), as formulações não apresentaram bandas de absorção aos  $\lambda$  de absorção registados para o RSV. É, portanto, possível constatar que os componentes das formulações não

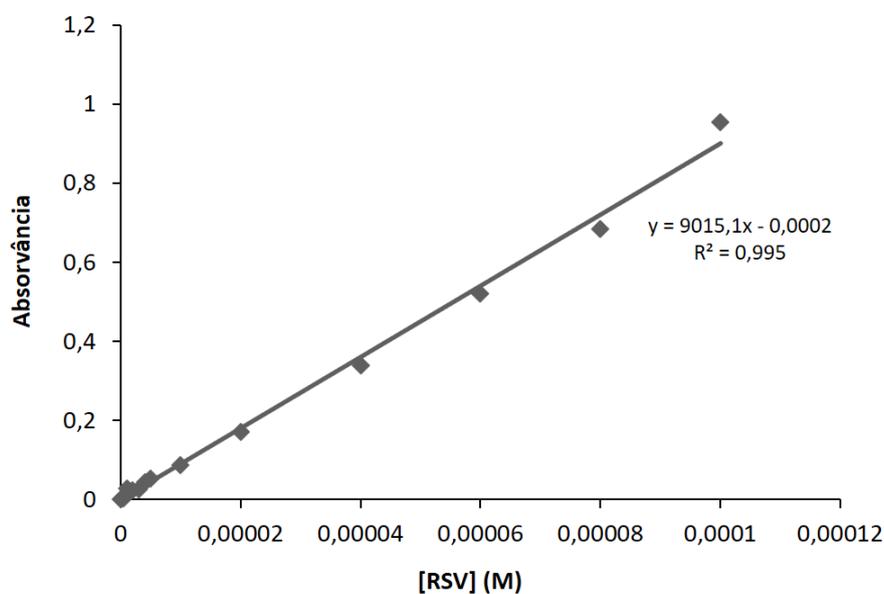
interferem com a quantificação do RSV e que, por isso, o método é específico para o RSV (Figura 16).



**Figura 16** – Comparação do espectro de absorção das dispersões lipídicas de nanossistemas com uma solução padrão de RSV (40 μM).

### Linearidade

A obtenção da correlação direta entre a absorvância do composto e a sua concentração é de elevada importância para a quantificação do RSV. Deste modo, representando graficamente a absorvância ao  $\lambda_{\text{máx}}$  de 305 nm em função da concentração de RSV, procedeu-se ao traçado da curva de calibração apresentado na Figura 17.



**Figura 17** – Curva de calibração do RSV em água ultrapura ao comprimento de onda máximo de 305 nm.

Os dados da curva analítica ( $Y = 9015,1x - 0,0002$ ) foram ajustados pela análise de regressão linear. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) apresentou um valor de 0,995, o que indica que 99,5% da variação total em torno da absorvância é explicada pela regressão linear, com um resíduo de 0,0002. Além disso, o valor da interceção com o eixo dos YY não se mostrou significativamente diferente de zero. Posto isto, pode-se considerar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de RSV na amostra, dentro do intervalo estipulado das concentrações (0,5  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ). Em suma, é possível concluir que o método analítico demonstrou uma boa linearidade dentro do intervalo de concentrações proposto.

### **Precisão**

Para determinar a precisão do método foram realizadas cinco medidas da absorvância para a concentração máxima de RSV (100  $\mu\text{M}$ ) e foram obtidos os seguintes resultados para o  $\lambda_{\text{máx}}$  de 305 nm: 0,954; 0,953; 0,954; 0,956 e 0,957. A proximidade ( $\pm 0,001$ ) entre os valores obtidos permite afirmar que o método é preciso.

### **Limite de detecção e limite de quantificação**

A partir da curva de calibração e das equações 7 e 8, foi possível calcular os DL e QL. Assim, o resultado obtido para o DL foi de  $2,91744 \times 10^{-06}$  M e para o QL foi de  $8,84072 \times 10^{-06}$  M.

Após a análise de todos estes parâmetros de validação, é possível concluir que o método analítico é válido para a quantificação do RSV em dispersões de nanossistemas lipídicos, uma vez que este se mostrou específico, linear e preciso no intervalo de concentrações de RSV de 0,5  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Este método permite ainda determinar quantitativamente com precisão e exatidão concentrações aceitáveis a partir dos  $8,84072 \times 10^{-06}$  M. O coeficiente de absorvidade molar determinado para o RSV foi de  $9015,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## 4.2. Estudos de pré-formulação

### 4.2.1. Estudo *in silico* das características físico-químicas do resveratrol e descritores moleculares relevantes

Através do *software* da Chemaxon® com o módulo MarvinSketch® foi possível obter importantes parâmetros físico-químicos com base na estrutura da molécula de RSV, tal como pode ser observado na seguinte Tabela.

**Tabela 5** - Previsão *in silico* de alguns parâmetros obtidos através do software Chemaxon® e do MarvinSketch® para o RSV.

	Massa molecular (g/mol)	Log P	Solubilidade	PSA (Å <sup>2</sup> )	VWSA (Å <sup>3</sup> )	Grupos dadores de H	Grupos aceitadores de H
<b>RSV</b>	228,25	3,4	Baixa	60,69	308,38	3	3

PSA - Área de Superfície Polar (do inglês, *Polar surface area*); VWSA- Volume de Van der Waals (do inglês, *Van der Waals surface area*)

A partir da determinação *in silico* destes parâmetros, é possível retirar considerações sobre algumas características do composto: ionização, lipofilicidade, solubilidade, permeabilidade, classificação biofarmacêutica, parâmetros que serão avaliados nas secções seguintes. Estes são preditores usados no desenvolvimento racional de formulações [143-145] e que permitiram compreender desafios mais importantes no desenvolvimento de uma formulação para entrega de RSV, nomeadamente se as suas características de lipofilicidade e solubilidade eram indicativas de que os lipossomas e as nanopartículas lipídicas poderiam ser formulações adequadas para veicularem este composto bioativo.

#### Ionização do resveratrol

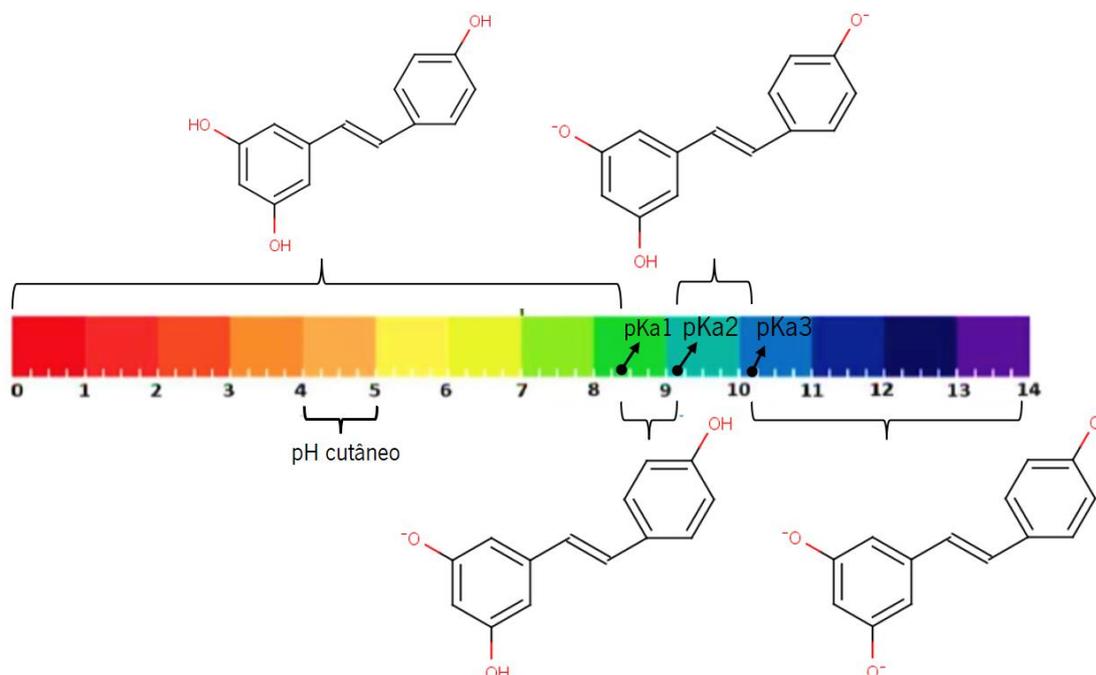
O pKa, cologaritmo da constante de acidez (Ka), pode ser relacionado com o pH através da relação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{Equação 14}$$

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. Assim, o valor de pH é igual ao valor de pKa quando a razão [A-]/[AH] é igual à unidade (e  $\log_{10}1=0$ ). Como tal, o pKa é o valor de pH ao qual se obtém 50% de espécies neutras e 50% de espécies ionizadas [146-148].

Através do *software* MarvinSketch<sup>®</sup>, os valores de pKa calculados para a ionização do RSV foram de 8,49 (pKa1), 9,13 (pKa2) e 10,14 (pKa3), os quais se aproximam dos valores obtidos experimentalmente descritos na literatura (8,99; 9,63 e 10,64) [149]. A um pH inferior ao pKa1, a molécula de RSV encontra-se maioritariamente na sua forma neutra e a um pH superior ao pKa1, a molécula de RSV encontra-se maioritariamente carregada negativamente, ou seja, na sua forma ionizada.

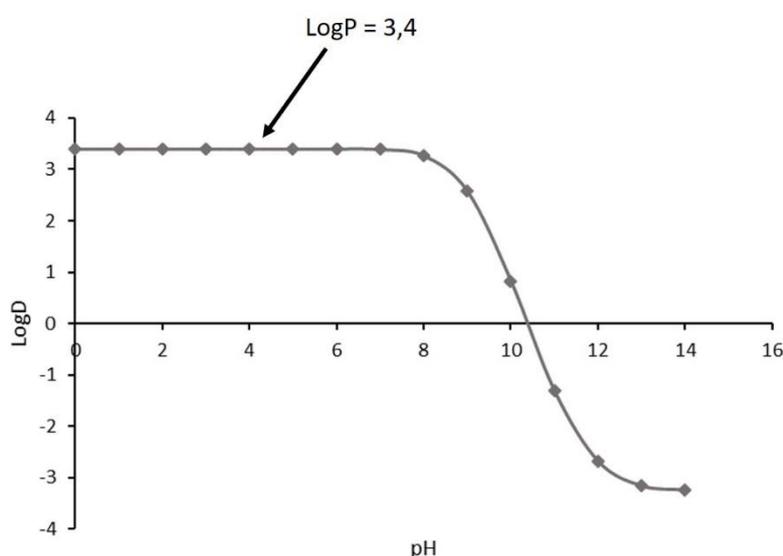
A solubilização e a capacidade de permeabilizar membranas são condicionadas pela ionização dos fármacos. Assim, na Figura 18 estão apresentadas as microespécies de RSV predominantes de acordo com o pH. Ao pH cutâneo o RSV encontra-se na sua forma neutra.



**Figura 18** - Escala de pH com a representação da distribuição de microespécies de RSV (neutra e negativa), e ainda os valores de pKa do RSV e os valores de pH da pele.

## Lipofilicidade do resveratrol

A lipofilicidade de um fármaco ou composto bioativo pode ser avaliada através do coeficiente de partição do mesmo num sistema bifásico octanol/água. Quanto maior a apetência do fármaco ou composto bioativo para se distribuir na fase orgânica (octanol), maior o seu coeficiente de partição e, conseqüentemente, maior a sua lipofilicidade [146-148]. Designa-se por LogP o coeficiente de partição que é avaliado a um valor de pH, ao qual a molécula do fármaco ou composto bioativo é neutra. Por outro lado, quando a partição é avaliada a um determinado valor de pH e não necessariamente aquele em que a molécula está na forma neutra, é designada por LogD [146-148]. Na Figura 19 encontra-se apresentada a previsão *in silico* do LogD e do LogP do RSV num sistema bifásico octanol/água.



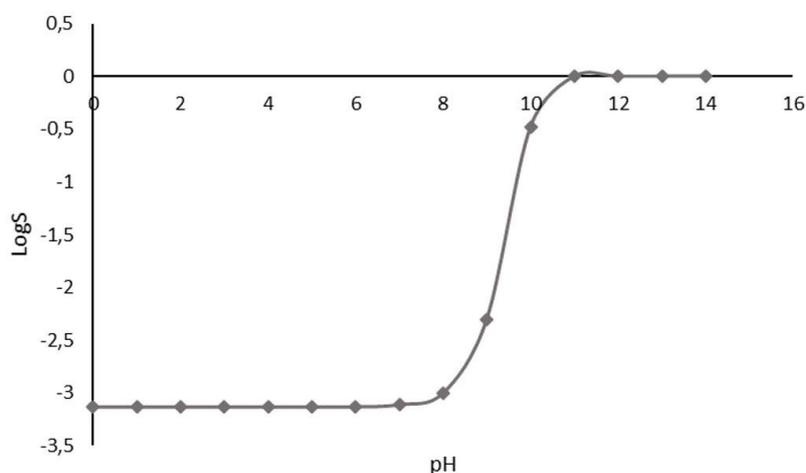
**Figura 19** - Representação gráfica do LogD da molécula RSV num sistema bifásico octanol:água em função do pH e representação do LogP do RSV no mesmo sistema. Elaborada com recurso ao software MarvinSketch®.

Ao pH da pele o valor de LogD previsto é de 3,4. À semelhança do LogD, o valor previsto para o LogP foi de 3,4, o qual vai ao encontro do valor descrito pela literatura ( $\approx 3,1$ ) [150]. O valor de LogP determinado para o resveratrol revela que é um composto com lipofilicidade moderada a elevada (lipofilicidade moderada implica  $0 < \text{LogP} < 3$  e lipofilicidade elevada implica  $\text{LogP} > 5$ ) [146-148]. Como tal, a lipofilicidade do RSV indicia que este composto seja lipossolúvel e parece ser adequada para a sua incorporação em nanossistemas lipídicos. Contudo, apesar de uma lipofilicidade moderada a elevada, o RSV apresenta outros parâmetros elevados, como a  $\text{PSA} = 60,69 \text{ \AA}^2$  (Tabela 5), que é uma medida dos átomos polares de uma molécula, sendo assim indicativo do caráter anfifílico do RSV. Assim, apesar da lipofilicidade ser adequada para a sua

incorporação em nanossistemas lipídicos, a sua PSA não mostra ser adequada à incorporação em sistemas como as SLN e NLC, que são sistemas francamente apolares, nos quais as zonas polares limitam a interface do tensoativo com a água. Por outro lado, a dupla natureza química dos sistemas lipossomais, com pelo menos duas interfaces polares e maior fluidez poderão constituir um veículo mais adequado para a encapsulação do RSV.

### Solubilidade do resveratrol

Na Figura 20 está representado o gráfico do LogS (em que S é a solubilidade em mg/mL) em função do pH e é através deste que é possível concluir que a solubilidade do RSV é extremamente baixa quando em ambientes aquosos básicos, neutros ou ácidos.



**Figura 20** – Representação gráfica do LogS do RSV em função do pH. Elaborada com recurso ao software MarvinSketch®.

Desta forma, a baixa solubilidade do RSV irá condicionar a sua absorção e permeabilização membranar, promovendo ainda uma fácil eliminação renal do mesmo [151]. Mais uma vez, estas conclusões determinam que a encapsulação do RSV em nanossistemas lipídicos é uma estratégia importante para melhorar o seu perfil farmacocinético.

### Classificação biofarmacêutica do resveratrol

Pela previsão *in silico* efetuada, depreende-se que o RSV tem moderada a elevada lipofilicidade e baixa solubilidade, o que o colocariam teoricamente na classe 2 segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS, do inglês, *Biopharmaceutical Classification System*). Esta classificação está de acordo com o descrito na literatura para o RSV [152] e, segundo as regras

do desenvolvimento racional de formulações, esta classificação indica que para compostos desta classe são necessárias estratégias (e.g. formular em nanossistemas lipídicos) para melhorar as taxas de dissolução do bioativo [153].

### Permeabilidade cutânea ao resveratrol

De acordo com a regra “*rule of 5*” de Lipinski, se um composto possuir duas das seguintes características apresentará uma baixa permeabilidade e uma baixa absorção:  $\text{LogP} > 5$ ; peso molecular  $> 500$  Da; doadores de Hidrogénio  $> 5$  e aceptores de Hidrogénios  $> 10$  [146-148]. Assim, segundo esta regra, o RSV não possuiria problemas de baixa permeabilidade e baixa absorção (ver Tabela 5).

Neste trabalho é particularmente importante obter uma previsão a respeito da permeabilidade cutânea do RSV (composto bioativo livre, não encapsulado), uma vez que se pretende desenvolver uma formulação contendo RSV para aplicação tópica que, se possível, melhore as propriedades de permeação cutânea do RSV. Assim, as propriedades mais relevantes na absorção dérmica são a massa molecular, a solubilidade e o coeficiente de partição, pois são estas as propriedades que irão condicionar a passagem através da principal barreira cutânea, o estrato córneo [154]. Geralmente, são as moléculas lipídicas e anfílicas com um  $\text{LogP}$  de 1 a 3 e um peso molecular inferior a 400-500 Da que favorecem a permeação cutânea [155]. O RSV apresenta o peso molecular requerido, no entanto, o seu  $\text{LogP}$  parece invalidar uma boa permeação, pelo que esta poderá ocorrer principalmente pelos espaços inter-lamelares do estrato córneo, ou através dos poros da pele, ou poderá um recurso ao encapsulamento em nanossistemas lipídicos melhorar a sua permeação.

Outra regra muito importante foi o algoritmo criado por Potts e Guy a partir de um extenso número de dados (cerca de 100 compostos testados) que lhes permitiu estabelecer que para compostos com pesos moleculares (PM) de 18 a 750 Da e com  $\text{Log P}$  de - 3 a + 6, a permeabilidade através da pele humana ( $P$ , em cm/h) pode ser prevista pela equação seguinte:

$$P = 10^{(-2,7+0,7 \times \text{LogP} - 0,0061 \times \text{PM})} \quad \text{Equação 15}$$

Aplicando esta equação, é possível calcular a permeabilidade do RSV através da pele humana como sendo 0,0210 cm/h. Também é possível calcular o fluxo máximo ( $J_{\text{máx}}$  em

$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), ao qual o RSV pode atravessar uma área unitária da pele, já que este é teoricamente alcançado quando o composto é mantido como uma solução saturada (ou em forma química pura) na superfície cutânea:

$$J_{m\acute{a}x} = P \times C_{sat} \quad \text{Equação 16}$$

em que  $C_{sat}$  é a solubilidade máxima em água (para o RSV é de  $0,03 \text{ mg}/\text{cm}^3$ ) e  $P$  é a permeabilidade calculada pela equação anterior. Assim,  $0,629 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  é o fluxo máximo ao qual o RSV pode atravessar uma área unitária da pele.

## 4.2.2. Testes de triagem para avaliação da lipossolubilidade do resveratrol

### Estudo da solubilidade lipídica do resveratrol

Apesar da lipofilia moderada a elevada do RSV e uma vez que o RSV apresenta uma elevada PSA, antes de se proceder à formulação deste bioativo em NLC procedeu-se a um estudo para testar a sua solubilidade (1 % m/m) em diferentes lípidos sólidos após aquecimento e fusão do lípido: Dynasan<sup>®</sup> 114, Gelucire<sup>®</sup> 43/01, Witepsol<sup>®</sup> E85, Imwitor<sup>®</sup> 900K, Compritol<sup>®</sup> 888 ATO e Suppocire<sup>®</sup> D; e em diferentes lípidos líquidos: Labrafac<sup>®</sup> lipophile WL1349, Maisine<sup>®</sup>, Peceol<sup>®</sup>, Lauroglycol<sup>®</sup> FCC e óleo de peixe (Myprotein<sup>®</sup>) a 15, 30, 45 e 60 min.

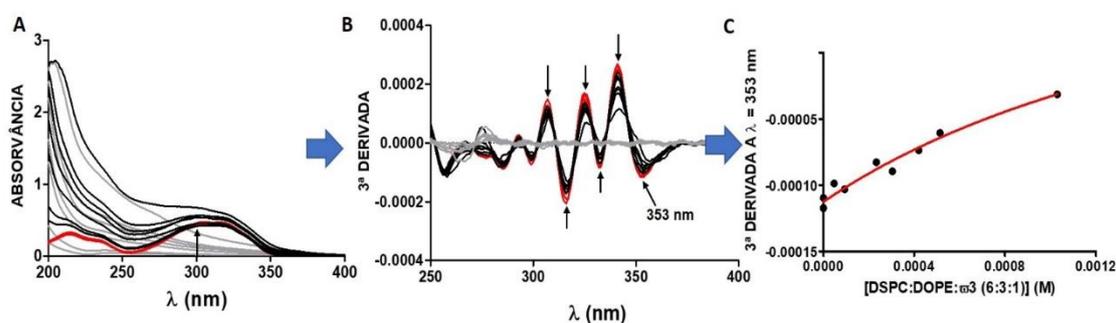
Em todas estas misturas testadas observou-se a presença de cristais de RSV no final de 1 hora, indicando que o RSV não é solúvel, nesta concentração e neste período de tempo, tanto nos lípidos sólidos como nos lípidos líquidos analisados. Deste modo, não foi possível selecionar nenhum dos lípidos para a preparação de NLC contendo RSV encapsulado e reservou-se a preparação dos NLC para a inclusão do outro bioativo (ácidos gordos ómega 3 presentes no óleo de peixe).

