



**Desenvolvimento e otimização de modelos lipídicos  
para avaliação da permeação cutânea de fármacos**

Paulo Alexandre Cardoso Teles

UMinho | 2023



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Paulo Alexandre Cardoso Teles

**Desenvolvimento e otimização de modelos  
lipídicos para avaliação da permeação  
cutânea de fármacos**

janeiro de 2023





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Paulo Alexandre Cardoso Teles

**Desenvolvimento e otimização de  
modelos lipídicos para avaliação da  
permeação cutânea de fármacos**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da

**Professora Doutora Marlene Lúcio**

e da

**Doutora Vanessa Fernandes Cardoso**

janeiro de 2023

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-Não comercial-Sem Derivações**

**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho acadêmico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer outra forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# AGRADECIMENTOS

Terminada mais uma etapa do meu percurso acadêmico, a mais importante de todas e um dos meus maiores objetivos desde bastante cedo, tenho alguns agradecimentos especiais a fazer.

Primeiro agradecer à Prof. Dr<sup>a</sup> Marlene Lúcio por desde início ter aceite o desafio de me orientar. Queria agradecer pela oportunidade, pela orientação, por todos os conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, pela paciência com as minhas dificuldades, pela ajuda e pelo apoio emocional em momentos em que estive mais em baixo e em que duvidei das minhas capacidades.

Agradecer à Prof. Dr<sup>a</sup> Vanessa Cardoso pela orientação, por toda a ajuda, críticas construtivas, disponibilidade e conhecimentos valiosos que me passou, por todo o apoio e por todas as vezes que me deu força e me fez valorizar cada etapa ultrapassada na tese.

Agradecer também à Mestre Eduarda Fernandes que desde o primeiro dia me recebeu, me deixou à vontade para tirar qualquer dúvida, me orientou e me acompanhou tanto na parte laboratorial como na escrita da tese.

No geral, agradecer a estas pessoas pela influência em todo o processo e por puxarem por mim para sair da minha zona de conforto e evoluir. O mais sincero obrigado!

Quero agradecer aos meus amigos que muitas vezes me ouviram, me apoiaram em todo este processo, me ajudaram a descontraír quando foi necessário e me fizeram acreditar em mim. Tenho muita sorte por vos ter comigo, obrigado!

Por último, mas não menos importante, agradecer à minha família que me transmitiu os valores necessários para chegar até aqui e que sempre acreditaram nas minhas capacidades e me incentivaram a lutar pelos meus objetivos. Em especial à pessoa mais importante que tenho, a minha irmã, por ser a melhor pessoa que conheço, a minha maior inspiração e orgulho e que me faz querer ser melhor em todos os aspetos todos os dias. Obrigado, Daniela!

# RESUMO

A administração de fármacos e outros compostos bioativos através da pele é uma área de investigação de crescente interesse para o desenvolvimento de formulações com aplicações farmacêuticas e cosméticas. A via cutânea é bem tolerada e aceita e, por isso, pode ser explorada para um efeito local ou sistémico, desde que seja possível garantir a permeação transdérmica dos compostos administrados. Quando se pretende uma permeação trans(dérmica) é muito importante também ter em conta as barreiras da pele (principalmente a camada mais externa, o estrato córneo) que, devido à sua matriz lipídica intercelular e ao seu arranjo estrutural, dificulta a permeação de compostos. Assim, neste trabalho é proposto o desenvolvimento e otimização de modelos lipídicos miméticos da matriz lipídica do estrato córneo. Pretende-se que os modelos propostos mimetizem a barreira cutânea, constituindo uma alternativa mais económica, de simples preparação e reprodutível comparativamente aos modelos de pele humana e animal, que não se justificam por questões funcionais e éticas. Os modelos desenvolvidos foram validados pela aplicação de ensaios clássicos de difusão em células de Franz com compostos-modelo de permeabilidade bem conhecida (cafeína, diclofenac e testosterona). Numa tentativa de desenvolver uma solução de triagem rápida (HTS, do inglês *"high throughput screening"*) capaz de testar um grande número de compostos em simultâneo, como alternativa aos ensaios clássicos de avaliação de permeabilidade dos compostos, os modelos validados foram incorporados numa plataforma microfluidica. A adaptação dos modelos para plataformas microfluidicas permitirá reduzir o volume de reagentes utilizado e aumentar a fiabilidade e reprodutibilidade dos ensaios de permeação através da padronização dos procedimentos analíticos, enquanto permite simular o fluxo observado em fenómenos fisiológicos de difusão que não podem ser imitados pelos métodos convencionais.

Resumindo, este trabalho pretende demonstrar a relevância quer da aplicação de modelos lipídicos, quer da microfluidica para estudar a permeabilidade de compostos bioativos para servir de suporte à descoberta de fármacos e/ou desenvolvimento de formulações.

**PALAVRAS-CHAVE:** permeação trans(dérmica); estrato córneo; modelos miméticos lipídicos; ensaios HTS; microfluidica.

# ABSTRACT

The administration of drugs and other bioactive compounds through the skin is a research area of growing interest for the development of formulations with pharmaceutical and cosmetic applications. The cutaneous route is well tolerated and accepted and, therefore, can be explored for a local or systemic effect, if it guarantees the transdermal permeation of the administered compounds. When trans(dermal) permeation is intended, it is also very important to consider the skin barrier (mainly the outermost layer, the *Stratum Corneum*) which, due to its intercellular lipid matrix and its structural arrangement, makes the permeation of compounds difficult. Thus, this work proposes the development and optimization of lipid mimetic models of the *Stratum Corneum* lipid matrix as a cheaper alternative, with simple preparation and reproducible compared to human and animal skin models, that are additionally unjustified by functional and ethical matters. The developed models were validated by applying classical diffusion assays in Franz cells with well-known permeability model compounds (caffeine, diclofenac and testosterone). Towards a high throughput screening (HTS) strategy capable of testing a large number of bioactive compounds simultaneously, as an alternative to traditional permeability methods, the validated models were incorporated in a microfluidic platform. The adaptation of the lipid biomimetic models to microfluidic platforms will allow to reduce chemical volumes used and increase reliability and reproducibility of permeation studies through standardization of the analytical processes, and simultaneously mimic the flux observed in physiological conditions of the diffusion phenomenon, which is not possible through traditional methods.

Summarizing, the main goal of this research is to demonstrate the potential of lipid models and microfluidics for studying the permeability of bioactive compounds and support the drug discovery process and formulation development.

**KEYWORDS:** trans(dermal) permeation; Stratum Corneum; lipid mimetic models; HTS assays; microfluidics.



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>VI</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Motivação para o desenvolvimento do trabalho .....	2
1.2. Objetivo principal, objetivos específicos e enquadramento do trabalho desenvolvido.....	3
1.3. Organização da dissertação.....	4
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>5</b>
<b>ESTADO DE ARTE</b> .....	<b>5</b>
2.1. Tipos de administração cutânea e suas vantagens/desvantagens relativamente a outras vias de administração.....	6
2.2. Estrutura da pele .....	7
2.3. Principal barreira à permeação cutânea: o estrato córneo .....	9
2.4. Influência das propriedades físico-químicas de compostos na permeação cutânea.....	10
2.4.1. Permeação cutânea e lipofilicidade .....	10
2.4.2. Permeação cutânea e ionização.....	11
2.5. Métodos tradicionais de avaliação da permeabilidade no estrato córneo .....	12
2.6. Modelos lipídicos miméticos do estrato córneo .....	13
2.7. Lipossomas .....	13
2.8. Bicamadas lipídicas em suporte sólido.....	15
2.9. Testes de alto rendimento .....	16
2.10. Microfluídica.....	16
2.10.1. Fabrico de plataformas microfluídicas .....	17
2.10.2. Materiais utilizados para o fabrico de plataformas microfluídicas.....	17
2.11. Fabrico de plataformas microfluídicas em Polidimetilsiloxano por fotolitografia suave.....	19
2.12. Material fotossensível: SU-8.....	20
2.13. Material elastomérico: PDMS .....	21
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>22</b>
<b>MATERIAIS, MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>

3.1. Materiais utilizados .....	23
3.2. Determinação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas dos compostos .....	24
3.2.1. Estrutura molecular .....	24
3.2.2. Grau de ionização e pKa .....	24
3.2.3. Coeficientes de distribuição e de partição .....	25
3.2.4. Análise elementar.....	26
3.3. Doseamento espectral por espectrofotometria pelo método da curva de calibração.....	26
3.3.1. Preparação das soluções-padrão .....	26
3.3.2. Obtenção das retas de calibração por espectroscopia UV-Visível.....	26
3.3.3. Validação do método analítico.....	27
3.4. Preparação de modelos miméticos lipídicos em dispersão: Lipossomas.....	28
3.4.1. Preparação de lipossomas unilamelares .....	28
3.5. Caracterização físico-química e biofísica dos lipossomas unilamelares .....	30
3.5.1. Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta .....	30
3.5.2. Temperatura de transição de fase principal e cooperatividade .....	32
3.6. Determinação <i>in vitro</i> do coeficiente de distribuição .....	34
3.7. Determinação <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> da permeação cutânea e fluxo máximo de permeação .....	36
3.8. Determinação <i>in vitro</i> do coeficiente de distribuição com recurso a uma plataforma microfluídica.....	38
3.8.1. Fabrico das estruturas microfluídicas .....	38
3.8.2. Fabrico dos moldes em SU-8.....	38
3.8.3. Fabrico das estruturas microfluídicas em PDMS.....	40
3.9. Hidrofilização dos canais .....	40
3.10. Avaliação da eficiência de hidrofilização pelo método do ângulo de contacto.....	41
3.11. Preparação dos modelos miméticos lipídicos a aplicar na plataforma microfluídica: bicamadas lipídicas suportadas.....	41
3.12. Determinação <i>in vitro</i> do coeficiente de distribuição numa plataforma microfluídica com canais revestidos de membranas lipídicas .....	42
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1. Determinação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas dos compostos-modelo. ....	44
4.1.1. Cafeína.....	44
4.1.2. Diclofenac.....	47
4.1.3. Testosterona.....	50
4.2. Doseamento espectral por espectrofotometria dos compostos-modelo por espectroscopia UV-visível.....	52
4.3. Caracterização físico-química e biofísica dos modelos lipídicos.....	55
4.3.1. Diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão.....	55

4.3.2. Temperatura de transição de fase e cooperatividade da transição.....	56
4.4. Determinação <i>in vitro</i> do coeficiente de distribuição dos compostos-modelo em sistemas membrana/água e comparação com valores obtidos <i>in silico</i> .....	59
4.5. Classificação da permeação cutânea dos compostos-modelo.....	63
4.5.1. Permeação cutânea teórica avaliada com recurso a valores de coeficientes de distribuição determinados <i>in silico</i> .....	63
4.5.2. Permeação cutânea teórica avaliada com recurso a valores de coeficientes de distribuição determinados <i>in vitro</i> .....	64
4.5.3. Permeação cutânea experimental avaliada com recurso a ensaios <i>in vitro</i> em células de difusão de Franz contendo membranas sintéticas.....	66
4.6. Desenvolvimento de uma plataforma microfluídica para determinação <i>in vitro</i> do coeficiente de distribuição.....	68
4.6.1. Caracterização das plataformas microfluídicas fabricadas .....	68
4.6.2. Avaliação da eficiência de hidrofiliação pelo método do ângulo de contacto .....	68
4.6.3. Determinação <i>in vitro</i> do coeficiente de distribuição da cafeína usando uma plataforma microfluídica.....	72
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>

# Lista de abreviaturas e siglas

Abs- Absorvância (do inglês "*absorvance*")

ATR-FTIR- Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - refletância total atenuada (do inglês "*Fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance*")

CAD- Desenho assistido por computador (do inglês "*computer aided design*")

CHOL- Colesterol (do inglês "*cholesterol*")

Csat- Concentração de saturação

DL- Limite de detecção (do inglês "*detection limit*")

DLS- Dispersão dinâmica de luz (do inglês "*dynamic light scattering*")

DPPC- Dipalmitoilfosfatidilcolina (do inglês "*dipalmitoylphosphatidylcholine*")

DSC- Calorimetria de varrimento diferencial (do inglês "*differential scanning calorimetry*")

ELS- Dispersão de luz eletroforética (do inglês "*electrophoretic light scattering*")

EPC- Fosfatidilcolina do ovo (do inglês "*egg phosphatidylcholine*")

GI- Gastrointestinal

GUV- Vesículas unilamelares gigantes (do inglês "*giant unilamellar vesicles*")

HTS- Teste de alto rendimento (do inglês "*high throughput screening*")

ICH- Conferência Internacional de Harmonização (do inglês "*International Conference on Harmonization*")

Jmáx- Fluxo máximo de permeação

Ka- Constante de acidez

log D- Coeficiente de distribuição

log P- Coeficiente de partição

LPP- Fase de periodicidade longa (do inglês "*long periodicity phase*")

LUV- Vesículas unilamelares grandes (do inglês "*large unilamellar vesicles*")

MEMS- Sistemas micro-eleto-mecânicos (do inglês "*micro-eleto-mechanical systems*")

MLV- Vesículas multilamelares (do inglês "*multilamellar vesicles*")

NMF- Fator de hidratação natural (do inglês "*natural moisturizing factor*")

PAMPA- Ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela (do inglês "*parallel artificial membrane permeability assay*")

PDI- Índice de polidispersão (do inglês "*polydispersity index*")

PDMS- Polidimetilsiloxano (do inglês "*polydimethylsiloxane*")

pka- Log da constante de ionização

PM- Peso molecular

PMMA- Polimetilmetacrilato (do inglês "*polymethylmethacrylate*")

PVA- Álcool polivinílico do inglês ("*poly-vinyl alcohol*")

PVPA- Ensaio de permeação baseado em vesícula fosfolipídica do inglês ("*phospholipid vesicle-based permeation assay*")

PC- Fosfatidilcolina (do inglês "*phosphatidylcholine*")

QL- Limite de quantificação (do inglês "*quantification limit*")

SALB- Bicamada Lipídica Assistida por Solvente (do inglês "*solvent assisted lipid bilayer*")

SB- Estrato basal (do inglês "*stratum basale*")

SC- Estrato córneo (do inglês "*stratum corneum*")

SCS- Estrato córneo substituto (do inglês "*stratum corneum substitute*")

SG- Estrato granuloso (do inglês "*stratum granulosum*")

SLB- Bicamadas lipídicas suportadas (do inglês "*supported lipid bilayers*")

SPP- Fase de periodicidade curta (do inglês "*short periodicity phase*")

SS- Estrato espinhoso (do inglês "*stratum spinosum*")

SUV- Pequenas vesículas unilamelares (do inglês "*small Unilamellar Vesicles*")

TCM- Taxa de contagens média

Teflon FEP- Etileno-propileno perfluorado (do inglês "*perfluorinated ethylene-propylene*")

Teflon PFA- Perfluoroalcóxi (do inglês "*perfluoroalkoxy*")

Teflon PTFE- Politetrafluoretileno (do inglês "*polytetrafluoroethylene*")

Tm- Temperatura de transição de fase principal (do inglês "*main phase transition temperature*")

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano (do inglês "*tris(hydroxymethyl)aminomethane*")

UV- ultravioleta

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura da pele [14].	8
<b>Figura 2.</b> Estrutura do estrato córneo representada pelo modelo “brick and mortar”.	9
<b>Figura 3.</b> Formação de lipossomas [38].	14
<b>Figura 4.</b> Classificação dos lipossomas relativamente ao seu tamanho e número de camadas [43].	15
<b>Figura 5.</b> Métodos de preparação das SLBs [47]: (A) Método de Langmuir-Blodgett; (B) Método de fusão vesicular; (C) Método de Langmuir-Schaeffer; (D) Métodos híbridos; (E) Bicamadas com base em polímeros;	15
<b>Figura 6.</b> Processo da fotolitografia suave: obtenção de moldes em resina fotossensível por fotolitografia e PDMS por moldagem por réplica [46].	20
<b>Figura 7.</b> Método de hidratação do filme lipídico fino seguido de extrusão. O processo a) resulta na obtenção de vesículas multilamelares (MLVs) e o processo b) resulta na obtenção de vesículas unilamelares (LUVs).	30
<b>Figura 8.</b> Figura exemplificativa de um ajuste sigmoide que correlaciona a taxa média de contagens ao longo da temperatura.	34
<b>Figura 9.</b> (A) Exemplo de um espectro de absorção de um determinado composto. (B) Terceira derivada do espectro de absorção e consequente eliminação das interferências espectrais. (C) Exemplo de um ajuste não linear aplicando a equação 7 aos valores da derivada de absorvância em função da concentração de lípido [99].	35
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica do fotolito para a produção dos moldes em SU-8 e posterior obtenção das estruturas microfluidicas em PDMS. As linhas representam os canais com larguras de 50, 100 e 200 $\mu\text{m}$ (3 réplicas de cada), comprimento de 15 mm e espaçadas de 2 mm. As entradas e saída apresentam um diâmetro de 1 mm.	38
<b>Figura 11.</b> Estrutura molecular da cafeína (composto hidrofílico).	44
<b>Figura 12.</b> Distribuição do log D da cafeína em função do pH.	45
<b>Figura 13.</b> Curva de titulação da cafeína: distribuição de microespécies em função do pH.	46
<b>Figura 14.</b> Estrutura molecular do diclofenac (composto anfifílico).	47
<b>Figura 15.</b> Distribuição do log D do diclofenac em função do pH.	48
<b>Figura 16.</b> Curva de titulação do diclofenac: distribuição de microespécies em função do pH.	49
<b>Figura 17.</b> Estrutura molecular da testosterona (composto lipofílico).	50
<b>Figura 18.</b> Distribuição do log D da testosterona em função do pH.	51
<b>Figura 19.</b> Curva de titulação da testosterona: distribuição de microespécies em função do pH.	51
<b>Figura 20.</b> Espectro de absorvância das soluções padrão com concentrações crescentes de cafeína em tampão universal a pH 5.5.	53
<b>Figura 21.</b> Reta de calibração da cafeína em tampão universal (pH 5.5) ao comprimento de onda de absorção máxima de 273 nm.	54
<b>Figura 22.</b> A) Tm e B de DPPC e DPPC +Cafeína. (B) Tm e B de DPPC: CHOL (2:1) e DPPC: CHOL (2:1) +Cafeína.	56

<b>Figura 23.</b> A) Espectro de absorvância das amostras após subtração da contribuição da absorção das referências (espectros coloridos) e espectros de absorção das referências (espectros de cor preta) usados para a determinação do log D da cafeína em modelos membranares de DPPC. B) 2ª derivada dos espectros de absorvância representados em A) .....	60
<b>Figura 24.</b> Ajuste não linear dos valores da derivada das absorvâncias a 313 nm e 314 nm em função da concentração de modelos membranares: (A) DPPC e (B) DPPC: CHOL (2:1). A partir deste ajuste não linear foi possível determinar o log D do composto cafeína ao pH 5.5. ....	61
<b>Figura 25.</b> Perfis de permeação in vitro dos diferentes compostos traçados ao longo do tempo obtidos com recurso a células de difusão de Franz contendo membranas sintéticas de polissulfona.....	66
<b>Figura 26.</b> Fotografia representativa de uma das plataformas microfluidicas desenvolvida.....	68
<b>Figura 27.</b> Comparação entre os ângulos de contacto obtidos em amostras de PDMS pré-tratadas com NaOH para diferentes tempos (t=0, t=5, t=10 e t=15 min) na ausência de PVA e na presença de PVA a diferentes concentrações.....	69
<b>Figura 28.</b> Comparação entre os ângulos de contacto obtidos em amostras de PDMS sem pré-tratamento com NaOH para diferentes tempos (t=0, t=5, t=10 e t=15 min) na ausência de PVA e na presença de PVA a diferentes concentrações.....	70
<b>Figura 29.</b> Comparação entre os ângulos de contacto obtidos em amostras de PDMS pré-tratadas com NaOH no próprio dia (a azul) VS no dia anterior (a castanho) e com a mesma concentração de PVA – 1% (w/w). ....	71
<b>Figura 30.</b> Imagem obtida da gota de água desionizada ao longo do tempo com pré-tratamento com NaOH e na presença de PVA a 1% (w/w). ....	72
<b>Figura 31.</b> Concentração da solução de cafeína (pH 5.5) injetada nos canais da plataforma microfluidica hidrofílica e revestida de SLB de DPPC e concentração da cafeína que não ficou retida nos canais e foi recolhida a vários tempos.....	73

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Métodos tradicionais e alternativas para a mimetização do SC.....	12
<b>Tabela 2.</b> Materiais utilizados no fabrico de dispositivos microfluidicos [29, 30]. .....	18
<b>Tabela 3.</b> Lista de reagentes e instrumentos utilizados ao longo do projeto.....	23
<b>Tabela 4.</b> Classificação da permeação cutânea de um composto em função do valor de fluxo máximo de permeação ( $J_{máx}$ ) [103].....	37
<b>Tabela 5.</b> Dados obtidos da previsão in silico das propriedades da cafeína através do software MarvinSketch®. ....	46
<b>Tabela 6.</b> Dados obtidos da previsão in silico das propriedades do diclofenac através do software MarvinSketch®. ....	49
<b>Tabela 7.</b> Dados obtidos da previsão in silico das propriedades da testosterona através do software MarvinSketch®. ....	52
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros para a validação do método analítico de doseamento dos compostos.....	54
<b>Tabela 9.</b> Resumo da caraterização físico-química dos modelos lipídicos na ausência e na presença de cada composto. Os resultados são apresentados como valores médios $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 determinações. ....	55
<b>Tabela 10.</b> Resumo da caraterização biofísica dos modelos membranares na presença e na ausência de cada composto. Os resultados são apresentados como valores médios $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 determinações. ....	57
<b>Tabela 11.</b> Tabela que resume e compara os valores de log D obtidos em sistemas membranares lipossoma/água obtidos in vitro e valores de log D octanol/água in silico. ....	61
<b>Tabela 12.</b> Cálculo do $S_p$ e $J_{máx}$ com base no log D determinado in silico no módulo MarvinSketch® do software da Chemaxon®. Classificação da permeação de acordo com os valores de $J_{máx}$ obtidos e comparação com a permeação descrita em estudos reportados na literatura. ....	63
<b>Tabela 13.</b> Cálculo do $S_p$ e $J_{máx}$ com base no log D determinado in vitro em modelos miméticos membranares de DPPC e DPPC: CHOL (2:1). Classificação da permeação de acordo com os valores de $J_{máx}$ obtidos e comparação com a permeação descrita em estudos reportados na literatura. ....	65
<b>Tabela 14.</b> Valores de $J_{máx}$ obtidos in vitro com recurso a células de difusão de Franz e respetiva classificação de permeação cutânea de cada composto. ....	67



# **CAPÍTULO 1**

---

## **INTRODUÇÃO**

### 1.1. Motivação para o desenvolvimento do trabalho

Atualmente, os modelos animais/celulares são bastante utilizados no desenvolvimento de formulações para administração tópica na pele e para a administração transdérmica fazendo parte de testes *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Porém, embora estes modelos tenham a vantagem de ser, em termos de complexidade, o substituto mais próximo da pele humana, sendo, portanto, usados para mimetizar os processos de permeabilidade no organismo humano, têm também inúmeras desvantagens, tais como o facto de serem dispendiosos, serem demorados e precisarem de requisitos específicos em termos de infraestruturas e, principalmente, por razões éticas e regulamentares. De facto, o regulamento Cosmético da União Europeia (EU) (EC 1223/2009) banuiu a comercialização de cosméticos que, a certo ponto, para o seu desenvolvimento fossem submetidos a testes utilizando animais. Da mesma forma, também o regulamento REACH da UE (Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas) incita à procura e ao uso de alternativas a testes que utilizem modelos animais. Além dos problemas regulamentares, estes modelos permitem uma informação da permeabilidade cutânea quanto ao fluxo de permeação e quanto ao resultado (permeia ou não permeia), mas não permitem obter uma explicação biofísica que relacione a estrutura química do composto com o seu efeito na permeação (relação estrutura-atividade). Assim, os modelos lipídicos biomiméticos tornam-se modelos promissores para estabelecer este tipo de relações e para constituir uma alternativa aos modelos animais/celulares.