### Determinação do coeficiente de distribuição do resveratrol

Apesar da moderada a elevada lipofilicidade do RSV ( $\text{Log } P \text{ octanol}/\text{água} = 3,40$ ) prevista *in silico*, verificou-se que este bioativo contém um valor de PSA elevado indicando que tem grupos polares, que podem prejudicar a sua incorporação em nanossistemas lipídicos. Assim, fez-se um teste usando uma das formulações lipossomais propostas (DSPC:DOPE: $\omega$ 3 (6:3:1)) para a

determinação do coeficiente de distribuição do RSV no sistema bifásico lipossomas/água (Log D lipossoma/água).

A determinação do coeficiente de distribuição de um composto num sistema lipossoma/água, através do doseamento do composto por espectrofotometria de absorção sem proceder à separação de fases (lipídica e aquosa) apresenta um obstáculo analítico. De facto, tal como se pode ver na Figura 21 (A), as suspensões de lipossomas unilamelares (LUV's) utilizadas neste estudo causam dispersão de luz incidente durante o traçado dos espectros de absorção (espectros a cinza). A dispersão é tanto maior quanto mais concentrada for a suspensão e verifica-se ao longo de todo o intervalo de comprimentos de onda estudados, sendo mais notória a comprimentos de onda mais baixos. A espectrofotometria derivativa permite a eliminação deste tipo de interferência, ou seja, permite a anulação satisfatória dos sinais de fundo e a observação dos detalhes espectrais resultantes da interação bioativo/lipossoma [156, 157]. Na Figura 21 (B) está representada a 3ª derivada dos espectros de absorvância, onde se verifica uma eliminação eficaz da interferência devida à dispersão causada pelos LUV's (espectros a cinza passam, praticamente, pelo zero). Em comparação, o sinal analítico (bandas assinaladas com setas) correspondente ao composto a dosear apresenta-se bem resolvido.



**Figura 21** - (A) Espectros de absorvância usados para a determinação do coeficiente de partição do RSV no sistema bifásico lipossoma/ água. Seta vertical mostra dispersão da luz nos espectros dos lipossomas sem resveratrol; (B) Espectro da 3ª derivada de absorção do RSV no sistema bifásico lipossoma/água. Setas verticais mostram bandas onde há boa resolução do sinal analítico e anulação da interferência da dispersão de luz; (C) Representação gráfica dos valores da 3ª derivada dos espectros de absorção do RSV num sistema bifásico lipossoma/água a 353 nm, em função da concentração de lipossomas. A linha representa o ajuste pelo método de regressão não linear reportado em [157]. Espectros a vermelho: RSV na ausência de lipossomas; espectros a cinza: referências (lipossomas na ausência de RSV); espectros a negro: espectros de RSV com lipossomas (concentrações crescentes de lipossomas: 0 M;  $4,7 \times 10^{-5}$  M;  $9,3 \times 10^{-5}$  M;  $2,3 \times 10^{-4}$  M;  $3,0 \times 10^{-4}$  M;  $4,2 \times 10^{-4}$  M;  $5,1 \times 10^{-4}$  M;  $1,0 \times 10^{-3}$  M).

O coeficiente de distribuição do RSV foi determinado pela representação gráfica do valor mínimo ou máximo da derivada em função da concentração de LUV's de DSPC:DOPE: $\omega$ 3 (6:3:1), ajustando os dados experimentais com um ajuste não linear de acordo com um método descrito na literatura [156, 157]. A Figura 21 (C) representa um exemplo deste ajuste.

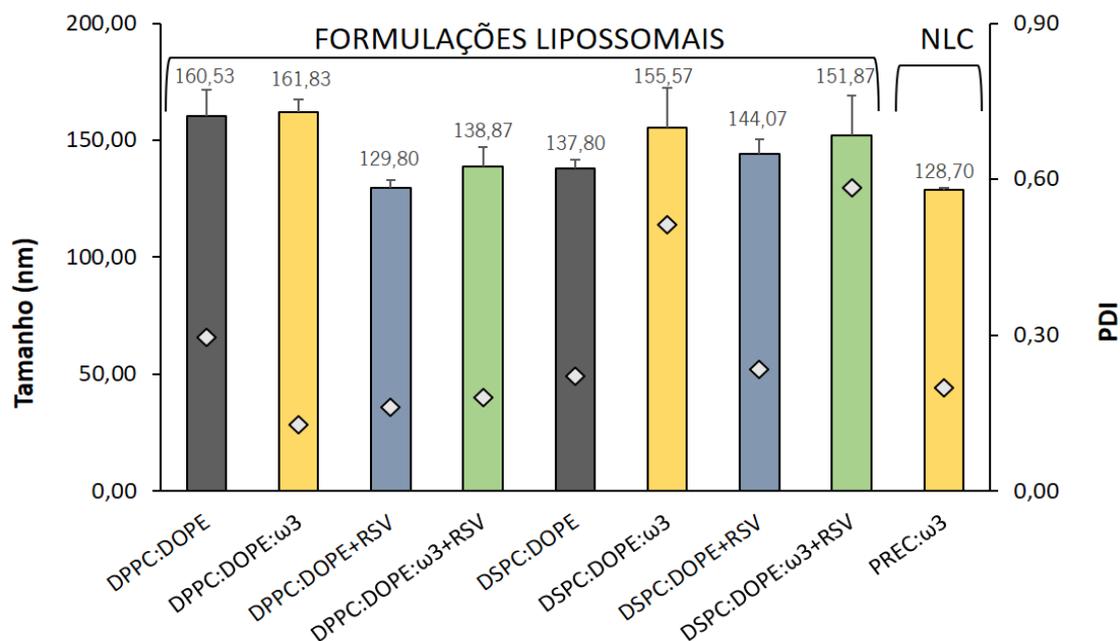
Os resultados obtidos ( $\text{Log D lipossoma/água} = 2,88 \pm 0,097$ ) indicam que o RSV tem uma distribuição moderada no sistema bifásico lipossoma/água. Uma explicação para a diferença de distribuição relativamente à prevista *in silico* reside no tipo de solvente que é utilizado para representar a fase apolar. Ao contrário do octanol, as bicamadas lipídicas possuem moléculas anfífilas cujas cabeças polares permitem o estabelecimento de diferentes interações com os compostos bioativos. O valor da distribuição determinado, apesar de mais baixo que o teórico, é ainda assim indicativo de que os lipossomas propostos são formulações adequadas ao encapsulamento de RSV.

### **4.3. Caracterização dos nanossistemas lipídicos**

#### **4.3.1. Avaliação do tamanho e polidispersão**

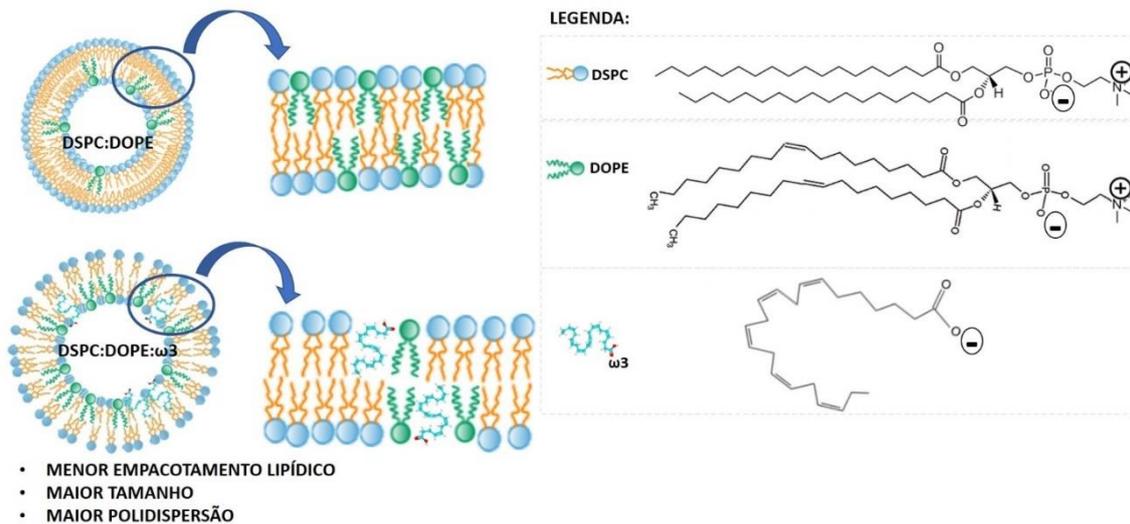
Os NLC e as formulações lipossomais foram preparadas segundo o processo descrito nos pontos 3.4.1 e 3.4.2, respetivamente.

Os resultados da caracterização do tamanho e do PDI dos nanossistemas lipídicos estão apresentados na Figura 22.



**Figura 22** – Tamanho médio e PDI dos nanossistemas lipídicos. As amarelo estão as formulações que contêm apenas óleos de peixe ricos em ácidos gordos ómega 3 ( $\omega 3$ ); a azul estão as formulações que contêm apenas RSV; e a verde estão as formulações que contêm simultaneamente RSV e  $\omega 3$ . A cinza são formulações placebo sem RSV e sem  $\omega 3$ . Os valores são apresentados em valores médios  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 medições. As medidas foram realizadas imediatamente após a preparação das formulações.

Analisando a Figura 22, verifica-se que das formulações lipossomais que contêm bioativos, as que contêm apenas óleos de peixe ricos em ácidos gordos ómega 3 ( $\omega 3$ ) apresentam o maior tamanho médio (161,83 nm para DPPC:DOPE: $\omega 3$  e 155,57 nm para DSPC:DOPE: $\omega 3$ ). Tal poder-se-á dever à introdução de ácidos gordos insaturados, como é o caso dos  $\omega 3$ , que têm uma geometria que prejudica o empacotamento dos fosfolípidos com caudas de ácidos gordos saturados (DPPC e DSPC), tornando os sistemas mais fluidos e, portanto, maiores. Esse efeito é mais notório precisamente no sistema que é constituído pelo lípido de cauda mais longa e que forma sistemas mais empacotados e rígidos (DSPC), onde a introdução de ácidos gordos  $\omega 3$  com “*kinks*” provoca um aumento de tamanho de 137,80 nm (sem  $\omega 3$ ) para 155,57 nm (com  $\omega 3$ ). Este aumento de tamanho é acompanhado por um aumento significativo do PDI o que confirma o facto de a introdução dos  $\omega 3$  perturbarem o empacotamento lipídico e originarem dispersões coloidais menos homogéneas (Figura 23).

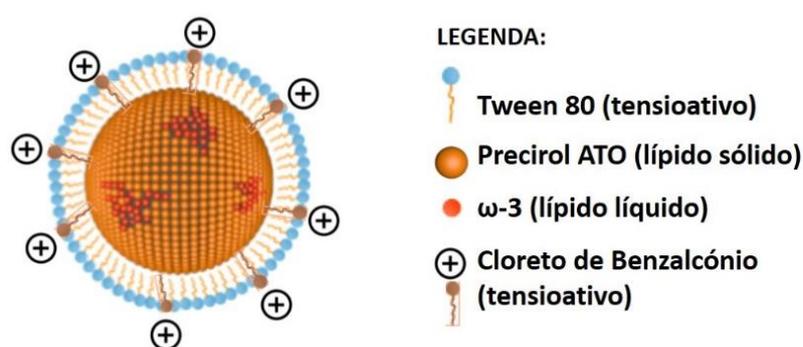


**Figura 23** - Representação esquemática do empacotamento lipídico nas formulações de LUV's de DSPC:DOPE sem e com  $\omega 3$ .

Relativamente às formulações lipossomais com  $\omega 3$ , a adição de RSV parece ter um efeito de melhoria do empacotamento lipídico, uma vez que provoca uma diminuição do tamanho dos nanossistemas (161,83 nm para DPPC:DOPE: $\omega 3$  passa a 138,87 nm para DPPC:DOPE: $\omega 3$ +RSV e 155,57 nm para DSPC:DOPE: $\omega 3$  passa a 151,87 nm para DSPC:DOPE: $\omega 3$ +RSV). O RSV apresenta similaridades estruturais com o colesterol e também tem efeitos de empacotamento lipídico [158], pelo que a sua introdução nos sistemas pode favorecer a formação de domínios mais ordenados e mais compactos, com uma consequente diminuição do tamanho dos lipossomas resultantes.

Os resultados obtidos para o tamanho médio dos lipossomas com  $\omega 3$  são ligeiramente maiores do que os obtidos por Skibinski et al. (2016) ( $137 \pm 12$  nm), no entanto, os obtidos para os lipossomas contendo os dois compostos bioativos ( $\omega 3$  e RSV) são menores do que os resultados conseguidos por Jøraholmen et al. (2015) ( $206 \pm 10$  nm). Estes autores recorreram à técnica de extrusão para a produção dos nanossistemas, pelo que esta técnica também utilizada neste trabalho mostrou-se ser eficaz para a obtenção de tamanhos idênticos aos repostados na literatura [94, 95].

Embora o  $\omega 3$  afete o empacotamento lipídico nos lipossomas, o mesmo não parece acontecer com a introdução de  $\omega 3$  nos NLC. De facto, nos NLCs, o  $\omega 3$  encontra-se em reservatórios, em volta dos quais se encontra o lipido sólido (Figura 24), pelo que a nanopartícula lipídica resultante apresenta pequenas dimensões (128,70 nm) e PDI baixo (0,2). Os resultados obtidos para o tamanho médio dos NLC são significativamente menores do que os obtidos por Averina et al. (2001) e por Muchow et al. (2009) (> 200 nm) [97, 98]. Por outro lado, o PDI obtido para estes NLC é muito idêntico aos valores obtidos por Gokce et al. (2012) e por Neves et al. (2013), que rondaram em ambos os estudos 0,2, o que permite aferir que as formulações são homogêneas e que a técnica utilizada para a sua produção foi eficaz [99, 100].



**Figura 24** - Representação esquemática das formulações NLC.

Independentemente da variabilidade de tamanhos, todas as formulações desenvolvidas são adequadas para uma aplicação terapêutica, uma vez que o tamanho ótimo de um nanossistema lipídico para este tipo de aplicação está reportado entre 100 e 200 nm [159]. Além disso, tamanhos pequenos são importantes quando se pretende uma aplicação tópica cutânea, pois a penetração de nanossistemas lipídicos através do estrato córneo diminui com o aumento dos tamanhos dos mesmos [160]. No entanto, o tamanho é um fator mais limitante no caso das nanopartículas inorgânicas, dada a sua rigidez estrutural. Os lipossomas e os NLC são formulações mais flexíveis e moldáveis e, por esta razão, permeabilizam melhor o estrato córneo [161].

Além disso, no caso dos lipossomas, a existência de componentes que perturbam o empacotamento (como o  $\omega 3$  e o DOPE, designados em inglês por “*edge activators*”) possibilita a formação de sistemas com maior flexibilidade e, portanto, com maior penetração cutânea [162].

Relativamente ao PDI, um valor inferior a 0,3 é indicador de uma maior homogeneidade do tamanho dos nanossistemas e, por outro lado, valores mais elevados (superiores a 0,3) indicam

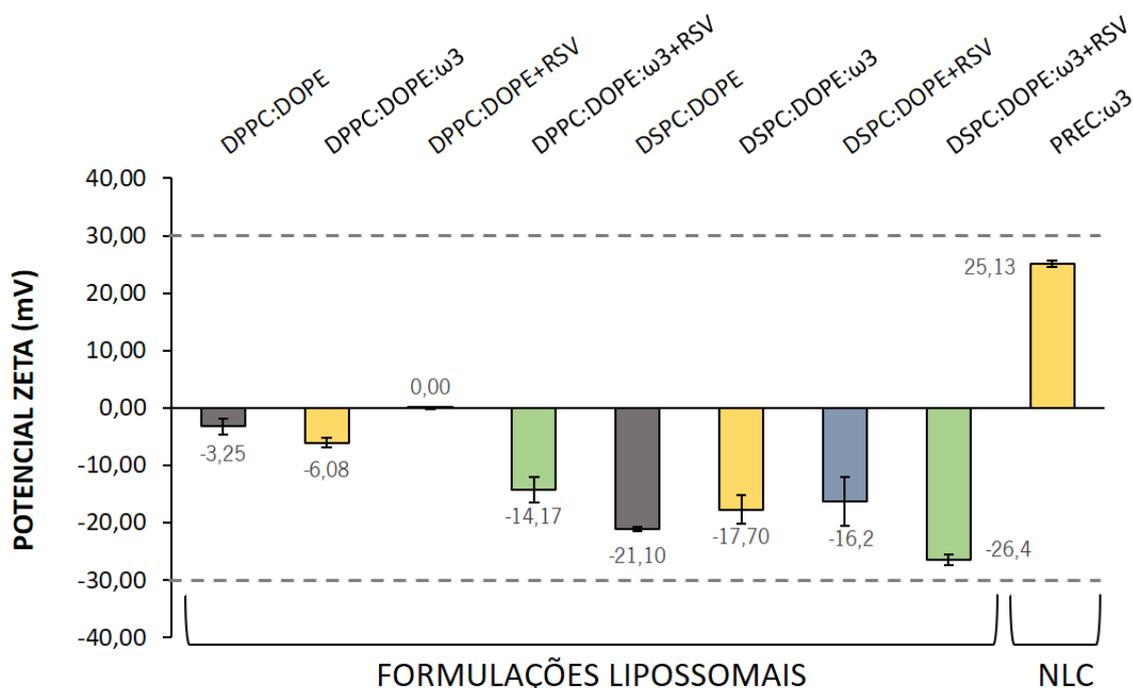
uma grande heterogeneidade. Todas as formulações lipossomais apresentam valores de PDI inferiores a 0,3, exceto as formulações DSPC:DOPE: $\omega$ 3 e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV, que apresentam valores superiores a 0,5, provavelmente pela perturbação do empacotamento induzida pela introdução de  $\omega$ 3, já referida. Os valores de PDI obtidos permitem classificar estas duas formulações como heterogêneas quanto ao seu tamanho. Portanto, é necessário considerar que um PDI muito baixo é um requisito essencial à aplicação de nanossistemas.

Ghorbanzade et al. (2017), ao encapsularem óleo de peixe nos lipossomas obtiveram um valor de PDI de  $0,557 \pm 0,01$  e Caddeo et al. (2008) alcançaram valores de PDI de  $\approx 0,2$  com a veiculação de RSV também em lipossomas [93, 96]. Os resultados obtidos neste trabalho, quando comparados com os descritos na literatura, mostram que as formulações DSPC:DOPE: $\omega$ 3 e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV poderão apresentar alguma instabilidade, mas que as restantes formulações com  $\omega$ 3 ou RSV serão mais estáveis e homogêneas.

No caso deste trabalho, as formulações destinam-se a uma aplicação tópica cutânea, em pele psoriática que se apresenta lesada, inflamada e mais permeável. Portanto, nem o requisito de tamanho nem o PDI são condicionantes para um sucesso da sua aplicação.

### 4.3.2. Avaliação da carga superficial dos nanossistemas lipídicos por determinação do potencial zeta

Os resultados da caracterização do potencial zeta dos nanossistemas lipídicos são apresentados na Figura 25.



**Figura 25** – Potencial zeta das nanossistemas lipídicos. A amarelo estão as formulações que contêm apenas óleos de peixe ricos em ácidos gordos ómega-3 ( $\omega$ 3); a azul estão as formulações que contêm apenas RSV; e a verde estão as formulações que contêm simultaneamente RSV e  $\omega$ 3. A cinza são formulações placebo sem RSV e sem  $\omega$ 3. Os valores são apresentados em valores médios  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 medições. As medidas foram realizadas imediatamente após a preparação das formulações. O tracejado indica o valor de potencial zeta a partir do qual as dispersões possuem maior estabilidade.

Por observação da Figura 25 é possível verificar que os NLC apresentam carga superficial positiva e os lipossomas apresentam uma carga superficial perto da neutralidade (DPPC:DOPE e DPPC:DOPE+RSV) ou negativa (nos restantes casos). Tais resultados estão relacionados com a sua composição química. Assim, os NLC possuem na interface lípido/água um tensoativo catiónico, o cloreto de benzalcónio (Figura 24) que justifica o potencial zeta positivo. Nos lipossomas com  $\omega$ 3 era expectável a presença de carga superficial negativa, pois tratam-se de ácidos gordos, cujo grupo ácido carboxílico (Figura 23) está ionizado a um pH > 4,5. No caso dos lipossomas sem  $\omega$ 3 (com ou sem RSV encapsulado), seria esperado que a carga superficial fosse muito próxima da neutralidade, porque os fosfolípidos DPPC, DSPC e DOPE são zwitteriónicos

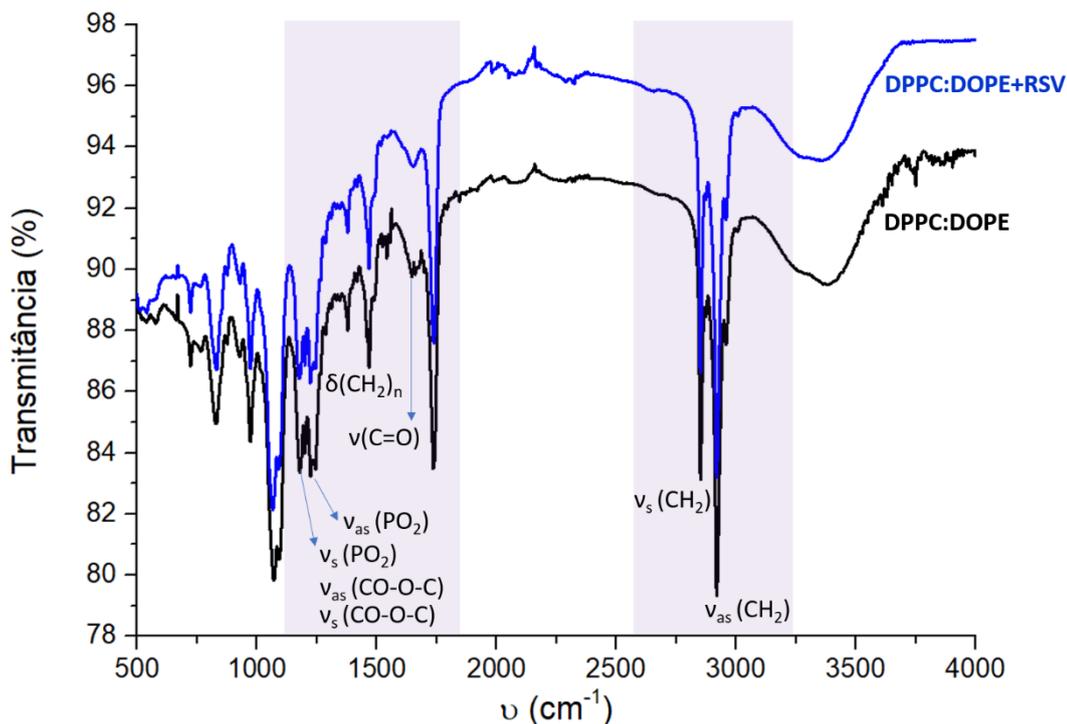
(têm uma carga positiva do grupo colina ou etanolamina e uma carga negativa do grupo fosfato) (Figura 23) e o RSV é neutro (ao pH das formulações:  $\approx 6,2$ , ou seja, pH da água ultrapura). No entanto, as formulações com DSPC sem  $\omega 3$  apresentam carga superficial negativa o que, apesar da pureza do lípido utilizado, pode por vezes acontecer devido à presença de ácido esteárico não esterificado.

Valores de potencial zeta que se aproximem de  $\pm 20$  mV indicam que uma formulação apresenta uma estabilidade a curto prazo, no entanto, valores inferiores indicam que há aglomeração e instabilidade na formulação [163]. Assim, são consideradas formulações estáveis aquelas que apresentam valores de potencial zeta superiores a  $\pm 30$  mV [164, 165]. Como é possível observar no gráfico da Figura 25, todas as formulações apresentam valores de potencial zeta inferiores a  $\pm 30$  mV, os quais permitem prever uma instabilidade destas formulações. No entanto, as formulações DPPC:DOPE: $\omega 3$ +RSV, DSPC:DOPE, DSPC:DOPE+RSV, DSPC:DOPE: $\omega 3$ +RSV e os NLC PREC:  $\omega 3$  poderão mostrar alguma estabilidade a curto prazo, visto que apresentam valores de potencial zeta muito próximos ou até superiores a  $\pm 20$  mV.

Como foi referido anteriormente, dos inúmeros nanossistemas lipídicos existentes, aqueles que são considerados como sistemas deformáveis são os mais aptos para ultrapassar as barreiras impostas pelo estrato córneo. Portanto, para uma aplicação tópica, esta instabilidade dos sistemas não será um problema, mas sim um benefício para a penetração cutânea [166].

#### **4.3.3. Composição química estudada por Espectroscopia de infravermelho de reflexão total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

Foi efetuada uma análise de ATR-FTIR de modo a identificar os modos de vibração das ligações químicas dos compostos bioativos (RSV e  $\omega 3$ ) e das formulações lipossomais com e sem o co-encapsulamento. Nas Figuras seguintes mostram-se os espetros obtidos a partir das diferentes amostras analisadas.

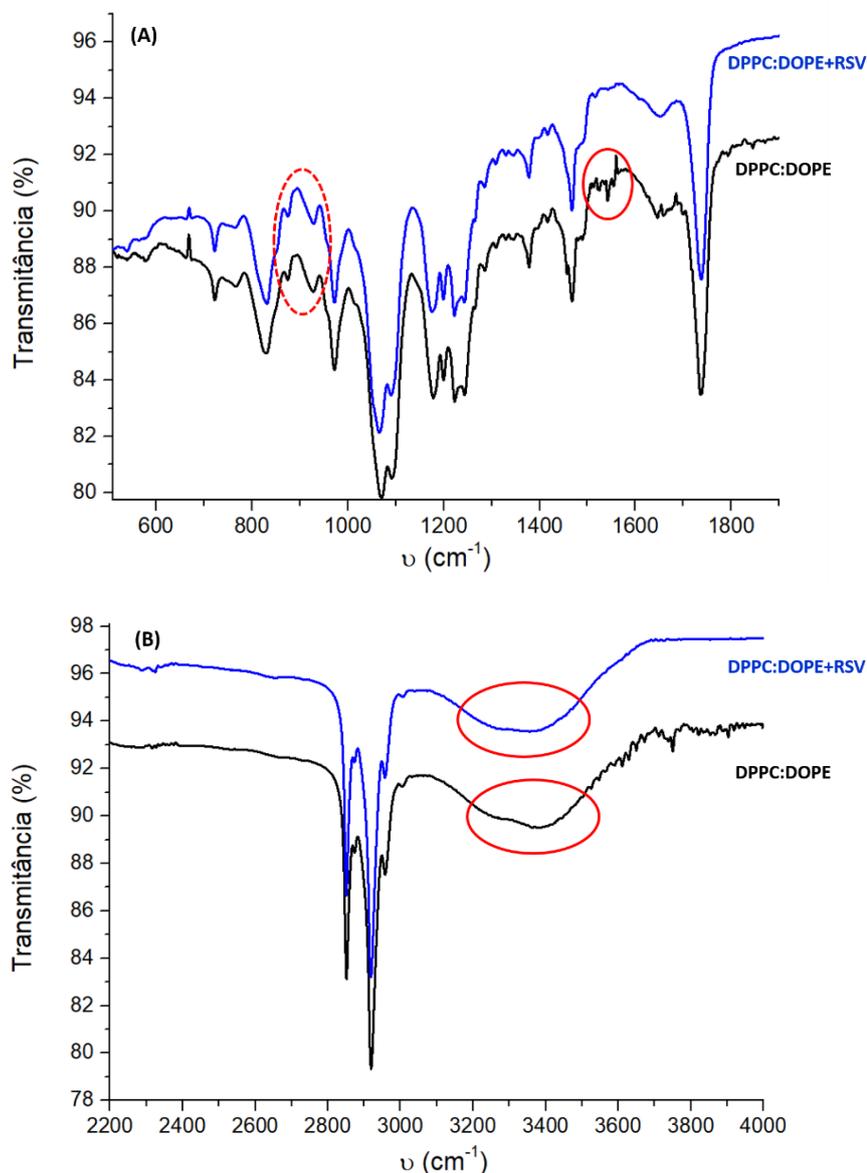


**Figura 26** - Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC:DOPE, sem bioativos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC:DOPE, com RSV encapsulado. Nas zonas sombreadas destacam-se os grupos funcionais característicos dos fosfolípidos.

Na Figura 26 são visíveis os principais modos de vibração correspondentes aos fosfolípidos constituintes dos lipossomas [167]: 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 a 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  $\text{PO}_2$ .

Apesar de na Figura 26 serem visíveis os principais modos de vibração correspondentes aos fosfolípidos, quer no espectro correspondente aos lipossomas sem RSV, quer no espectro correspondente aos lipossomas com RSV encapsulado, não são à partida visíveis modos de vibração correspondentes ao RSV que permitam identificar a sua presença nos lipossomas. Para avaliar com mais detalhe a possibilidade de existência de bandas que possam ser atribuídas ao

RSV, na Figura 27 (A) e (B) as duas zonas de grupos funcionais detetadas na Figura 26 são apresentadas separadamente.

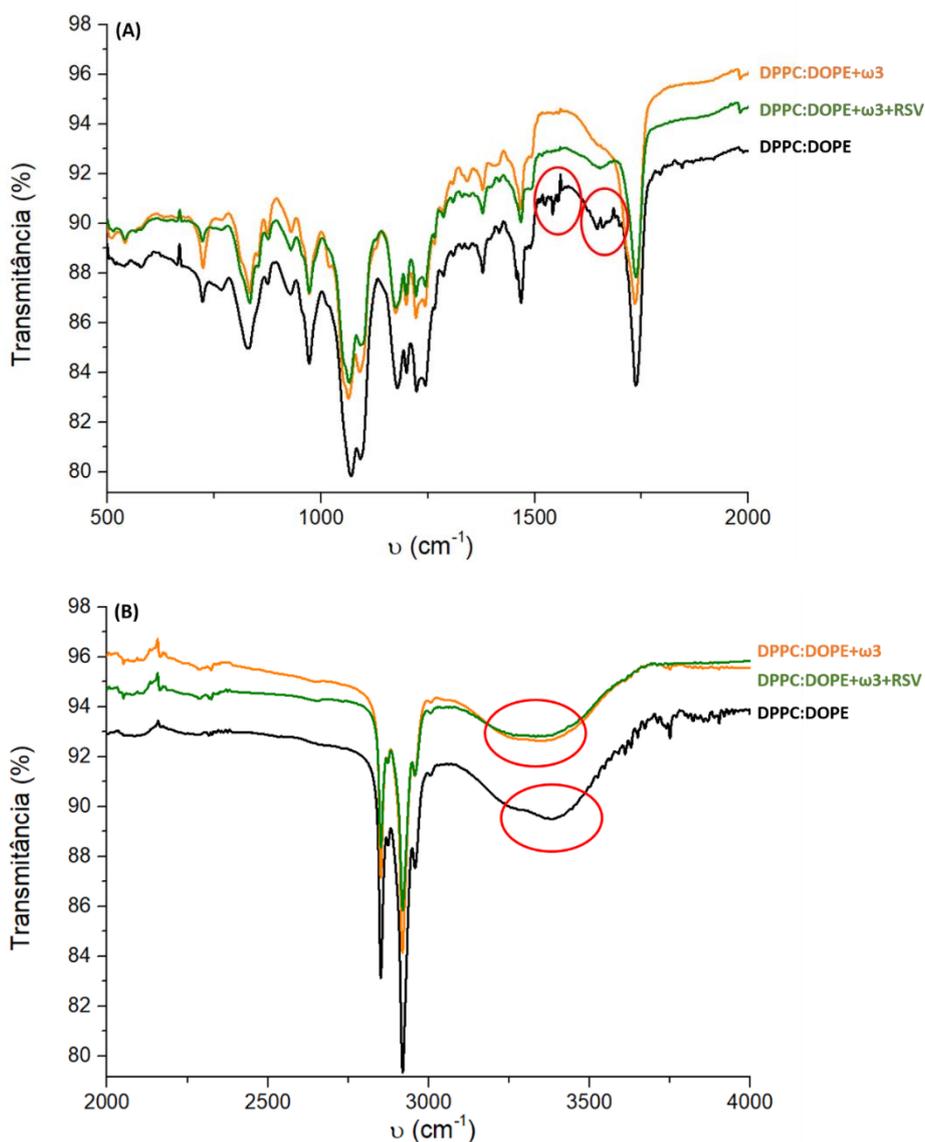


**Figura 27** – Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC:DOPE, sem bioativos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC:DOPE, com RSV encapsulado separados em duas regiões (A) e (B). Nas zonas circundadas a traço cheio vermelho destacam-se pequenas diferenças espectrais e na zona circundada a tracejado assinala-se a zona onde se esperaria encontrar as bandas trans-olefinicas.

Na Figura 27 (A) é possível verificar uma pequena diferença espectral entre os espectros de DPPC:DOPE sem RSV que apresentam algumas bandas pequenas na zona de 1525, 1542 e 1555  $\text{cm}^{-1}$  (assinalada com círculo vermelho) possivelmente devido a ligações -NH, o que é espetável

tendo em consideração os grupos amina das cabeças dos fosfolípidos. No espectro DPPC:DOPE+RSV estas bandas não estão visíveis ou estão atenuadas, o que poderá ser resultado da interação do RSV com os grupos aminados da cabeça dos fosfolípidos. De facto, de acordo com as previsões *in silico* efetuadas neste trabalho, o RSV pode funcionar como aceitador e dador de pontes de hidrogénio e, portanto, é provável que se estabeleçam pontes de hidrogénio entre os grupos HO- do RSV e -NH dos fosfolípidos que motivem a atenuação das bandas das ligações -NH. Por outro lado, também a banda correspondente ao modo de vibração do grupo carbonilo ( $1736\text{ cm}^{-1}$ ) se encontra alterada no espectro DPPC:DOPE+RSV, o que pode, mais uma vez, significar uma interação por pontes de hidrogénio entre o grupo C=O dos fosfolípidos e os grupos HO- do RSV.

Na mesma Figura, assinalado a tracejado está a região onde deveriam constar bandas trans-olefínicas características do RSV (a  $986$  e  $984\text{ cm}^{-1}$ ), mas que não foram observadas, talvez porque a quantidade de RSV seja muito pequena em relação aos lípidos para ser detetada a sua presença nos espectros de ATR-FTIR. Na Figura 27 (B) apresenta-se com mais pormenor a região dos  $2200 - 4000\text{ cm}^{-1}$ . Nenhuma diferença espectral significativa é detetada, apenas se pode verificar que a banda a  $3360\text{ cm}^{-1}$  apresenta, no caso dos sistemas com RSV, um aspeto mais arredondado característico da vibração de estiramento dos grupos -OH dos álcoois (presentes na molécula de RSV), enquanto que nos sistemas sem RSV esta banda apresenta mais o aspeto da vibração de estiramento dos grupos -NH (presentes nos fosfolípidos).



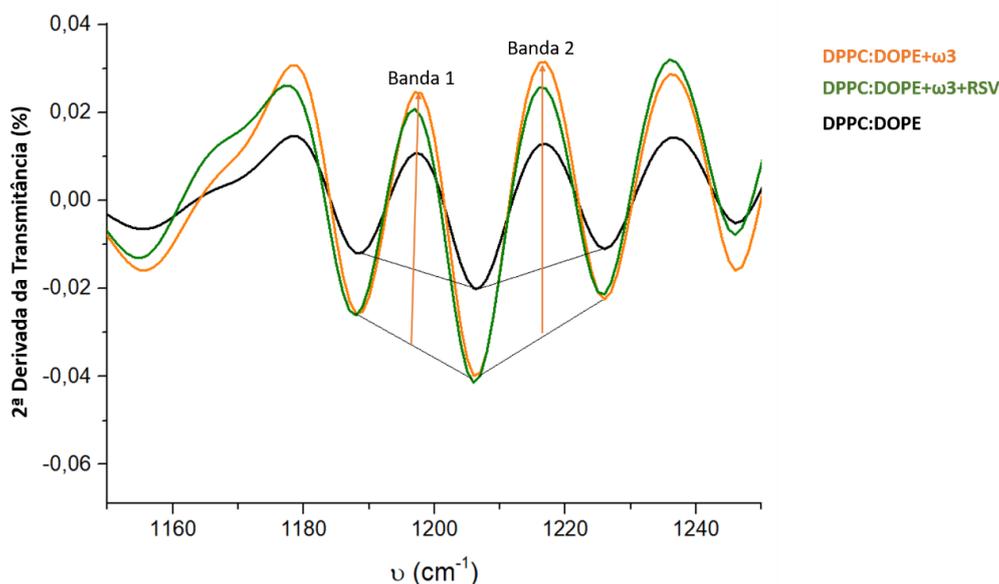
**Figura 28** – Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC:DOPE, sem bioativos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC:DOPE, com  $\omega 3$  e com  $\omega 3$  e RSV encapsulado separados em duas regiões (A) e (B). Nas zonas circundadas a traço cheio vermelho destacam-se pequenas diferenças espectrais.

Na Figura 28 (A) e (B) estão representados os espectros de ATR-FTIR obtidos para a formulação DPPC:DOPE, DPPC:DOPE: $\omega 3$  e DPPC:DOPE: $\omega 3$  + RSV. Tal como acontecia com o RSV, o  $\omega 3$  também está presente numa proporção muito inferior aos fosfolípidos DPPC:DOPE, pelo que a sua presença não é claramente visível através dos espectros apresentados. Além disso, o  $\omega 3$  é um conjunto de ácidos gordos existentes num óleo de peixe, pelo que apresenta muitos grupos funcionais em comum com os fosfolípidos (também constituídos por ácidos gordos esterificados pelo glicerol) e como tal, à exceção dos modos vibracionais para o grupo fosfato ( $-PO_2$ ), todos os modos vibracionais referidos na Figura 26 estão também presentes no espectro de

$\omega_3$ , justificando que os espectros de DPPC:DOPE e DPPC:DOPE: $\omega_3$  sejam muito semelhantes (Figura 28 (A) e (B)). No entanto, tal como já foi referido para o RSV, é possível verificar as mesmas pequenas diferenças espectrais entre os espectros de DPPC:DOPE sem RSV e sem  $\omega_3$  e os espectros dos lipossomas com  $\omega_3$  ou com os dois bioativos (Figura 28 (A) e (B), círculos vermelhos).

O mesmo tipo de conclusões se pode tirar nos sistemas de DSPC:DOPE, DSPC:DOPE+RSV, DSPC:DOPE: $\omega_3$  e DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV, cujos espectros de ATR-FTIR se apresentam em anexo (Anexos 1 e 2).

Apesar da preparação cuidada das amostras de ATR-FTIR, estas poderão ter quantidade de material analisado diferente, o que corresponderá a intensidades diferentes de transmitância. A análise feita até aqui foi meramente qualitativa, uma vez que para uma análise quantitativa era necessário um controlo maior da quantidade de material depositado em cada análise. No entanto, apesar das intensidades das bandas de ATR-FTIR variarem, a variação quer da sua posição quer de razões de intensidades de bandas num mesmo espectro não devem variar e poderão dar indicações acerca de interações entre os bioativos e os lipossomas. Assim, após proceder à 2ª derivada dos espectros de ATR-FTIR, para anulação de ruído e melhor definição das bandas espectrais, procedeu-se ao cálculo da razão das áreas de duas bandas (Área da banda 2/Área da banda 1) correspondentes à vibração de estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ) dos grupos PO<sub>2</sub> (Figura 29).



**Figura 29** – 2ª Derivada dos espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DPPC:DOPE, sem bioativos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DPPC:DOPE, com  $\omega_3$  e com  $\omega_3$  e RSV encapsulados. Para cada amostra calculam-se as áreas da banda 1 e 2 que correspondem às ( $\nu_{as}$ ) dos grupos PO<sub>2</sub> e a razão (área da banda 2/área da banda 1).

A Tabela 6 apresenta a razão das áreas obtidas para cada uma das formulações.

**Tabela 6** - Razão das áreas das bandas que correspondem às ( $\nu_{as}$ ) dos grupos PO<sub>2</sub>.

DPPC:DOPE	DPPC:DOPE: $\omega$ 3	DPPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV
0,44	2,87	1,94
DSPC:DOPE	DSPC:DOPE: $\omega$ 3	DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV
1,39	1,52	1,50

Um aumento do valor da razão das áreas da banda indica que há desidratação em torno dos grupos fosfato e, possivelmente, interação eletrostática [168]. Este foi o efeito verificado em ambos os sistemas lipossomais quando lhes foi adicionado ácidos gordos  $\omega$ 3, provavelmente porque para acomodar um ácido gordo com um grupo polar com carga negativa, foi necessária uma interação mais forte entre os grupos colina e etanolamina e os grupos fosfato. Quando se adiciona RSV a estes sistemas verifica-se em ambos os casos uma diminuição do valor das áreas da banda, o que pode ser visto como mais uma prova do estabelecimento de pontes de hidrogénio entre o RSV e as cabeças polares dos fosfolípidos dos lipossomas.

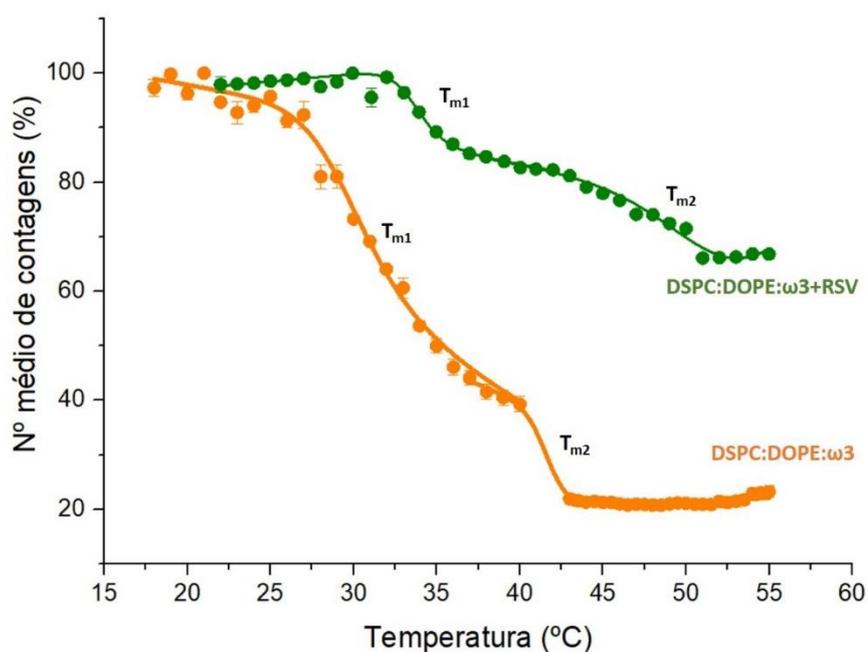
#### 4.3.4. Avaliação do efeito do RSV nas propriedades biofísicas dos lipossomas estudada por dispersão de luz dinâmica (DLS)

A incorporação de um composto bioativo em nanossistemas lipídicos pode promover alterações biofísicas provocando, por exemplo, um aumento da fluidez dos sistemas. Estas alterações podem ter consequências no desempenho terapêutico da formulação devido a alterações na permeabilidade do nanossistema mas também no perfil de libertação do composto bioativo. Assim, é aconselhável que faça parte da caracterização dos sistemas a avaliação do impacto do bioativo encapsulado nas propriedades biofísicas do nanossistema [169].