Outra desvantagem importante do uso de modelos animais/celulares é o seu baixo rendimento, requerendo altos custos e elevados tempos de preparação, limitando o seu uso no âmbito do desenvolvimento de novos compostos, em que há uma necessidade de testar rapidamente centenas de compostos. A triagem de alto rendimento (HTS, do inglês, “*high throughput screening*”) é uma abordagem com interesse crescente para aplicação ao nível da descoberta de fármacos e outros compostos bioativos e traduz-se na testagem de grandes “bibliotecas químicas” através de ensaios miniaturizados e análise de dados em larga escala de forma autónoma [1, 2]. Assim, a avaliação de novos compostos e formulações para administração tópica cutânea e/ou transdérmica é uma área que requer ainda esforços na investigação para: (i) o desenvolvimento de modelos cutâneos apropriados ao estabelecimento de relações entre as estruturas químicas dos compostos e a sua capacidade de permeação ; (ii) a integração desses modelos em plataformas HTS que permitam maior rendimento, menores custos e maior padronização no processo de desenvolvimento de compostos e formulações.

## 1.2. Objetivo principal, objetivos específicos e enquadramento do trabalho desenvolvido

Este trabalho constitui uma primeira abordagem para desenvolver uma alternativa ao uso de modelos animais/celulares no estudo da permeação cutânea. Como tal, o objetivo principal do presente trabalho é o desenvolvimento de modelos lipídicos biomiméticos da matriz lipídica do estrato córneo (SC) da pele para avaliação da permeação cutânea de compostos bioativos, com sua posterior integração numa plataforma microfluidica HTS apelativa às indústrias farmacêuticas e cosméticas, bem como a todos os investigadores que se dediquem à descoberta de novos compostos bioativos. Assim, a plataforma microfluidica incorporando modelos lipídicos poderá constituir um avanço do estado da arte dos métodos que visam a utilização de modelos que são ou demasiado complexos, como enxertos de pele humana e/ou de animais (com todas as desvantagens já enumeradas), ou demasiado simples, como as membranas poliméricas sintéticas que não são capazes de mimetizar as condições fisiológicas das biomembranas da pele.

Desta forma, os objetivos específicos do trabalho são os seguintes:

- Desenvolvimento/caracterização de modelos biomiméticos da matriz lipídica do SC explorando uma composição simples à base de fosfatidilcolina (PC) e uma composição mais complexa de mistura de PC e colesterol (CHOL) e testando modelos de diferente dimensionalidade (lipossomas e bicamadas lipídicas suportadas);
- Determinação *in silico* de propriedades físico-químicas de compostos bioativos, aqui usados como modelo (cafeína, diclofenac e testosterona);
- Aplicação dos modelos biomiméticos lipídicos (lipossomas) para determinar efeitos nas propriedades biofísicas membranares dos compostos bioativos por metodologia não HTS;
- Cálculo teórico dos valores de fluxo máximo de permeação dos compostos-modelo por aplicação das propriedades extensivas determinadas *in vitro* ou *in silico* (e.g., coeficiente de distribuição, peso molecular);
- Determinação experimental dos valores de fluxo máximo de permeação dos compostos-modelo, usando a metodologia clássica das células de Franz, usando modelos membranares sintéticos;
- Comparação dos dados de permeabilidade dos compostos-modelo obtidos experimentalmente com os valores teóricos calculados e os valores reportados na literatura;
- Aplicação dos modelos biomiméticos lipídicos na forma de bicamadas lipídicas suportadas em microcanais de plataformas microfluidicas;
- Determinação do coeficiente de distribuição nas plataformas microfluidicas e comparação com os valores obtidos no protocolo não HTS;

Este trabalho está contextualizado no âmbito de um projeto de doutoramento “BIOMYSKIN – *“Biomimicry profiling supporting drug discovery for topical applications”*” da Mestre Eduarda Fernandes, a decorrer no Departamento de Física da Universidade do Minho, sob supervisão da Doutora Marlene Lúcio, do Professor Senentxu Lancéros-Méndez e da Doutora Vanessa Cardoso. O projeto de doutoramento visa o desenvolvimento de uma solução HTS baseada em plataformas microfluídicas destinada às indústrias farmacêuticas e cosméticas para avaliar a capacidade de um determinado composto atravessar a barreira da pele. Os objetivos, os modelos miméticos lipídicos e as técnicas biofísicas de caracterização utilizadas neste projeto de mestrado permitiram explorar alguns dos primeiros objetivos do referido projeto de doutoramento e estão perfeitamente inseridos nas linhas estratégicas do Centro de Física das Universidades do Minho e Porto, nomeadamente na Linha 2 e 3.

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

A presente dissertação de mestrado encontra-se dividida em cinco capítulos:

Capítulo 1 – Introdução

Neste capítulo introduz-se a motivação, os objetivos e o respetivo enquadramento da dissertação;

Capítulo 2 – Estado da Arte

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão da literatura sobre a administração tópica e/ou transdérmica de compostos; as barreiras cutâneas à administração dos compostos; os métodos clássicos de avaliação da permeabilidade cutânea e os modelos miméticos da pele; e as estratégias microfluídicas como potenciais plataformas HTS.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Este capítulo é dedicado a uma breve descrição dos reagentes, materiais e metodologias experimentais utilizados.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

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

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste capítulo são enumeradas as principais conclusões obtidas no trabalho desenvolvido assim como sugestões de futuros ensaios a serem realizados no âmbito do tema que deu origem a esta dissertação.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **ESTADO DE ARTE**

De acordo com o exposto no capítulo anterior, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de modelos lipídicos e a sua integração numa plataforma HTS para avaliar a capacidade de permeação cutânea de compostos. Desta forma o estado da arte que se segue focará diversos aspetos importantes para o proposto, nomeadamente: a administração cutânea de compostos (tipos, vantagens/desvantagens); a pele, sua constituição e principais barreiras à administração de compostos; as propriedades físico-químicas dos compostos que afetam a sua permeação cutânea; os métodos clássicos de avaliação da permeação cutânea; o tipo de modelos miméticos lipídicos e as plataformas microfluídicas como estratégias de HTS.

## **2.1. Tipos de administração cutânea e suas vantagens/desvantagens relativamente a outras vias de administração**

As vias de administração de compostos mais comuns são a via oral e parentérica. A via oral apresenta vantagens como a autoadministração do composto por parte do paciente, a predeterminação das doses a administrar e ainda a portabilidade das mesmas [3]. No entanto, apresenta algumas desvantagens: o grande conteúdo enzimático e gradiente de valores de pH característico do trato gastrointestinal (GI), que poderão levar à degradação dos compostos antes destes serem absorvidos; e as limitações na absorção dos compostos por dificuldades ao nível do transporte através do epitélio GI [4]. No caso das vias parentéricas (por injeção intravenosa, intramuscular e subcutânea) também existem desvantagens, como a natureza invasiva destas vias, o facto de serem uma alternativa dolorosa para o paciente, bem como a necessidade de especialização da pessoa que faz a administração [3].

Tendo em conta as desvantagens enumeradas das outras vias de administração, a administração na pele oferece uma oportunidade acessível e conveniente para a administração de compostos de uma forma não invasiva. A administração cutânea dos compostos pode ser feita localmente na pele, designando-se administração tópica, ou com o objetivo de fazer chegar os compostos à corrente sanguínea através da qual serão distribuídos pelos locais alvo, designando-se administração transdérmica [5].

A administração cutânea, é, portanto, alvo de um forte estudo e investimento na tentativa de encontrar abordagens inovadoras e que permitam otimizar resultados tanto ao nível da cosmética como do desenvolvimento farmacêutico.

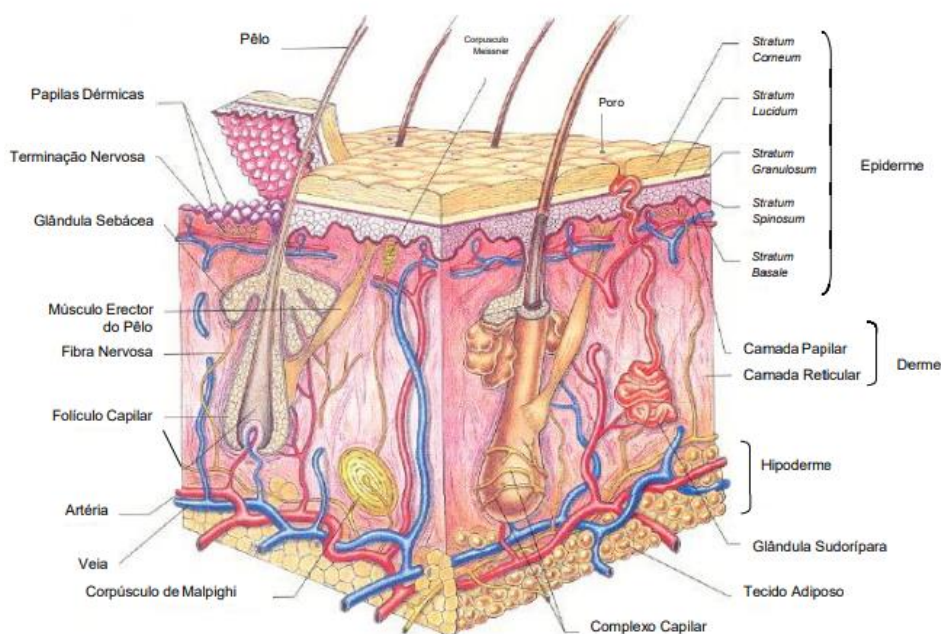
Algumas das vantagens da administração cutânea incluem: a possibilidade de obter uma duração prolongada da ação pretendida; o facto de ser uma via não invasiva (desde que não seja uma administração parentérica do tipo subcutâneo), provocando pouco desconforto ao paciente que pode ainda variar as zonas de aplicação já que a pele tem uma grande área de superfície; o facto desta via poder reduzir os efeitos adversos dos compostos administrados (se a administração é tópica e se pretende um efeito local); evita o efeito de primeira passagem do metabolismo hepático e GI, correlacionando melhor as concentrações do fármaco com a sua atividade (se a administração é transdérmica) [3, 4, 5].

Não obstante, a administração cutânea apresenta também alguns desafios, sendo o maior deles o facto de apenas alguns compostos apresentarem uma permeação eficaz, que é limitada quer pelo seu peso molecular (<400-500 Da), quer pelas suas características físico-químicas (é favorecida a permeação de moléculas lipofílicas e anfifílicas devido à matriz lipídica existente na barreira mais externa e principal da pele, o SC) [5, 6, 7, 8]. Como tal é muito importante uma triagem dos compostos que tenham capacidades de permeação cutânea e é também importante que as metodologias de triagem possibilitem obter uma informação biofísica dos motivos pelos quais determinado composto não apresenta boa permeação, como forma de desenvolver uma relação entre a estrutura dos compostos e a sua permeação. Este tipo de informação só será possível com metodologias de triagem que integrem modelos lipídicos miméticos da matriz lipídica da pele, pelo que o investimento no desenvolvimento destes modelos é um dos pontos fulcrais deste trabalho.

## **2.2. Estrutura da pele**

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como uma barreira que protege o corpo do mundo exterior. A pele forma uma barreira eficaz entre o organismo e o meio ambiente evitando a invasão de agentes patogénicos e afastando agressões químicas e físicas, bem como a perda desregulada de água e solutos [9]. A sua estrutura divide-se em três camadas distintas: A hipoderme (camada mais interior), a derme (camada intermédia) e a epiderme (camada mais exterior) (Figura 1). A hipoderme apresenta uma espessura variável de acordo com a região do corpo e contém células adiposas com função de proteção mecânica, contendo ainda neurónios sensoriais e vasos sanguíneos [10]. A derme consiste em duas camadas de tecido conjuntivo (1-2 mm) e é composta por: células adiposas dérmicas, células com atividade imunológica (mastócitos) e fibroblastos que produzem fibras de colagénio, elastina, reticulina e proteoglicanos e que constituem a matriz

extracelular que serve de suporte para a pele. A derme contém ainda apêndices cutâneos tais como os folículos pilosos, glândulas sudoríparas, sebáceas e é inervada e vascularizada, contendo vasos sanguíneos e linfáticos [11]. A epiderme, por sua vez, é a parte superficial da pele, não é vascularizada e tem uma espessura entre os 100 e os 150  $\mu\text{m}$  estando separada da derme por uma membrana basal. A epiderme é dividida em quatro camadas: estrato basal (SB), estrato espinhoso (SS), estrato granuloso (SG) e SC [11]. Destas, apenas o SC é constituído por células não viáveis (mortas). As camadas viáveis da epiderme são compostas essencialmente por queratinócitos (95% da constituição total da epiderme), por desmossomas produzidos pelos queratinócitos, que têm a capacidade de os conectar, e por outros tipos de células com funções específicas: os melanócitos (função de proteção contra a radiação conferindo cor à pele), as células de Langerhans (com funções imunológicas) e as células de Merkel (com funções de transmissão sensorial). A epiderme viável possui ainda uma variedade de enzimas catabólicas (esterases, fosfatases, proteases, nucleotidasas e lipases) [10, 12, 13]. A camada não viável da epiderme, SC, tem especial interesse pois constitui a primeira e principal barreira à permeação cutânea de compostos e por esse motivo será descrita com mais detalhe na secção seguinte.



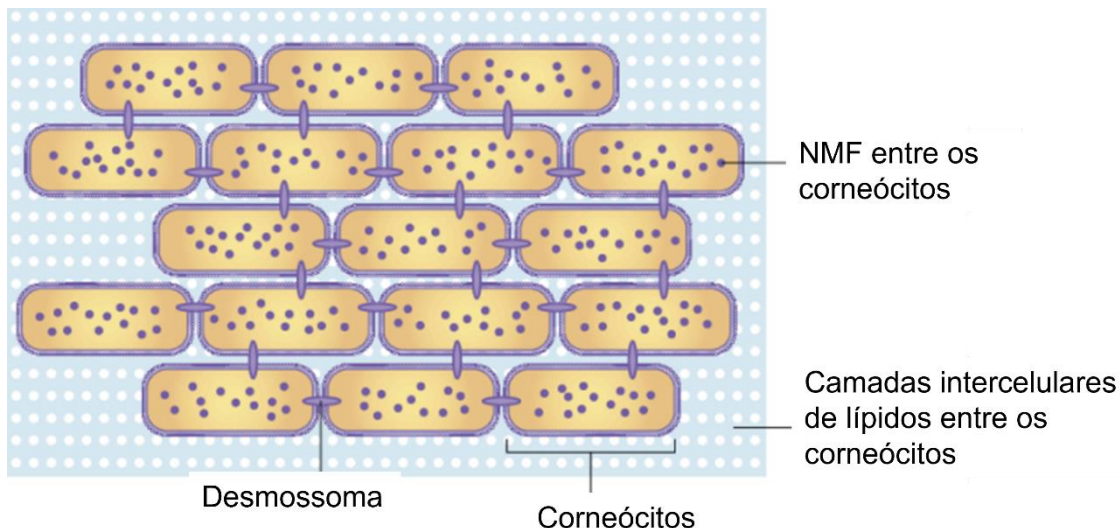
**Figura 1.** Estrutura da pele [14].



### 2.3. Principal barreira à permeação cutânea: o estrato córneo

Tal como já referido, a pele atua como a principal barreira entre o corpo e o meio exterior. Para esta função é absolutamente crucial a camada mais externa da pele, o SC. A sua função é proteger o organismo da perda excessiva de água e prevenir a entrada no organismo, através da epiderme, de agentes infecciosos ou compostos que possam provocar uma resposta imunológica [15, 16, 17].

O SC é constituído por células mortas (queratinócitos não viáveis) que tomam a designação de corneócitos. A organização estrutural do SC é muitas vezes descrita pelo modelo “tijolos e cimento” (em inglês referido como “*brick and mortar*”) onde os corneócitos (cerca de 25 camadas) representam os “tijolos” e o “cimento” é representado por uma matriz lipídica (Figura 2). Esta estrutura divide-se, portanto, em dois domínios: a) uma região celular (corneócitos) rica em água e proteínas (e.g., enzimas, filagrina e queratina) e b) uma região intercelular rica em lípidos [18]. A filagrina existente nos corneócitos tem uma função de alinhar os filamentos de queratina e os seus metabolitos são importantes para a hidratação do SC, pois são parte integrante do chamado fator de hidratação natural (NMF, do inglês “*natural moisturizing factor*”).



**Figura 2.** Estrutura do estrato córneo representada pelo modelo “*brick and mortar*”.

A matriz intercelular lipídica do SC organiza-se em bicamadas multilamelares densamente compactadas compostas por três principais classes de lípidos: ceramidas, CHOL e uma mistura de ácidos gordos [15, 16] presentes em igual razão molar (1:1:1) [17, 19]. Estas estruturas multilamelares são constituídas por duas fases lamelares de diferente periodicidade com

aproximadamente 6 e 13 nm, também denominadas como a fase de periodicidade curta (SPP) e fase de periodicidade longa (LPP), respetivamente [20].

A maioria dos compostos administrados através da pele atravessa o SC através da sua matriz lipídica [5]. Assim, facilmente se compreende que as características físico-químicas dos compostos, nomeadamente, o seu tamanho, o seu estado de ionização e a sua lipofilicidade, sejam determinantes para garantir a sua permeação. Como tal, na secção seguinte serão explicadas resumidamente as principais vias de permeação cutânea e como as características físico-químicas dos compostos influenciam a sua permeação cutânea.

## **2.4. Influência das propriedades físico-químicas de compostos na permeação cutânea**

### **2.4.1. Permeação cutânea e lipofilicidade**

Para que a administração de compostos ocorra através da pele há dois fatores bastante importantes. O primeiro é a permeação cutânea que se refere à capacidade de um determinado composto passar de uma camada da pele para outra de composição e estrutura diferente. As vias de permeação cutânea são principalmente limitadas pelo SC e incluem: (i) a via transcelular; (ii) a permeação através dos poros e/ou ductos de glândulas sebáceas e sudoríparas; (iii) a via interlamelar hidrofílica e (iv) a via lipídica intercelular. A via transcelular diz respeito à passagem dos compostos diretamente através de estruturas celulares (corneócitos) e intercelulares (matriz lipídica). Esta via é muito dificilmente utilizada pelos compostos administrados na pele, pois, para além da barreira imposta pela matriz lipídica extracelular, apresenta como barreiras à permeação, os constituintes celulares dos corneócitos, ou seja, os compostos têm de ultrapassar estruturas de diferentes naturezas: lipofílicas, hidrofílicas, lipídicas e proteicas. A passagem de compostos através do SC pode também ocorrer pelos poros e apêndices glandulares. No entanto, esta via é também considerada pouco importante para efeitos de permeação cutânea, pois quer os poros, quer os apêndices glandulares ocupam uma percentagem insignificante da superfície total da pele humana. A via interlamelar hidrofílica refere-se às zonas aquosas existentes nos pequenos espaços interlamelares da matriz lipídica intercelular, ou seja, entre as bicamadas lipídicas que rodeiam o SC. Esta via é limitada a moléculas hidrofílicas muito pequenas porque os espaços interlamelares apresentam dimensões < 10 nm, pelo que não é a via mais utilizada por compostos bioativos, maioritariamente lipofílicos e anfífilos. A via lipídica intercelular refere-se à passagem de

compostos entre os corneócitos pelas regiões interlamelares do SC, ricas em lípidos. Esta é a via mais comum de permeação dos compostos após administração cutânea [21].

Uma vez que a via mais comum de permeação do SC é a via lipídica intercelular, entende-se a permeação como um processo de difusão passiva através de membranas lipídicas. Os processos de difusão passiva obedecem à 1ª lei de Fick que descreve que o fluxo dos compostos através de membranas lipídicas ocorre a favor de um gradiente de concentração (de zonas onde a concentração dos compostos é maior para zonas de menor concentração) [22]. Como tal, o fluxo dos compostos através das membranas lipídicas depende muito da distribuição dos compostos entre as fases lipídica e aquosa (mensurável através do seu coeficiente de distribuição) e da própria lipofilicidade dos compostos (determinada pelo seu coeficiente de partição). Matematicamente ambos os coeficientes são expressos em valores logarítmicos e referem-se à razão entre as concentrações de um composto numa fase lipídica e numa fase aquosa. No entanto, enquanto o coeficiente de distribuição ( $\log D$ ) é calculado a um determinado valor de pH, o coeficiente de partição ( $\log P$ ) é calculado ao pH ao qual o composto se encontra na sua forma neutra [23]. De um modo geral, conhecendo-se todas as vias de permeação do SC e recorrendo-se às características físico-químicas de um fármaco pode-se afirmar que a permeação cutânea é favorecida para moléculas hidrofílicas muito pequenas (que difundem pela via hidrofílica interlamelar) ou para moléculas anfífilas e lipofílicas com valores de  $\log P$  entre 1 e 3 e pesos moleculares de 400-500 Da [5].

#### **2.4.2. Permeação cutânea e ionização**

O  $pK_a$  ( $\log$  da constante de ionização) de um composto é uma propriedade físico-química que determina o seu estado de ionização quando em solução [24] e, neste contexto, é um indicador de elevada importância pois influencia a permeação cutânea. As formas neutras dos compostos são mais apolares e, portanto, mais lipofílicas e com maior capacidade de permeação do SC pela via intercelular. As formas ionizadas dos compostos são mais polares e, portanto, mais solúveis em água e, portanto, apresentam menor capacidade de permeação do SC pela via intercelular. Uma vez que o pH cutâneo apresenta um valor ácido ( $\approx 5.5$ ) [25], compostos que sejam ácidos fracos com  $pK_a > 6$  apresentar-se-ão neutros ao pH cutâneo e terão maior capacidade de permeação do SC pela via intercelular.

## 2.5. Métodos tradicionais de avaliação da permeabilidade no estrato córneo

As membranas lipídicas são estruturas complexas e dinâmicas comuns a todas as células vivas. A interação entre compostos bioativos e lípidos que constituem estas membranas são de extrema importância para estudar a biodisponibilidade de compostos [26]. Além disso, as membranas das células constituem ambientes equilibrados, pelo que mudanças nestes ambientes provocados por compostos bioativos devem ser estudados para compreender os seus efeitos na integridade e função das membranas [27].

Estudos utilizando a pele humana seriam o ideal para a obtenção de resultados fidedignos e que refletissem exatamente o que acontece na permeação cutânea de compostos, porém, por razões éticas, e devido ao elevado custo em ensaios tão primordiais não são, de todo, uma possibilidade [28]. Assim, para estudar o efeito da aplicação de diferentes compostos através da pele para a sua aplicação na cosmética e na indústria farmacêutica, é imperativo definir, testar e caracterizar diferentes modelos biomiméticos lipídicos do SC, a principal barreira da pele, através de estudos *in vitro*.

A Tabela 1 sumariza algumas das alternativas testadas e descritas na literatura, bem como as limitações associadas.

**Tabela 1.** Métodos tradicionais e alternativas para a mimetização do SC.

<b>Métodos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Limitações</b>
PAMPA (do inglês " <i>Parallel artificial membrane permeability assay</i> ")	- Consiste numa membrana artificial líquida que separa dois compartimentos: um contendo uma solução tampão de compostos a serem testados (definido como compartimento dador) e outro contendo uma solução tampão inicial (definida como compartimento aceitador) [29].	- A utilização de ceramidas artificiais que não são estruturalmente iguais às ceramidas do SC fazem com que este modelo não seja o mais apropriado para mimetizar o SC [30, 31].
PVPA (do inglês " <i>Phospholipid vesicle-based permeation assay</i> ")	- Inclui uma barreira constituída pelas principais classes lipídicas presentes na pele como modelo mimético das biomembranas [32].	- Dificuldade na mimetização do SC; - Origem não biológica [30, 31].
SCS (do inglês " <i>Stratum corneum substitute</i> ").	- Imitação artificial da organização do SC; - Consiste num substrato poroso coberto com lípidos SC sintéticos específicos de composição uniforme e espessura da camada, imitando a organização e orientação lipídica do SC [33].	- Origem não biológica. - Nunca foi usado na otimização de formulações [30].