De todos os aspetos relativos à avaliação biofísica dos nanossistemas lipídicos, sejam eles dispersões de nanopartículas lipídicas ou dispersões lipossomais, o mais importante é o que se refere à transição de fase entre uma fase gel mais ordenada (no caso dos lipossomas) ou sólida (no caso das nanopartículas lipídicas) e uma fase fluida menos ordenada (no caso dos lipossomas) ou líquida (no caso das nanopartículas lipídicas) [170, 171].

No caso das dispersões de nanopartículas lipídicas a inclusão de um bioativo deve assegurar que a temperatura de fusão do sistema se mantenha elevada de forma a que as nanopartículas lipídicas permaneçam sólidas à temperatura ambiente e do organismo [100]. A formulação PREC: $\omega$ 3 preparada neste trabalho foi previamente utilizada para outro fim (veiculação do fármaco aciclovir) e portanto já foi avaliada quanto à sua temperatura de fusão ( $T_f$ ), tendo-se verificado que a inclusão do bioativo  $\omega$ 3 originou NLC com uma  $T_f = 59\text{ }^\circ\text{C}$  [172], garantindo assim que as nanopartículas são sólidas à temperatura ambiente e corporal.

As formulações lipossomais foram desenvolvidas no âmbito deste trabalho e não foram previamente analisadas quanto ao efeito da inclusão dos bioativos na temperatura de transição de fase ( $T_m$ ). Anteriormente verificou-se que a formulação DSPC:DOPE foi a que apresentou maior perturbação de tamanho por inclusão do bioativo  $\omega$ 3, provavelmente devido a uma perturbação do empacotamento lipídico (ver secção 4.3.1), tendo a inclusão do bioativo RSV levado a uma condensação dos sistemas e a um possível aumento da rigidez dos mesmos. Para confirmar esses efeitos do  $\omega$ 3 e RSV a temperatura de transição de fase lipídica foi analisada por DLS para as formulações lipossomais DSPC:DOPE: $\omega$ 3, na ausência e na presença de RSV. Na Figura 30 apresentam-se os perfis sigmóides obtidos por ajuste da Equação 11 aos dados experimentais através do *software* Origin 8.0<sup>®</sup>.



**Figura 30** - Representação gráfica dos perfis sigmóides da temperatura de transição de fase lipídica da formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3 na ausência e na presença de RSV. Os valores obtidos correspondem à média e respetivo desvio padrão de pelo menos três determinações.

Na Tabela seguinte apresenta-se um resumo dos parâmetros obtidos pelo ajuste matemático efetuado.

**Tabela 7** - Dados obtidos através de ajustes não lineares (recorrendo à Equação 11) das curvas de perfil sigmoide, em que B representa o valor de cooperatividade da transição de fase e  $T_m$  é a temperatura de transição de fase lipídica.

Formulação	B <sub>1</sub>	T <sub>m1</sub> (°C)	R <sup>2</sup>	B <sub>2</sub>	T <sub>m2</sub> (°C)	R <sup>2</sup>
<b>DSPC:DOPE:ω3</b>	223,77±21,73	30,14±0,14	0,99	1170,62±42,73	41,72±0,56	0,99
<b>DSPC:DOPE:ω3+RSV</b>	595,13±108,44	33,73±0,14	0,99	452,00±72,11	53,24±3,95	0,98

Teoricamente a formulação DSPC:DOPE (6:4) teria uma  $T_m$  de 26,6 °C ( $6 \times T_m(\text{DSPC}) + 4 \times T_m(\text{DOPE}) / (6+4)$ ) [173, 174]. Por observação da Tabela 7 e da Figura 30 é possível verificar que a adição de ω3 ao sistema provoca a existência de duas fases com dois valores de  $T_m$ . Uma das fases corresponde a domínios mistos dos lípidos DSPC:DOPE, sendo todavia mais rígida como se pode verificar pelo aumento da  $T_m$  para  $30,14 \pm 0,14$  °C. A outra fase (mais ordenada) provavelmente é rica em DSPC, mas que por inserção do ω3 encontra-se mais fluida como se pode verificar pelo abaixamento da  $T_m$  para  $41,72 \pm 0,56$  °C relativamente à  $T_m$  do DSPC puro (55 °C) [173, 174]. Assim, confirma-se as conclusões apresentadas na secção 4.3.1 e verifica-se que o ω3 tem um efeito perturbador do empacotamento lipídico, provocando um abaixamento da temperatura de transição e uma separação de fases acentuada, como se observa pelas diferenças dos valores de cooperatividade entre a fase rica em DSPC ( $B_2 = 1170,62 \pm 42,73$ ) e a fase correspondente à mistura de lípidos ( $B_1 = 223,77 \pm 21,73$ ). Normalmente, quando há só um tipo de lípidos numa bicamada lipídica ou quando todos os componentes da bicamada estão homogeneamente distribuídos, a transição de fase ocorre de um modo cooperativo, ou seja, quando é iniciado num ponto da bicamada lipídica propaga-se rapidamente a toda a bicamada [170, 171]. A perda de cooperatividade ocorre quando há uma mistura de lípidos não homogénea num sistema, ou quando na bicamada é inserido um outro componente (fármaco ou bioativo) que não se distribui de forma homogénea e que influencia mais uma região que outra. A diferença do valor da cooperatividade das duas fases comprova isso mesmo, que o ω3 influencia mais a fase rica em DSPC:DOPE do que a fase rica em DSPC, não se distribuindo homogeneamente.

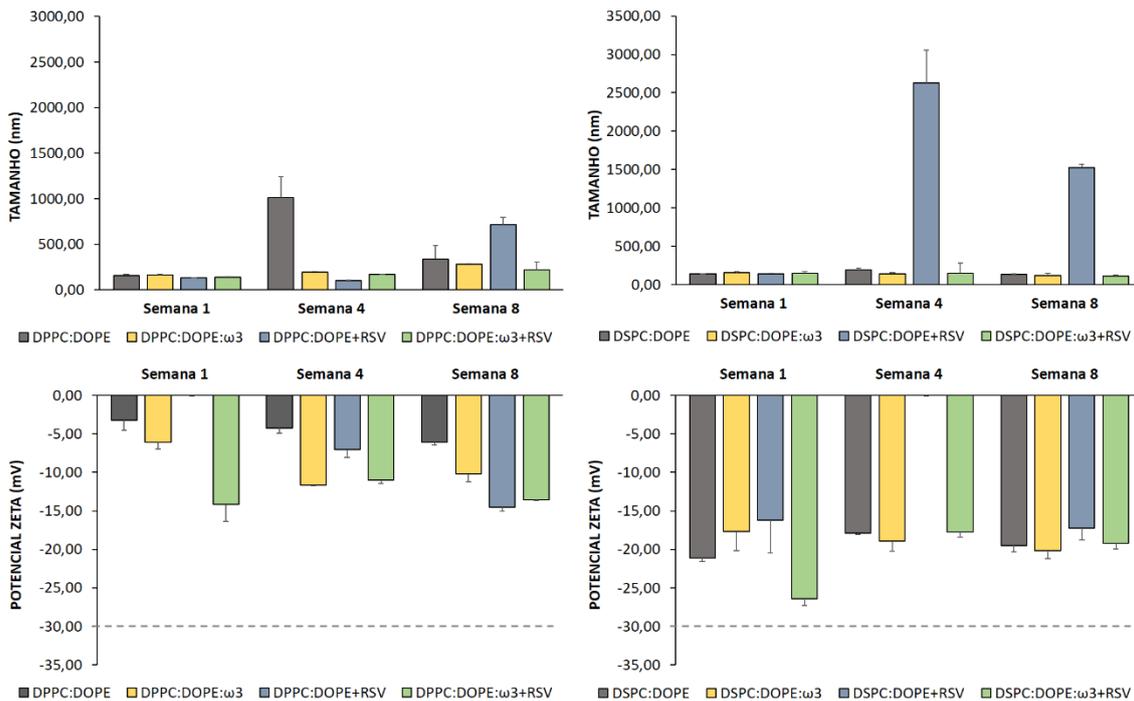
Quando o RSV é encapsulado na formulação, mantém-se a existência de duas fases lipídicas, mas ambas se apresentam mais ordenadas. De facto, a  $T_m$  da fase rica em DSPC:DOPE sobe para  $33,73 \pm 0,14$  °C, um valor mais elevado do que o teoricamente previsto para a mistura dos dois lípidos (26,6 °C). A  $T_m$  da fase rica em DSPC também sobe para  $53,24 \pm 3,95$  °C. Tal está de acordo com as conclusões apresentadas na secção 4.3.1 e com o efeito biofísico do RSV nas membranas lipídicas descrito na literatura [158]. A cooperatividade das duas fases apresenta valores próximos ( $595,13 \pm 108,44$  e  $452,00 \pm 72,11$ ), o que indica uma distribuição homogénea do RSV em ambas as fases e ainda a existência de uma distribuição equilibrada de domínios mais ordenados e domínios mais fluidos no sistema.

Como conclusão destes ensaios, podemos dizer que em termos biofísicos o sistema lipossomal DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV desenvolvido é muito interessante pois apresenta-se na fase gel ordenada à temperatura da pele (32 °C). Perante uma situação de aplicação sobre zonas psoriáticas inflamadas de temperaturas mais elevadas, o sistema poderá fazer a sua libertação de um modo faseado, pois apresenta domínios de DSPC:DOPE que irão transitar para a fase fluida, apresentando, no entanto, domínios mais ordenados ricos em DSPC que permitirão uma libertação mais lenta dos bioativos. Também para a permeação cutânea, as fases mais desordenadas poderão funcionar como “*edge activators*” (como o DOPE e o  $\omega$ 3) o que possibilita a formação de sistemas com maior flexibilidade e com maior penetração cutânea [162].

#### **4.3.5. Avaliação da estabilidade dos nanossistemas lipídicos durante o tempo de armazenamento**

De forma a avaliar a estabilidade dos nanossistemas lipídicos, estes foram armazenados durante 8 semanas no frigorífico a uma temperatura de 4 °C. As formulações foram analisadas às semanas 1, 4 e 8. Os resultados da estabilidade das formulações lipossomais e dos NLC estão apresentados nas Figuras 31 e 32, respetivamente.

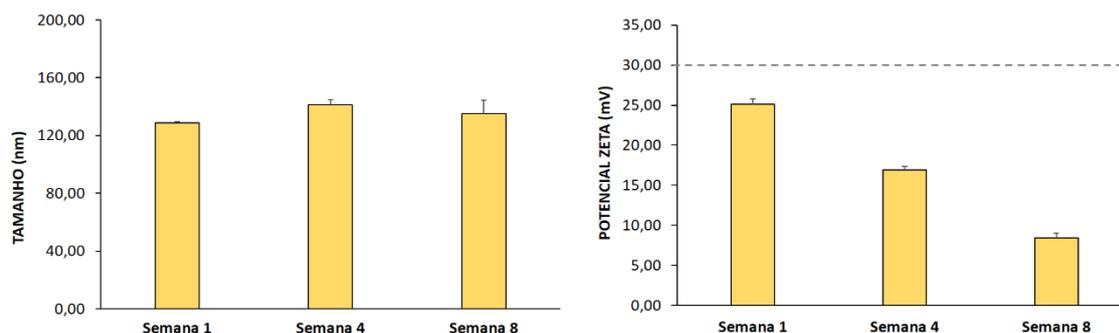
Durante as oito semanas não foram visíveis alterações macroscópicas nas preparações.



**Figura 31** – Tamanho e potencial zeta das formulações lipossomais DPPC:DOPE (esquerda) e DSPC:DOPE (direita) ao longo de 8 semanas. A tracejado assinala-se o valor de potencial zeta desejável para assegurar uma maior estabilidade. Os resultados correspondem a um valor médio  $\pm$ desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Observando a Figura 31 é possível verificar que as formulações mais instáveis foram as formulações de DPPC:DOPE e as formulações de DSPC:DOPE+RSV que apresentaram tamanhos muito elevados ( $\geq 500$  nm) a partir da 4<sup>a</sup> semana. A formulação DPPC:DOPE+RSV também apresentou tamanhos elevados ( $\geq 500$  nm) a partir da 8<sup>a</sup> semana. Relativamente ao potencial-zeta, verifica-se de um modo geral que as formulações com DSPC (Figura 31, direita) apresentam potencial zeta mais negativo que as formulações de DPPC (Figura 31, esquerda) o que é indicativo de uma maior estabilidade a longo prazo no armazenamento.

A Figura 32 permite constatar que ao longo das 8 semanas não ocorreram alterações significativas no tamanho médio da formulação PREC:ω3 (NLC), sendo este inferior a 150 nm, na primeira, na quarta e na oitava semana.



**Figura 32** – Tamanho (esquerda) e potencial zeta (direita) dos NLC (PREC:ω3) ao longo de 8 semanas. A tracejado assinala-se o valor de potencial zeta desejável para assegurar uma maior estabilidade. Os resultados correspondem a um valor médio  $\pm$ desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Relativamente ao potencial zeta, na primeira semana este foi superior a +20 mV, podendo concluir-se que nesta semana a formulação PREC:ω3 se encontrava estável. Ao longo das semanas seguintes, este valor diminui e, conseqüentemente, a estabilidade do sistema sofre também uma diminuição. No entanto, a presença do Tween<sup>®</sup> 80 na composição dos NLC poderá conferir alguma estabilidade ao sistema ao longo do tempo, uma vez que este agente tensoativo atua por estabilização estérica da interface (Figura 24) por adsorção das cadeias hidrofóbicas na superfície das partículas, o que faz com que as cabeças hidrofílicas fiquem voltadas para o meio aquoso. Assim, este agente tensoativo promove a atração da água à volta das partículas prevenindo a sua agregação, pela formação de uma barreira protetora [175, 176].

Na Tabela 8 apresentam-se também os valores de PDI analisados durante as 8 semanas de avaliação das condições de armazenamento.

**Tabela 8** - Valores do PDI das formulações ao longo de 8 semanas.

Formulação	PDI (Semana 1)	PDI (Semana 4)	PDI (Semana 8)
DPPC:DOPE	0,30	0,41	1,00
DPPC:DOPE:ω3	0,13	0,25	0,39
DPPC:DOPE+RSV	0,16	0,56	0,65
DPPC:DOPE:ω3+RSV	0,18	0,25	0,27
DSPC:DOPE	0,22	0,29	0,45
DSPC:DOPE:ω3	0,51	0,49	0,51
DSPC:DOPE+RSV	0,23	0,26	0,34
DSPC:DOPE:ω3+RSV	0,58	0,26	0,39
PREC: ω3	0,20	0,19	0,24

Tal como observado na Figura 31, as formulações DPPC:DOPE e DPPC:DOPE+RSV que apresentaram tamanhos muito elevados ( $\geq 500$  nm) ao fim das 8 semanas, também apresentam um PDI muito elevado, o que já não permite uma avaliação do tamanho com rigor pela técnica de DLS.

Na primeira semana, todas as formulações apresentaram valores de PDI  $\leq 0,3$ , à exceção das formulações DSPC:DOPE:ω3 e DSPC:DOPE:ω3+RSV, que apresentaram valores superiores a 0,5. Já foi explicado anteriormente motivos possíveis para esta polidispersão e que têm a ver com as alterações de empacotamento lipídico provocadas pelo ω3. Também foi explicado anteriormente o efeito benéfico do RSV a moderar as alterações biofísicas impostas pelo ω3 e este efeito ordenador reflete-se no abaixamento do PDI para os sistemas DSPC:DOPE:ω3+RSV para valores de 0,39 na 8ª semana. Assim, com o tempo o RSV encapsulado ajuda à reorganização lipídica originando formulações menos polidispersas.

A formulação PREC: ω3 (NLC) manteve um PDI baixo durante as 8 semanas de avaliação (PDI  $\leq 0,24$ ).

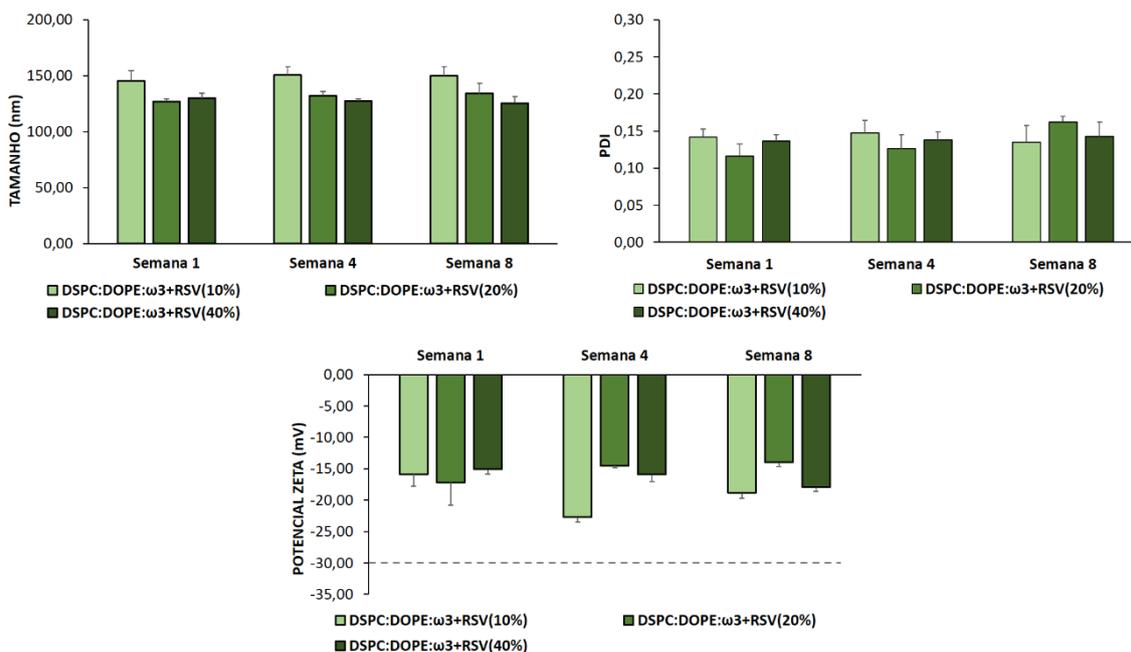
Resumindo todas as características aqui apresentadas, as formulações escolhidas para realizar os estudos de performance terapêutica foram os lipossomas DSPC:DOPE:ω3+RSV, porque apresentaram ao fim de 8 semanas um potencial zeta aceitável ( $\approx -20$  mV), um tamanho adequado à administração cutânea tópica ( $< 200$  nm), um PDI aceitável, dada a aplicação terapêutica (0,39)

e características biofísicas interessantes com domínios mais ordenados e domínios menos ordenados. Também os NLC serão testados relativamente à sua performance terapêutica uma vez que ao fim de 8 semanas apresentam: potencial zeta positivo e estabilização estérica não dependente da carga de superfície, tamanho adequado à administração terapêutica (< 150 nm) e um PDI de 0,24.

#### **4.3.6. Avaliação da estabilidade acelerada dos nanossistemas lipídicos durante o tempo de armazenamento**

A avaliação da estabilidade acelerada consiste em estudar a estabilidade dos nanossistemas em condições de armazenamento que imponham algum stress às formulações, para perceber o seu comportamento em situações não tão controladas.

Esta avaliação foi realizada para a formulação DSPC:DOPE:ω3 com diferentes concentrações de RSV: 10%, 20% e 40%, que constituiu a formulação lipossomal selecionada como a de maior interesse para aplicação pretendida. As formulações foram submetidas a uma centrifugação, armazenadas à temperatura ambiente e analisadas durante 8 semanas. Os resultados do tamanho médio e do potencial zeta estão representados na Figura 33.



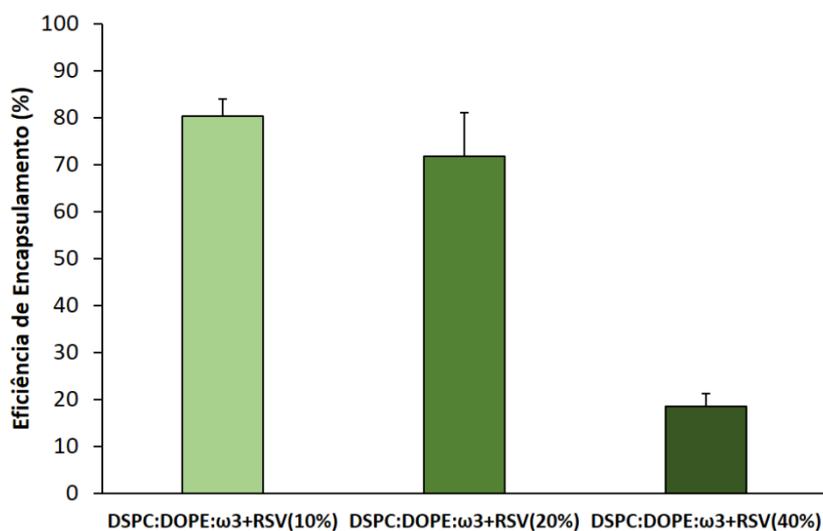
**Figura 33** – Tamanho (em cima, lado esquerdo), PDI (em cima, lado direito) e potencial zeta (em baixo) das formulações DSPC:DOPE:ω3+RSV(10%) (verde claro), DSPC:DOPE:ω3+RSV(20%) (verde escuro) e DSPC:DOPE:ω3+RSV(40%) (verde mais escuro) armazenadas à temperatura ambiente ao longo de 8 semanas. A tracejado assinala-se o valor de potencial zeta desejável para assegurar uma maior estabilidade. Os resultados correspondem a um valor médio  $\pm$ desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Todas as formulações sofreram um aumento mínimo do seu tamanho médio, durante as 8 semanas. No entanto, pode-se afirmar que se mantiveram relativamente estáveis, uma vez que o seu PDI não sofreu grandes alterações, mantendo-se inferior a 0,3. Por outro lado, os dados relativos ao potencial zeta, embora não se mostrem desde o início ideais (idealmente deveriam ser  $>$ -30 mV), não apresentam uma variação significativa entre a 1ª e a 8ª semana, apresentando valores negativos entre os -15 e os -20 mV. A estabilidade das formulações em condições tão extremas de stress, prova mais uma vez que o RSV tem um efeito ordenador no empacotamento lipídico na formulação DSPC:DOPE:ω3, tal como já havia sido verificado pela determinação da  $T_m$  destes sistemas.

#### 4.4. Ensaio de performance terapêutica

#### 4.4.1. Eficiência de encapsulamento

Foi avaliada a eficiência de encapsulamento para três concentrações de RSV nas formulações lipossomais (DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(10%); DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(20%) e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(40%)), de forma a determinar qual o limite máximo de encapsulamento destes nanossistemas lipídicos. Após o procedimento de encapsulamento do RSV nas formulações procedeu-se à separação das fases lipídica e aquosa. Posto isto, o RSV não encapsulado presente na fase aquosa, foi doseado espectrofotometricamente possibilitando calcular a percentagem de encapsulamento de RSV na formulação, como descrito em 3.6.1. (Figura 34).



**Figura 34** – Eficiência de encapsulamento do RSV, alcançada para as formulações DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(10%); DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(20%) e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(40%). Os resultados correspondem a um valor médio  $\pm$ desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Apesar da formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(10%) apresentar uma eficiência de encapsulamento superior relativamente à formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(20%), esta diferença é de apenas 8,55%. Por outro lado, para uma mesma concentração de formulação, a formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(20%) tem o dobro da quantidade de RSV do que a formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(10%). Deste modo, e por apresentar uma quantidade superior de RSV encapsulado, a formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(20%) foi a formulação selecionada para a realização dos ensaios posteriores.

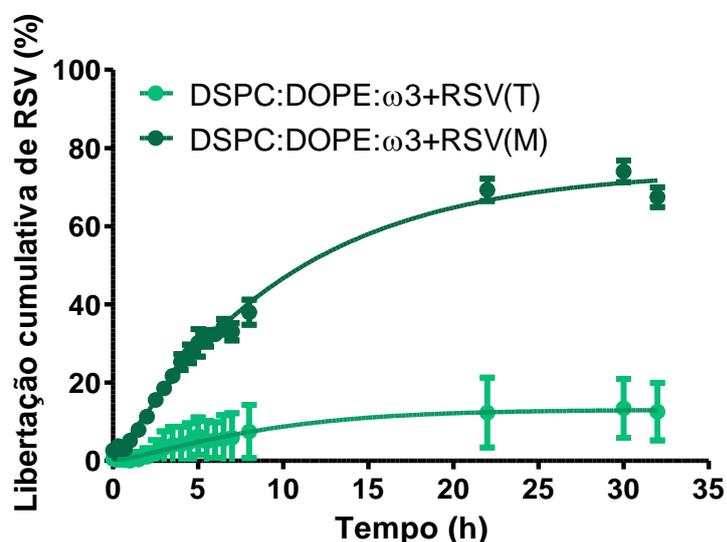
A eficiência de encapsulamento para a formulação selecionada, DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(20%), assim como para a formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV(10%) é superior a 70% (71,76  $\pm$  9,23 (%) e 80,31  $\pm$  3,59 (%), respetivamente). Estes resultados são muito idênticos

aos resultados obtidos por Jøraholmen et al. e por Caddeo et al., que alcançaram eficiências de encapsulamento elevadas,  $80\pm 4\%$  e  $73,1\pm 3,3\%$ , respetivamente [95, 96].

#### 4.4.2. Estudos de libertação do resveratrol em condições *in vitro*

O estudo de libertação de RSV das formulações lipossomais foi realizado usando um sistema de membranas de diálise imerso em dois meios de dissolução: (i) solução tampão (T) de  $\text{pH} \approx 5,5$  (mimética do  $\text{pH}$  cutâneo e de zonas inflamadas como as lesões psoriáticas); (ii) suspensão micelar (M) de  $\text{pH} \approx 5,5$  (mimética não só do  $\text{pH}$  cutâneo mas também do filme hidrolipídico existente ao nível cutâneo). O meio de dissolução foi mantido a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , usando um banho de circulação de água para fornecer às formulações a ensaiar uma temperatura de  $32\text{ }^\circ\text{C}$  por dissipação de calor.

Através da recolha ao longo de 32 h de aliquotas de cada um dos meios de dissolução, foi medida pelo método de doseamento espectrofotométrico (detalhado na secção 3.2) a quantidade de RSV libertada das formulações que passou através da membrana de diálise. Os resultados, apresentados sob a forma de percentagem cumulativa de RSV libertado (face à quantidade inicial de bioativo), estão representados na Figura 35.



**Figura 35** – Percentagem de libertação cumulativa de RSV da formulação DSPC:DOPE:ω3 em tampão (T) ou meio micelar (M), ambos a  $\text{pH} \approx 5,5$ , em função do tempo (32 horas). As linhas representam o melhor ajuste cinético obtido de acordo com o modelo de Weibull.

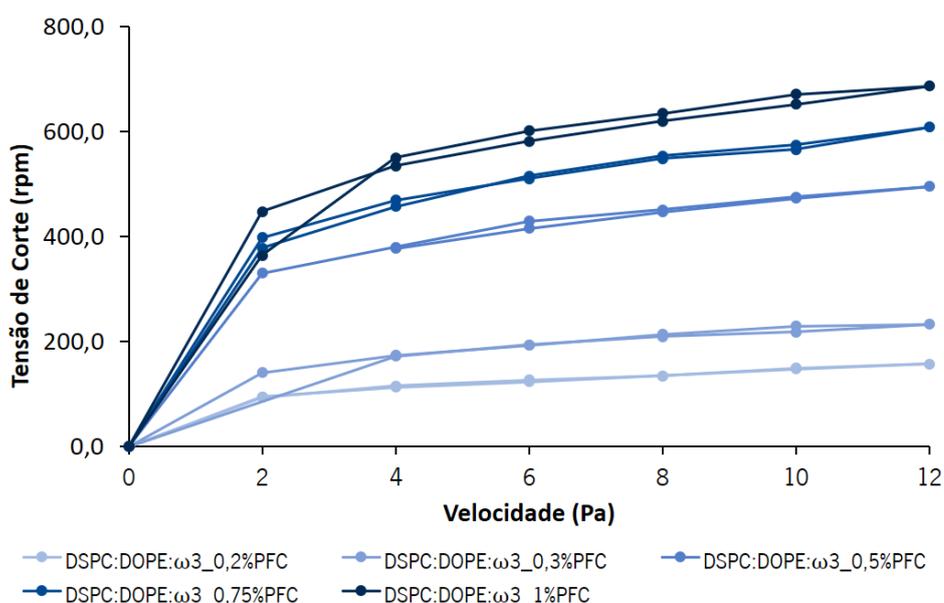
Os perfis de libertação obtidos foram submetidos a um ajuste com diferentes modelos matemáticos, a fim de melhor entender o mecanismo de libertação do bioativo [177]. Os valores

obtidos após a aplicação dos modelos matemáticos são apresentados no Anexo 3. Através do valor do coeficiente de determinação,  $R^2$  ajustado, calculado tendo em conta o número de parâmetros a ajustar em cada modelo, o número de dados e o  $R^2$  de cada determinação, é possível avaliar a qualidade do ajuste, uma vez que é tão melhor quanto mais próximo de 1 [177]. Desta forma, é possível afirmar que o modelo Weibull apresenta a melhor função de regressão.

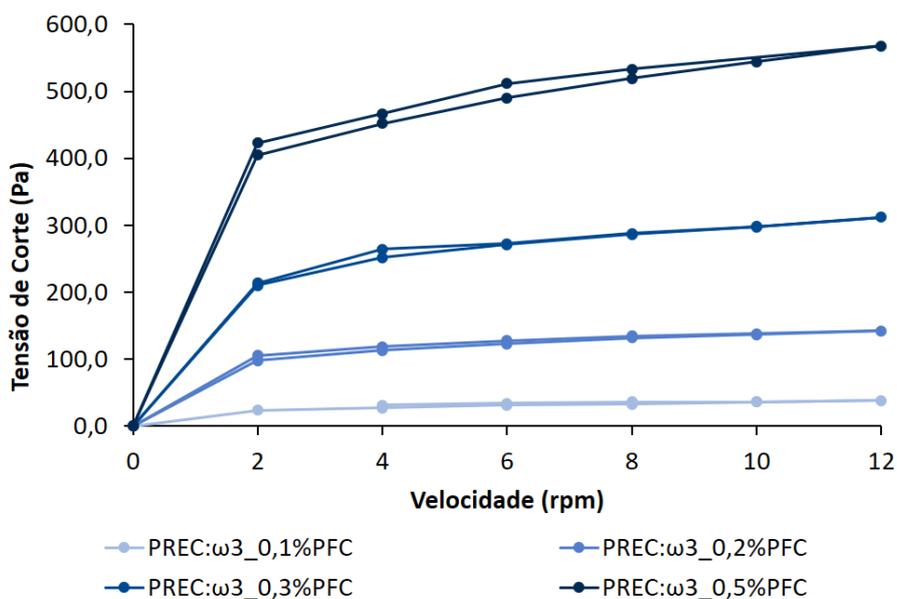
Analisando a Figura 35, é possível verificar que ocorre uma maior libertação de RSV quando o meio de dissolução da formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV é a suspensão micelar (74,03 % de libertação ao fim de 30 horas), comparativamente à percentagem de libertação da mesma formulação quando em solução tampão (13,42 % de libertação ao fim de 30 horas). Como previsto na secção 4.2.1.2., o RSV revelou ser um composto com lipofilicidade moderada a elevada ( $\text{LogP}=3,4$ ), o que pode explicar a sua afinidade para o meio micelar.

#### 4.4.3. Análise reológica das formulações incorporadas em base semissólida

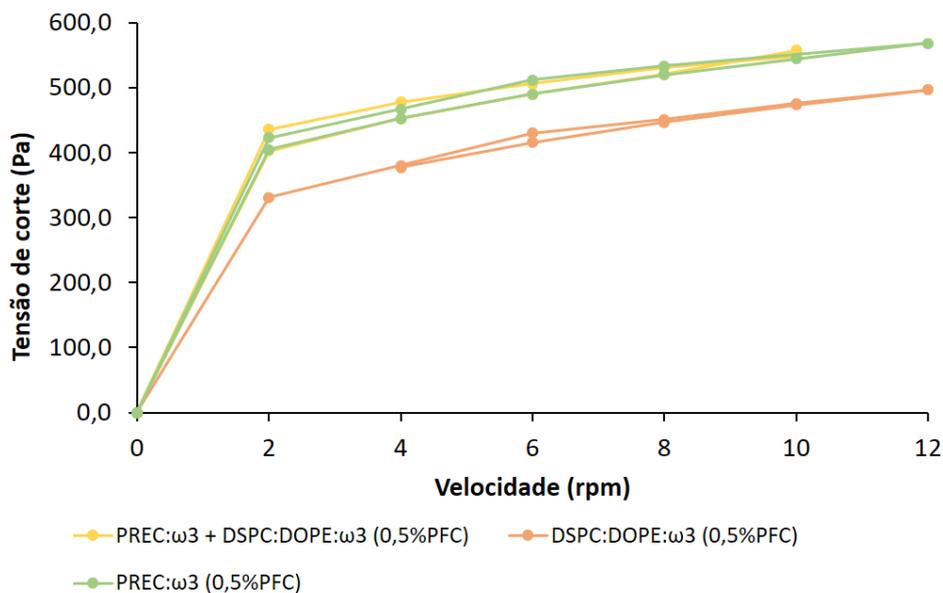
Foi realizada a análise reológica das formulações incorporadas em bases semissólidas (hidrogéis) com diferentes concentrações do gelificante PFC. As formulações incorporadas nas bases semissólidas foram: a formulação lipossomal DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV, a formulação NLC (PREC: $\omega$ 3) e ainda foram incorporadas na mesma base semissólida uma mistura destas duas formulações. Os resultados da análise reológica são apresentados nas Figuras 36, 37 e 38.



**Figura 36** - Reograma das bases semissólidas com a formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV e com concentrações de gelificante PCF crescentes (0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,75 % e 1 %).



**Figura 37** – Reograma das bases semissólidas com a formulação NLC (PREC ω3) e com concentrações de gelificante PCF crescentes (0,1 %, 0,2 %, 0,3 % e 0,5 %).



**Figura 38** – Comparação entre o reograma da base semissólida (0,5% de PFC) que contém a mistura das formulações NLC (PREC ω3) e lipossomais de DSPC:DOPE:ω3+RSV e os reogramas de cada uma das bases semissólidas com as formulações NLC e as bases semissólidas com as formulações lipossomais.

Com o aumento da velocidade de corte a estrutura de rede do gel sofre uma quebra, levando a uma diminuição gradual da viscosidade [178]. Nos reogramas é possível observar esta 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 estas bases semissólidas não apresentam tixotropia, ou seja, não ocorre uma variação da viscosidade com o tempo, uma vez que as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas são praticamente sobrepostas e sem a histerese característica do comportamento tixotrópico [137].

Para a administração tópica das bases semissólidas com fins terapêuticos, o comportamento pseudoplástico é interessante, favorecendo a aplicação da base enquanto o doente faz movimentos de espalhamento do produto, uma vez que durante estes movimentos a sua viscosidade diminui e quando os movimentos cessam, a viscosidade retoma os seus valores iniciais [137, 179].

Comparando os reogramas das bases semissólidas das Figuras 36 e 37, verificou-se que a tensão de corte necessária para que o hidrogel se torne mais fluido, é superior quando é aumentada a concentração do gelificante PFC. Por outro lado, comparando os reogramas da Figura 38, verificou-se que, quando se realizou a mistura das duas formulações na base semissólida, esta adotou um comportamento idêntico à base semissólida contendo apenas a formulação NLC.

#### **4.4.4. Ensaio de permeação das formulações**

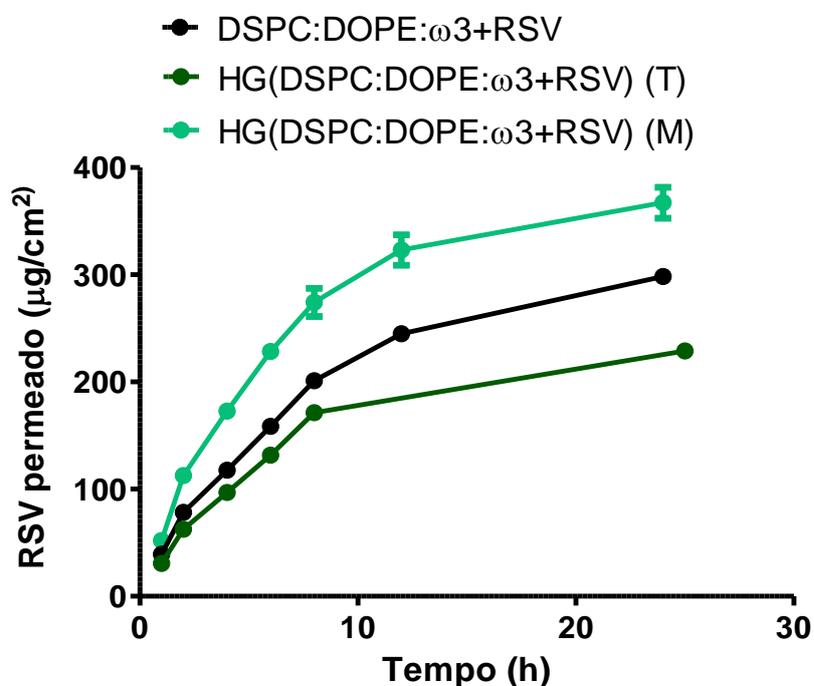
A permeabilidade cutânea e a absorção percutânea de fármacos e/ou compostos bioativos têm sido alvo de vários estudos para aplicação por via transdérmica [132].

Um dos objetivos do presente trabalho é a administração tópica cutânea para uma ação local, anti-inflamatória e anti-oxidante do RSV, ao nível das lesões psoriáticas, não sendo um requisito essencial que haja uma administração transdérmica. No entanto, uma vez que os processos inflamatórios da patogénese da psoríase envolvem estruturas cutâneas da epiderme, mas também de regiões mais profundas e vascularizadas da derme, torna-se importante perceber se a formulação desenvolvida tem capacidade de permeação cutânea.

Deste modo, a avaliação da permeação de formulações lipossomais contendo RSV (DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV), foi feita pelo doseamento do RSV difundido através da membrana de PSO em células Franz. Uma vez que as formulações serão administradas incorporadas numa base semissólida, também foi estudada DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV incorporada num hidrogel. A membrana de PSO apresenta propriedades, como rigidez, elevada resistência mecânica, elevada estabilidade térmica e resistência à oxidação que fazem com que seja muito utilizada em estudos de difusão

[180]. Esta membrana apresenta-se ainda quimicamente como mimética do ambiente lipídico cutâneo sendo por isso utilizada neste trabalho para avaliar a permeação das formulações contendo RSV.

Na Figura 39, está representado o perfil de difusão do RSV através da membrana de PSO.



**Figura 39** - Perfis de permeação *in vitro* do RSV a partir das formulações DSPC:DOPE:ω3+RSV ou de formulações incorporadas na base semissólida (HG), num meio micelar (M) ou em tampão (T).

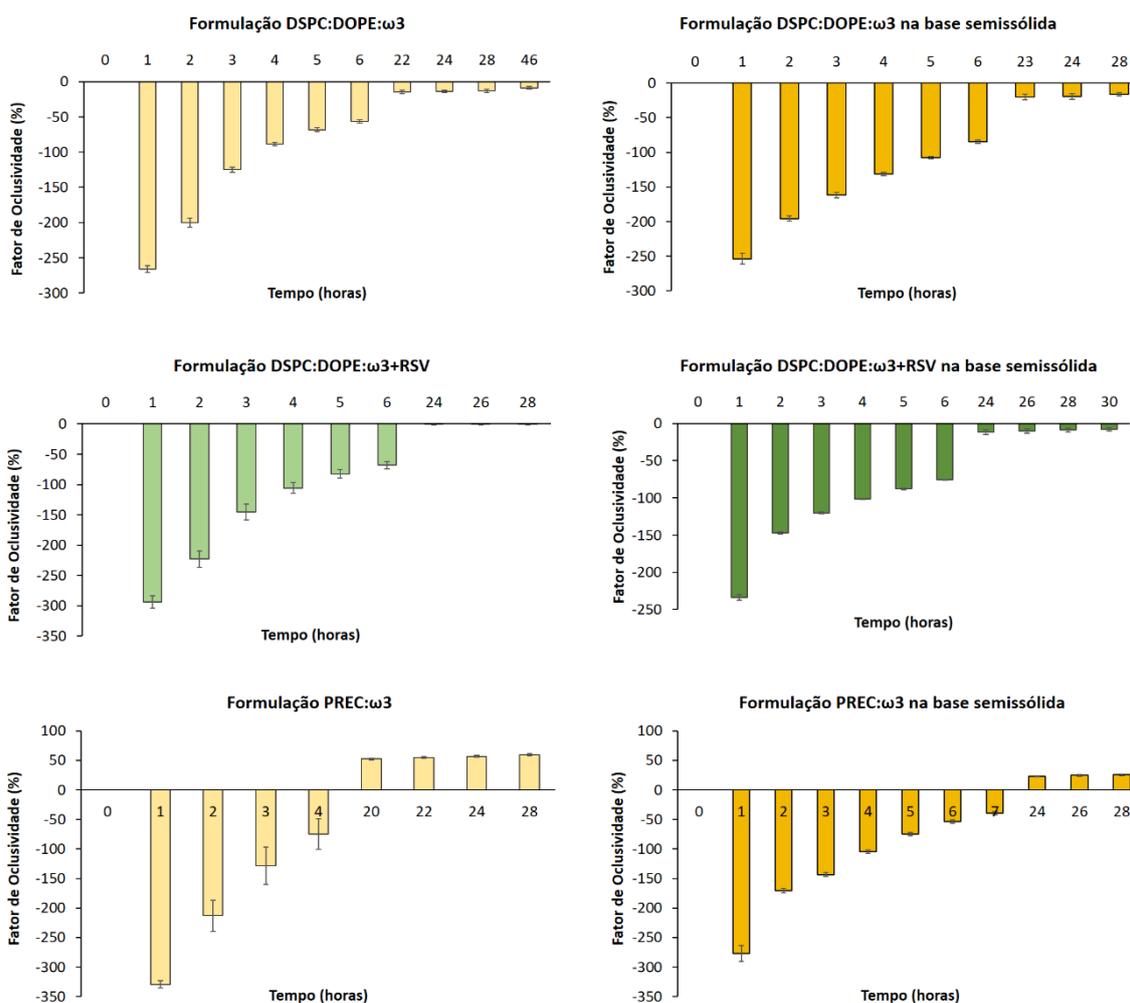
Como se pode ver pela Figura 39, a quantidade de RSV permeada é maior a partir da formulação incluída no HG e num meio micelar a pH 5.5. A diferença da permeação do RSV nos dois meios utilizados (micelar, M e tampão, T) pode ser justificada pelo facto de o meio micelar mimetizar o ambiente hidrolipídico do local de aplicação e permitir uma melhor difusão do RSV no meio e, conseqüentemente, uma permeação mais rápida do RSV. A partir da zona linear inicial dos perfis de permeação é possível calcular o fluxo de difusão através da membrana segundo a primeira lei de Fick da difusão ( $J_{ss} = C_0 \times P$ ). Esse fluxo de difusão foi de 29,36 µg/cm²/h, 17,73 µg/cm²/h ou 28,97 µg/cm²/h para respetivamente o ensaio da formulação não veiculada no gel; ensaio da formulação veiculada no HG em tampão e ensaio da formulação veiculada no HG em micelas. Sabendo estes valores de fluxo é possível determinar a permeabilidade do RSV através da membrana de difusão:  $0,03306 \pm 0,0077$ ;  $0,020257 \pm 0,000383$  cm/h e  $0,03389 \pm$

0,001054 cm/h para respetivamente o ensaio da formulação não veiculada no gel; ensaio da formulação veiculada no HG em tampão e ensaio da formulação veiculada no HG em micelas.