Monocamadas lipídicas de <i>Langmuir</i>	- Sistema composto apenas por um folheto lipídico; - Úteis pois fornecem informação relevantes sobre a capacidade de os compostos permearem a organização lipídica do SC através de estudos interação composto-membrana [26].	- Compostos apenas por um folheto lipídico, o que não traduz a realidade das bicamadas lipídicas do SC [26, 34, 35].
Membranas de silicone	- Membranas artificiais de silicone para mimetizar o SC [30].	- Capacidade de prever a permeabilidade da pele de compostos lipofílicos, mas o mesmo não acontece para compostos hidrofílicos [30].
Membranas não artificiais	- Pele humana reconstruída ou pele animal [30].	- Questões éticas e regulamentares [30]; - Processo muito dispendioso; - Variação das membranas lipídicas de animal para animal.

## 2.6. Modelos lipídicos miméticos do estrato córneo

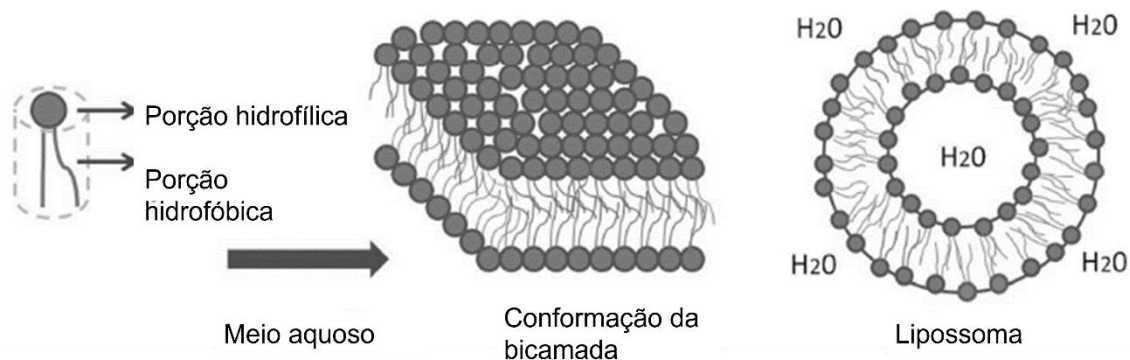
Como referido anteriormente, as biomembranas apresentam uma grande complexidade. De tal forma que, como analisado no ponto anterior, vários modelos miméticos do SC não se mostraram capazes de mimetizar os domínios lipídicos desta barreira de forma satisfatória. Após uma continuada evolução no desenvolvimento destes modelos, dois destacaram-se sendo mais comumente utilizados para avaliar as interações fármaco-membrana: lipossomas e SLBs (do inglês “*Supported lipid bilayers*”) [36, 37]. Estes sistemas têm as suas vantagens e limitações, portanto, para escolher um modelo de membrana apropriado para um estudo da interação composto-membrana, é necessário entender as suas propriedades intrínsecas e a natureza do estudo [36].

## 2.7. Lipossomas

Os lipossomas são bicamadas lipídicas, envolvendo um núcleo aquoso, muito atraentes para a administração de compostos através da pele por diversos motivos tais como: a sua composição e a semelhança com as biomembranas permitindo uma maior permeação das moléculas de interesse e favorecendo a sua libertação sustentada sem a necessidade de promotores de permeação e conseguindo transportar compostos hidrofílicos, lipofílicos e anfílicos [38, 39].

Os fosfolípidos, bastante utilizados na preparação de lipossomas têm um formato cilíndrico com uma cabeça polar (hidrofílica) e duas caudas apolares (hidrofóbicas). Em meio aquoso, as

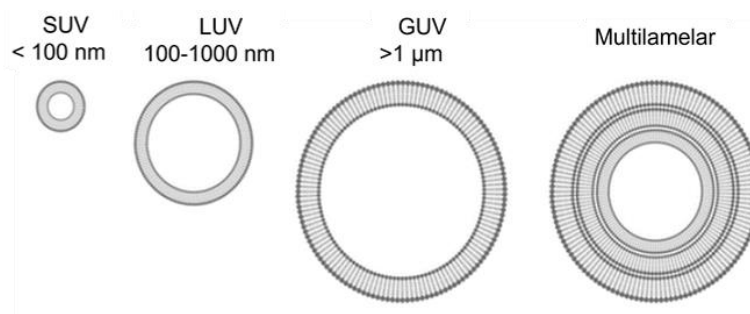
moléculas organizam-se ficando as duas caudas apolares direcionadas para dentro e a cabeça polar orientada para fora, interagindo com o meio aquoso. A este processo chama-se formação espontânea de lipossomas (Figura 3) [40].



**Figura 3.** Formação de lipossomas [38].

Devido à sua estrutura vesicular os lipossomas assemelham-se às biomembranas com a vantagem de serem um sistema simples e de composição controlada. Os estudos recorrendo aos lipossomas possibilitam uma análise do comportamento de fase da membrana, bem como processos da mesma tais como fusão membrana, reconhecimento de moléculas, adesão celular, trânsito membrana e formação de poros. Por isso são amplamente usados como modelos miméticos das biomembranas, tendo um papel preponderante na elucidação das propriedades das biomembranas [41, 42].

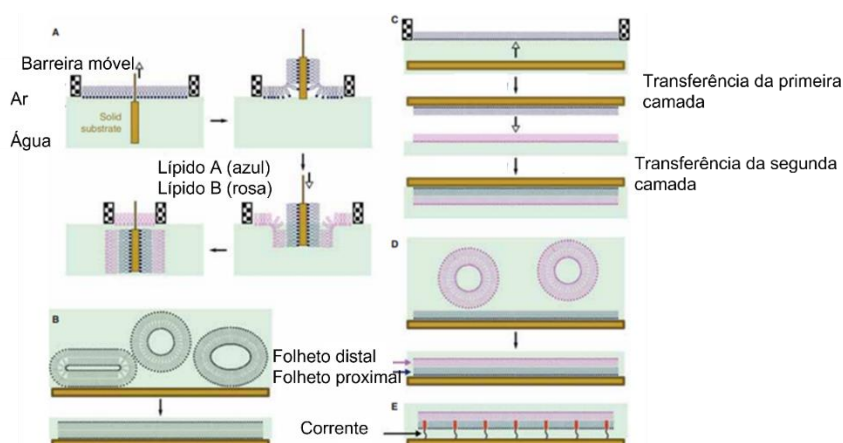
Os lipossomas podem ser divididos em dois grupos tendo em conta o seu tamanho e o número de bicamadas que os constituem: vesículas multilamelares (do inglês "*Multilamellar vesicles*") e vesículas unilamelares (Figura 4). Tradicionalmente, uma estrutura multilamelar é formada por bicamadas fosfolipídicas concêntricas separadas por meio aquoso e compostas por várias vesículas unilamelares de dimensões inferiores. As vesículas unilamelares são divididas em três tipos: (i) GUVs (do inglês "*Giant Unilamellar Vesicles*") com tamanhos acima de 1  $\mu\text{m}$  (ii) LUVs (do inglês "*Large Unilamellar Vesicles*") com dimensões entre 100-1000 nm; (iii) SUVs (do inglês "*Small Unilamellar Vesicles*") com dimensões abaixo dos 100 nm [43].



**Figura 4.** Classificação dos lipossomas relativamente ao seu tamanho e número de camadas [43].

## 2.8. Bicamadas lipídicas em suporte sólido

As SLBs são um dos modelos biomiméticos mais populares usados no estudo da bioquímica de superfície [44]. São compostas por uma bicamada lipídica plana suportada por uma superfície sólida (como sílica oxidada, nanotubos de carbono, placas de vidro revestidas com polímeros ou micas [36, 26]) e possuem uma geometria relativamente simples mantendo assim mobilidade suficiente para a molécula lipídica e oferecem uma alta estabilidade em duas camadas [45]. Estes modelos biomiméticos podem ser preparados através de técnicas como fusão de vesículas, transferência da deposição de *Langmuir-Blodgett* seguida pela deposição de *Langmuir-Schaeffer* [45] ou até adsorção de misturas micelares (surfactantes micelares) [46]. As SLBs permitem a análise de interações com grupos de cabeça lipídica, prever o efeito de fármacos no comportamento de fase e a organização lateral molecular das bicamadas biológicas [44]. Como já referido, as SLBs podem ser obtidas com diferentes métodos que se encontram representados na Figura 5.



**Figura 5.** Métodos de preparação das SLBs [47]: (A) Método de *Langmuir-Blodgett*, (B) Método de fusão vesicular; (C) Método de *Langmuir-Schaeffer*; (D) Métodos híbridos; (E) Bicamadas com base em polímeros;

No método *Langmuir-Blodgett* o substrato sólido é desenhado através de uma monocamada de um lípido A e depois impulsionado através de outra monocamada contendo o lípido B, podendo originar uma camada assimétrica. Cada monocamada tem uma pressão superficial controlada, o que oferece grande controlo da composição da SLB. O método de fusão vesicular é o mais simples, mas não favorece a preparação de bicamadas assimétricas. No método de *Langmuir-Schaeffer*, monocamadas inteiras são transferidas para o substrato sólido sequencialmente. Os métodos híbridos podem combinar os métodos *Langmuir-Blodgett* ou *Langmuir-Schaeffer* com fusão vesicular e possibilitam que bicamadas assimétricas sejam preparadas *in situ* sendo ideais para realizar medições em SLBs imediatamente após a sua preparação. As bicamadas com base em polímeros consistem em moléculas anfifílicas ancoradas a um substrato por intermédio de um polímero (como por exemplo, o polietilenoglicol) e têm uma maior profundidade da camada de água entre a superfície proximal da bicamada e o suporte sólido [47].

## 2.9. Testes de alto rendimento

A utilização de modelos animais/celulares tem vindo a diminuir devido a elevados tempos de espera, elevados custos e proibições impostas pelo regulamento cosmético da União Europeia (EC 1223/2009) que banuiu a comercialização de cosméticos que, a certo ponto, para o seu desenvolvimento fossem submetidos a testes utilizando estes modelos. Também o regulamento REACH da UE (Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas) incita à procura e ao uso de alternativas a testes que utilizem modelos animais [48, 49]. Os testes de alto rendimento ou HTS (do inglês “*high throughput screening*”) surgem como alternativa aos testes únicos e de grande volume, apresentando vantagens para a descoberta de fármacos/compostos bioativos, nomeadamente aqueles que visam a administração na pele (tópica ou transdérmica). Além disso, neste projeto é utilizada uma plataforma microfluidica que pelas suas características de HTS será uma mais-valia para a avaliação de diferentes modelos biomiméticos da matriz lipídica do SC e da interação de compostos com estes modelos.

## 2.10. Microfluidica

A microfluidica é uma área relativamente recente que combina os princípios da física, química, biologia, dinâmica de fluidos, microeletrónica e ciência dos materiais [50]. É a ciência e tecnologia



de sistemas que processam e/ou manipulam pequenos volumes de fluidos ( $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros) através de canais com dimensões de dezenas a centenas de micrómetros [51]. Os sistemas microfluídicos, em comparação com os tradicionais ensaios *in vitro* à macro escala, fornecem uma representação mais realista das condições fisiológicas e patológicas de sistemas complexos para investigação fundamental e desenvolvimento de fármacos. De facto, os sistemas microfluídicos têm sido usados para modelar ambientes biológicos e mimetizar as complexas interações célula-célula e célula-microambiente encontradas em tecidos e órgãos biológicos; bem como alguns dos processos fisiologicamente relevantes relacionados com a absorção, distribuição, metabolismo e processos de eliminação (ADME), que podem ajudar a acelerar o desenvolvimento de fármacos e a reduzir a necessidade de testes em animais. Isto ocorre porque os sistemas microfluídicos têm a capacidade de controlar com precisão o microambiente fluídico, o que é especialmente relevante e representativo porque muitos processos biológicos ocorrem à escala micrométrica, coincidente com as dimensões do canal microfluídico [52, 53]. A microfluídica apresenta outras vantagens comuns aos sistemas HTS, como a sua facilidade de integração numa grande variedade de sistemas, o seu automatismo que minimiza a intervenção humana ("*sample to answer*"), o facto de requerer quantidades de amostra reduzidas e ainda a portabilidade dos dispositivos microfluídicos para a sua aplicação *in situ* [54, 55, 56, 57].

### **2.10.1. Fabrico de plataformas microfluídicas**

Tendo em conta que o objetivo da utilização da microfluídica neste projeto é a obtenção de um sistema HTS com um modelo lipídico do SC, apresentam-se seguidamente alguns materiais e métodos de fabrico que podem ser empregues para a produção destas plataformas.

### **2.10.2. Materiais utilizados para o fabrico de plataformas microfluídicas**

Um dos pontos iniciais e mais relevantes no fabrico das plataformas microfluídicas prende-se pela escolha do material correto para o seu fabrico. Aspetos como aplicação, função requerida e grau de integração são cruciais pois determinam tanto as propriedades inerentes da plataforma quanto as possíveis tecnologias de fabrico que podem ser utilizadas [58]. Ao escolher um material, características como flexibilidade, permeabilidade ao ar, condutividade elétrica, compatibilidade com solventes, transparência ótica e biocompatibilidade devem ser consideradas [59]. Outra

consideração importante é o custo, que deve ser mantido o menor possível para fabricar itens e dispositivos descartáveis de uso único que evitem a contaminação cruzada entre os ensaios. A Tabela 2 sumariza alguns dos materiais mais utilizados no fabrico de plataformas microfluídicas e ainda as suas vantagens e limitações.

**Tabela 2.** Materiais utilizados no fabrico de dispositivos microfluídicos [29, 30].

<b>Materiais</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
Silício	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compatibilidade química;</li> <li>- Termoestabilidade;</li> <li>- Facilidade de fabrico;</li> <li>- Propriedades semicondutoras;</li> <li>- Permite modificações de superfície.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevado custo;</li> <li>- Opacidade do silício, o que o torna incompatível para deteção ótica nas regiões do visível e ultravioleta.</li> </ul>
Vidro	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quimicamente inerte;</li> <li>- Termoestabilidade;</li> <li>- Isolamento elétrico;</li> <li>- Rigidez;</li> <li>- Biocompatibilidade;</li> <li>- Permite fácil funcionalização da superfície;</li> <li>- Excelente transparência ótica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apesar de ser um material pouco dispendioso, o fabrico de plataformas microfluídicas tem elevados custos e requer bastante tempo.</li> </ul>
Polímeros	<u>PDMS (do inglês "Polydimethylsiloxane")</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Barato;</li> <li>- Fácil de moldar;</li> <li>- Adequado para prototipagem;</li> <li>- Transparência ótica;</li> <li>- Permeabilidade a gases;</li> <li>- Biocompatibilidade;</li> <li>- Baixa autofluorescência;</li> <li>- Grande elasticidade.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A porosidade do PDMS torna-o um material com elevada capacidade de adsorção, no qual as moléculas se podem difundir;</li> <li>- Incompatível com solventes orgânicos (por exemplo hexano, tolueno e clorofórmio), pois as suas moléculas podem ser adsorvidas ao PDMS;</li> </ul>
	<u>PMMA (do inglês "Polymethylmethacrylate")</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transparência ótica;</li> <li>- Boas propriedades mecânicas;</li> <li>- Permite modificação da superfície;</li> <li>- Bom para prototipagem em pequena escala de produção.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa permeação a gases;</li> <li>- Rigidez dificulta o fabrico de plataformas funcionais.</li> </ul>
	<u>Polímeros perfluorados: Teflon PFA (do inglês "Perfluoroalkoxy"), Teflon FEP (do inglês "Perfluorinated ethylene-propylene") e PTFE (do inglês "Polytetrafluoroethylene")</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Termoprocessabilidade;</li> <li>- Inércia química;</li> <li>- Compatibilidade com solventes orgânicos;</li> <li>- Transparência ótica;</li> <li>- Permeabilidade moderada a gases;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altas temperaturas de fusão;</li> <li>- Elevada toxicidade.</li> </ul>

<b>Materiais</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
Resinas epóxi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Material termofixo;</li> <li>- Maior estabilidade em altas temperaturas;</li> <li>- Resistência química;</li> <li>- Transparência ótica;</li> <li>- Resolução elevada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevado custo.</li> </ul>
Hidrogéis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Redes tridimensionais altamente porosas de cadeias poliméricas hidrofílicas que permitem a difusão de pequenas moléculas e biopartículas;</li> <li>- Biocompatibilidade;</li> <li>- Baixa citotoxicidade;</li> <li>- Biodegradabilidade;</li> <li>- Tamanho dos poros controlável;</li> <li>- Alta permeabilidade.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manter a integridade do dispositivo é bastante desafiante e pode limitar o seu uso a longo prazo.</li> </ul>

De seguida será dado especial ênfase ao fabrico de estruturas microfluídicas recorrendo ao PDMS (elastómero amplamente usado em microfluídica pelas propriedades e vantagens referidas na Tabela 2) e à obtenção de réplicas das mesmas através de moldes fabricados em SU-8 (resina fotossensível) recorrendo à técnica de fotolitografia suave, materiais e técnica de fabrico utilizados neste trabalho.

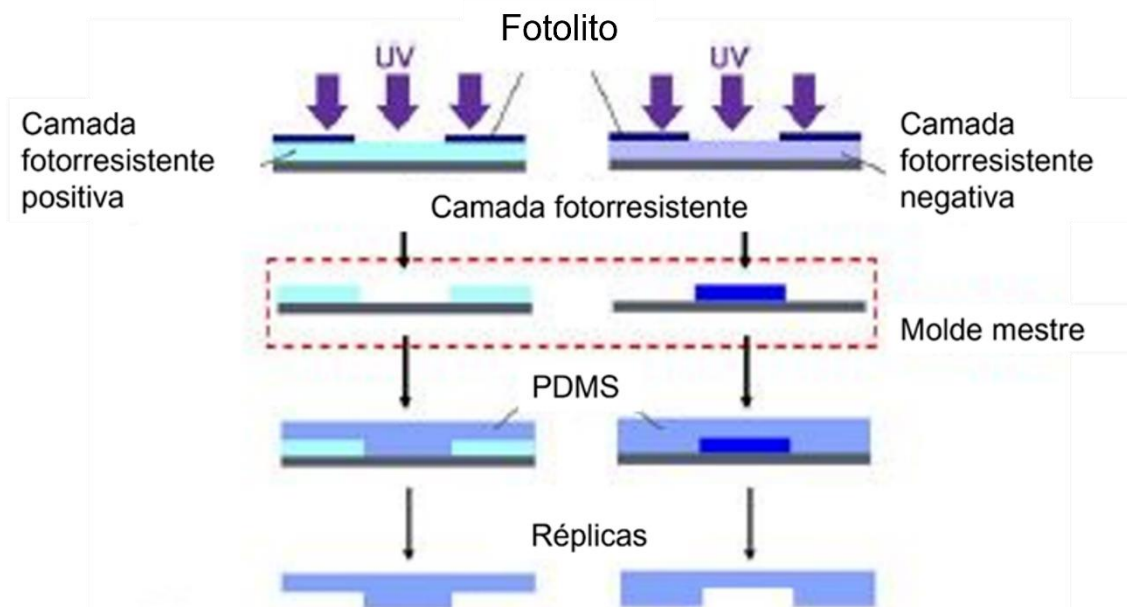
### **2.11. Fabrico de plataformas microfluídicas em Polidimetilsiloxano por fotolitografia suave**

Para a criação rápida de réplicas de plataformas microfluídicas de materiais elastoméricos como o PDMS, a abordagem de fotolitografia suave é comumente utilizada [60]. Esta técnica permite a microfabricação de estruturas na ordem dos micrómetros, com diferentes formas e tamanhos.

A técnica de fotolitografia suave recorre, em primeiro lugar à padronização de um material fotossensível, neste projeto o SU-8, que quando exposto a um tipo específico de radiação, permite a obtenção de moldes. Para a padronização do material utiliza-se um fotolito, colocado entre o material e a radiação (fotolitografia), de forma a controlar as áreas expostas à radiação [61], conforme apresentado na Figura 6.

Os fotolitos são desenhados recorrendo ao desenho computadorizado (CAD, do inglês "computer aided design") e posteriormente impressos comercialmente. É nos fotolitos que estão impressos os padrões bidimensionais pretendidos nos moldes em SU-8 (espelhos do que serão as estruturas em PDMS). A transferência dos padrões desejados é assegurada pela incidência da luz UV no

material fotossensível que promove a sua polimerização e cria uma elevada densidade de ligações cruzadas neste material [62]. Este é um passo crucial na microfabricação de estruturas microfluídicas.



**Figura 6.** Processo da fotolitografia suave: obtenção de moldes em resina fotossensível por fotolitografia e PDMS por moldagem por réplica [46].

As áreas não protegidas pelo fotolito reagem de forma diferente daquelas que se encontram protegidas, dependendo do tipo de material fotossensível. As áreas desprotegidas de materiais fotossensíveis positivos desintegram-se em solventes orgânicos e podem ser removidas, enquanto as áreas expostas de materiais fotossensíveis negativos, como o caso do SU-8, formam uma estrutura em rede e tornam-se insolúveis [63]. Os moldes obtidos são, de seguida, utilizados para a obtenção das estruturas em PDMS por moldagem por réplica.

De seguida, será descrito de forma mais detalhada o material fotossensível utilizado neste projeto que servirá como “molde mestre” (a resina baseada em epóxi negativa SU-8) para a obtenção de moldes reutilizáveis, padronizados e replicados de PDMS. A utilização deste material possibilita a obtenção dos canais microfluídicos com espessura/altura controláveis.

## 2.12. Material fotossensível: SU-8

Nos últimos anos, a resina SU-8 tem vindo a ser utilizada numa variedade de aplicações incluindo a construção de microcanais para plataformas microfluídicas e *lab-on-a-chip* [64] e como

componente estrutural em dispositivos MEMS (do inglês “*micro-electro-mechanical systems*”) [65, 66, 67]. A SU-8 é uma resina baseada em epóxi negativa muito utilizada para a construção de microestruturas, com baixo custo e de fácil processamento [68] e possui características como fotossensibilidade e transparência à luz visível que permitem a sua padronização por fotolitografia de raios UV e boa detecção por sistemas óticos. É também um material biocompatível, mecânica e quimicamente estável/inerte [65, 62].

Devido a todas estas propriedades de interesse, a resina SU-8 padronizada, resultante da fotolitografia, é utilizada como um “molde mestre” para a réplica do respetivo padrão em materiais elastoméricos, como é o caso do PDMS (descrito no próximo ponto).

### **2.13. Material elastomérico: PDMS**

O PDMS é um elastómero do grupo dos siloxanos que apresenta propriedades muito interessantes para o desenvolvimento de microestruturas com vários tipos de aplicações na área da microfluídica [69, 70]. Este permite o fabrico de estruturas à microescala com alta-fidelidade e reprodutibilidade, por métodos de moldagem por réplica. Algumas das suas vantagens são o seu baixo custo, fácil manuseamento, biocompatibilidade, elasticidade, permeabilidade e transparência ótica nos intervalos de 290-1100 nm. Além disso, possui facilidade de ligação a outros materiais, como é o caso do vidro, ou estruturas de PDMS, boa estabilidade térmica e baixa tensão superficial. Para além disto é térmica e eletricamente isolante, e quimicamente inerte [71].

A superfície do PDMS é hidrofóbica devido aos grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), sendo que a mesma pode ser modificada recorrendo, por exemplo, a tratamento com plasma de oxigénio que induz a oxidação da superfície tornando-a hidrofílica [72].

De um modo geral, ao longo dos últimos pontos foram apresentados os materiais empregues para a obtenção de plataformas microfluídicas com características HTS e a forma como estas foram desenvolvidas para satisfazer as condições necessárias à avaliação dos diferentes modelos biomiméticos da matriz lipídica do SC e a interação destes com os compostos bioativos a testar.

## **CAPÍTULO 3**

---

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Materiais utilizados

Na Tabela 3 estão sumarizados todos os instrumentos e reagentes utilizados no desenvolvimento deste projeto.