O valor teórico da permeabilidade do RSV foi calculado como sendo 0,0210 cm/h, assim a formulação HG(DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV) em meio micelar tem a capacidade de aumentar a permeabilidade do RSV para 0,3389 cm/h e a formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV tem a capacidade de melhorar a permeabilidade do RSV para 0,0330 cm/h.

#### **4.4.5. Avaliação da oclusividade**

Para avaliar o efeito oclusivo das formulações, comparou-se a capacidade das formulações DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV e NLC (PREC:  $\omega$ 3) reterem a água num recipiente por oclusão dos poros de um filtro colocado sobre a abertura do recipiente. Também foi avaliada a capacidade de oclusão do filtro pelas bases semissólidas contendo as mesmas formulações. A capacidade de retenção de água no recipiente foi determinada por pesagem rigorosa ao longo do tempo, sendo que a redução do peso foi interpretada como perda de água através do filtro. Como controlo avaliou-se a percentagem da perda de água através de um filtro sem formulação. Na Figura 40 representam-se os valores do fator de oclusividade (F) calculado para as formulações, como descrito em 3.6.6., em função do tempo.



**Figura 40** – Representação da média das réplicas do fator de oclusividade (%) em função do tempo de todas as formulações testadas. Representação do fator de oclusividade (%) em função do tempo de todas as formulações testadas. Os valores correspondem à média e desvio padrão das determinações para 3 réplicas.

É possível observar que tanto na formulação DSPC:DOPE:ω3 como na formulação DSPC:DOPE:ω3+RSV, não se verificou qualquer efeito oclusivo. Nas primeiras horas do ensaio ocorre a evaporação de água presente na formulação, o que explica as percentagens extremamente negativas nessas horas iniciais, ou seja, a massa dos sistemas contendo formulação baixa mais comparativamente ao controlo. Após esta evaporação, ambas as formulações apresentam valores de oclusividade próximos de 0% (acima dos -20%), não atingindo valores positivos até ao final do ensaio. O mesmo se observa quando as formulações são incorporadas na base semissólida. Posto isto, verifica-se que nenhuma das formulações tem efeito oclusivo, o que não facilita a sua penetração na pele [181]. Contudo, este resultado que não seria

tão favorável na aplicação tópica numa pele saudável, não é desanimador sabendo que se pretende uma aplicação em pele lesada (psoríase) que é mais permeável [182].

Analisando o gráfico relativo à formulação NLC, observa-se que nas primeiras quatro horas do ensaio não existe um efeito oclusivo, devido à evaporação da fase aquosa dos NLC. No entanto, após vinte horas de ensaio, o fator de oclusividade foi superior a 50 %.

Quando a formulação NLC é incorporada na base semissólida, não há efeito oclusivo até às primeiras sete horas do ensaio e após as vinte e quatro horas o fator de oclusividade foi apenas superior a 20 %. Isto deve-se também à menor concentração de NLC por unidade de área de filtro que existe quando a formulação é dispersa numa base semissólida e colocada sob o filtro, comparativamente, à concentração existente quando a formulação é colocada diretamente sob o mesmo. Ainda assim os NLC apresentam efeito oclusivo, o que parece sublinhar o interesse de uma base semissólida contendo ambas as formulações (NLC e lipossomas).

#### **4.4.6. Efeito anti-inflamatório dos bioativos resveratrol e ómega 3**

O efeito anti-inflamatório de compostos bioativos pode ocorrer por vários mecanismos. Por exemplo, a ação inibitória destes compostos na atividade enzimática das enzimas responsáveis pelo processo inflamatório (e.g. cicloxigenase, ou COX) terá um impacto na redução da produção de importantes mediadores químicos da inflamação (tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas).

Assim, foi avaliado o efeito inibitório da COX-1 pelo RSV livre ou encapsulado na formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3; pela própria formulação DSPC:DOPE: $\omega$ 3 e pela formulação PREC: $\omega$ 3. Este efeito foi comparado com o efeito de um inibidor da COX-1 (SC-560). A capacidade inibitória foi doseada através da quantidade de resorufina, cuja produção só ocorre perante a atividade da enzima COX-1. Assim, se não existe inibição da COX-1, grande quantidade de resorufina é produzida e pode ser doseada pela emissão de fluorescência ao  $\lambda$  de 585 nm. Se as formulações e/ou compostos testados apresentam capacidade inibitória da COX-1, isso resulta numa menor quantidade de resorufina produzida.

Primeiramente procedeu-se à definição de um método de doseamento da resorufina, preparando com rigor uma série de soluções padrão deste composto e medindo o seu espectro de emissão de fluorescência de 550 a 700 nm após excitação aos 535 nm (Figura 41).

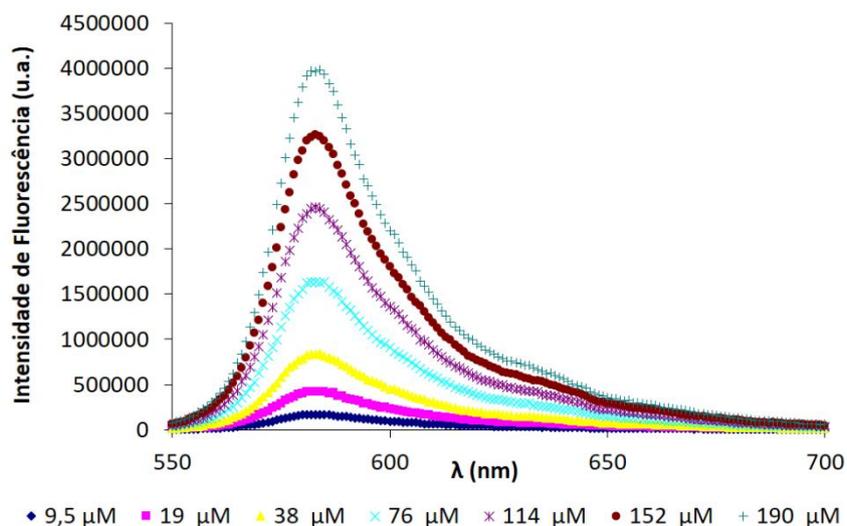


Figura 41– Espectros de emissão das soluções padrão de resorufina.

A partir dos valores máximos de emissão de fluorescência ao  $\lambda$  de 585 nm traçou-se uma curva de calibração, que relaciona a intensidade de fluorescência emitida (y) com a concentração de resorufina (M) através da relação linear ( $R^2 = 0,9996$ ) (Figura 42).

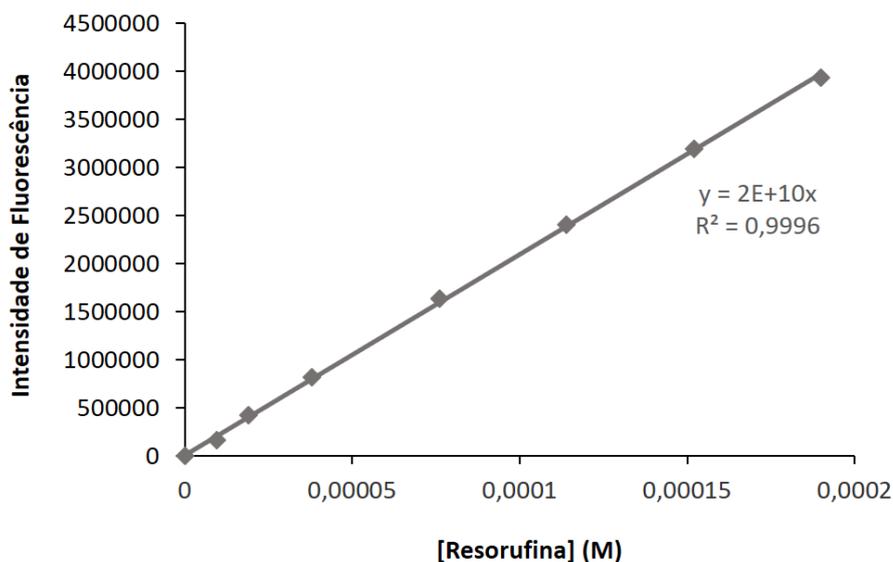
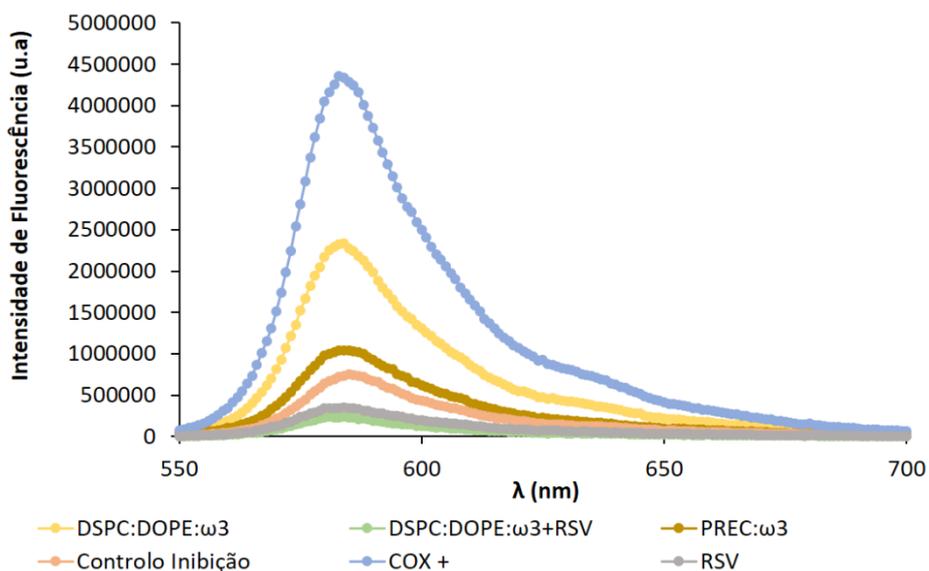


Figura 42 – Curva de calibração da resorufina ao comprimento de onda máximo de 585 nm.

De seguida avaliou-se a emissão de fluorescência de cada uma das amostras a testar perante uma reação de inflamação desencadeada pela adição de ácido araquidónico e COX-1, acompanhada pela produção de resorufina. Os controlos utilizados foram: (i) COX +, amostra reacional sem a adição de qualquer inibidor ou amostra e que portanto corresponde à quantidade máxima possível de resorufina produzida (100 % de atividade inflamatória); (ii) Controlo inibição,

composto SC-560 com capacidade inibitória reconhecida da COX-1; (iii) Background, amostra de referência que continha todos os reagentes das demais amostras à exceção da COX, para providenciar uma subtração de emissão residual pelos reagentes.

Os espectros de emissão de cada uma das amostras e controles (i) e (ii) testados, após subtração do background, apresentam-se na Figura 43.



**Figura 43** - Espectros de emissão das amostras a testar atividade anti-inflamatória. RSV representa o composto livre, Cox + representa o máximo de atividade inflamatória e controle inibição representa um inibidor da COX-1.

A partir dos valores máximos de emissão de fluorescência ao  $\lambda$  de 585 nm (1ª coluna da Tabela 9) e tendo em conta a relação anteriormente obtida entre intensidade de emissão de fluorescência e concentração de resorufina, foi possível dosear a resorufina produzida em cada caso (2ª coluna da Tabela 9) e relacionar a quantidade de resorufina produzida com o efeito anti-inflamatório obtido (3ª coluna da Tabela 9).

**Tabela 9** - Avaliação do efeito anti-inflamatório através da quantidade de resorufina produzida.

	Intensidade de fluorescência ( $\lambda=584$ nm)	[Resorufina] M	Efeito anti-inflamatório (%)
DSPC:DOPE: $\omega$ 3	2330206,36	0,00011651	46,24
DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV	233544,36	1,16772E-05	94,61
PREC: $\omega$ 3	1040561,86	5,20281E-05	75,99
Inibidor	728390,98	3,64195E-05	83,19
COX +	4334223,86	0,000216711	0,00
RSV	353590,48	1,76795E-05	91,84

Pela análise da tabela verifica-se que o RSV livre apresenta um efeito anti-inflamatório superior ao do inibidor usado como controlo. O RSV encapsulado apresenta um efeito superior em cerca de 3 % que pode ser devido à presença de  $\omega 3$ , uma vez que a formulação sem RSV e contendo  $\omega 3$  apresenta um efeito anti-inflamatório de 46 %. A confirmação do efeito anti-inflamatório do  $\omega 3$  foi dada pelo facto de as formulações NLC apresentarem também um efeito anti-inflamatório de cerca de 75 % (note-se que as diferenças de efeito do  $\omega 3$  presente nas NLC e lipossomas, poderá ser apenas devida ao facto de nas NLC a concentração de  $\omega 3$  ser maior).

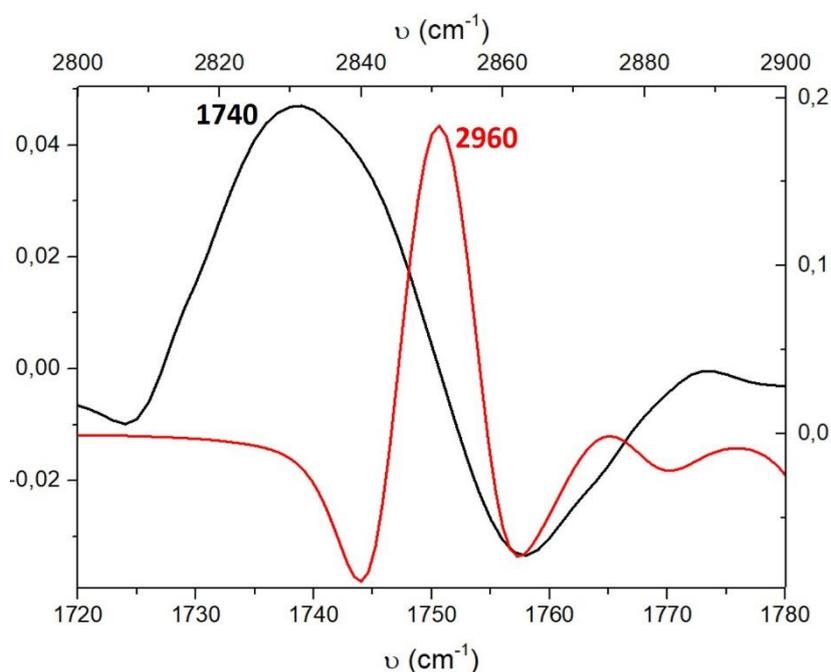
Perante uma ferida ou um agente externo, uma maior produção de óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*) aumenta a resposta inflamatória [183]. Assim, a inibição da produção de NO será um outro indicador de uma ação anti-inflamatória do fármaco e/ou composto bioativo. Testes preliminares celulares (em macrófagos de ratinho) realizados por investigadores do CEBIMED/FP-ENAS, no âmbito de uma colaboração com este trabalho, permitiram concluir que o  $\omega 3$  adicionado à formulação DSPC:DOPE apresenta um efeito inibitório na produção de NO, o que demonstra o seu potencial de ação anti-inflamatória. Nestes mesmos ensaios a adição do RSV não parece ter tido qualquer ação anti-inflamatória adicional que já não exista na formulação com  $\omega 3$ . Uma vez que a ação anti-inflamatória do RSV se encontra bem documentada na literatura [72], é possível que o mecanismo anti-inflamatório do RSV passe preferencialmente pela inibição da síntese de prostaglandinas, e não interfira na produção de NO.

Em suma, através destes resultados de inibição da COX-1 *in vitro* e dos testes celulares preliminares efetuados, é possível concluir que as formulações desenvolvidas apresentam uma perspectiva promissora na administração em lesões de patologias de cariz inflamatório como a psoríase.

#### **4.4.7. Efeito antioxidante do resveratrol e do ómega-3**

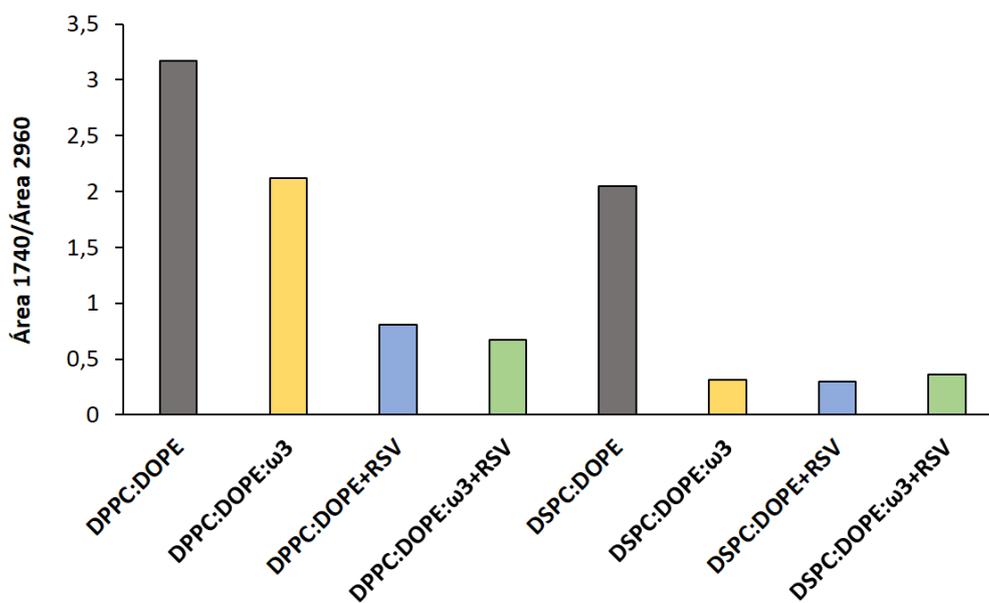
A peroxidação lipídica está associada à formação de peróxidos como produtos primários que são divididos em produtos secundários com cadeias de hidrocarbonetos mais curtas. A espectroscopia de FTIR permite uma observação direta do aparecimento ou desaparecimento de bandas que vêm de vibrações distintas de grupos lipídicos funcionais, cujas mudanças indicam uma formação de produtos de oxidação primária [184, 185]. Uma dessas bandas é a vibração de estiramento do grupo C = O. O aumento da  $\nu$  (C = O) é resultado do processo de peroxidação.

Uma vez que os espectros de ATR-FTIR analisados (ver secção 4.3.3.) não proporcionam uma análise quantitativa que permita correlacionar a área de uma única banda com a quantidade de produtos de oxidação produzidos, selecionamos para análise uma razão de áreas de duas bandas:  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  a  $2960\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a  $1740\text{ cm}^{-1}$  [184, 185]. Assim, procedeu-se inicialmente ao traçado de espectros de segunda derivada (Figura 44), uma vez que o seu uso foi relatado anteriormente como sendo útil para resolver as bandas cuja integração foi utilizada para o cálculo das proporções de sinais IR das duas bandas diferentes (Área 1740/Área 2960) [185]. Quanto menor a razão Área 1740/Área 2960 menor quantidade de peróxidos, ou seja, menor peroxidação do sistema lipídico [184, 185].



**Figura 44** - 2ª derivada dos espectros ATR-FTIR das formulações lipídicas representando as bandas  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  a  $2960\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a  $1740\text{ cm}^{-1}$  para cálculo da razão das suas áreas: Área 1740/Área 2960.

Na Figura seguinte (Figura 45) apresentam-se representados os valores obtidos de Área 1740/Área 2960 para cada uma das formulações desenvolvidas.



**Figura 45** - Área 1740/Área 2960 para cada uma das formulações lipossomais desenvolvidas. As amarelo estão as formulações que contêm apenas óleos de peixe ricos em ácidos gordos ómega 3 ( $\omega 3$ ); a azul estão as formulações que contêm apenas RSV; e a verde estão as formulações que contêm simultaneamente RSV e  $\omega 3$ . As cinzas são formulações placebo sem RSV e sem  $\omega 3$ .

Por análise da Figura 45 é possível concluir que as formulações com maior capacidade antioxidante foram as formulações contendo simultaneamente RSV e  $\omega 3$ , embora as formulações com  $\omega 3$  também apresentassem atividade antioxidante relativamente às formulações placebo.



## **Capítulo 5**

---

### Conclusões e perspectivas futuras



Com a realização deste trabalho foi possível desenvolver e caracterizar formulações lipossomais contendo  $\omega 3$  e RSV e NLC com  $\omega 3$ . O desenvolvimento destas formulações teve como objetivo a veiculação dos compostos bioativos ( $\omega 3$  e RSV) e posterior incorporação das mesmas numa base semissólida, com a finalidade de uma terapêutica tópica cutânea para lesões psoriáticas.

Para um desenvolvimento racional das formulações, foi necessário realizar estudos de pré-formulação, analisando as características físico-químicas do RSV. Para tal, uma análise *in silico* permitiu conhecer a ionização ao pH fisiológico de interesse (pH cutâneo) para a aplicação tópica, a lipofilicidade (moderada a elevada), a solubilidade (baixa) e ainda a capacidade para a permeação cutânea da molécula de RSV. Assim, a partir destes descritores moleculares e segundo o sistema de classificação biofarmacêutica, foi possível colocar o RSV na classe 2, a qual indica que são necessárias estratégias, como a veiculação em nanossistemas lipídicos para melhorar as taxas de dissolução do fármaco. De forma a complementar estas informações teóricas, foram realizados testes *in vitro*, como a solubilidade lipídica e a determinação do coeficiente de distribuição, que comprovaram que a encapsulação do RSV em nanossistemas lipídicos, nomeadamente os lipossomas, seria a mais vantajosa e viável. Uma vez que a solubilidade lipídica não permitiu selecionar nenhum dos lípidos testados para a preparação de NLC contendo RSV encapsulado, as formulações de NLC foram selecionadas apenas para a inclusão do outro composto bioativo (ácidos gordos ómega 3 presentes no óleo de peixe).

Com base no conhecimento adquirido através dos ensaios de pré-formulação, foram preparadas oito formulações lipossomais (DPPC:DOPE, DPPC:DOPE: $\omega 3$ , DPPC:DOPE: $\omega 3$ +RSV, DSPC:DOPE, DSPC:DOPE: $\omega 3$  e DSPC:DOPE: $\omega 3$ +RSV) e uma formulação NLC (PREC: $\omega 3$ ). Estas formulações foram sujeitas a vários estudos de caracterização. Relativamente ao tamanho médio e ao PDI, quer os lipossomas quer os NLC apresentaram valores aceitáveis, tendo em conta que a aplicação pretendida para estes nanossistemas lipídicos é uma aplicação tópica cutânea, em pele psoriática que se encontra lesada, inflamada e mais permeável. Quanto ao potencial zeta, todas as formulações apresentaram valores inferiores a  $\pm 30$  mV permitindo prever uma instabilidade dos nanossistemas lipídicos, a qual não sendo ideal num contexto de armazenamento, se torna benéfica para a penetração cutânea, uma vez que são os sistemas deformáveis os mais aptos para transpor as barreiras do estrato córneo.

Foi efetuada uma análise de ATR-FTIR para as formulações lipossomais com e sem o encapsulamento dos compostos bioativos, que permitiu provar o estabelecimento de pontes de

hidrogénio entre o RSV e as cabeças polares dos fosfolípidos dos lipossomas e a interação eletrostática estabelecida com  $\omega_3$ , comprovando assim a interação dos compostos bioativos com os lipossomas. De forma a avaliar o efeito do  $\omega_3$  e do RSV nas propriedades biofísicas dos lipossomas, foram realizados ensaios por DLS para a determinação da  $T_m$  dos sistemas. Estes ensaios permitiram concluir que o sistema lipossomal DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV desenvolvido é o mais interessante em termos biofísicos, uma vez que se apresenta na fase gel ordenada à temperatura da pele (32 °C) e que a sua libertação poderá ocorrer de forma faseada, o que permite uma libertação mais lenta e uma penetração cutânea maior do RSV.

Todas as formulações desenvolvidas foram armazenadas à temperatura de 4 °C e a sua estabilidade ao longo de 8 semanas foi avaliada, sendo que a formulação DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV foi a selecionada para a realização dos estudos de performance terapêutica, pois apresentaram um potencial zeta aceitável ( $\approx -20$  mV), um tamanho adequado à administração cutânea tópica ( $< 200$  nm), um PDI aceitável, dada a aplicação terapêutica (0,39) e características biofísicas interessantes com domínios mais ordenados e domínios menos ordenados. Assim como os lipossomas, também os NLC foram selecionados para testes de performance terapêutica, uma vez que contêm na sua composição o bioativo  $\omega_3$  e possuem ainda propriedades oclusivas que podem ser facilitadoras da permeação cutânea. Para a formulação lipossomal selecionada (DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV) foi ainda realizada a avaliação da estabilidade acelerada a diferentes concentrações de RSV (10 %, 20 %, 30 %), a qual revelou mais uma vez o efeito ordenador no empacotamento lipídico na formulação DSPC:DOPE: $\omega_3$ . As formulações DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV(10%) e DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV(20%) apresentaram eficiências de encapsulamento idênticas, no entanto, a formulação DSPC:DOPE: $\omega_3$ +RSV(20%) foi a selecionada para os restantes ensaios de performance terapêutica, pois apresenta o dobro da concentração de RSV.

Como as formulações deverão ter uma consistência adequada à administração, também se procedeu à sua inclusão numa base semissólida (hidrogel) avaliando-se o seu perfil reológico. Este apresenta um comportamento pseudoplástico interessante no contexto de uma administração tópica, já que favorece a aplicação da base enquanto o doente faz movimentos de espalhamento do produto (viscosidade diminui) e quando os movimentos cessam, a viscosidade retoma os seus valores iniciais. Comparando os reogramas das bases semissólidas verificou-se que, quando se realizou a mistura das duas formulações na base semissólida, esta adotou um comportamento idêntico à base semissólida contendo apenas a formulação NLC.

Em suma desenvolveram-se duas nanoformulações distintas contendo dois bioativos, que podem ainda ser veiculadas no mesmo hidrogel. Os primeiros passos no desenvolvimento e caracterização das formulações foram dados, contudo como perspectivas futuras podem ser efetuados outros métodos de caracterização importantes, tais como: calorimetria diferencial de varrimento para confirmar os resultados de determinação da  $T_m$  e para avaliar a cristalinidade das formulações: microscopia electrónica de varrimento com unidade criogénica, para avaliar a morfologia e confirmar os tamanhos das nanoformulações desenvolvidas. As nanoformulações deveriam também ser testadas em linhas celulares da pele, para avaliar a sua biocompatibilidade. Finalmente, seria importante terminar os estudos preliminares em macrófagos com a avaliação do carácter anti-inflamatório e anti-imunogénico das formulações. Relativamente aos hidrogéis, para além de avaliar a sua reologia, seria interessante fazer estudos de texturização, estudos de avaliação do potencial irritativo e ainda estudos de biometria cutânea.



## **Referências bibliográficas**

---



1. Simopoulos, A.P., *Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases*. Journal of the American College of Nutrition, 2002. **21**(6): p. 495-505.
2. Pelliccia, M.T., Giannella, A., and Giannella, J., *Resveratrol for the treatment of exfoliative eczema, acne or psoriasis*, E.P. Office, Editor. 2001. p. 5.
3. Graedon, T. *Should You Take Biotin and Resveratrol for Your Skin?* 2016 [cited 2018 December]; Available from: <https://www.peoplespharmacy.com/2016/06/20/should-you-take-biotin-and-resveratrol-for-your-skin/#respond>.
4. Javadzadeh, Y. and Azharshekoufeh Bahari, L., *Chapter 8 - Therapeutic Nanostructures for Dermal and Transdermal Drug Delivery*, in *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems*, A.M. Grumezescu, Editor. 2017, Elsevier. p. 131-146.
5. Hua, S., *Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives*. Frontiers in Pharmacology, 2015. **6**(219).
6. Vinardell, M.P. and Mitjans, M., *Nanocarriers for Delivery of Antioxidants on the Skin*. Cosmetics, 2015. **2**(4): p. 342-354.
7. Goyal, A.K., et al., *Development and characterization of effective topical liposomal system for localized treatment of cutaneous candidiasis AU - Gupta, Madhu*. Journal of Liposome Research, 2010. **20**(4): p. 341-350.
8. Mendes, A.I., et al., *Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **111**: p. 755-763.
9. Tichota, D.M., et al., *Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 3855-3864.
10. Gong, C., et al., *A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing*. Biomaterials, 2013. **34**(27): p. 6377-6387.
11. *Autoimmune Diseases*. 2016 [cited 2018 August]; Available from: [https://www.niams.nih.gov/health\\_info/Autoimmune/default.asp](https://www.niams.nih.gov/health_info/Autoimmune/default.asp).
12. Schmidt, E. and Zillikens, D., *The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Blistering Skin Diseases*. Deutsches Ärzteblatt International, 2011. **108**(23): p. 399-405.
13. *Inflammation*. [cited 2018 August]; Available from: [https://www.dermamedics.com/inflammation\\_id55.html](https://www.dermamedics.com/inflammation_id55.html).
14. D. A. Rodrigues, et al., *Doenças inflamatórias*, in *Atlas de dermatologia em povos indígenas*. 2010, Editora Fap-Unifesp. p. 109-128.
15. Mitra, A. and Wu, Y., *Topical delivery for the treatment of psoriasis*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2010. **7**(8): p. 977-992.
16. Grumezescu, A.M., *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications*. 2018: Elsevier Science. 690.
17. Weigle, N. and McBane, S., *Psoriasis*. American Family Physician, 2013. **87**: p. 626-633.
18. Mahfoozur, R., et al., *Classical to Current Approach for Treatment of Psoriasis: A Review*. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets, 2012. **12**(3): p. 287-302.
19. . Psoríase. Vol. #2. outubro 2018, Associação Portuguesa da Psoríase.
20. Gaspari, A.A., *Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2006. **54**(3, Supplement 2): p. S67-S80.
21. Parisi, R., et al., *Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence*. Journal of Investigative Dermatology, 2013. **133**(2): p. 377-385.
22. Festugato, M., *Estudo piloto sobre alimentos que devem ser evitados nos portadores de psoríase*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2011. **86**: p. 1103-1108.

23. Martins, G.A. and Arruda, L., *Tratamento sistêmico da psoríase - Parte I: metotrexato e acitretina*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2004. **79**: p. 263-278.
24. Naldi, L. and Griffiths, C.E.M., *Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis: an assessment of the benefits and risks*. British Journal of Dermatology, 2005. **152**(4): p. 597-615.
25. Zeichner, J.A., et al., *Optimizing topical therapies for treating psoriasis: a consensus conference*. Cutis, 2010. **86**(3 Suppl): p. 5-31; quiz 32.
26. Lebwohl, M., Ting, P.T., and Koo, J.Y.M., *Psoriasis treatment: traditional therapy*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2005. **64**(suppl 2): p. ii83-ii86.
27. Uva, L., et al., *Mechanisms of Action of Topical Corticosteroids in Psoriasis*. International Journal of Endocrinology, 2012. **2012**: p. 16.
28. Barrea, L., et al., *Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2017. **18**(2): p. 195-205.
29. Weischer, M., et al., *No Evidence for Increased Skin Cancer Risk in Psoriasis Patients Treated with Broadband or Narrowband UVB Phototherapy: A First Retrospective Study*. Vol. 84. 2004. 370-374.
30. Dothard, E.H., et al., *Home ultraviolet light therapy for psoriasis: Why patients choose other options*. Dermatology Online Journal, 2015. **21**(21(2)).
31. Zanolli, M., *Phototherapy treatment of psoriasis today*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2003. **49**(2, Supplement): p. 78-86.
32. Farahnik, B., et al., *The Patient's Guide to Psoriasis Treatment. Part 2: PUVA Phototherapy*. Dermatology and Therapy, 2016. **6**(3): p. 315-324.
33. Vangipuram, R. and Feldman, S., *Ultraviolet phototherapy for cutaneous diseases: a concise review*. Oral Diseases, 2016. **22**(4): p. 253-259.
34. Menter, A., et al., *Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2009. **61**(3): p. 451-485.
35. Sue Lee, C. and Koo, J., *A review of acitretin, a systemic retinoid for the treatment of psoriasis*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2005. **6**(10): p. 1725-1734.
36. Puig, L., et al., *Spanish Evidence-Based Guidelines on the Treatment of Psoriasis With Biologic Agents, 2013. Part 1: On Efficacy and Choice of Treatment*. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition), 2013. **104**(8): p. 694-709.
37. Karasulu, H.Y., Gundogdu, E., and Baspinar, Y., *Biological Treatment of Psoriasis*. 2013: Clinical Medicine Insights: Dermatology.
38. D'Haens, G., *Risks and benefits of biologic therapy for inflammatory bowel diseases*. Gut, 2007. **56**(5): p. 725-732.
39. *Moderate to Severe Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Biologic Drugs*. [cited 2018 November]; Available from: <https://www.psoriasis.org/about-psoriasis/treatments/biologics>.
40. Cencic, A. and Chingwaru, W., *The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health*. Nutrients, 2010. **2**(6): p. 611-625.
41. Gul, K., Singh, A.K., and Jabeen, R., *Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016. **56**(16): p. 2617-2627.
42. Zeisel, S.H., *Regulation of "Nutraceuticals"*. Science, 1999. **285**(5435): p. 1853-1855.
43. *Policy Paper - Nutraceuticals/Functional Foods and Health Claims On Foods*. [cited 2018 August]; Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food->

- nutrition/food-labelling/health-claims/nutraceuticals-functional-foods-health-claims-foods-policy-paper.html.
44. Shahidi, F., *Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods*. Trends in Food Science & Technology, 2009. **20**(9): p. 376-387.
  45. Vannice, G. and Rasmussen, H., *Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Dietary Fatty Acids for Healthy Adults*. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2014. **114**(1): p. 136-153.
  46. Rustan, A.C. and Drevon, C.A., *Fatty Acids: Structures and Properties*, in *eLS*. 2005.
  47. Yaqoob, P., *Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications*. Proceedings of the Nutrition Society, 2007. **63**(1): p. 89-105.
  48. 2017 [cited 2018 August]; Available from: <http://www.umm.edu/health/medical/altmed/supplement/omega3-fatty-acids>.
  49. Innes, J.K. and Calder, P.C., *Omega-6 fatty acids and inflammation*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2018. **132**: p. 41-48.
  50. Delgado, G.E., et al., *Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality—The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study*. Journal of Clinical Lipidology, 2017. **11**(1): p. 126-135.
  51. Tvrzicka, E., et al., *Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions*. Vol. 155. 2011. 117-130.
  52. Teixeira, M.I.d.A.F., *Vetores lipídicos contendo ácidos gordos naturais*. 2016, Universidade Fernando Pessoa.
  53. Fetterman, J.W. and Zdanowicz, M.M., *Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease*. American Journal of Health-System Pharmacy, 2009. **66**(13): p. 1169-1179.
  54. Calder, P.C., *Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids*. The Journal of Nutrition, 2012. **142**(3): p. 592S-599S.
  55. Marina Yazigi Solis, Cid Yazigi Sabbag, and Frangella, V.S., *Evidence of the impact of nutrition in psoriasis*. Revista da Associação Brasileira de Nutrição, 2013. **5**: p. 41-51.
  56. Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S., and Moustaid-Moussa, N., *Chapter 13 - Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, S.-K. Kim, Editor. 2012, Academic Press. p. 211-222.
  57. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 197-202.
  58. Mori, T.A. and Beilin, L.J., *Omega-3 fatty acids and inflammation*. Current Atherosclerosis Reports, 2004. **6**(6): p. 461-467.
  59. Balbás, G.M., Regaña, M.S., and Millet, P.U., *Study on the use of omega-3 fatty acids as a therapeutic supplement in treatment of psoriasis*. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 2011. **4**: p. 73-77.
  60. Calder, P.C., *n-3 Fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions*. Proceedings of the Nutrition Society, 2013. **72**(3): p. 326-336.
  61. Modh Hanif Zulfakar, Michael Edwards, and Heard, C.M., *Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis?* European Journal of Dermatology, 2007. **17**(4): p. 284-291.
  62. Mahfoozur, R., et al., *Omega – 3 Fatty Acids as Pharmacotherapeutics in Psoriasis: Current Status and Scope of Nanomedicine in its Effective Delivery*. Current Drug Targets, 2013. **14**(6): p. 708-722.

63. Serhan, C.N., et al., *Novel Functional Sets of Lipid-Derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2–Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(8): p. 1197-1204.
64. Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E., *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**: p. 349-361.
65. Schwab, J.M., et al., *Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes*. Nature, 2007. **447**: p. 869-874.
66. Vassiliou, E.K., et al., *Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Generated in the Presence of Resolvin E1 Induce Apoptosis of Activated CD4+ T Cells*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(7): p. 4534-4544.
67. Taneja, A. and Singh, H., *Challenges for the Delivery of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Functional Foods*. Annual Review of Food Science and Technology, 2012. **3**(1): p. 105-123.
68. Rahman, M., et al., *Beneficial Effect of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids in Psoriasis*, in *Omega-3 Fatty Acids: Keys to Nutritional Health*, M.V. Hegde, A.A. Zanwar, and S.P. Adekar, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 531-540.
69. Das, S., et al., *The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(11): p. 2593-2600.
70. Neves, A.R., et al., *Effects of resveratrol on the structure and fluidity of lipid bilayers: A membrane biophysical study*. The Royal Society of Chemistry, 2016. **12**: p. 2118-2126.
71. Kapetanovic, I.M., et al., *Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2011. **68**(3): p. 593-601.
72. Neves, A.R., et al., *Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions*. Current Medicinal Chemistry, 2012. **19**(11): p. 1663-1681.
73. Docherty, J.J., et al., *Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice*. Antiviral Research, 2004. **61**(1): p. 19-26.
74. Cottart, C.-H., et al., *Resveratrol bioavailability and toxicity in humans*. Molecular Nutrition & Food Research, 2010. **54**(1): p. 7-16.
75. Signorelli, P. and Ghidoni, R., *Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005. **16**(8): p. 449-466.
76. Udenigwe, C.C., et al., *Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy*. Nutrition Reviews, 2008. **66**(8): p. 445-454.
77. Nabavi, S.M., et al., *Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review*. Nutritional Neuroscience, 2017. **20**(3): p. 180-194.
78. Donnelly, L.E., et al., *Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004. **287**(4): p. L774-L783.
79. Verdin, E., *NAD+ in aging, metabolism, and neurodegeneration*. Science, 2015. **350**: p. 1208-1213.
80. Lee, J.-H., et al., *Resveratrol induces human keratinocyte damage via the activation of class III histone deacetylase, Sirt1*. Oncology Reports, 2016. **35**(1): p. 524-529.

81. Wu, Z., et al., *Resveratrol inhibition of human keratinocyte proliferation via SIRT1/ARNT/ERK dependent downregulation of aquaporin 3*. Journal of Dermatological Science, 2014. **75**(1): p. 16-23.
82. Souto, E.B., Doktorovova, S., and Boonme, P., *Lipid-based colloidal systems (nanoparticles, microemulsions) for drug delivery to the skin: materials and end-product formulations*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2011. **21**(1): p. 43-54.
83. Pierre, M.B.R. and dos Santos Miranda Costa, I., *Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications*. Archives of Dermatological Research, 2011. **303**(9): p. 607-621.
84. Antonio, J.R., et al., *Nanotechnology in Dermatology*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2014. **89**(1): p. 126-136.
85. Gupta, M., Agrawal, U., and Vyas, S.P., *Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2012. **9**(7): p. 783-804.
86. Tamjidi, F., et al., *Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013. **19**: p. 29-43.
87. Müller, R.H., Radtke, M., and Wissing, S.A., *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. S131-S155.
88. Müller, R.H., et al., *Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 522-530.
89. Shah, K.A., et al., *Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **345**(1): p. 163-171.
90. Wissing, S.A., Kayser, O., and Müller, R.H., *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(9): p. 1257-1272.
91. Soares, T.B., et al., *Lipid nanocarriers loaded with natural compounds: Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases?* Progress in Neurobiology, 2018. **168**: p. 21-41.
92. Pardeike, J., Hommoss, A., and Müller, R.H., *Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **366**(1): p. 170-184.
93. Ghorbanzade, T., et al., *Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt*. Food Chemistry, 2017. **216**: p. 146-152.
94. Skibinski, C.G., et al., *A novel biologically active acid stable liposomal formulation of docosahexaenoic acid in human breast cancer cell lines*. Chemico-Biological Interactions, 2016. **252**: p. 1-8.
95. Jøraholmen, M.W., et al., *Resveratrol-loaded liposomes for topical treatment of the vaginal inflammation and infections*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **79**: p. 112-121.
96. Caddeo, C., et al., *Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **363**(1): p. 183-191.
97. Averina, E., S., et al., *Physical and chemical stability of nanostructured lipid drug carriers (NLC) based on natural lipids from Baikal region (Siberia, Russia)*. Vol. 66. 2011. 348-356.
98. Muchow, M., et al., *Omega-3 fatty acids-loaded lipid nanoparticles for patient-convenient oral bioavailability enhancement*. Vol. 64. 2009. 499-504.

99. Gokce, E.H., et al., *Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: p. 1841-1850.
100. Neves, A.R., et al., *Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability*. International Journal of Nanomedicine, 2013. **8**: p. 177-187.
101. Trotta, M., et al., *Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **270**(1): p. 119-125.
102. Agarwal, R., et al., *A randomized, double-blind, vehicle-controlled study of a novel liposomal dithranol formulation in psoriasis AU - Saraswat, Abir*. Journal of Dermatological Treatment, 2007. **18**(1): p. 40-45.
103. Harde, H., et al., *Solid lipid nanoparticles-loaded topical gel containing combination drugs: an approach to offset psoriasis AU - Sonawane, Rahul*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2014. **11**(12): p. 1833-1847.
104. Agrawal, Y., Petkar, K.C., and Sawant, K.K., *Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **401**(1): p. 93-102.
105. Pinto, M.F., et al., *A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **477**(1): p. 519-526.
106. Douglas A. Skoog, F. James Holler, and Crouch, S.R., *Principles of instrumental analysis*. Seventh Edition ed.
107. *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) 1994, 2005: p. 17.
108. Rajendra Patil, et al., *Review on Analytical Method Development and Validation*. . Journal of Pharmaceutical Analysis 2014. **3**(3): p. 10.
109. Diksha Rajput, Vaishnav Rajat, and Goyal, A., *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*. International Journal of Pharmaceutical Erudition, 2013. **3**(1): p. 31-40.
110. Hou, T. and Wang, J., *Structure – ADME relationship: still a long way to go?* Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2008. **4**(6): p. 759-770.
111. Kerns, E.H. and Di, L., *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. 2008.
112. Castro, B., et al., *A Fast and reliable spectroscopic method for the determination of membrane-water partition coefficients of organic compounds*. Lipids, 2001. **36**(1): p. 89-96.
113. Rodrigues, C., et al., *Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L-alpha-phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes*. Biophysical Chemistry, 2001. **94**: p. 97-106.
114. Balon, K., Riebesehl, B.U., and Müller, B.W., *Determination of liposome partitioning of ionizable drugs by titration*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **88**(8): p. 802-806.
115. Magalhães, L.M., et al., *High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients*. Nature Protocols, 2010. **5**: p. 1823-1830.
116. Hänggi, E., et al., *Functional Analysis of the Extracellular Cysteine Residues in the Human Organic Anion Transporting Polypeptide, OATP2B1*. Molecular Pharmacology, 2006. **70**(3): p. 806-817.
117. Aleandri, S., et al., *Dynamic Light Scattering of Biopharmaceutics—Can Analytical Performance Be Enhanced by Laser Power?* Pharmaceutics, 2018. **10**(3): p. 94.