**Tabela 3.** Lista de reagentes e instrumentos utilizados ao longo do projeto.

Reagentes		Instrumentos	
Designação	Empresa fabricante	Designação	Empresa fabricante
Ácido cítrico	<i>Sigma Aldrich</i>	Agitador magnético	<i>MSH 300, BOECO</i>
Ácido clorídrico	<i>Sigma Aldrich</i>	Balança analítica	<i>Denver instruments</i>
Cafeína	<i>Sigma Aldrich</i>	Banho de ultrassons	<i>Branson ultrasonics</i>
Cloreto de potássio	<i>May and Baker</i>	Banho termostatzado	<i>VWR</i>
CHOL	<i>Avanti Polar Lipids</i>	Canais microfluídicos	<i>CMEMS</i> (do inglês “ <i>Centre for Microelectrome-chanical Systems</i> ”), UMinho
Diclofenac	<i>Sigma Aldrich</i>	Célula de Franz	<i>PermeGear</i>
DPPC (do inglês “ <i>Dipalmitoylphosphatidylc holine</i> ”)	<i>Avanti Polar Lipids</i>	Dipcell	<i>Malvern Instruments Ltd.</i>
Etanol absoluto	<i>Fisher Chemical</i>	Drop Shape Analysis System DSA100	<i>Krüss Scientific</i>
Fosfato de potássio	<i>Sigma Aldrich</i>	Espectrofotómetro de varrimento UV-3101PC UV-Vis-NIR	<i>Shimadzu Corporation</i>
Hidróxido de sódio	<i>Sigma Aldrich</i>	Extrusor Lipex	<i>Northern Lipids Inc.</i>
Kit Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit (base do pré-polímero e agente de cura do PDMS)	SU-8 100, <i>MicroChem</i> ; SU-8 Developer, <i>Microchem</i> ;	Filtros de membrana de policarbonato	<i>Whatman</i>
PDMS (do inglês “ <i>Poly(dimethylsiloxane)</i> ”)	<i>Dow Chemical Company</i>	Lâmina de vidro (26×76 mm)	<i>LabBox</i>
PVA (do inglês “ <i>Poly (Vinyl alcohol)</i> ”)	<i>AlfaAesar</i>	Filtros de membrana de polissulfona (Tuffryn®)	<i>Pall</i>
Testosterona	<i>Sigma Aldrich</i>	pHmetro de bancada 691	<i>Metrohm</i>
Tetraborato de sódio	<i>Sigma Aldrich</i>	Vórtex	<i>lhx Instruments</i>
Tris (do inglês “ <i>tris(hydroxymethyl)amino methane</i> ”)	<i>Merck</i>	Spin-coater	<i>Spin-coater Polos 200</i>

### 3.2. Determinação *in silico* das propriedades físico-químicas dos compostos

A descoberta e desenvolvimento de fármacos ou outros compostos bioativos tornou-se inconcebível sem a ajuda de métodos computacionais que permitam prever e analisar as suas propriedades físico-químicas, bem como a sua estrutura molecular e o seu comportamento biológico. Neste sentido, *in silico* é a designação atribuída à previsão teórica das propriedades dos compostos que permite ajudar a estabelecer uma correlação entre testes *in vitro* e *in vivo*, sendo ainda um auxiliar precioso no desenvolvimento de formulações [73]. Neste projeto os compostos-modelo (cafeína, diclofenac e testosterona) foram analisados *in silico* tendo sido possível prever propriedades tais como: a estrutura molecular, a distribuição de microespécies e pKa, o perfil de log D e log P e ainda, a sua análise elementar.

#### 3.2.1. Estrutura molecular

A estrutura molecular dos compostos é, sem dúvida, um parâmetro importante uma vez que determina a absorção e orientação dos compostos nas biomembranas. Para além disso, a estrutura molecular é determinante na forma como os compostos ultrapassam as barreiras cutâneas, bem como na escolha e desenvolvimento de uma formulação que funcionará como veículo para os compostos e os encaminhará para o lugar de atuação. A estrutura molecular dos compostos-modelo foi desenhada recorrendo ao módulo MarvinSketch® do *software* da Chemaxon®.

#### 3.2.2. Grau de ionização e pKa

O pKa, cologaritmo da constante de acidez (Ka), pode ser relacionado com o pH através da relação de Henderson-Hasselbalch (Equação 1).

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

Em que  $[A^-]$  representa a concentração de moléculas do fármaco que se encontram no estado ionizado e  $[HA]$  representa a concentração de moléculas do fármaco não ionizado. Por observação da equação anterior é possível perceber que o valor de pH é igual ao valor de pKa quando a razão  $[A^-]/[HA]=1$ . Ou seja, o pKa define-se como o valor de pH ao qual 50% das moléculas de um



composto se encontram no estado ionizado e 50% se encontram no estado neutro ou não ionizado [74].

Posto isto, através do pKa do composto é possível: (i) prever o grau de ionização do composto a diferentes valores de pH e estimar a sua absorção durante o seu percurso no organismo; (ii) entender a ligação do composto a proteínas plasmáticas bem como ao seu alvo terapêutico e (iii) antever a disponibilidade do composto para participar em reações biológicas [75, 76]. A determinação do valor de pKa dos compostos permite ainda compreender determinadas interações estabelecidas entre o composto e os componentes da formulação, sendo, por isso, um importante fator em estudos de pré-formulação [77, 78, 79].

### 3.2.3. Coeficientes de distribuição e de partição

Os compostos com grupos ionizáveis existem numa solução como uma mistura de diferentes formas iónicas, não iónicas (sem carga e eletricamente neutras) ou ainda zwitteriónicas (com igual número de cargas positivas e negativas e, portanto, eletricamente neutras). A ionização desses grupos, isto é, a proporção das formas iónicas e neutras, varia com o pH.

Traçando o perfil do coeficiente de distribuição ( $\log D$ ) e do coeficiente de partição ( $\log P$ ) no módulo MarvinSketch® do *software* da Chemaxon® é possível determinar a lipofilicidade de um composto que se traduz na razão entre a afinidade desse composto para um meio lipídico/orgânico ou para a água. O  $\log D$  indica a distribuição de um dado composto entre uma fase lipídica/orgânica e uma fase aquosa a um determinado valor de pH (ao qual as moléculas se podem encontrar no estado ionizado ou neutro) enquanto o  $\log P$  indica a partição do composto a um pH em que todas as moléculas deste composto se encontram na forma neutra. Entre as formas ionizadas e não ionizadas de uma molécula é sabido que as mais solúveis em água (hidrofilicas) são as formas ionizadas, enquanto as formas mais solúveis nas fases lipídicas (lipofilicas) são as formas neutras. Por outro lado, quanto mais lipofílica uma molécula, mais esta se dissolve na fase lipídica/orgânica e conseqüentemente maior o  $\log D$  e o  $\log P$  e maior a sua capacidade de distribuição nas membranas biológicas.

No *software* da Chemaxon®, o cálculo destes dois parâmetros de avaliação da lipofilicidade tem como base o método descrito por Viswanadhan *et al.* [80] que tem em conta o efeito da concentração de contra-íões.

### 3.2.4. Análise elementar

O módulo MarvinSketch® do *software* da Chemaxon® permite calcular descritores básicos da composição elementar das moléculas dos compostos tais como: o número de átomos, a composição atômica ou peso molecular. Estes descritores têm grande importância biofísica, pois influenciam o mecanismo de difusão molecular ao longo das barreiras cutâneas [81]. Por exemplo, vários estudos revelam que o transporte de compostos bioativos através das barreiras cutâneas decresce com o aumento do peso molecular dos compostos [3, 82, 83].

## 3.3. Doseamento espectrofotométrico pelo método da curva de calibração

### 3.3.1. Preparação das soluções-padrão

Numa balança analítica foram feitas pesagens rigorosas de cada um dos compostos e transferidos os pós para três balões volumétricos onde se fez o volume de 5,00 mL com água ultrapura de forma a obter soluções-stock com concentrações de  $1,01 \times 10^{-3}$  M de cafeína,  $1,00 \times 10^{-4}$  M de diclofenac e  $1,04 \times 10^{-3}$  M de testosterona. A partir destas soluções-stock procedeu-se à diluição rigorosa em balões volumétricos de 5,00 mL para obter soluções padrão de concentrações crescentes:  $1,00 \times 10^{-4}$  M a  $4,00 \times 10^{-5}$  M para a cafeína;  $2,04 \times 10^{-5}$  M a  $4,12 \times 10^{-5}$  M para o diclofenac e  $1,00 \times 10^{-4}$  M a  $1,00 \times 10^{-5}$  M para a testosterona.

### 3.3.2. Obtenção das retas de calibração por espectroscopia UV-Visível

Quando um feixe de radiação monocromática atravessa um meio absorvente a quantidade de luz absorvida depende da concentração das espécies absorventes ( $c$ , em M), do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ , em  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) da espécie absorvente e do percurso ótico da radiação no interior da amostra ( $l$ , em cm). Efetuando leituras espectrofotométricas numa gama adequada de comprimentos de onda obtém-se informação sobre onde e quanto é que a espécie a dosear absorve. À representação da absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente ( $\lambda$ , nm) chama-se espectro de absorção. Este espectro permite a identificação e a determinação quantitativa de substâncias químicas, o estudo de cinéticas de reações em solução, a determinação do grau de pureza de um composto, entre outros [84].

A concentração de fármaco ou composto bioativo e a absorvância (Abs) têm uma relação de proporcionalidade direta, pois quanto maior a concentração de espécie a dosear na amostra, maior a absorvância dessa mesma amostra. Esta relação de proporcionalidade direta é verificada pela lei de *Lambert-Beer* descrita na equação seguinte:

$$Abs = \varepsilon \times l \times c$$

#### Equação 2

A lei de *Lambert-Beer* é, portanto, vulgarmente usada para a determinação de  $\varepsilon$  ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ), medindo a Abs correspondente a várias concentrações do analito no mesmo percurso ótico. Para isso traçaram-se espectros de absorção das soluções-padrão num espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC, entre 200 e 500 nm, usando cuvetes de quartzo de volume reduzido (1 mL) com percurso ótico de 1 cm. A obtenção de valores exatos de  $\varepsilon$  ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ) deve ter em conta os desvios à linearidade da absorvância com a concentração. Estes desvios ocorrem para concentrações superiores a 0,01M e resultam da variação do  $\varepsilon$  ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ), provocada pelas interações entre nuvens eletrónicas de espécies absorventes que estejam muito próximas em soluções altamente concentradas. Uma outra causa de desvios à lei de *Lambert-Beer* é a variação do  $\varepsilon$  ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ) com o índice de refração do meio que, por sua vez, depende da concentração da espécie absorvente. As retas de calibração ( $y=mx$ ) devem, portanto, ser traçadas para uma gama de concentrações de analito onde se verifique proporcionalidade entre Abs (valores de y) e concentração (valores de x) e que esta proporcionalidade possa ser traduzida por um ajuste linear cujo declive, m corresponde ao valor de  $\varepsilon$  ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ).

### 3.3.3. Validação do método analítico

Para assegurar a validação de um método analítico e a relevância estatística dos seus resultados há certos parâmetros, descritos pelo guia da *International Conference on Harmonization* (ICH) que devem ser tidos em conta [85]. Assim, para validar o doseamento espectrofotométrico dos compostos-modelo pelo método da curva de calibração, procedeu-se à avaliação dos seguintes parâmetros:

**Intervalo de determinação** – Corresponde ao intervalo de concentrações de cada um dos compostos-modelos usadas para a construção da reta de calibração.

**Linearidade** – A linearidade do método analítico é a sua capacidade (dentro do intervalo de determinação) para obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra [86]. Neste caso a linearidade do método foi verificada no intervalo de concentrações para o qual os compostos-modelo apresentam uma Abs diretamente proporcional à sua concentração. A linearidade é verificada graficamente através de métodos estatísticos, designadamente pela análise da regressão linear através do método dos mínimos quadrados. Segundo este método, o coeficiente de correlação (R) deve apresentar um valor igual ou superior a 0,99 e a interceção com o eixo dos y não deve ser significativamente diferente de zero [87]. O ajuste e análise da regressão linear foram realizados com recurso ao *software* OriginLab®.

**Limite de deteção (DL)** – corresponde ao valor mais baixo de analito numa amostra que pode ser detetado sem ser necessariamente quantificado como um valor exato e é dado pela seguinte equação [8]:

$$DL = (3,3 \times \sigma)/S$$

**Equação 3**

Em que  $\sigma$  é o desvio padrão da interceção da regressão linear com o eixo dos y e S representa o declive da reta de calibração.

**Limite de quantificação (QL)** – diz respeito ao valor mais baixo de analito que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis e é dado pela seguinte equação [86]:

$$QL = (10 \times \sigma)/S$$

**Equação 4**

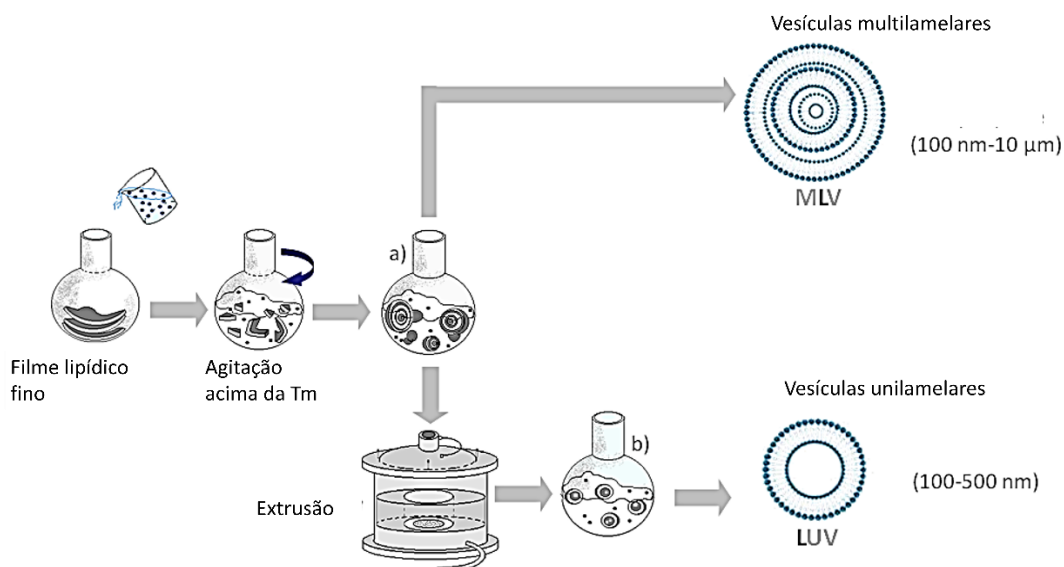
**Precisão** – A precisão mede o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de uma amostragem múltipla e é geralmente expressa como coeficiente de variação (%) de um conjunto de medições [86].

### **3.4. Preparação modelos miméticos lipídicos em dispersão: Lipossomas**

#### **3.4.1. Preparação de lipossomas unilamelares**

A preparação dos lipossomas foi feita pelo método de hidratação do filme lipídico seguida de extrusão de forma semelhante ao descrito na literatura [88]. Para preparar lipossomas com

concentrações de  $1 \times 10^{-2}$  M procedeu-se à adição de volumes definidos das soluções stock lipídicas a um tubo de vidro com fundo redondo. Como as soluções stock lipídicas têm a mesma concentração, o volume de solução de DPPC deve ser o dobro do volume de CHOL, para, no caso dos lipossomas DPPC: CHOL, obter uma proporção molar de DPPC: CHOL (2:1). De seguida, de modo a obter um filme lipídico fino (para garantir uma distribuição homogénea), procedeu-se à evaporação total do solvente orgânico (etanol) sob uma corrente constante de azoto e em contínua rotação. Após obtenção do filme lipídico procedeu-se à sua hidratação com um volume previamente definido de solução tampão de pH 5.5 aquecida a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) dos lípidos, no caso  $50\text{ }^\circ\text{C}$  ( $T_m$  do DPPC e da mistura DPPC: CHOL (2:1) ronda os  $41\text{ }^\circ\text{C}$ ) [89]. A dispersão resultante foi submetida a ciclos alternados de banho termostatizado a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  e agitação vigorosa no vórtex durante cerca de 10 min, com o intuito de garantir a remoção completa do filme lipídico das paredes do tubo. No final deste processo, obteve-se uma dispersão de MLVs (do inglês "*multilamellar vesicles*"). Finalmente, e de forma a obter LUVs (do inglês "*large unilamellar vesicles*") com diâmetros entre os 100-200 nm, a dispersão de MLVs foi extrudida por um extrusor Lipex® (Northern Lipids, Inc) termostatizado a uma temperatura superior à  $T_m$  do lípido ou mistura de lípidos ( $50\text{ }^\circ\text{C}$ ) e sob uma pressão de 6-8 bar. De modo a garantir a homogeneidade e uniformidade dos LUVs produzidos, foram utilizadas membranas de policarbonato Nucleopore Track-Etched® (Millipore, SAS) com poros de distintos tamanhos sendo realizadas 10 extrusões por uma membrana de 200 nm seguidas de 10 extrusões por uma membrana de 100 nm. Antes da utilização, as suspensões de LUVs foram equilibradas à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 min. Esta metodologia encontra-se esquematizada na Figura 7.



**Figura 7.** Método de hidratação do filme lipídico fino seguido de extrusão. O processo a) resulta na obtenção de vesículas multilamelares (MLVs) e o processo b) resulta na obtenção de vesículas unilamelares (LUVs).

### 3.5. Caracterização físico-química e biofísica dos lipossomas unilamelares

#### 3.5.1. Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O estudo da distribuição de tamanho dos nanossistemas na dispersão e a análise do potencial zeta com base, respectivamente na dispersão dinâmica de luz (do inglês “*dynamic light scattering*”, DLS) e na dispersão eletroforética de luz (do inglês “*electrophoretic light scattering*”, ELS) são técnicas essenciais para a caracterização físico-química dos nanossistemas [90].

A dispersão dinâmica de luz (DLS), também conhecida como espectroscopia de correlação fotônica, é uma técnica que permite determinar o coeficiente de difusão de nanossistemas, num determinado solvente. Quando um feixe de luz monocromática incide sobre uma dispersão de nanossistemas, ocorre dispersão da luz em todas as direções. Como os nanossistemas em dispersão estão em constante movimento (movimentos brownianos), a distância entre eles muda constantemente com o tempo. Portanto, o feixe de luz incidente é disperso, mas a taxa de dispersão varia com o tempo. Assim, as flutuações de luz detetadas podem ser correlacionadas com a escala de tempo de movimento dos dispersores de luz, isto é, é possível calcular o coeficiente de difusão ( $K_d$ ) dos nanossistemas. A relação entre  $K_d$  e o tamanho dos nanossistemas (determinado como o seu raio hidrodinâmico, i.e., o raio do nanossistema quando este se encontra numa dispersão aquosa) é dada pela equação de *Stokes-Einstein* (Equação 5) [90, 91].

$$R_h = \frac{KT}{6\pi\eta K_d}$$

**Equação 5**

Em que  $R_h$  é o raio hidrodinâmico,  $K$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura (em Kelvin), e  $\eta$  é a viscosidade do solvente dispersante. Uma dispersão de nanossistemas que apresenta uma homogeneidade de tamanhos diz-se monodispersa, em oposição a uma dispersão de nanossistemas com uma grande variedade de tamanhos que se designa polidispersa. O índice que permite aferir a homogeneidade de tamanhos dos nanossistemas de uma dispersão é designado por índice de polidispersão (PDI, do inglês “*polydispersity index*”).

Nas técnicas de dispersão de luz, a mudança de frequência ou mudança de fase de um feixe de luz incidente numa dispersão de nanossistemas depende da mobilidade dos nanossistemas. Na técnica de DLS, o movimento browniano é o causador do movimento dos nanossistemas. Já na técnica de dispersão eletroforética de luz (ELS), um campo elétrico oscilante aplicado é quem desempenha esta função. A medição da luz dispersa é medida por um fotomultiplicador e a contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de variação da frequência ou mudança de fase, a partir do qual a mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) e, conseqüentemente, o potencial zeta dos nanossistemas pode ser calculado. O potencial zeta (também conhecido como potencial eletrocinético e normalmente medido em mV) de um nanossistema é estabelecido na superfície de qualquer nanossistema quando ele entra em contacto com um meio líquido. É, portanto, uma propriedade interfacial. Se um nanossistema entrar em contacto com um líquido, os grupos funcionais da sua superfície reagirão com o meio circundante. Esse processo resulta numa carga superficial, que atrai iões com cargas opostas (contra-iões). Esses contra-iões organizam-se espontaneamente numa dupla camada eletroquímica. Assim, ao nível da interface existe uma camada estacionária de iões imobilizados formada diretamente na superfície e uma camada externa difusa com iões que são menos atraídos pela superfície e têm a capacidade de se mover dentro dessa camada. O limite entre a camada estacionária e a camada difusa é caracterizada como o plano de corte e especifica qual parte da camada dupla eletroquímica contribui para a carga líquida total do nanossistema. Portanto, o potencial que está presente no plano de corte é definido como o potencial zeta.

Para caracterizar os LUVs de DPPC e DPPC: CHOL (2:1) ( $1,00 \times 10^{-2}$  M) na ausência ou presença dos bioativos ( $1,01 \times 10^{-3}$  M de cafeína;  $1,00 \times 10^{-4}$  M de diclofenac ou  $1,04 \times 10^{-3}$  M de

testosterona) em termos de tamanho (obtido pelo raio hidrodinâmico) e PDI colocou-se uma alíquota de LUVs ( $\approx 600-1000 \mu\text{L}$ ) em células descartáveis de polistireno (com a inserção do acessório DIP Cell<sup>®</sup> no caso das medidas ELS) e procedeu-se à análise de DLS e ELS, usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern<sup>®</sup> Instruments Ltd., UK). Todas as medidas foram realizadas em condições de temperatura controlada a  $25,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$  no dia da preparação. O tamanho e o PDI foram obtidos a partir do correlograma do *software* Zetasizer Nano ZS (Malvern<sup>®</sup>, UK), após análise dos cumulantes, conforme ISO 22412: 2017 [92]. O potencial-zeta foi obtido pela conversão da mobilidade eletroforética de acordo com o método de *Helmholtz-von Smoluchowski* [93].

### 3.5.2. Temperatura de transição de fase principal e cooperatividade

A  $T_m$  é outro parâmetro muito importante na caracterização biofísica de sistemas lipídicos, pois o seu estudo permite otimizar sistemas lipídicos que estejam em desenvolvimento para transporte e libertação de fármacos, bem como, estudar a interação fármaco-membrana quando os sistemas lipídicos são usados como modelos miméticos de membranas. Alterações nas propriedades das membranas como a sua estabilidade, permeabilidade ou fluidez podem ser intimamente relacionadas com alterações nas propriedades biofísicas dos lípidos que as compõe, nomeadamente alterações da  $T_m$  desses lípidos [94]. A  $T_m$  define assim uma temperatura à qual se dá uma passagem de uma fase lipídica mais ordenada (fase gel ou sólido-cristalina) para uma fase lipídica mais desordenada (fase fluida ou líquido-cristalina) [95]. Uma vez que as diferentes fases lipídicas apresentam diferentes propriedades de dispersão da luz [96], é possível, recorrendo à técnica de DLS e fazendo um estudo num intervalo de temperaturas determinar a  $T_m$  de sistemas lipídicos.

Para determinar a  $T_m$  de LUVs de DPPC e DPPC: CHOL (2:1), na ausência e na presença de compostos bioativos, procedeu-se da mesma forma descrita na secção anterior, no entanto, as medidas de DLS do tamanho hidrodinâmico e intensidade de luz dispersa foram efetuadas numa gama de 25 a 55  $^\circ\text{C}$  com intervalos de 1 $^\circ\text{C}$ . Para cada temperatura foram efetuadas 3 medidas com um tempo de estabilização de 1 min.

A intensidade de luz dispersa (dada pela taxa de contagens média, TCM) é correlacionada com a temperatura ( $T$ ), tal como ilustra a Figura 8, por aplicação de uma equação modificada de Boltzmann usando o módulo de ajuste não linear do *software* OriginLab<sup>®</sup> (Equação 6) [97].

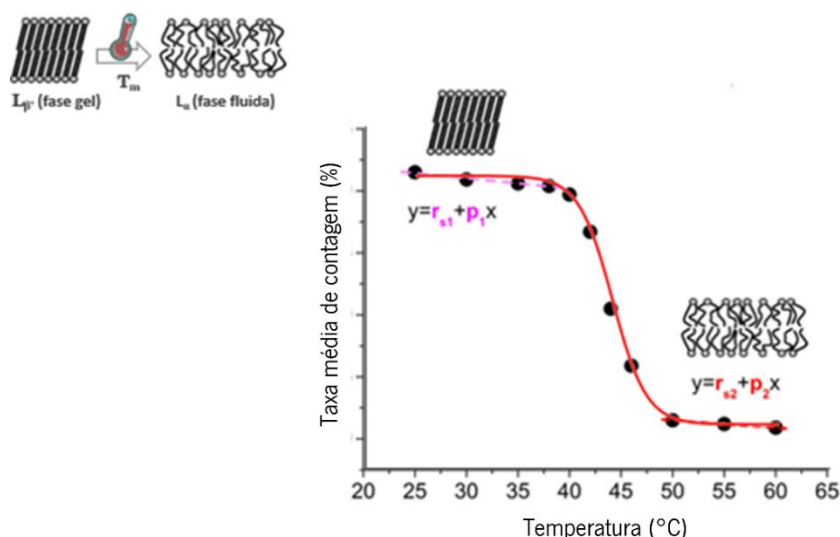


$$TCM = r_{s1} + p_1T + \frac{r_{s2} - r_{s1} + p_2T - p_1T}{1 + 10^B \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)}$$

**Equação 6**

Em que  $r_{s1}$  e  $p_1$  são respectivamente o declive e a ordenada na origem da tendência linear anterior à  $T_m$ ;  $r_{s2}$  e  $p_2$  correspondem ao declive e à ordenada na origem na tendência linear a temperaturas acima da  $T_m$  e  $B$  corresponde à cooperatividade do sistema. Deste ajuste é, portanto, possível determinar dois parâmetros:  $T_m$  e  $B$ .

$B$  é um parâmetro cujo valor permite avaliar homogeneidade da composição do nanossistema lipídico. Se o nanossistema é constituído por um único tipo de moléculas, ou se a mistura de moléculas que o constitui se encontra bem distribuída, estas transitarão de fase (da fase gel para a fase fluida) em simultâneo, pelo que o perfil sigmoide correspondente à transição de fase apresenta um decaimento abrupto. Por outras palavras, o intervalo no qual as fases lipídicas gel e fluída coexistem é muito diminuto. Uma transição de fase com um baixo valor de  $B$  apresenta um perfil sigmoide com um decaimento prolongado, o que indica que não existe uma homogeneidade das moléculas que constituem o nanossistema. Assim, algumas moléculas transitarão de fase a uma dada temperatura e outras a uma temperatura diferente, pelo que não existe uma temperatura de transição única, mas um intervalo de temperaturas durante o qual a transição ocorre. Neste caso, o intervalo no qual as fases lipídicas gel e fluída coexistem é mais alargado. Portanto,  $B$ , tal como a  $T_m$ , são parâmetros que podem indicar mudanças no sistema lipídico na presença de moléculas diferentes no sistema e sugerir alterações na biofísica das membranas. Uma variação nos valores destes parâmetros poderá sugerir a incorporação de um composto no meio lipídico e permite ainda concluir sobre a localização mais provável do composto.



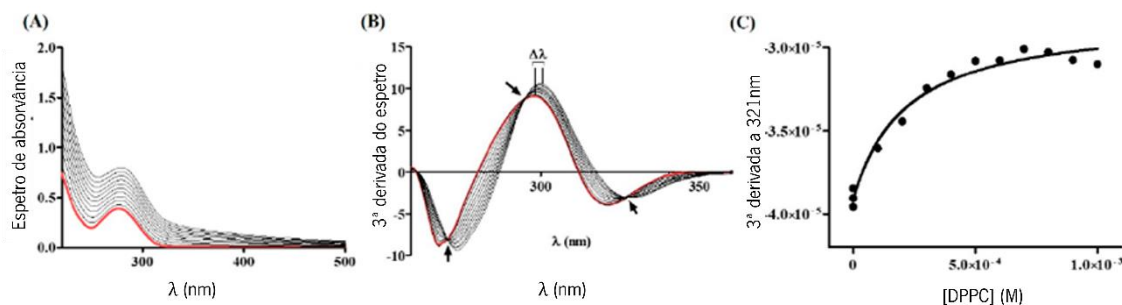
**Figura 8.** Figura exemplificativa de um ajuste sigmoide que correlaciona a taxa média de contagens ao longo da temperatura.

### 3.6. Determinação *in vitro* do coeficiente de distribuição

Tal como referido anteriormente o  $\log D$  é um parâmetro que caracteriza a distribuição de um dado composto entre uma fase lipídica e uma fase aquosa a um determinado valor de pH. Assim, para a determinação do  $\log D$  dos compostos em estudo nos modelos lipídicos miméticos de membranas é necessário proceder ao doseamento do composto quer na fase lipídica quer na fase aquosa. Recorrendo à técnica de espectroscopia derivativa UV-Vis é possível fazer a determinação do  $\log D$  sem ter de recorrer à separação de fases lipídica e aquosa, o que evita dificuldades como o controlo da temperatura, e também evita o facto desta separação de fases (recorrendo por exemplo a centrifugação e filtração) poder afetar o equilíbrio estabelecido entre os compostos e as fases lipídica e aquosa [98, 99].

A técnica de espectroscopia derivativa UV-Vis aplicada à determinação do  $\log D$  assenta no princípio de que quando um determinado composto se distribui nas membranas lipídicas (passa de um meio aquoso ou polar para um meio lipídico ou apolar) há uma mudança num parâmetro de absorção como o comprimento de onda máximo de absorção ou no coeficiente de absorvidade molar desse composto. Assim, os espectros de absorção de um composto que se distribui em modelos miméticos membrana/água são adquiridos para concentrações crescentes de modelo mimético, procedendo-se posteriormente à derivação dos espectros. A derivação dos espectros é essencial pois permite a eliminação de interferências espectrais provocadas pela difusão de luz dos modelos miméticos, permite uma deteção mais apurada das características espectrais e aumenta a

resolução das bandas de absorção [100]. Seguidamente à derivação dos espectros de absorção procede-se à representação gráfica dos valores máximos ou mínimos da derivada dos espectros de absorção em função da concentração do modelo mimético lipídico. A Figura 9 (A) representa um exemplo do espectro de absorção de um composto e subsequente aplicação do método derivativo.



**Figura 9.** (A) Exemplo de um espectro de absorção de um determinado composto. (B) Terceira derivada do espectro de absorção e consequente eliminação das interferências espectrais. (C) Exemplo de um ajuste não linear aplicando a equação 7 aos valores da derivada de absorvância em função da concentração de lipídeo [99].

O ajuste destes dados é feito por aplicação de uma equação de ajuste não linear no *software* OriginLab®, permitindo obter o valor do coeficiente de distribuição (D) cujo logaritmo permite a determinação do log D [100]:

$$D\text{Abs}_{\text{total}} = D\text{Abs}_{\text{aquosa}} + \frac{(D\text{Abs}_{\text{membranar}} - D\text{Abs}_{\text{aquosa}}) \times D \times [\text{Modelo membranar}]}{1 + D \times [\text{Modelo membranar}]} \quad \text{Equação 7}$$

Em que  $D\text{Abs}_{\text{total}}$ ,  $D\text{Abs}_{\text{membranar}}$ ,  $D\text{Abs}_{\text{aquosa}}$  são respetivamente o valor da derivada da absorvância do composto determinada espectralmente a um dado comprimento de onda, no sistema membrana/água (total), na fase membranar e na fase aquosa, respetivamente. [Modelo membranar] é a concentração (em M) do modelo lipídico utilizado.

Para a determinação do coeficiente de distribuição dos compostos bioativos (cafeína, diclofenac sódio e testosterona) em modelos membranares (LUVs de DPPC e de DPPC: CHOL (2:1)) foram preparadas suspensões contendo concentrações fixas de composto bioativo ( $8,00 \times 10^{-5}$  M para a cafeína;  $4,00 \times 10^{-5}$  M para o diclofenac e  $3,00 \times 10^{-5}$  M para a testosterona) e concentrações crescentes de LUVs ( $5,00 \times 10^{-5}$  M a  $2,50 \times 10^{-3}$  M para a cafeína;  $1,00 \times 10^{-4}$  M a  $3,00 \times 10^{-3}$  M para o diclofenac e  $5,00 \times 10^{-5}$  M a  $2,50 \times 10^{-3}$  M para a testosterona). As concentrações de compostos

bioativos foram escolhidas de forma a estarem contidas na zona linear das respectivas retas de calibração. Foram preparadas ainda referências contendo apenas as mesmas concentrações acima referidas de LUVs (sem composto bioativo) e controlos contendo apenas soluções aquosas de compostos bioativos na concentração já referida. Seguiu-se uma incubação durante 30 min das amostras, referências e controlos em banho termostaticado a uma temperatura de  $35\pm 1^\circ\text{C}$  de modo a permitir estabelecer a distribuição dos compostos nos modelos membranares e mimetizar a temperatura fisiológica no SC [101]. Após a incubação traçaram-se espectros de absorção num espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC, entre 200 e 400 nm, usando cuvetes de quartzo de volume reduzido (1 mL) com percurso ótico de 1 cm. Por fim procedeu-se à análise dos dados obtidos recorrendo à folha de cálculo desenvolvida em Excel “*Kp calculator*” [100] que permite a derivação dos espectros e ao *software* OriginLab® que permitiu ajustar, recorrendo à equação 7, os valores das derivadas a um dado comprimento de onda (em que a difusão de luz pelos sistemas lipídicos é eliminada) em função da concentração.

### 3.7. Determinação *in silico* e *in vitro* da permeação cutânea e fluxo máximo de permeação

A permeação de fármacos e outros compostos bioativos através da barreira do SC é definida pelo coeficiente de permeabilidade ( $\log S_p$ ), que relaciona o gradiente de concentração do composto (descrito pela sua distribuição,  $\log D$ , ao nível da matriz lipídica que compõe o SC) e o peso molecular desse fármaco ou composto bioativo (PM), de acordo com a seguinte equação:

$$\log S_p(\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}) = -2,7 + 0,71 \times \log D - 0,0061 \times PM \quad \text{Equação 8 [147]}$$

Substituindo na equação acima,  $\log D$  pelos valores de coeficiente de distribuição obtidos *in silico*, ou *in vitro* para cada um dos compostos bioativos estudados (cafeína, diclofenac e testosterona), é possível determinar o coeficiente de permeabilidade para cada um destes compostos. O coeficiente de permeabilidade poderá assim ser utilizado para calcular teoricamente o fluxo máximo de permeação ( $J_{\text{máx}}$ ) dos compostos através da seguinte equação:

$$J_{\text{máx}}(\text{mg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}) = S_p \times C_{\text{sat}} \text{ em } H_2O \quad \text{Equação 9 [147]}$$

Em que  $C_{sat}$  refere-se à máxima concentração de composto (em  $mg/cm^3$ ) que se consegue solubilizar em água.

A determinação experimental do  $J_{m\acute{a}x}$  foi realizada *in vitro* com recurso a células de difusão de Franz (V-Series Stirrers for Franz Cells; PermeGear, USA). Estas células de difusão são constituídas por um compartimento dador onde se coloca o composto em estudo e por um compartimento recetor que contém o meio de dissolução. Para além disso, a separar os dois compartimentos é colocada uma membrana com o objetivo de mimetizar a membrana epitelial. A utilização de membranas sintéticas (e.g. silicone, celulose ou polissulfona) neste tipo de ensaios é considerada adequada pela FDA para a avaliação do desempenho terapêutico de formulações tópicas [102]. Apesar de não mimetizarem o ambiente lipídico natural, estas membranas permitem retirar ilações acerca da partição e difusão de compostos bioativos [103].

O procedimento experimental consistiu então na adição de 400  $\mu L$  de uma solução aquosa de composto bioativo livre ( $1,54 \times 10^{-2}$  M de cafeína;  $6,75 \times 10^{-3}$  M de diclofenac e  $1,04 \times 10^{-5}$  M de testosterona) no compartimento dador e 5 mL de tampão universal (pH=5.5) no compartimento recetor. O sistema foi mantido a 37 °C utilizando um banho de água circulante continuamente homogeneizado com agitação magnética. Entre os compartimentos dador e recetor foi colocada uma membrana de polissulfona (Tuffryn®, Palls, EUA) com uma área de difusão de 0,64  $cm^2$ .

A diferentes tempos de ensaio (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0 e 24 h), foram retiradas alíquotas de 400  $\mu L$  do compartimento recetor (volume que foi sempre substituído por 400  $\mu L$  de tampão universal) procedendo-se à quantificação de cada composto pelo método de doseamento por espectrofotometria UV/Vis previamente validado.

Em função dos valores de  $J_{m\acute{a}x}$  teóricos (*in silico/in vitro*) ou experimentais (*in vitro*) é possível perceber se um determinado composto tem maior ou menor capacidade de permeação cutânea de acordo com a classificação esquematizada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Classificação da permeação cutânea de um composto em função do valor de fluxo máximo de permeação ( $J_{m\acute{a}x}$ ) [104].

$J_{m\acute{a}x}$ (mg/cm <sup>2</sup> /h)	Classificação da permeação cutânea
$2,78 \times 10^3$ a $6,64 \times 10^5$	Muito fraca
$1,07 \times 10^4$ a $9,79 \times 10^4$	Fraca
$1,18 \times 10^3$ a $7,76 \times 10^3$	Moderada
$1,03 \times 10^2$ a $7,53 \times 10^2$	Elevada
$1,14 \times 10^1$ a 1,38	Muito elevada

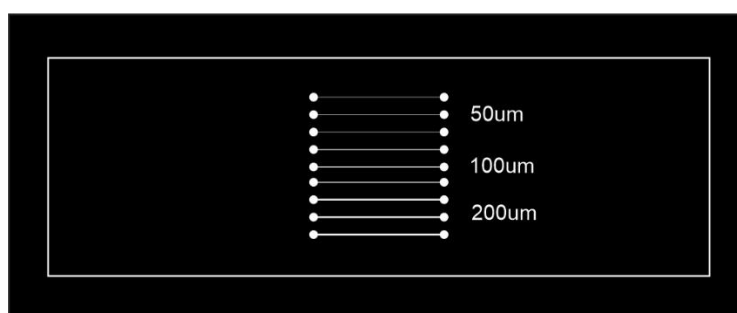
### 3.8. Determinação *in vitro* do coeficiente de distribuição com recurso a uma plataforma microfluídica

#### 3.8.1. Fabrico das estruturas microfluídicas

Como previamente descrito, moldes em SU-8 foram fabricados e utilizados para a obtenção de estruturas microfluídicas em PDMS. Os moldes em SU-8 consistem numa matriz de canais 3D com largura de 50, 100 e 200  $\mu\text{m}$ , comprimento de 15 mm e espaçadas por 2 mm. A altura/profundidade de 150  $\mu\text{m}$  é obtida através do controlo do tipo de SU-8 utilizado e parâmetros de processamento, como descrito na secção seguinte. O fabrico foi realizado no Centro CMEMS-UMinho, Departamento de Eletrónica Industrial da Universidade do Minho.

#### 3.8.2. Fabrico dos moldes em SU-8

A resina fotossensível SU-8 100 (*MicroChem*) foi utilizada para o fabrico de moldes em SU-8 com espessura de  $\sim 150 \mu\text{m}$ . Para o efeito, em primeiro lugar desenharam-se as estruturas pretendidas recorrendo ao programa AutoCad (versão experimental) para posterior impressão em fotolitos. Na Figura 10 está ilustrada uma representação gráfica do fotolito utilizado para o fabrico dos moldes em SU-8, que por sua vez irão dar lugar a estruturas em PDMS com canais com as mesmas dimensões, inclusive altura/profundidade.



**Figura 10.** Representação gráfica do fotolito para a produção dos moldes em SU-8 e posterior obtenção das estruturas microfluídicas em PDMS. As linhas representam os canais com larguras de 50, 100 e 200  $\mu\text{m}$  (3 réplicas de cada), comprimento de 15 mm e espaçadas de 2 mm. As entradas e saída apresentam um diâmetro de 1 mm.

O fabrico dos moldes em SU-8 requer vários passos e os parâmetros de processamento foram definidos adaptando o protocolo descrito em [64]. Resumidamente, pesou-se 1 g de SU-8 100

para cada lâmina de vidro (26×76 mm) previamente limpa (obtendo-se um total de 6 réplicas de moldes em SU-8, num total de 6 lâminas de vidro). De seguida, cada lâmina foi colocada num *spin-coater* seguindo dois ciclos. O primeiro ciclo tem como objetivo a dispersão da resina na lâmina de vidro e foi definida a uma velocidade de 500 rpm e aceleração de 300 rpm/s durante 7 s. O segundo ciclo define a espessura do filme, pelo que os parâmetros foram definidos a uma velocidade de 2500 rpm e aceleração de 300 rpm/s durante 30 s para a obtenção de uma estrutura final em SU-8 de aproximadamente 150 µm. Nos próximos passos, à exceção do processo de exposição à luz UV e aquando do processo de revelação, as amostras foram sempre mantidas no escuro recorrendo a uma simples tampa de alumínio. Deste modo, após o processo de deposição, as lâminas revestidas com SU-8 (e protegidas da luz) foram colocadas numa placa de aquecimento com o objetivo de evaporar o solvente gama-butirolactona (GBL) presente no SU-8 e assim promover um endurecimento e uma maior aderência ao substrato (*Prazitherm PZ28-2*). Este processo envolveu dois ciclos de temperatura, ambas a uma taxa de aquecimento controlada de 2,5°C/min de forma a reduzir a tensão induzida nos filmes de SU-8. O primeiro ciclo passou pelo aquecimento dos filmes até atingir 65°C durante 45 min enquanto no segundo passo a temperatura foi aumentada até atingir 95 °C durante 90 min (esses tempos incluem os tempos para atingir a temperatura desejada e os tempos expostos a essa mesma temperatura). Após arrefecimento, as lâminas foram expostas a luz UV com uma faixa de emissão entre os 347 e 377 nm recorrendo a 10 lâmpadas UV de 20 W, colocando os fotolitos na superfície de cada lâmina revestidas com SU-8 e recorrendo a um sistema de vácuo para garantir um máximo contacto entre os fotolitos e as amostras. Este passo permite formar um fotoácido nas zonas expostas que irá promover a polimerização do SU-8 exposto durante a próxima etapa de aquecimento. O tempo de exposição depende igualmente do tipo de SU-8 e da espessura desejada, tendo sido definido um tempo de 9 min, considerando as características dos moldes pretendidos. De seguida, procedeu-se a um novo processo de aquecimento, similar ao definido anteriormente de forma a reticular o SU-8 exposto a luz UV e torná-lo resistente a ação de solventes. Neste caso, os tempos foram de 23 min a 65 °C e 35 min a 95 °C a uma taxa de aquecimento de 2,5 °C/min. Por fim, as amostras foram imersas em solvente comercial da *MicroChem* sobre agitação magnética de forma a remover de forma eficiente e rápida as áreas não expostas à luz UV e assim obter os moldes em SU-8. O processo demorou 15 min e de seguida os moldes foram finalmente limpos com isopropanol (IPA) e secos com pistola de azoto.

### 3.8.3. Fabrico das estruturas microfluídicas em PDMS

Antes da preparação da solução de PDMS, foram criadas barreiras em cada lâmina contendo os moldes de SU-8 recorrendo a fita adesiva de alumínio rígida de forma a possibilitar a deposição da solução polimérica no seu interior.

De seguida, aproximadamente 5 g de solução de PDMS com uma razão agente de cura/base de 1:10 (*Ellsworth*) desgaseificada (com recurso a um sistema de vácuo fabricado no laboratório) foi vertida lentamente em cada lâmina de vidro. Após ficar homogeneamente distribuída, colocando as lâminas de vidro numa superfície plana durante 10 min, as amostras foram colocadas numa placa de aquecimento a 80 °C durante aproximadamente 1 h de forma a curar o PDMS. Por fim, após arrefecimento das amostras, foi utilizado um bisturi de forma a recortar o PDMS nas laterais e possibilitar a remoção das estruturas em PDMS dos moldes em SU-8. Após abrir as entradas e saídas dos canais microfluídicos em PDMS, as estruturas foram ligadas irreversivelmente em substratos de vidro com recurso a tratamentos de plasma com oxigénio (*Diener Zepto*). Para o efeito, as estruturas em PDMS e os substratos de vidro foram colocadas no interior de uma câmara de plasma, com as superfícies a ligar viradas para cima. A potência utilizada foi de 50 W sob uma pressão total de 80 Pa durante 45 s. Por fim retirou-se as amostras da câmara, colocou-se as superfícies de PDMS em contacto com as superfícies das lâminas de vidro e colocou-se numa placa de aquecimento a 80 °C durante 5 min de forma a maximizar a ligação irreversível entre ambas as superfícies.

### 3.9. Hidrofilização dos canais

Tal como referido no estado de arte, o PDMS é o material mais utilizado no fabrico de dispositivos microfluídicos, no entanto as suas propriedades hidrofóbicas constituem um desafio à formação de bicamadas lipídicas que requerem uma superfície hidrofílica para facilitar a sua formação. Posto isto, surgiu a necessidade de encontrar uma forma de modificar a superfície dos canais microfluídicos tornando-a hidrofílica. Com base na bibliografia optou-se por revestir a superfície dos canais microfluídicos com álcool polivinílico (PVA), um polímero hidrofílico adaptando a metodologia descrita em [105].

Inicialmente, fez-se uma passagem de água ultrapura pelos canais. Seguidamente preencheram-se os canais microfluídicos com uma solução de NaOH (0,5 M) preparada através da diluição da solução comercial em água ultrapura. Esta solução ficou a repousar nos canais durante 30 min.



Após este tempo, a solução de NaOH é retirada e é injetada novamente água ultrapura nos canais. De seguida, uma solução de PVA a 1% (w/w) previamente preparada no dia anterior foi injetada nos microcanais e deixada a repousar durante 10 min com a plataforma microfluídica à temperatura ambiente. Para a preparação da solução de PVA, 100 mg de PVA foram dissolvidos em 10 mL de água desionizada previamente aquecida a 90 °C e sob agitação magnética. Após os 10 min foi aplicada uma corrente de azoto e a plataforma microfluídica foi colocada no forno a 110 °C por 15 min para assegurar a completa remoção de resíduos/solventes [105]. Este processo de deposição de PVA seguida de evaporação do solvente foi repetido 3 vezes.

### **3.10. Avaliação da eficiência de hidrofilição pelo método do ângulo de contacto**

Os ângulos de contacto da água na superfície de placas de PDMS, com e sem revestimento de PVA foram medidos num equipamento Drop Shape Analysis System DSA100 (Krüss Scientific, Alemanha) equipado com uma câmara CCD. Em cada medição, e usando uma microseringa colocou-se uma gota de água desionizada sobre as placas. Quando uma gota de água é colocada sobre uma superfície sólida forma-se uma interface tripla entre o sólido (superfície), o líquido (gota) e o vapor (ar). O ângulo formado entre a superfície sólida e a tangente à superfície do líquido no ponto de contacto com o sólido é definido como o ângulo de contacto [106].

As imagens da gota sobre cada uma das superfícies foram obtidas imediatamente após a gota ser colocada na superfície da placa. A partir dessas imagens, foram calculados os valores dos ângulos de contacto que podem ser relacionados com a lipofilicidade das superfícies [106].

### **3.11. Preparação dos modelos miméticos lipídicos a aplicar na plataforma microfluídica: bicamadas lipídicas suportadas**

Após a hidrofilição dos microcanais procedeu-se à formação das SLBs através do protocolo SALB (do inglês *"Solvent Assisted Lipid Bilayers"*) descrito em [105]. O método SALB é um processo rápido e eficiente que tem como base a deposição de uma mistura lipídica num suporte sólido seguida pela troca de um solvente orgânico com um tampão aquoso resultando na formação espontânea de bicamadas lipídicas. No protocolo realizado, o etanol foi utilizado como solvente

orgânico e o tampão Tris-NaCl como tampão aquoso. O método de preparação do tampão Tris-NaCl (pH 7.5, 150mM de NaCl) está também descrito em [105].