118. Arzenšek, D., *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. 2010.
119. Narayanan, T., *Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering*, in *Soft Matter Characterization*, R. Borsali and R. Pecora, Editors. 2008, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 899-952.
120. Pusey, P.N., *Dynamic light scattering by non-ergodic media*. Macromolecular Symposia, 1994. **79**(1): p. 17-30.
121. Duncan, B., Dermot, H., and Richard, W., *Multi Length-Scale Characterisation*. 2014.
122. Das, S. and Chaudhury, A., *Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery*. AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(1): p. 62-76.
123. Pathak, P. and Nagarsenker, M., *Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery*. AAPS PharmSciTech, 2009. **10**(3): p. 985-992.
124. Verma, D.D., et al., *Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003. **55**(3): p. 271-277.
125. Verma, D.D., et al., *Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **258**(1): p. 141-151.
126. *Malvern instruments: Zetasizer Nano Series User Manual*. 2004: Malvern Instruments Ltd.
127. Heurtault, B., et al., *Physico-chemical stability of colloidal lipid particles*. Biomaterials, 2003. **24**(23): p. 4283-4300.
128. Wu, L., Zhang, J., and Watanabe, W., *Physical and chemical stability of drug nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(6): p. 456-469.
129. Rodrigues, A.L.F., *Bicalutamida: um contributo para a investigação do processo de cristalização e de co-cristalização*. 2016, Universidade de Coimbra.
130. Sharma, A. and Sharma, U.S., *Liposomes in drug delivery: Progress and limitations*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **154**(2): p. 123-140.
131. OECD/OCDE, *Skin Absorption: in vitro Method*. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2004. **428**: p. 1-8.
132. Allen, L.V., Popovich, N.G., and Ansel, H.C., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. Vol. 9. 1989.
133. Loew, S., Fahr, A., and May, S., *Modeling the Release Kinetics of Poorly Water-Soluble Drug Molecules from Liposomal Nanocarriers*. Journal of Drug Delivery, 2011. **2011**: p. 10.
134. Schroeder, A., et al., *Controlling Liposomal Drug Release with Low Frequency Ultrasound: Mechanism and Feasibility*. Langmuir, 2007. **23**(7): p. 4019-4025.
135. Babinová, M., et al., *AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy*. Bioelectrochemistry, 2002. **55**(1): p. 17-19.
136. LAHOUD, M.H. and CAMPOS, R., *THEORETICAL ASPECTS RELATED TO PHARMACEUTICAL RHEOLOGY*. Visão Académica, 2010. **11**: p. 65-73.
137. Lee, C.H., Moturi, V., and Lee, Y., *Thixotropic property in pharmaceutical formulations*. Journal of Controlled Release, 2009. **136**(2): p. 88-98.
138. Nágila Maluf Corrêa, et al., *Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2005. **41**: p. 73-78.
139. Nugteren, D.H. and Hazelhof, E., *Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1973. **326**(3): p. 448-461.

140. Hamberg, M. and Samuelsson, B., *Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. **70**(3): p. 899-903.
141. Xie, W.L., et al., *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(7): p. 2692-2696.
142. Blobaum, A.L. and Marnett, L.J., *Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**(7): p. 1425-1441.
143. Pharmaceutical Research, 2007. **25**(4).
144. The AAPS Journal, 2014. **16**(4).
145. Simões, A., et al., *A Tutorial for Developing a Topical Cream Formulation Based on the Quality by Design Approach*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **107**(10): p. 2653-2662.
146. H. Kerns, E. and Di, L., *Drug-Like Properties: Concept, Structure Design and Methods, From ADME to Toxicity Optimization*. Vol. 136. 2008.
147. Kerns, E.H., *High throughput physicochemical profiling for drug discovery*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **90**(11): p. 1838-1858.
148. Alex, A., *Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State)*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001. **1**(4): p. 277-351.
149. López-Nicolás, J.M. and García-Carmona, F., *Aggregation State and pKa Values of (E)-Resveratrol As Determined by Fluorescence Spectroscopy and UV-Visible Absorption*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(17): p. 7600-7605.
150. Spogli, R., et al., *Solid Dispersion of Resveratrol Supported on Magnesium Dihydroxide (Resv@MDH) Microparticles Improves Oral Bioavailability*. Nutrients, 2018. **10**(12): p. 1925.
151. Van de Waterbeemd, H., et al., *Estimation of Blood-Brain Barrier Crossing of Drugs Using Molecular Size and Shape, and H-Bonding Descriptors*. Vol. 6. 1998. 151-65.
152. Peng, R.-M., et al., *Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: Resveratrol and pterostilbene*. BioFactors, 2018. **44**(1): p. 5-15.
153. X Yu, L., *Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control*, in *Pharmaceutical Research*. 2008. p. 781-91.
154. Hadgraft, J., *Skin deep*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**(2): p. 291-299.
155. Uchechi, O., Ogbonna, J.D.N., and Attama, A.A., *Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery*, in *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. 2014. p. 193-235.
156. Luis, M.M., et al., *High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients*. Nature Protocols, 2010. **5**(11): p. 1823-1830.
157. Fernandes, E., et al., *Spectroscopic Studies as a Toolbox for Biophysical and Chemical Characterization of Lipid-Based Nanotherapeutics*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**(323).
158. Neves, A.R., Nunes, C., and Reis, S., *Resveratrol induces ordered domains formation in biomembranes: Implication for its pleiotropic action*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2016. **1858**(1): p. 12-18.
159. Kobayashi, H., Watanabe, R., and Choyke, P.L., *Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target?* Theranostics, 2013. **4**(1): p. 81-89.
160. De Leeuw, J., et al., *Liposomes in dermatology today*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2009. **23**(5): p. 505-516.

161. Hamblin, M.R., Avci, P., and Prow, T.W., *Nanoscience in Dermatology*, ed. M.R. Hamblin, P. Avci, and T.W. Prow. 2016, Boston: Academic Press. xi-xii.
162. El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C., and Barry, B.W., *Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **276**(1): p. 143-161.
163. Mishra, P.R., et al., *Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **371**(1): p. 182-189.
164. Tucker, I.M., et al., *Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2015. **20**(4): p. 215-226.
165. Uskoković, V., *Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations*. Journal of dispersion science and technology, 2012. **33**(12): p. 1762-1786.
166. Benson, H.A.E., et al., *Formulation effects on topical nanoparticle penetration*. 2016, UK Academic Press. p. 115-126.
167. Blume, A., *Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1996. **1**(1): p. 64-77.
168. Schmid, M., et al., *A combined FTIR and DSC study on the bilayer-stabilising effect of electrostatic interactions in ion paired lipids*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018. **169**: p. 298-304.
169. Simões, A., et al., *A practical framework for implementing Quality by Design to the development of topical drug products: Nanosystem-based dosage forms*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. **548**(1): p. 385-399.
170. Lúcio, M., Lima, J.L., and Reis, S., *Drug–Membrane Interactions: Molecular Mechanisms Underlying Therapeutic and Toxic Effects of Drugs*, in *Ideas in Chemistry and Molecular Sciences*, B. Pignataro, Editor. 2010.
171. Lúcio, M., *Estudos de anti-inflamatórios não esteróides em modelos membranares*, in *Faculdade de Farmácia*. 2006, Universidade do Porto.
172. Silva, J., *Desenvolvimento de um formulação dermocosmética para o tratamento e prevenção de infeções herpéticas*, in *Escola de Ciências*. 2017, Unversidade do Minho.
173. Silvius, J.R., *Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins*. 1982, John Wiley & Sons, Inc.: Lipid-Protein Interactions.
174. Caffrey, M., *Lipid Thermotropic Phase Transition Database (LIPIDAT): User's Guide. Version 1.0*. Vol. 34. 1993, NIST standard reference database: U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program.
175. M. de Oliveira, J. and Innocentini-Mei, L., *Surfactantes reativos não-iônicos em polimerização em emulsão de látices de acetato de vinila - vinil neodecanoato: influência nas propriedades de barreira à água*. Polímeros, 2009. **19**(1): p. 22-30.
176. Tadros, T., *Polymeric surfactants in disperse systems*. Advances in Colloid and Interface Science, 2009. **147-148**: p. 281-299.
177. Costa, P. and Sousa Lobo, J.M., *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **13**(2): p. 123-133.
178. Beck, R., Guterres, S., and Pohlmann, A., *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. 2011.
179. Ghica, M.V., et al., *Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels*. Molecules (Basel, Switzerland), 2016. **21**(6): p. 786.
180. Huang, H.-L. and Yang, S., *Filtration characteristics of polysulfone membrane filters*. Journal of Aerosol Science, 2006. **37**(10): p. 1198-1208.

181. Hafeez, F. and Maibach, H., *Occlusion Effect on in vivo Percutaneous Penetration of Chemicals in Man and Monkey: Partition Coefficient Effects*. Skin Pharmacology and Physiology, 2013. **26**(2): p. 85-91.
182. Wan, T., et al., *Effects of nanoparticles with hydrotropic nicotinamide on tacrolimus: permeability through psoriatic skin and antipsoriatic and antiproliferative activities*. International journal of nanomedicine, 2017. **12**: p. 1485-1497.
183. Hierholzer, C., et al., *Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(6): p. 917-928.
184. Oleszko, A., et al., *Application of FTIR-ATR Spectroscopy to Determine the Extent of Lipid Peroxidation in Plasma during Haemodialysis*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 8.
185. Barraza-Garza, G., et al., *Infrared Spectroscopy as a Tool to Study the Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds in Isolated Rat Enterocytes*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016. **2016**: p. 10.

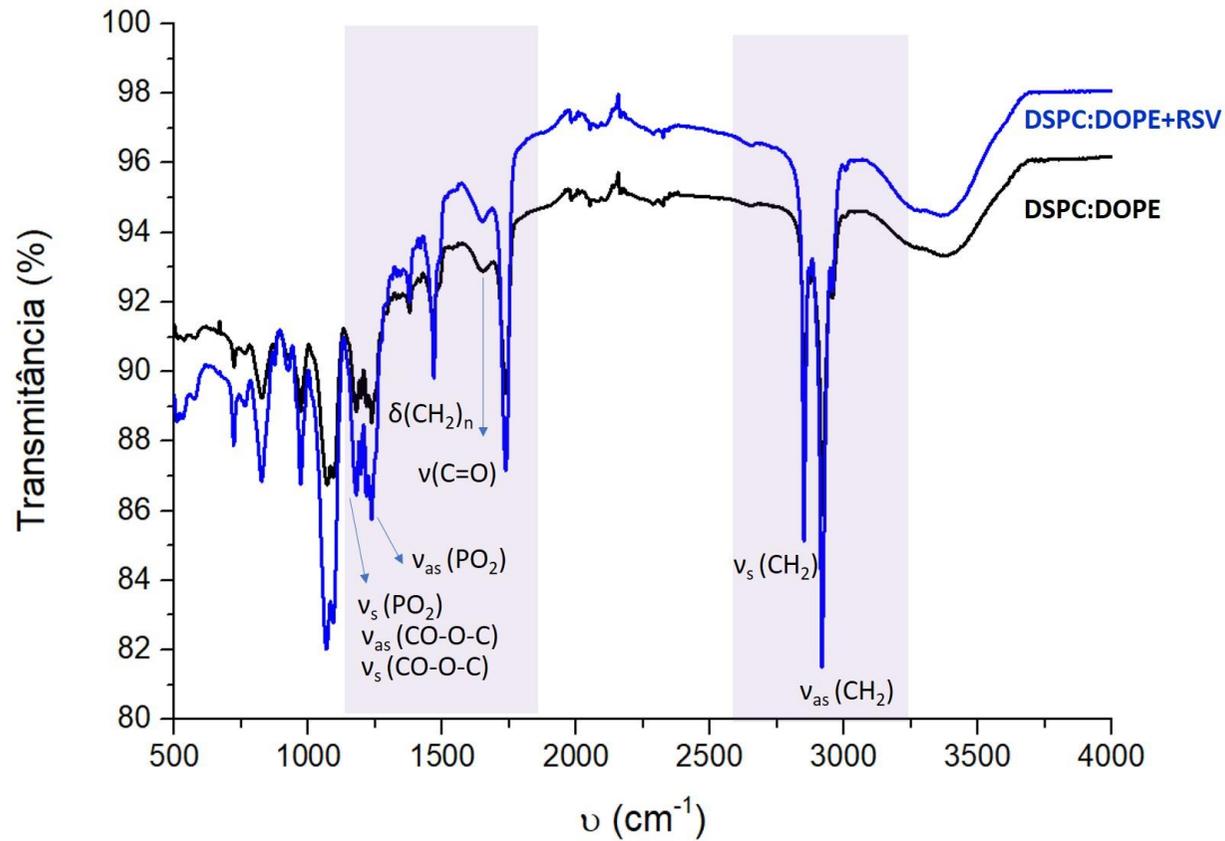
## **Anexos**

---



## Anexo 1

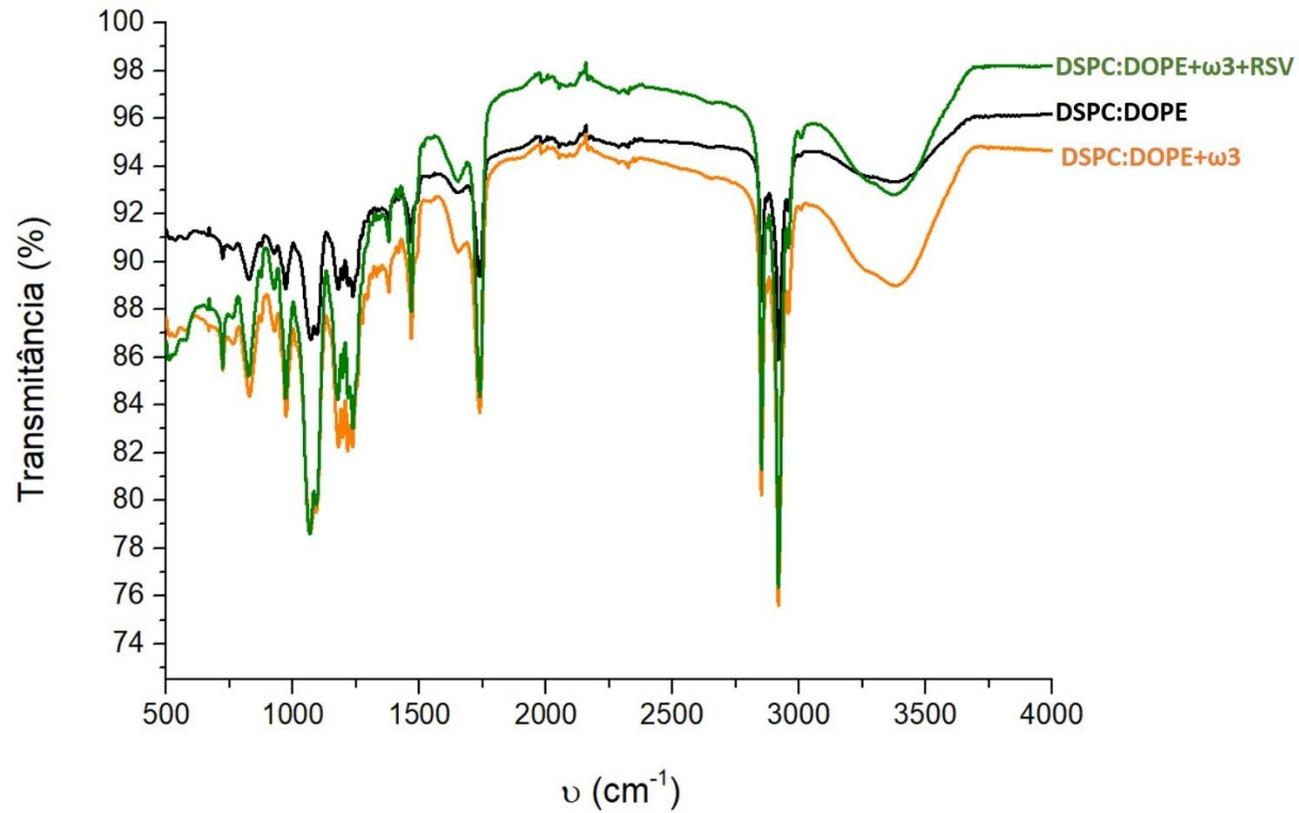
Espetros de ATR-FTIR obtidos para as formulações DSPC:DOPE, DSPC:DOPE+RSV, DSPC:DOPE: $\omega$ 3 e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV



**Figura A1** – Espetros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DSPC:DOPE, sem bioativos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DSPC:DOPE, com RSV encapsulado. Nas zonas sombreadas destacam-se os grupos funcionais característicos dos fosfolípidos.

## Anexo 2

Espectros de ATR-FTIR obtidos para as formulações DSPC:DOPE, DSPC:DOPE+RSV, DSPC:DOPE: $\omega$ 3 e DSPC:DOPE: $\omega$ 3+RSV



**Figura A2** – Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir de lipossomas de DSPC:DOPE, sem bioativos encapsulados (cor preta) e de lipossomas de DSPC:DOPE, com  $\omega$ 3 encapsulado (cor laranja) e com  $\omega$ 3 e RSV encapsulado (cor verde).

### Anexo 3

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

**Tabela A1** – Ajustes das cinéticas de liberação do RSV das formulações lipossomas DSPC:DOPE:ω3 em tampão e em meio micelar através de modelos matemáticos.

Cinética de 1ª ordem		Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$F_{max}(1 - e^{-kt})$	Em tampão	$F_{max} = 14,30 \pm 0,7195$ $k = 0,08219 \pm 0,007975$	0,9732	0,9719
	Ensaio meio micelar	$F_{max} = 75,96 \pm 1,897$ $k = 0,09276 \pm 0,004556$	0,99912	0,9908

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

Modelo Korsmeyer–Peppas		Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$at^n$	Em tampão	$a = 1,665 \pm 0,2103$ $n = 0,6172 \pm 0,04335$	0,9396	0,9366
	Ensaio meio micelar	$a = 10,67 \pm 0,8910$ $n = 0,5688 \pm 0,02928$	0,9649	0,9631

$a$  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).

**Tabela A2** – Ajustes das cinéticas de liberação do RSV das formulações lipossomas DSPC:DOPE:ω3 em tampão e em meio micelar através de modelos matemáticos.

Modelo Korsmeyer–Peppas com burst		Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$at^n + b$	Em tampão	$a = 2,455 \pm 0,6048$ $n = 0,5250 \pm 0,06405$ $b = -1,121 \pm 0,7065$	0,9488	0,9434
	Ensaio meio micelar	$a = 13,77 \pm 2,543$ $n = 0,5088 \pm 0,04772$ $b = -4,160 \pm 2,925$	0,9691	0,9658

**b** representa o efeito do *burst*.

Modelo Gallagher-Corrigan		Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$Fb(1 - e^{-k_1t}) + (F_{max} - Fb) \left( \frac{e^{-k_2t - k_2t_{max}}}{1 + e^{-k_2t - k_2t_{max}}} \right)$	Em tampão	$Fb = 14,42 \pm 0,6527$ $k_1 = 0,09277 \pm 0,01044$ $F_{max} = 13,95 \pm 0,6793$ $k_2 = 0,1162$ $t_{max} = 32$	0,9766	0,9711
	Ensaio meio micelar	$Fb = 759,8 \pm 2,093$ $k_1 = 0,09187 \pm 0,006340$ $F_{max} = 76,11 \pm 2,181$ $k_2 = \text{n.d.}$ $t_{max} = 32$	0,9912	0,9890

**Fb** é a quantidade de fármaco libertado diretamente da superfície do nanossistema (no *burst* inicial); **F<sub>max</sub>** representa a quantidade de fármaco libertado durante o processo; **t<sub>max</sub>** representa o tempo em que ocorre a liberação máxima do fármaco da superfície do nanossistema (após o *burst* inicial); **k<sub>1</sub>** e **k<sub>2</sub>** são constantes de liberação da primeira e segunda fases, respetivamente.

**Tabela A3** – Ajustes das cinéticas de liberação do RSV das formulações lipossomas DSPC:DOPE:ω3 em tampão e em meio micelar através de modelos matemáticos.

Modelo Weibull		Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$F_{max} (1 - e^{-at^b})$	Em tampão	$a = 0,05867 \pm 0,01243$ $F_{max} = 13,04 \pm 0,4856$ $b = 1.278 \pm 0,1345$	0,9795	0,9773
	Ensaio meio micelar	$a = 0,08758 \pm 0,008031$ $F_{max} = 74,27 \pm 2,580$ $b = 1,053 \pm 0,06931$	0,9915	0,9906

$F_{max}$  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 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		Parâmetros	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
$kt^{0,5}$	Em tampão	$k = 2,263 \pm 0,1033$	0,9115	0,9115
	Ensaio meio micelar	$k = 12,76 \pm 0,3904$	0,9535	0,9535

$K$  é a constante de dissolução de Higuchi.