A formação de SLBs foi iniciada pela diluição da solução stock de DPPC em etanol previamente preparada de concentração bem definida (10 mg/mL) de forma a obter uma concentração lipídica final de 0,25 mg/mL. A concentração lipídica foi definida com base em resultados descritos na literatura [107] que indiciam a formação de uma bicamada mais homogênea.

Recorrendo a uma bomba de fluxo, seringas e tubos de plástico injetou-se o etanol a uma taxa de fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 10 min para garantir o preenchimento do canal microfluídico. Neste ponto é importante verificar se ocorreu a criação de bolhas de ar de forma a otimizar a montagem do sistema. De seguida, foi injetada a solução lipídica em etanol a uma taxa de fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante cerca de 10 min para garantir o preenchimento completo dos microcanais e incubou-se durante 10 min. Após o tempo de incubação, foi injetada a solução tampão Tris-NaCl a uma taxa de fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante cerca de 10 min para ocorrer a troca do solvente orgânico presente no interior dos microcanais pelo tampão aquoso. Assim, como os lípidos não se misturam com água ocorre deposição, rearranjo lipídico e consequente formação de bicamadas lipídicas junto ao substrato. Após a troca de solventes estar concluída, aumentou-se a taxa de fluxo do tampão Tris-NaCl para 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , de forma a promover a remoção de resíduos de solvente orgânico e pequenas estruturas lipídicas que não se encontrem adsorvidas à superfície. Após a formação da bicamada, é necessário manter a integridade das bicamadas lipídicas, mantendo os canais preenchidos com a solução tampão de Tris-NaCl.

### **3.12. Determinação *in vitro* do coeficiente de distribuição numa plataforma microfluídica com canais revestidos de membranas lipídicas**

Para determinação do log D na plataforma microfluídica hidrofílica e com canais revestidos de SLBs de DPPC foi testado o composto cafeína. Para o efeito, foi utilizada uma solução de cafeína com concentração de  $1,12 \times 10^{-4}$  M preparada em tampão universal (pH 5.5). A solução de cafeína foi injetada na entrada dos canais microfluídicos (taxa de injeção a 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e alíquotas desta solução foram recolhidas na saída dos canais a cada minuto até estabilização da concentração recolhida. A quantificação de cafeína em cada alíquota foi efetuada pelo método de doseamento

por espectrofotometria UV/Vis previamente validado. O log D foi calculado com recurso à seguinte equação, onde V representa o volume das fases lipídicas e aquosa:

$$\log D = \log \left( \frac{([Cafeína]_{injetada} - [Cafeína]_{recolhida}) \times V_{fase\ aquosa}}{[Cafeína]_{recolhida} \times V_{fase\ lipídica}} \right)$$

**Equação 10**

## **CAPÍTULO 4**

---

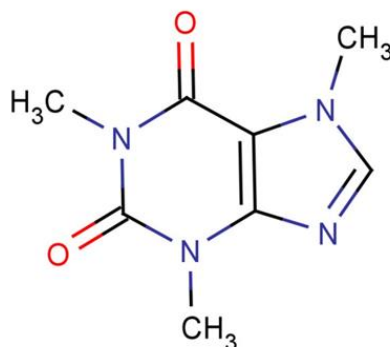
# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1. Determinação *in silico* das propriedades físico-químicas dos compostos-modelo.

Neste projeto foram utilizados três compostos-modelo: cafeína (modelo hidrofílico); diclofenac (modelo anfifílico) e testosterona (modelo lipofílico). Através do *software* MarvinSketch® foi possível uma análise de algumas propriedades tais como: a estrutura molecular, a distribuição de microespécies e pKa, o perfil de log D e log P e ainda, a sua análise elementar.

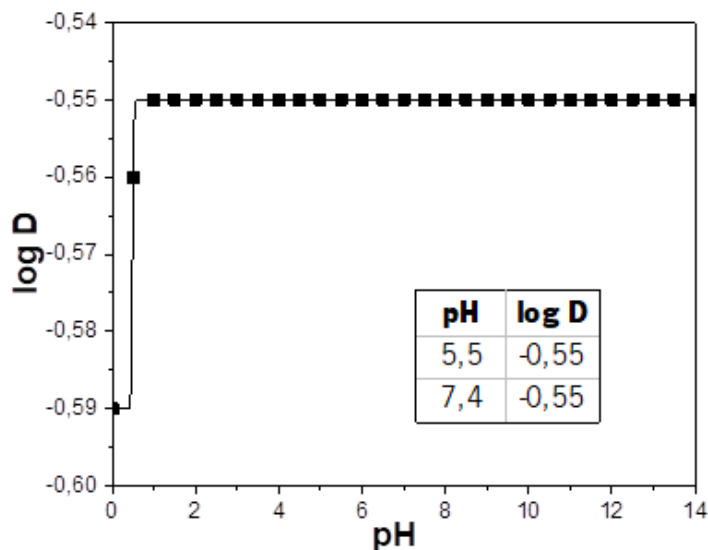
##### 4.1.1. Cafeína

A estrutura molecular encontra-se representada na Figura 11.



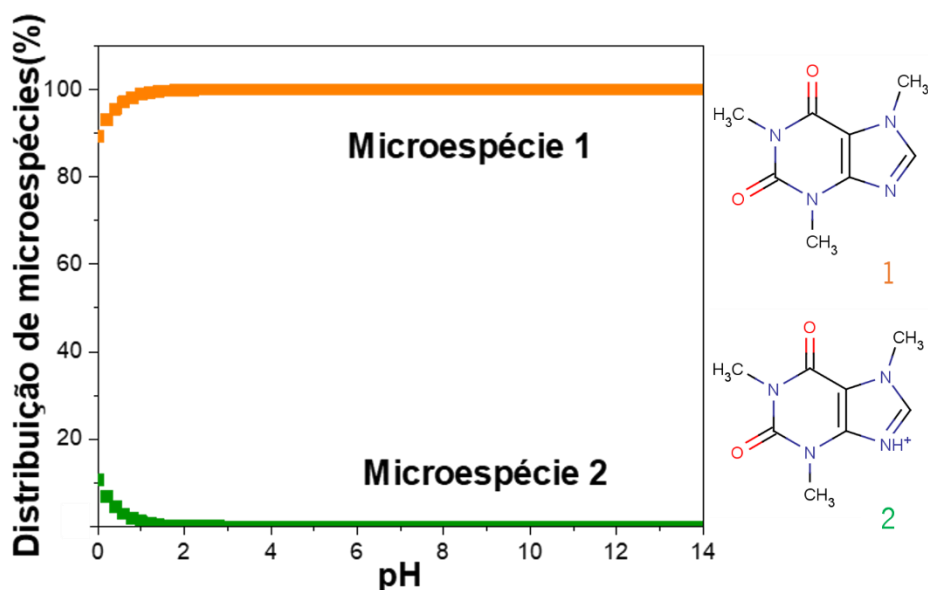
**Figura 11.** Estrutura molecular da cafeína (composto hidrofílico).

Na figura 12 observa-se um gráfico obtido através do software MarvinSketch® que estabelece uma correlação entre o pH e o log D para a cafeína. O log D indica a distribuição de um dado composto entre uma fase lipídica/orgânica e uma fase aquosa a um determinado valor de pH (ao qual as moléculas se podem encontrar no estado ionizado ou neutro). Por sua vez, o log P indica a partição do composto a um pH em que todas as moléculas deste composto se encontram na forma neutra. Na literatura está descrito que o valor do pH da pele se encontra entre 5 e 6 [108]. Assim sendo, é observável na Figura 12 que o valor de log D da cafeína nesta gama de valores de pH é de -0,55 sendo, portanto, um composto hidrofílico.



**Figura 12.** Distribuição do log D da cafeína em função do pH calculado *in silico* no Marvin Sketch® do software Chemaxon®.

A partir da Figura 12 é possível depreender que a cafeína não apresenta nenhum valor de pKa pois o log D apresenta um valor máximo e constante em toda a gama de valores de pH (de 1 a 14), ou seja,  $\log D = \log P$ . Portanto, no caso da cafeína, há uma prevalência da microespécie neutra (microespécie 1) em relação à microespécie carregada (microespécie 2) para toda a gama de valores de pH. Como a cafeína se encontra na forma neutra a praticamente qualquer valor de pH (microespécie 1 da Figura 13), isso traduz-se num valor de log P da cafeína também de -0,55. De acordo com a classificação descrita em Avdeef *et al.* [75], a cafeína insere-se na categoria dos compostos hidrofílicos ( $\log P < 1$ ). A classificação da cafeína obtida através da análise *in silico* efetuada está de acordo com a literatura [109, 110], e sugere que o facto deste composto ser muito hidrofílico poderá dificultar a sua permeação cutânea devido à maior afinidade para o meio aquoso e como tal, menor afinidade para os meios lipídicos existentes na matriz lipídica do SC [109]. No entanto a lipofilicidade de um composto não é o único descritor que define a sua capacidade de permeação, pelo que outros descritores foram também analisados.



**Figura 13.** Curva de titulação da cafeína: distribuição de microespécies em função do pH calculado *in silico* no Marvin Sketch® do software Chemaxon®.

Segundo a análise *in silico* da cafeína foi possível obter outros descritores que se encontram sumarizados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Dados obtidos da previsão *in silico* das propriedades da cafeína através do software MarvinSketch®.

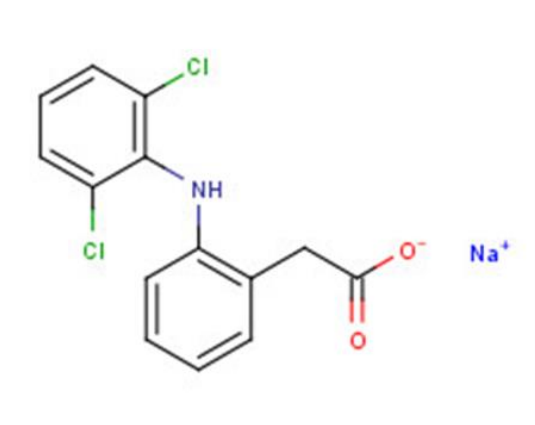
Composto	Massa molecular (g/mol)	Área de superfície polar (Å <sup>2</sup> )	Área de superfície molecular (Å <sup>2</sup> )	Nº de dadores de hidrogénios	Nº de aceitadores de hidrogénios
Cafeína	194,19	58,44	269,13	0	5

Através desta análise a massa molecular da cafeína é de 194,19 g/mol. De acordo com Palareti *et al.* [109] moléculas com massas moleculares elevadas (acima de 500 g/mol) são menos propensas a permear a pele. Assim, como a massa molecular da cafeína é bastante menor, este descritor indica que as moléculas de cafeína são passíveis de permear a pele. A área de superfície polar obtida é de 58,44 Å<sup>2</sup>, o que também indicia uma maior propensão das moléculas de cafeína em permear a pele, pois moléculas com área de superfície molecular superior a 140 Å<sup>2</sup> não são, normalmente, eficazes a permear as membranas celulares [111].

Relativamente ao número de dadores e aceitadores de hidrogénios é possível inferir que a molécula de cafeína não tem grupos químicos dadores de hidrogénios e tem 5 grupos químicos aceitadores de hidrogénios. Segundo Lipinski *et al.* [112] prevê-se uma menor absorção e permeação nas membranas celulares de compostos com mais de 5 grupos químicos dadores de hidrogénios e mais de 10 grupos de aceitadores de hidrogénios. Assim, é sugerido que, apesar de o log D e log P da cafeína apontarem como um composto hidrofílico com dificuldade de permeação, os outros descritores moleculares indicam uma probabilidade da cafeína permear e ser absorvida pelas membranas celulares, entre as quais as que constituem a matriz lipídica do SC.

#### 4.1.2. Diclofenac

Na Figura 14 está representada a estrutura molecular do diclofenac.



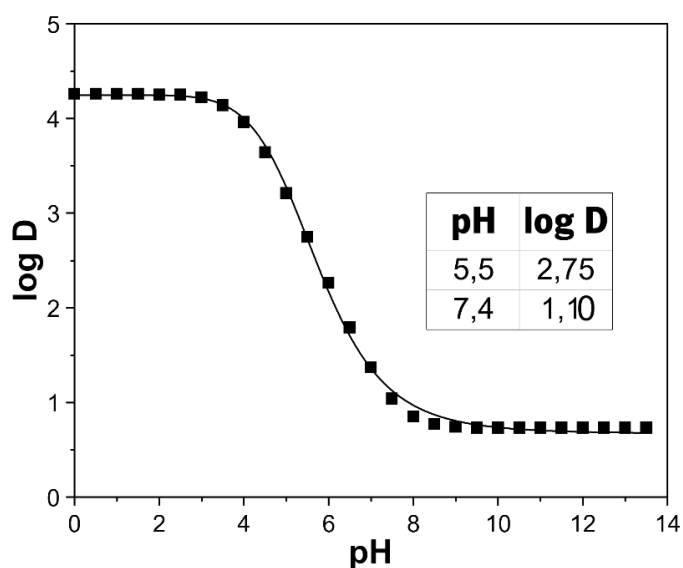
**Figura 14.** Estrutura molecular do diclofenac (composto anfifílico).

No caso do diclofenac, é possível observar através da Figura 15 que log P obtido *in silico* é de 4,25, e que corresponde ao valor que é obtido quando toda a molécula está na sua forma neutra (100% da microespécie 1). O log D obtido ao pH cutâneo é de 2,75, o que sugere um composto moderadamente lipofílico e solúvel ao nível cutâneo. Também o log P, de acordo com a classificação descrita em Avdeef *et al.* [75] classifica o diclofenac como um composto com moderada lipofilicidade tendo relativa facilidade de permear a matriz lipídica do SC, o que é corroborado pela literatura [113, 114, 115].

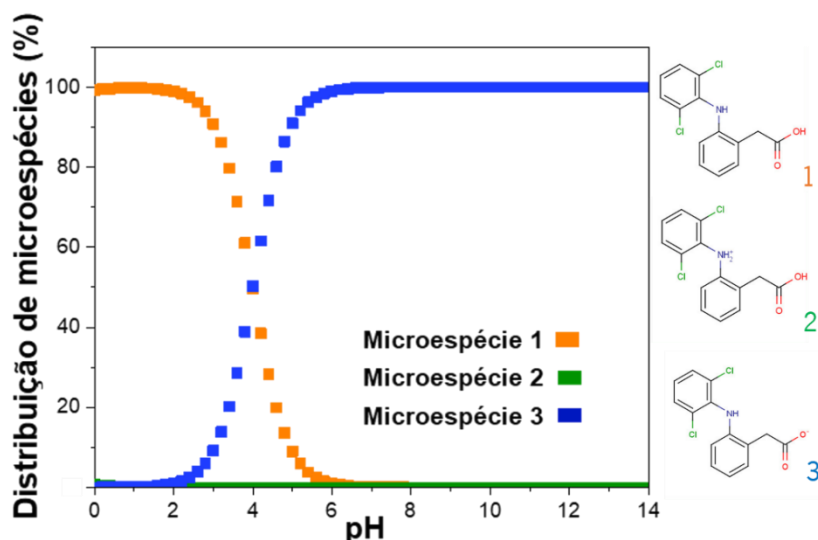
Uma das ilações a retirar da curva de titulação do diclofenac (Figura 16) é o pKa a pH 4, pois existe, a este valor de pH, um equilíbrio entre as formas protonada e desprotonada da molécula do diclofenac. Sengupta *et al.* [116] obtiveram um valor de pKa do diclofenac semelhante (pKa=3,9). Para pH > 4 o diclofenac está na forma ionizada e para pH < 4 este composto



encontra-se na forma neutra. É sabido que, quando no estado ionizado, as moléculas de um composto apresentam maior afinidade para a fase polar (fase aquosa ou grupos polares dos constituintes lipídicos das membranas) e as moléculas neutras têm mais afinidade para a fase apolar (caudas de ácidos gordos dos lípidos constituintes das membranas). Assim sendo, ao pH da pele ( $\approx 5,5$ ) as moléculas de diclofenac encontram-se ionizadas o que indica maior afinidade deste composto para a fase polar, o que se traduz numa maior permeabilidade do composto ao nível das cabeças polares dos fosfolípidos da membrana. Apesar da sua ionização não favorecer a permeação profunda nas regiões apolares das membranas, é seguro afirmar que o diclofenac é um ácido orgânico fraco com propriedades anfifílicas com capacidade de permeação na maioria das membranas celulares e matrizes lipídicas entre as quais as que constituem o SC [117].



**Figura 15.** Distribuição do log D do diclofenac em função do pH calculado *in silico* no Marvin Sketch® do software Chemaxon®.



**Figura 16.** Curva de titulação do diclofenac: distribuição de microespécies em função do pH calculado *in silico* no Marvin Sketch® do software Chemaxon®.

Na Tabela 6 estão sumarizados outros parâmetros que descrevem o diclofenac.

**Tabela 6.** Dados obtidos da previsão *in silico* das propriedades do diclofenac através do *software* MarvinSketch®.

Composto	Massa molecular (g/mol)	Área de superfície polar (Å <sup>2</sup> )	Área de superfície molecular (Å <sup>2</sup> )	Nº de dadores de hidrogénios	Nº de aceptadores de hidrogénios
Diclofenac	296,14	52,16	357,82	1	5

A massa molecular do diclofenac obtida *in silico* é 296,14 g/mol. Assim, de acordo com a classificação descrita por Palareti *et al.* [109], este valor indica que o diclofenac tem boa capacidade de permear as membranas celulares pois tem uma massa molecular abaixo dos 500 g/mol.

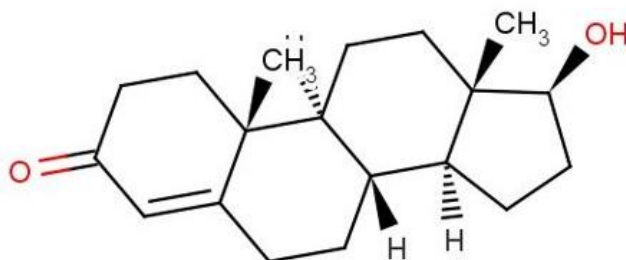
A área de superfície polar do diclofenac obtida *in silico* é de 52,16 Å<sup>2</sup>. Este valor é bastante inferior aos 140 Å<sup>2</sup> descritos na literatura [111] como valor a partir do qual as moléculas têm mais dificuldade em permear a pele. Assim, é possível prever que este valor indica que a o diclofenac tem eficácia na permeação das membranas celulares.

Na Tabela 6 retira-se a informação de que a molécula de diclofenac tem 1 grupo químico dador de hidrogénios e 5 grupos químicos aceptadores de hidrogénios o que, segundo Lipinski *et al.*

[112], é indicador de facilidade de permeação e absorção das moléculas de diclofenac por parte das membranas celulares como as existentes ao nível da matriz lipídica do SC.

#### 4.1.3. Testosterona

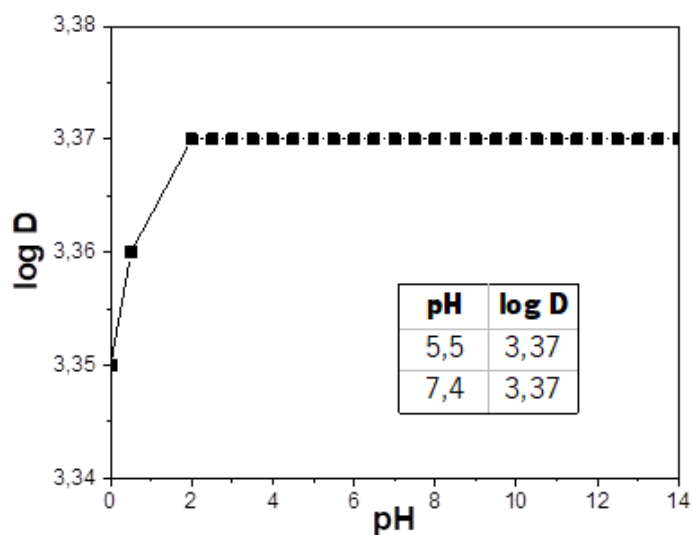
Na Figura 17 está representada a estrutura molecular da testosterona.



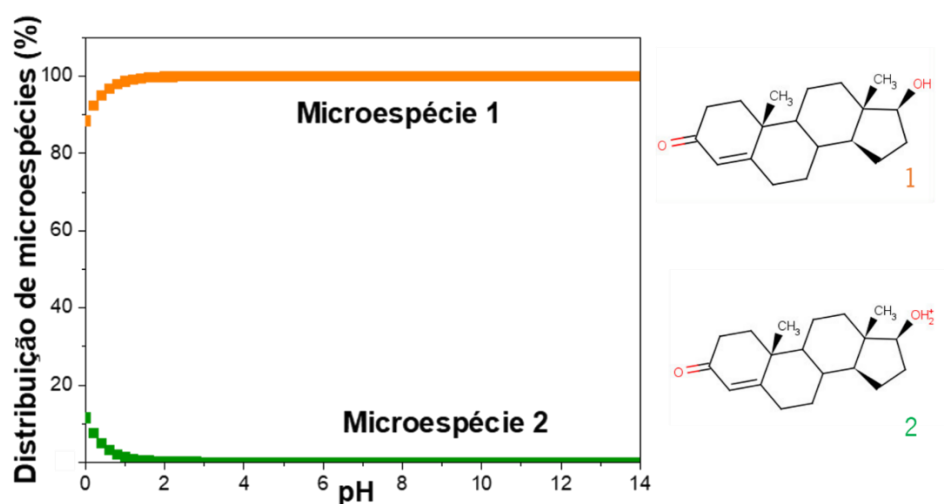
**Figura 17.** Estrutura molecular da testosterona (composto lipofílico).

Na Figura 18 e Figura 19 observa-se o log D em função do pH e a distribuição de microespécies para a testosterona (modelo lipofílico). A partir da análise destas figuras infere-se que a microespécie neutra (microespécie 1) predomina sobre a microespécie carregada (microespécie 2) ao longo de quase toda a gama de valores de pH (pH de 2 a 14). Ao pH da pele o log D da testosterona é de 3,37 o que indica um composto com maior lipofilicidade e menor solubilidade do que os compostos anteriormente descritos (cafeína e diclofenac). Além disso, como a microespécie maioritária é sempre a microespécie neutra em praticamente toda a gama de valores de pH (pH de 2 a 14), o log P da testosterona é também de 3,37. Segundo a classificação descrita por Avdeef *et al.* [75], a testosterona é um composto lipofílico com maior afinidade para a fase orgânica e, portanto, mais suscetível à permeação das membranas lipídicas embora tenha menor solubilidade.

Tal como no caso da cafeína, observando a Figura 19, pode-se concluir que a testosterona não apresenta nenhum pKa. A microespécie neutra (microespécie 1) é maioritária em toda a gama de valores de pH. Segundo Takács-Novák *et al.* [118], quando há uma predominância da microespécie neutra, a molécula é solúvel em fases apolares o que aliado a um log P elevado reforça a natureza lipídica das moléculas de testosterona.



**Figura 18.** Distribuição do log D da testosterona em função do pH calculado *in silico* no Marvin Sketch® do software Chemaxon®.



**Figura 19.** Curva de titulação da testosterona: distribuição de microespécies em função do pH calculado *in silico* no Marvin Sketch® do software Chemaxon®.

Na Tabela 7 estão sumarizados outros parâmetros que descrevem o composto testosterona.

**Tabela 7.** Dados obtidos da previsão *in silico* das propriedades da testosterona através do *software* MarvinSketch®.

Composto	Massa molecular (g/mol)	Área de superfície polar (Å <sup>2</sup> )	Área de superfície molecular (Å <sup>2</sup> )	Nº de dadores de hidrogénios	Nº de aceitadores de hidrogénios
Testosterona	288,42	37,30	477,56	1	3

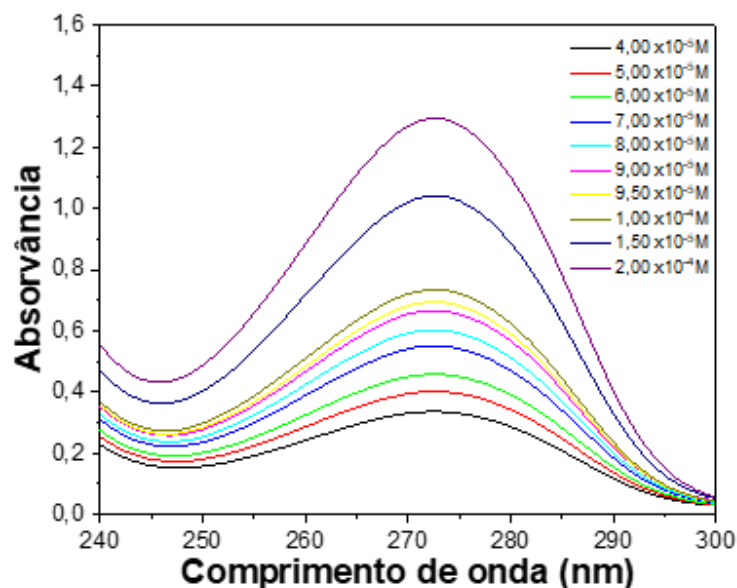
Os valores de massa molecular e área de superfície polar da testosterona indicados na Tabela 7 sugerem também que as moléculas de testosterona são propícias a permear a matriz lipídica do SC, tendo por base as classificações descritas por Palareti *et al.* [109], Hitchcock *et al.* [111] e Lipinski *et al.* [112].

As moléculas de testosterona têm 1 grupo químico dador de hidrogénios e 3 grupos químicos aceitadores de hidrogénios. As moléculas de testosterona cumprem mais um requisito da classificação de Lipinski *et al.* [112], o que confirma as suas propriedades lipofílicas e tendência para permear as membranas lipídicas.

## 4.2. Doseamento espectrofotométrico dos compostos-modelo por espectroscopia UV-visível

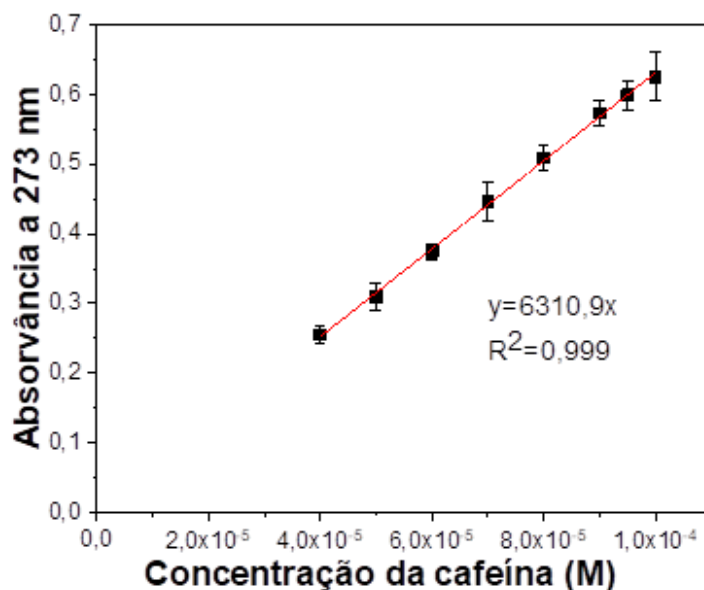
Os compostos-modelo foram quantificados por espectroscopia UV-visível. Através do espectro de absorvância de cada um dos compostos foram obtidos parâmetros como coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e comprimento de onda onde se verifica a máxima absorção. A partir do espectro de absorvância procedeu-se ao traçado da reta de calibração de cada um dos compostos bem como, à escolha de uma concentração fixa de composto, que obedeça à Lei de Lambert-Beer, a utilizar nos ensaios posteriores de determinação do coeficiente de partição.

A título de exemplo na Figura 20 estão representados os espectros de absorvância da cafeína em tampão universal (pH 5.5) com concentrações crescentes de cafeína ( $4,00 \times 10^{-5}$  M a  $1,00 \times 10^{-4}$  M). Os espectros de absorvância obtidos para o diclofenac e testosterona em tampão universal (pH 5.5) apresentam-se em anexo (Figura Anexo 1A e Figura Anexo 2A).



**Figura 20.** Espectro de absorvância das soluções padrão com concentrações crescentes de cafeína em tampão universal a pH 5.5.

Para quantificar cada composto é fundamental estabelecer uma correlação entre a absorvância e a sua concentração. Deste modo, com base no comprimento de onda de absorção máxima de cada composto e representando a absorvância máxima em função da concentração do composto é possível traçar uma reta de calibração. Por exemplo, no caso da cafeína procedeu-se à representação gráfica dos valores da absorvância a 273 nm em função da concentração de composto e procedeu-se ao traçado da reta de calibração da cafeína através de um ajuste linear utilizando o *software* Origin Lab® (Figura 21). Os ajustes lineares e respetivas retas de calibração obtidos para o diclofenac e testosterona são apresentados em anexo (Figura Anexo 1B e Figura Anexo 2B).



**Figura 21.** Retas de calibração da cafeína em tampão universal (pH 5.5) ao comprimento de onda de absorção máxima de 273 nm.

A partir de cada ajuste linear é possível determinar o  $\epsilon$  de cada composto (declive da reta de calibração), que permitirá dosear o composto através da determinação da sua absorvância. Este parâmetro assim como outros parâmetros de validação do método analítico de doseamento espectrofotométrico dos compostos estudados encontram-se sumarizados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Parâmetros para a validação do método analítico de doseamento dos compostos.

Composto	$\epsilon$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	Limite de deteção (M)	Limite de quantificação (M)	Precisão (%)	Intervalo de determinação (M)	Lineari- dade
Cafeína	6311	$1,04 \times 10^{-8}$	$3,17 \times 10^{-8}$	2,08	$4,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4}$	0,99
Diclofenac	9880	$3,34 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-8}$	0,58	$4,12 \times 10^{-7}$ a $2,04 \times 10^{-5}$	0,99
Testosterona	2140	$3,08 \times 10^{-8}$	$9,35 \times 10^{-8}$	1,66	$1,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4}$	0,99

A partir da Tabela 8 é possível constatar que o doseamento espectrofotométrico de cada um dos compostos para cada intervalo de determinação apresenta precisão (pois o coeficiente de variação não excede os 20%) e linearidade (pois o coeficiente de determinação é próximo de 1) [119]. Apesar de não serem apresentados os espectros comparativos do analito e da matriz ou solvente,

o método de doseamento apresentou também especificidade para o analito dado a distinção clara entre os espectros anteriores.

Com base no doseamento espectrofotométrico dos compostos foi usada uma concentração nos estudos subsequentes, que foi selecionada considerando o intervalo de determinação para garantir a proporcionalidade entre a absorvância do composto e a sua concentração em tampão universal (pH 5.5).

### 4.3. Caracterização físico-química e biofísica dos modelos lipídicos

#### 4.3.1. Diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão

Inicialmente foi feita a caracterização físico-química dos modelos lipídicos na presença e na ausência de cada composto. Esta caracterização assenta no estudo do diâmetro hidrodinâmico por DLS e em estudos de potencial zeta por ELS para avaliar o efeito da presença dos compostos quer no tamanho, quer na carga de superfície dos modelos lipídicos. O efeito do CHOL no diâmetro hidrodinâmico e no potencial zeta foi também avaliado.

**Tabela 9.** Resumo da caracterização físico-química dos modelos lipídicos na ausência e na presença de cada composto. Os resultados são apresentados como valores médios  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 determinações.

Modelos membranares	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
DPPC	107 $\pm$ 8	0,11 $\pm$ 0,03	+3,6 $\pm$ 0,3
DPPC+CAFEÍNA	112 $\pm$ 4	0,06 $\pm$ 0,01	+0,3 $\pm$ 2,7
DPPC+DICLOFENAC	151 $\pm$ 39	0,29 $\pm$ 0,24	+1,7 $\pm$ 0,7
DPPC+TESTOSTERONA	189 $\pm$ 54	0,18 $\pm$ 0,07	+0,8 $\pm$ 0,4
DPPC: CHOL (2:1)	153 $\pm$ 12	0,15 $\pm$ 0,06	+1,7 $\pm$ 0,9
DPPC: CHOL (2:1) +CAFEÍNA	136 $\pm$ 12	0,21 $\pm$ 0,08	+2,4 $\pm$ 1,7
DPPC: CHOL (2:1) + DICLOFENAC	163 $\pm$ 26	0,28 $\pm$ 0,09	+1,2 $\pm$ 0,1
DPPC: CHOL (2:1) +TESTOSTERONA	166 $\pm$ 44	0,26 $\pm$ 0,20	+1,2 $\pm$ 0,7

A comparação estatística dos valores da Tabela 9 por análise de variância (ANOVA) permitiu concluir que, num intervalo de confiança 95%, isto é  $P < 0,05$ , não existem diferenças significativas entre os modelos lipídicos e entre os modelos lipídicos na ausência ou na presença dos compostos. Assim estes modelos lipídicos apresentam um diâmetro hidrodinâmico médio da ordem dos  $147 \pm 28$  nm e uma carga superficial muito próxima da neutralidade uma vez que o potencial zeta

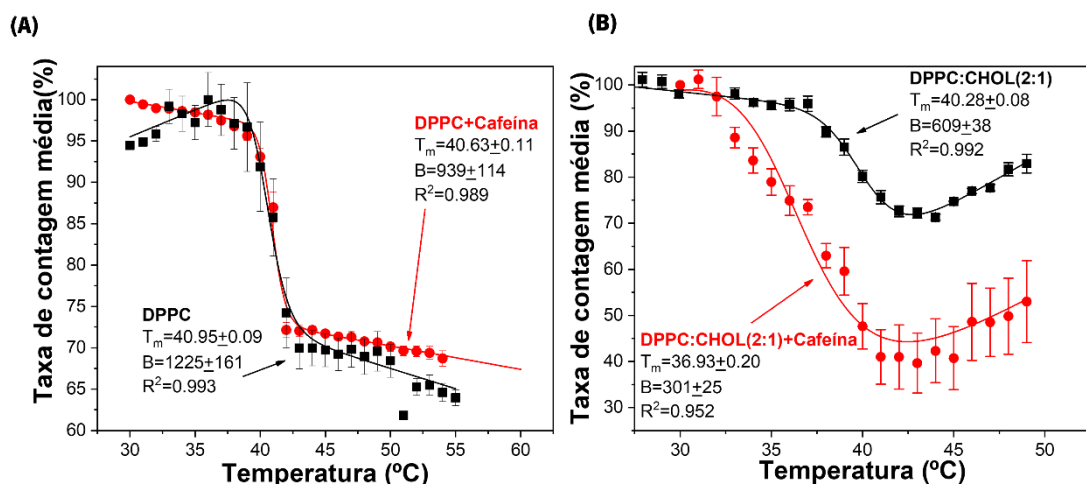


apresenta valores médios de  $+1.6 \pm 1.0$  mV. De referir também que o valor de PDI indica a polidispersão associada à distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos e quanto maior o valor de PDI, mais heterogênea a dispersão de nanossistemas. Os modelos lipídicos quer na ausência quer na presença dos compostos apresentam um valor de PDI baixo ( $0.19 \pm 0.08$ ) indicativo de uma dispersão homogênea de modelos lipídicos [120].

#### 4.3.2. Temperatura de transição de fase e cooperatividade da transição

Como já foi referido no capítulo 3, a  $T_m$  é um parâmetro relevante para avaliar as alterações biofísicas provocadas quer pela inserção de um determinado componente numa membrana (por exemplo para perceber o efeito da inserção de CHOL num modelo membranar lipídico), quer pela interação de compostos com as membranas.

Na Figura 22, apresenta-se um exemplo dos perfis sigmoides correspondentes à variação da intensidade de luz dispersa (Taxa de contagem média, TCM) por modelos membranares de DPPC e de DPPC: CHOL (2:1) para a cafeína no intervalo de temperaturas dos 25 °C aos 60 °C de forma a garantir a análise das duas fases membranares: fase gel, mais ordenada, que ocorre a temperaturas inferiores à  $T_m$  e fase fluida, mais desordenada, que ocorre a temperaturas superiores à  $T_m$ . Os perfis sigmoides obtidos para o diclofenac e testosterona em modelos membranares de DPPC e de DPPC: CHOL (2:1) no intervalo de temperaturas dos 25 °C aos 60 °C apresentam-se em anexo (Figura Anexo 1C e Figura 2C).



**Figura 22.** A)  $T_m$  e  $B$  de DPPC e DPPC +Cafeína. (B)  $T_m$  e  $B$  de DPPC: CHOL (2:1) e DPPC: CHOL (2:1) +Cafeína.

A Tabela 10 apresenta uma listagem dos valores de  $T_m$  e cooperatividade, dos modelos membranares lipídicos na ausência e na presença dos compostos, obtidos a partir do ajuste da equação 6 aos perfis sigmoides apresentados nas figuras anteriores.

**Tabela 10.** Resumo da caracterização biofísica dos modelos membranares na presença e na ausência de cada composto. Os resultados são apresentados como valores médios  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 determinações.

<b>Modelos membranares</b>	<b><math>T_m</math> (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Cooperatividade</b>	<b><math>R^2</math></b>
DPPC	40,95 $\pm$ 0,09	1225 $\pm$ 161	0,993
DPPC+CAFEÍNA	40,63 $\pm$ 0,11	939 $\pm$ 114	0,989
DPPC+DICLOFENAC	38,89 $\pm$ 0,05	1645 $\pm$ 111,7	0,997
DPPC+TESTOSTERONA	37,03 $\pm$ 0,11	653 $\pm$ 114	0,989
DPPC: CHOL (2:1)	40,28 $\pm$ 0,08	609 $\pm$ 38	0,992
DPPC: CHOL (2:1) +CAFEÍNA	36,93 $\pm$ 0,20	301 $\pm$ 25	0,952
DPPC: CHOL (2:1) +DICLOFENAC	37,27 $\pm$ 0,22	297 $\pm$ 22	0,975
DPPC: CHOL (2:1) +TESTOSTERONA	42,31 $\pm$ 0,14	532 $\pm$ 46	0,993

A  $T_m$  obtida para os modelos membranares de DPPC (40,95  $\pm$  0,09 $^{\circ}\text{C}$ ) é concordante com a descrita na literatura para o mesmo modelo lipídico, mas usando diferentes metodologias [121, 122, 123]. A inserção de CHOL nos modelos membranares de DPPC provocou uma ligeira redução da  $T_m$ , tal como observado em sistemas similares onde se efetuou a determinação dos parâmetros biofísicos por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) [121, 122, 123]. A análise ANOVA permitiu, no entanto, concluir que o efeito da introdução do CHOL não afetou significativamente a cooperatividade da transição de fase, o que indica que o CHOL se encontra homoganeamente distribuído entre os fosfolípidos de DPPC.

A comparação estatística ANOVA dos valores de  $T_m$  sumarizados na Tabela 10 permitiu concluir que, num intervalo de confiança 95%, isto é  $P < 0,05$ , apenas não existem diferenças significativas da  $T_m$  obtida para os modelos lipídicos de DPPC e de DPPC com cafeína. Em todos os outros casos as diferenças entre as  $T_m$  obtidas são estatisticamente significativas. Assim, de um modo geral verificou-se que no modelo membranar mais simples de DPPC sem CHOL, a incorporação, quer do diclofenac quer da testosterona, entre os lípidos do modelo membranar promoveu uma maior difusão lateral desses lípidos, provocando um aumento da fluidez membranar com consequente redução do valor de  $T_m$ . As alterações também estatisticamente significativas da cooperatividade da transição de fase dos modelos membranares de DPPC quando em presença de diclofenac ou testosterona indicam que estes compostos não têm uma distribuição homogénea

no modelo membranar lipídico e têm um efeito notório ao nível dos grupos polares dos fosfolípidos (carbonos 1 a 8) responsáveis pelo empacotamento lipídico [124]. Este efeito fluidificante do diclofenac e da testosterona e a perturbação que estes compostos provocam na cooperatividade da transição de fase em modelos membranares de DPPC também foi observado em outros estudos de avaliação do efeito biofísico destes compostos [125, 97]. O estudo conduzido por Biruss *et al.* [125] confirmou através de medições de ATR-FTIR e micro-DSC que hormonas esteroides, como a testosterona, interagem quer com os grupos polares de modelos membranares de DPPC, quer com as caudas apolares destes fosfolípidos. Estas interações podem ocorrer através da ligação de hidrogénios entre os grupos polares lipídicos da membrana e os grupos hidroxilo da testosterona ou através de uma interação entre o núcleo esterol apolar da testosterona e as cadeias acilo apolares dos fosfolípidos. Já o estudo conduzido por Fernandes *et al.* [97] sugere que o diclofenac se insere no modelo membranar com uma orientação paralela às moléculas fosfolipídicas e com o grupo carboxilo ionizado carregado negativamente ancorado na região polar dos fosfolípidos.

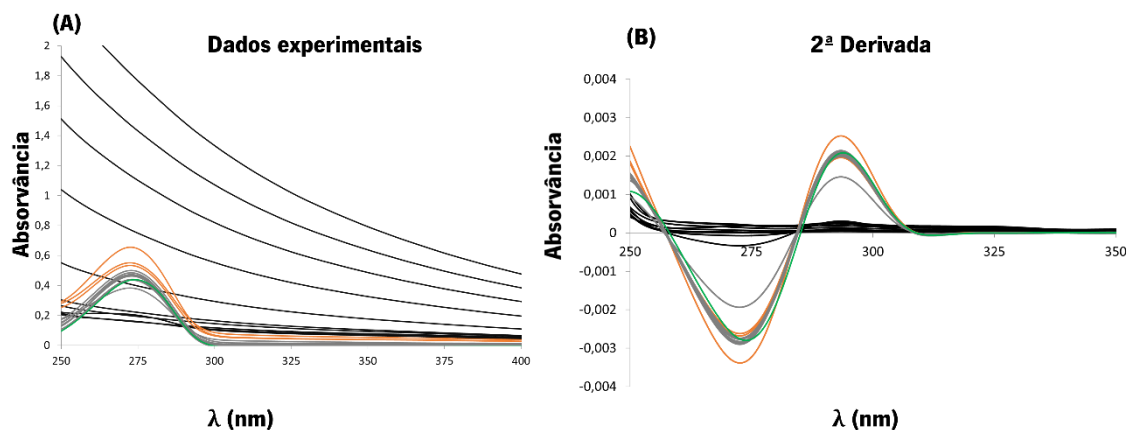
A incorporação de cafeína só apresentou efeitos biofísicos significativos de redução da  $T_m$  nos modelos membranares contendo CHOL, o que indica um efeito fluidificante deste composto. É sabido que a adição de CHOL aos modelos membranares lipídicos tem um papel importante na fluidez das biomembranas, e conseqüentemente na interação destas com os diferentes compostos, pois influencia o comportamento dos fosfolípidos e esfingolípidos da membrana [126]. A influência do CHOL nas biomembranas é dependente da sua concentração. O CHOL, quando presente em grandes concentrações, acima de 12% (mol/mol), como é o caso da matriz lipídica do SC que apresenta cerca de 33% (mol/mol), promove o aumento da rigidez da membrana, se os lípidos estiverem na fase gel (abaixo da  $T_m$ ) [127]. Por outro lado, antes da análise por DLS, os compostos foram incubados com os modelos membranares a 37°C (temperatura corporal) e a essa temperatura os modelos membranares utilizados encontram-se na fase gel. Tal facto pode justificar que, na fase gel onde os modelos contendo CHOL possuem um empacotamento ainda maior, a cafeína tenha uma ação fluidificante, uma vez que tem sido demonstrado que este composto promove uma maior dinâmica nos lípidos da membrana, precisamente na fase gel membranar [128, 129, 130, 131, 132, 133]. O mesmo efeito de redução significativa da  $T_m$  foi observado para o diclofenac após a incorporação do composto nos modelos membranares contendo CHOL. Já a testosterona nos modelos membranares contendo CHOL apresentou um efeito de aumento da  $T_m$ , o que se traduz como um aumento do empacotamento lipídico. Este efeito, oposto ao observado nos modelos sem CHOL poderá estar relacionado com o facto de a

testosterona ter um núcleo esterol semelhante ao CHOL e na presença deste provocar uma interação mais forte com as cadeias acilo dos fosfolípidos. A cooperatividade da transição de fase nos modelos lipídicos contendo CHOL na ausência e na presença dos compostos não apresentou por análise ANOVA diferenças significativas, o que parece significar que o CHOL promoveu uma distribuição mais homogênea dos compostos nos modelos membranares.

#### **4.4. Determinação *in vitro* do coeficiente de distribuição dos compostos-modelo em sistemas membrana/água e comparação com valores obtidos *in silico***

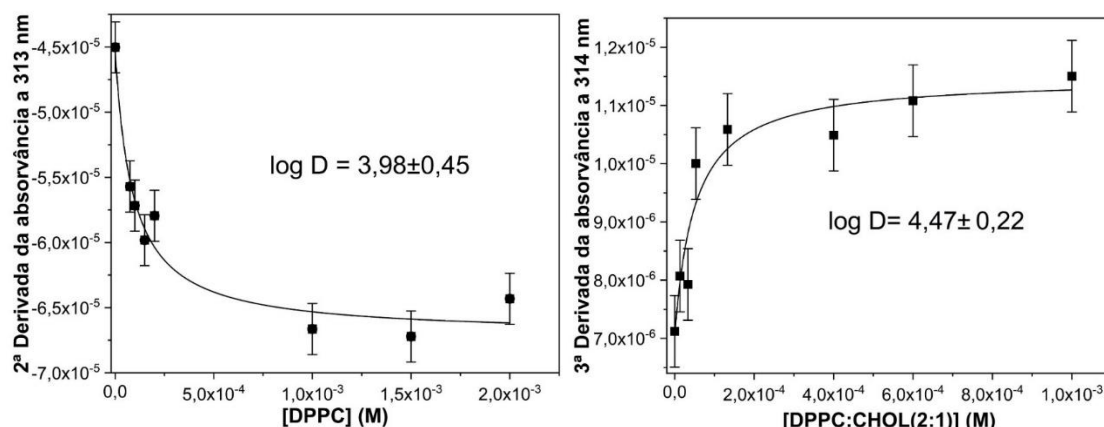
Para a determinação do log D dos compostos em sistemas bifásicos membrana/água foram obtidos espectros de absorvância das referências (modelo membrana em concentrações crescentes na ausência de composto) e das amostras (semelhantes às referências, mas contendo o composto a uma concentração fixa determinada pela zona linear da reta de calibração). Utilizando uma folha de cálculo desenvolvida em Excel (*Kp Calculator*) processou-se à análise dos espectros. Aos espectros das amostras foram subtraídos os espectros das referências sendo depois realizada a derivada de cada espectro para eliminar as interferências espectrais e a dispersão de luz provocada pelos modelos lipídicos. Este método derivativo permitiu depois representar a derivada da absorvância de cada um dos compostos em função do aumento da concentração dos modelos miméticos da matriz lipídica do SC e através de um ajuste não linear, usando o *software* Origin Lab®, calcular o log D.

A título de exemplo, a Figura 23 apresenta os espectros de absorvância e respetiva derivada da cafeína ( $8 \times 10^{-5}$  M) em modelos membranares de DPPC. Os espectros de absorvância e respetivas derivadas dos outros compostos, quer no modelo membrana de DPPC, quer no modelo membrana de DPPC: CHOL (2:1), serão disponibilizados em anexo (Figura Anexo 1D e Figura 2D).



**Figura 23.** A) Espectro de absorvância das amostras após subtração da contribuição da absorção das referências (espectros coloridos) e espectros de absorção das referências (espectros de cor preta) usados para a determinação do log D da cafeína em modelos membranares de DPPC. B) 2ª derivada dos espectros de absorvância representados em A).

De um ponto de vista geral, é observável em todos os espectros em que não foi aplicada a espectroscopia derivativa, um aumento da linha de base nas absorvâncias das referências (representadas a negro na Figura 23A) com o aumento da concentração de modelo membranar. Apesar do tratamento prévio dos espectros (espectros coloridos da Figura 23A) obtidos pela subtração da contribuição da absorvância das referências (espectros a negro da Figura 23A) minimizar a dispersão de luz causada pelos modelos membranares, procedeu-se a um método derivativo que elimina mais eficazmente estas interferências espectrais (Figura 23B). De facto, é observável na Figura 23B que houve uma eliminação das interferências espectrais causadas pelo aumento da concentração de modelo membranar, pois as linhas a negro que representam as referências, encontram-se sobre o zero. Após a eliminação das interferências espectrais é possível determinar a distribuição dos compostos entre as fases lipídica e aquosa e assim calcular o log D de cada composto. Para isso procedeu-se à representação gráfica dos valores das derivadas da absorvância (a um comprimento de onda ao qual as interferências sejam efetivamente eliminadas) em função da concentração de modelo membranar e através de um ajuste não linear utilizando a equação 7. A Figura 24 representa, a título de exemplo, os ajustes não lineares obtidos para a cafeína nos dois modelos membranares testados. Os ajustes não lineares obtidos para o diclofenac e testosterona quer no modelo membranar de DPPC, quer no modelo membranar de DPPC: CHOL (2:1), serão disponibilizados em anexo (Figura Anexo 1E e Figura Anexo 2E).



**Figura 24.** Ajuste não linear dos valores da derivada das absorvâncias a 313 nm e 314 nm em função da concentração de modelos membranares: (A) DPPC e (B) DPPC: CHOL (2:1). A partir deste ajuste não linear foi possível determinar o log D do composto cafeína ao pH 5.5.

Os valores de log D dos diferentes compostos determinados *in vitro* através dos ajustes não lineares em sistemas membranares lipossoma/água encontram-se listados na Tabela 11 onde se estabelece também uma comparação com os valores de log D obtidos calculados *in silico*.

**Tabela 11.** Tabela que resume e compara os valores de log D obtidos em sistemas membranares lipossoma/água obtidos *in vitro* e valores de log D octanol/água *in silico*.

Modelos membranares	log D lipossoma/água <i>in vitro</i>	R <sup>2</sup>	log D octanol/água <i>in silico</i>
DPPC+CAFEÍNA	3,98 ± 0,45	0,86	-0,55
DPPC+DICLOFENAC	3,76 ± 0,64	0,91	2,75
DPPC+TESTOSTERONA	4,48 ± 0,62	0,89	3,37
DPPC: CHOL (2:1) +CAFEÍNA	4,47 ± 0,22	0,84	-0,55
DPPC: CHOL (2:1) + DICLOFENAC	4,33 ± 0,45	0,89	2,75
DPPC: CHOL (2:1) +TESTOSTERONA	4,75 ± 0,44	0,94	3,37

A comparação estatística ANOVA dos valores de log D sumarizados na Tabela 11 permitiu concluir que apenas são estatisticamente significativas as diferenças entre: (i) o log D da cafeína determinado *in vitro* em ambos modelos membranares e o log D da cafeína determinado *in silico* ( $P < 0,0001$ ); (ii) o log D do diclofenac determinado *in vitro* no sistema membranar DPPC:CHOL (2:1) e o log D do diclofenac determinado *in silico* ( $P < 0,005$ ) e (iii) o log D da testosterona determinado *in vitro* no sistema membranar DPPC:CHOL (2:1) e o log D da testosterona determinado *in silico* ( $P < 0,05$ ).

Tradicionalmente a determinação do log D e log P de diferentes compostos é feita recorrendo a solventes bifásicos isotrópicos, entre os quais o sistema octanol/água de acordo com o descrito na literatura [134, 135]. Os valores obtidos para o log D da cafeína nos sistemas octanol/água são negativos e compreendidos entre -0,07 e -2,03 [136, 137]. Os valores de log D da cafeína, obtidos neste trabalho em sistemas bifásicos distintos que mimetizam melhor os sistemas membrana/água, são significativamente superiores e indicam que a cafeína é um composto lipofílico ( $\log D > 3$ ). Esta diferença considerável em relação aos valores obtidos em estudos que recorrem ao sistema octanol/água poderá estar relacionada com o facto de estes sistemas, ao contrário de sistemas lipídicos biomiméticos das membranas celulares, não terem em conta as interações entre os compostos e os grupos polares dos fosfolípidos, ou outras interações presentes nas membranas biológicas como ligações iónicas, pontes de hidrogénio ou interações dipolo-dipolo [138]. Outra possível explicação prende-se pelo facto de a técnica de espectrofotometria derivativa em sistemas lipossoma/água ter a capacidade de estudar a distribuição do composto entre a fase lipídica e a fase aquosa sem recorrer a uma separação de fases. Esta separação de fases orgânica e aquosa é normalmente conseguida à custa de métodos de filtração associados a ultracentrifugação que podem perturbar a interação estabelecida entre os compostos e o sistema bifásico utilizado [23]. Num estudo bastante recente conduzido por Andrade *et al.* [139], foram avaliadas as propriedades farmacocinéticas de diferentes compostos, entre eles, a cafeína. Neste estudo os autores recorreram a LUVs como modelos membranares, e utilizaram também a técnica de espectrofotometria derivativa para a determinação log D da cafeína obtendo valores que corroboram os obtidos no âmbito deste trabalho ( $\log D > 3$ ).

Na ausência de CHOL, os valores de log D do diclofenac e da testosterona obtidos em sistemas miméticos membrana/água *in vitro* não diferem significativamente dos valores de log D obtidos *in silico* e em ambos os casos permitem classificar estes dois compostos como lipofílicos, reiterando a sua capacidade para permear a matriz lipídica do SC e se distribuir pela mesma. Por exemplo, num estudo publicado por Ferreira *et al.* [138], foram determinados valores de  $\log D = 3,97$  para o diclofenac em LUVs de fosfatidilcolina de gema de ovo, concordantes com os valores de log D determinados neste trabalho. Outro estudo realizado por Fernandes *et al.* [97] corroborou os resultados deste trabalho e demonstrou que os log D do diclofenac são maiores para valores de pH menores. Este facto pode ser explicado pela existência da forma ionizada (mais polar) do diclofenac a valores de  $\text{pH} > 4$ , que dificulta a sua distribuição nas membranas lipídicas comparativamente à sua forma neutra. Neste estudo ficou também provado que o diclofenac tem

relativa facilidade em permear e interagir ao nível das membranas lipídicas bem como capacidade em alterar as suas propriedades biofísicas.

Finalmente, é necessário referir que na presença do CHOL os valores de log D obtidos nos sistemas miméticos membranares são significativamente maiores para todos os compostos do que o previsto *in silico*. Tal parece realçar a importância do CHOL ao nível das membranas nas interações estabelecidas entre estas e os compostos que nela se distribuem.

#### 4.5. Classificação da permeação cutânea dos compostos-modelo

##### 4.5.1. Permeação cutânea teórica avaliada com recurso a valores de coeficientes de distribuição determinados *in silico*

Tendo em conta os valores de log D determinados *in silico* é possível calcular, teoricamente, para cada um dos compostos-modelo dois parâmetros relevantes na descoberta de compostos: o coeficiente de permeação cutânea ( $S_p$ ) e fluxo máximo de permeação ( $J_{m\acute{a}x}$ ) que permitirão classificar o tipo de permeação apresentado pelos compostos. Para o efeito, é necessário considerar as equações 8 e 9 descritas no Capítulo 3. Os valores teóricos obtidos de  $S_p$  e  $J_{m\acute{a}x}$  encontram-se representados na Tabela 12 onde se apresenta também os valores de  $J_{m\acute{a}x}$  experimentais determinados em ensaios *ex vivo* em pele humana e de ratinho descritos na literatura.

**Tabela 12.** Cálculo do  $S_p$  e  $J_{m\acute{a}x}$  com base no log D determinado *in silico* no módulo MarvinSketch® do software da Chemaxon®. Classificação da permeação de acordo com os valores de  $J_{m\acute{a}x}$  obtidos e comparação com a permeação descrita em estudos reportados na literatura.

Composto	Massa molar (g/mol)	Csat em água (mg/cm <sup>3</sup> )	$S_p$ (cm/h)	$J_{m\acute{a}x}$ teórico (mg/cm <sup>2</sup> /h) e classificação da permeação	$J_{m\acute{a}x}$ experimental (mg/cm <sup>2</sup> /h) e classificação da permeação
Cafeína	194,19	21,6	$5,31 \times 10^{-5}$	$1,15 \times 10^{-3}$ fraca	$6,65 \times 10^{-3}$ [140] moderada
Diclofenac	296,14	$2,37 \times 10^{-3}$	$2,79 \times 10^{-3}$	$6,62 \times 10^{-6}$ muito fraca	$2,37 \times 10^{-6}$ [141] muito fraca
Testosterona	288,42	$2,34 \times 10^{-2}$	$8,58 \times 10^{-3}$	$2,01 \times 10^{-4}$ fraca	$2,69 \times 10^{-3}$ [142] moderada



Tendo em conta os valores de  $J_{\text{máx}}$  teórico apresentados na Tabela 12 e segundo a classificação da permeação teórica esquematizada na Tabela 4 do Capítulo 3 conclui-se que a permeação teórica é fraca para a cafeína, muito fraca para o diclofenac e fraca para a testosterona. Apesar da diferença existente entre os valores  $J_{\text{máx}}$  teóricos e os valores  $J_{\text{máx}}$  experimentais obtidos por ensaios *in vitro* reportados na literatura, a classificação da permeação é semelhante no caso do diclofenac, o que indica que os modelos *in silico* podem constituir uma ferramenta interessante de previsão da permeabilidade dos compostos. No entanto, para os casos da cafeína e testosterona a discrepância na classificação da permeabilidade com base em determinações *in silico* mostra que embora estes preditores teóricos possam ser úteis, não poderão substituir metodologias *in vitro* experimentais de previsão que contenham modelos miméticos de membranas. De facto, os cálculos *in silico* de  $\log D$  são efetuados tendo em conta um sistema octanol/água, que é bastante interessante para triagens rápidas iniciais, mas que apresenta dificuldades em traduzir as interações de compostos ionizados ou com grupos polares como com as membranas [97, 143]. Como o octanol é um composto estritamente apolar, este não consegue replicar a interação composto/membrana que pode decorrer de ligações eletrostáticas, de pontes de hidrogénio ou outro tipo de ligações dipolo-dipolo que se estabelecem entre os compostos e as cabeças polares lipídicas e que podem justificar uma maior partição membranar dos compostos, do que o seria previsto com o sistema octanol/água.

#### **4.5.2. Permeação cutânea teórica avaliada com recurso a valores de coeficientes de distribuição determinados *in vitro***

Procedendo da mesma forma que na secção anterior, mas usando os valores de  $\log D$  determinados *in vitro*, i.e., experimentalmente em modelos miméticos membranares de DPPC e DPPC: CHOL (2:1), foi possível determinar os valores de  $S_p$  e  $J_{\text{máx}}$  que permitirão classificar o tipo de permeação apresentado pelos compostos-modelo e compará-los com valores de  $J_{\text{máx}}$  experimentais determinados em ensaios *ex vivo* em pele humana e de ratinho descritos na literatura (Tabela 13).

**Tabela 13.** Cálculo do Sp e Jmáx com base no log D determinado *in vitro* em modelos miméticos membranares de DPPC e DPPC: CHOL (2:1). Classificação da permeação de acordo com os valores de Jmáx obtidos e comparação com a permeação descrita em estudos reportados na literatura.

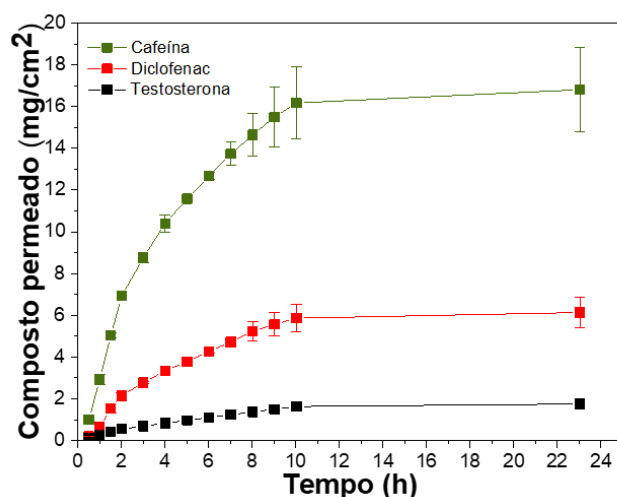
Composto	Modelo membranar DPPC		Modelo membranar DPPC: CHOL (2:1)		Jmáx experimental (mg/cm <sup>2</sup> /h) e classificação da permeação
	Sp (cm/h)	Jmáx teórico (mg/cm <sup>2</sup> /h) e classificação da permeação	Sp (cm/h)	Jmáx teórico (mg/cm <sup>2</sup> /h) e classificação da permeação	
Cafeína	8,73×10 <sup>2</sup>	1,89 muito elevada	1,95×10 <sup>1</sup>	4,20 muito elevada	6,65×10 <sup>3</sup> [140] moderada
Diclofenac	1,46×10 <sup>2</sup>	3,45×10 <sup>5</sup> muito fraca	3,70×10 <sup>2</sup>	8,76×10 <sup>5</sup> muito fraca	2,37×10 <sup>6</sup> [141] muito fraca
Testosterona	5,27×10 <sup>2</sup>	1,23×10 <sup>3</sup> moderada	8,19×10 <sup>2</sup>	1,92×10 <sup>3</sup> moderada	2,69×10 <sup>3</sup> [142] moderada

Pela análise da Tabela 13 é observável que a permeação cutânea e, conseqüentemente, o Jmáx é maior nos sistemas em que há presença de CHOL. El Maghraby e os seus colaboradores [144] concluíram que a adição de CHOL em grandes quantidades tem um efeito perturbador das propriedades de vesículas de DPPC. Nas bicamadas lipídicas constituídas somente por fosfolípidos de estrutura cilíndrica, estes tendem a agrupar-se de uma forma organizada, designando-se esta propriedade por empacotamento lipídico. Quando às bicamadas de fosfolípidos se adicionam moléculas volumosas de CHOL, estas irão perturbar o empacotamento dos fosfolípidos da bicamada atuando como disruptores das interações intermoleculares, o que pode justificar o aumento de permeabilidade membranar. Como tal, os modelos membranares com CHOL numa proporção de 2:1, apresentam uma percentagem considerável de CHOL (33,3%) que poderá justificar o aumento da permeabilidade membranar explicando assim os valores superiores de Jmáx obtidos para estes modelos membranares. Apesar do efeito do CHOL no aumento da permeação cutânea, observável ao nível dos valores de Jmáx obtidos, é de salientar que este efeito, nas condições da temperatura da pele, tem sido descrito como pouco relevante no ordenamento e no empacotamento das bicamadas lipídicas [145]. De facto, também neste trabalho se observou um aumento de Jmáx nos modelos membranares contendo CHOL, mas este aumento não foi, no entanto tão drástico que implique uma alteração na classificação de permeação dos compostos. Assim, verificou-se que em ambos os modelos: a permeação da cafeína é muito elevada; seguindo-se a testosterona que apresenta uma permeação moderada e por fim o diclofenac que apresenta uma permeação muito fraca.

Apesar da diferença existente entre os valores  $J_{\text{máx}}$  teóricos calculados através dos  $\log D$  obtidos *in vitro* nos modelos membranares e os valores  $J_{\text{máx}}$  experimentais, obtidos por ensaios *in vitro* reportados na literatura, a classificação da permeação é concordante para o diclofenac e testosterona, o que parece indicar que os modelos membranares *in vitro* possam constituir uma ferramenta mais interessante na previsão da permeabilidade dos compostos do que os modelos *in silico*. No caso da cafeína os modelos membranares superestimaram a sua permeação em comparação com o que foi reportado. Convém, no entanto, referir que a constituição dos modelos membranares mimetiza apenas a matriz lipídica existente no SC, pelo que outros obstáculos à permeação da cafeína existentes nas restantes camadas cutâneas não são considerados com este modelo simples, o que pode justificar os valores de permeação superiores obtidos nos modelos membranares lipídicos comparativamente aos obtidos *ex-vivo* nas amostras de pele.

#### 4.5.3. Permeação cutânea experimental avaliada com recurso a ensaios *in vitro* em células de difusão de Franz contendo membranas sintéticas

Tal como referido no ponto 3.7 do Capítulo 3 procedeu-se à determinação experimental *in vitro* do  $J_{\text{máx}}$  de cada um dos compostos com recurso a células de difusão de Franz contendo membranas sintéticas de polissulfona. Na Figura 25 encontram-se representados os perfis de permeação de cada um dos compostos ao longo do tempo.



**Figura 25.** Perfis de permeação *in vitro* dos diferentes compostos traçados ao longo do tempo obtidos com recurso a células de difusão de Franz contendo membranas sintéticas de polissulfona.

Na Figura 25 é visível que para todos os compostos há um aumento acentuado da permeação até a  $t=10h$ . A partir desse instante os valores de permeação aproximam-se da estabilização.

A partir da zona linear dos perfis de permeação dos compostos é possível calcular o  $J_{m\acute{a}x}$  tendo por base a primeira lei de Fick da difusão. Estes valores de  $J_{m\acute{a}x}$  obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores de  $J_{m\acute{a}x}$  obtidos *in vitro* com recurso a células de difusão de Franz e respetiva classificação de permeação cutânea de cada composto.

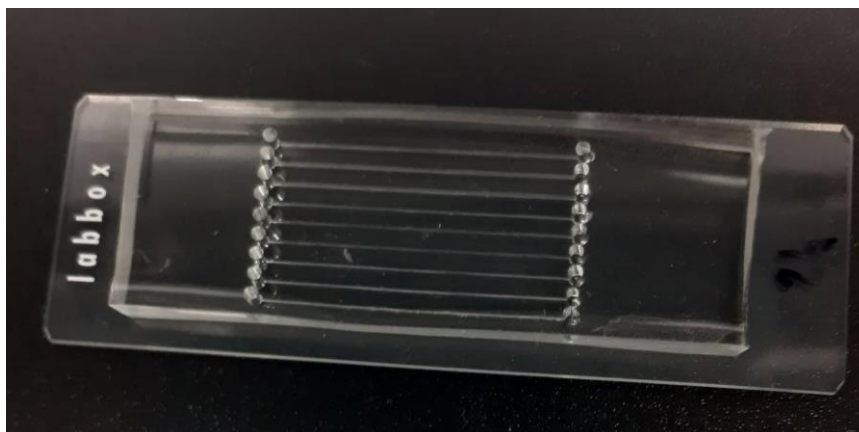
<b>Composto</b>	<b><math>J_{m\acute{a}x}</math> experimental (mg/cm<sup>2</sup>/h) e classificação da permeação</b>	<b><math>J_{m\acute{a}x}</math> experimental reportado (mg/cm<sup>2</sup>/h) e classificação da permeação</b>
Cafeína	$1,76 \times 10^{-2} \pm 0,02072$ elevada	$6,65 \times 10^{-3}$ [140] moderada
Diclofenac	$7,93 \times 10^{-4} \pm 0,00005$ fraca	$2,37 \times 10^{-6}$ [141] muito fraca
Testosterona	$2,02 \times 10^{-4} \pm 0,00004$ fraca	$2,69 \times 10^{-3}$ [142] moderada

Fazendo uma análise da Tabela 14 constata-se que neste ensaio verificou-se uma elevada permeação cutânea para a cafeína e fraca permeação cutânea para o diclofenac e testosterona. Estabelecendo uma comparação entre os resultados deste ensaio com os  $J_{m\acute{a}x}$  experimentais obtidos *ex vivo* em amostras de pele humana ou de ratinho, observa-se uma grande discrepância na classificação da permeação destes compostos. Esta diferença poderá estar relacionada, mais uma vez, com o uso de modelos membranares sintéticos que não mimetizam inteiramente o que acontece na matriz lipídica intercelular do SC. Quer o sistema octanol/água, quer a membrana sintética de polissulfona não conseguem replicar a interação composto/membrana que pode decorrer de ligações eletrostáticas, de pontes de hidrogénio ou outro tipo de ligações dipolo-dipolo que se estabelecem entre os compostos e as cabeças polares lipídicas. Assim, é possível concluir que não basta determinar experimentalmente o  $J_{m\acute{a}x}$  com recurso a células de Franz, é também necessário ter atenção ao tipo de modelos membranares cutâneos utilizados. De facto, a permeação depende grandemente dos modelos membranares usados e poderá ser mais eficaz o cálculo teórico do  $J_{m\acute{a}x}$  partindo de um log D determinado num modelo membranar que mimetize cabalmente a matriz lipídica do SC do que a determinação experimental do  $J_{m\acute{a}x}$  usando membranas sintéticas que não mimetizam de todo a matriz lipídica do SC.

## 4.6. Desenvolvimento de uma plataforma microfluídica para determinação *in vitro* do coeficiente de distribuição

### 4.6.1. Caracterização das plataformas microfluídicas fabricadas

Tal como descrito nas metodologias foi fabricada uma plataforma microfluídica com 9 canais (Figura 26).



**Figura 26.** Fotografia representativa de uma das plataformas microfluídicas desenvolvida.

Foram obtidos canais com 30 mm de comprimento e com larguras variáveis. Os primeiros três canais com largura de 0,05 mm, os três canais seguintes com 0,10 mm de largura e os últimos com 0,20 mm de largura. A altura média dos canais obtida experimentalmente foi de  $0,198 \pm 0,005$  mm.

Com base nos cálculos dimensionais, obteve-se um volume no caso dos canais de  $100 \mu\text{m}$  (usados como primeira abordagem no âmbito deste trabalho) de  $596,50 \mu\text{L}$  e uma área de superfície de  $6,05 \times 10^3 \text{ mm}^2$ . As restantes dimensões são previstas serem estudadas num trabalho futuro de forma a avaliar a sua influência.

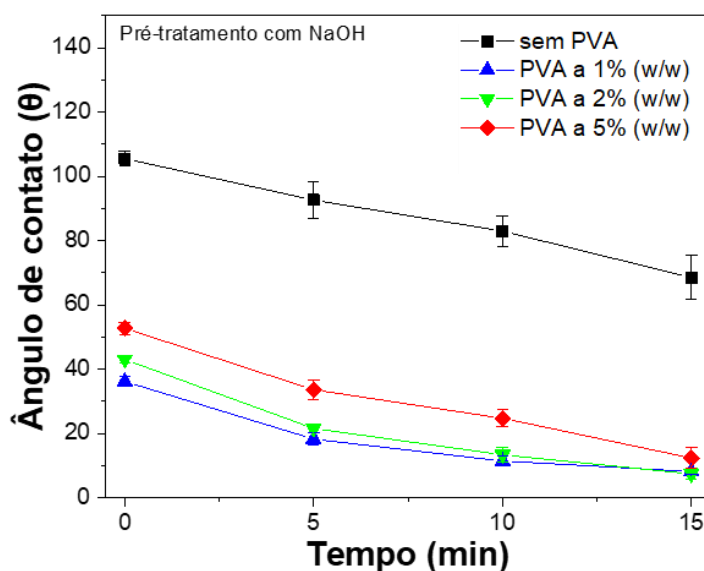
### 4.6.2. Avaliação da eficiência de hidrofilição pelo método do ângulo de contacto

Após o fabrico e caracterização das plataformas microfluídicas os seus canais foram hidrofiliados através do seu revestimento com um polímero hidrofílico, o PVA, conforme o descrito na secção 3.9. das metodologias experimentais. Seguidamente, e com o intuito de provar e otimizar as

condições de hidrofilição dos canais microfluídicos, realizaram-se medidas de ângulo de contacto em filmes de PDMS previamente produzidas cujos resultados aqui se descrevem.

Foram realizados dois ensaios de medidas de ângulo de contacto de uma gota de água depositada em filmes de PDMS não revestidos por PVA, um deles pré-tratado com NaOH e outro sem qualquer pré-tratamento. Estes dois ensaios serviram de controlo para avaliar o efeito de diferentes concentrações de PVA na presença e na ausência de NaOH. Foram também realizados ensaios de medidas de ângulo de contacto de uma gota de água depositada em filmes de PDMS tratados ou não tratados com NaOH e revestidos por concentrações crescentes de PVA (1,2 e 5%).

Na Figura 27 é apresentada a comparação entre os ângulos de contacto obtidos, ao longo do tempo, para amostras de PDMS previamente tratadas com NaOH e com diferentes concentrações de PVA.

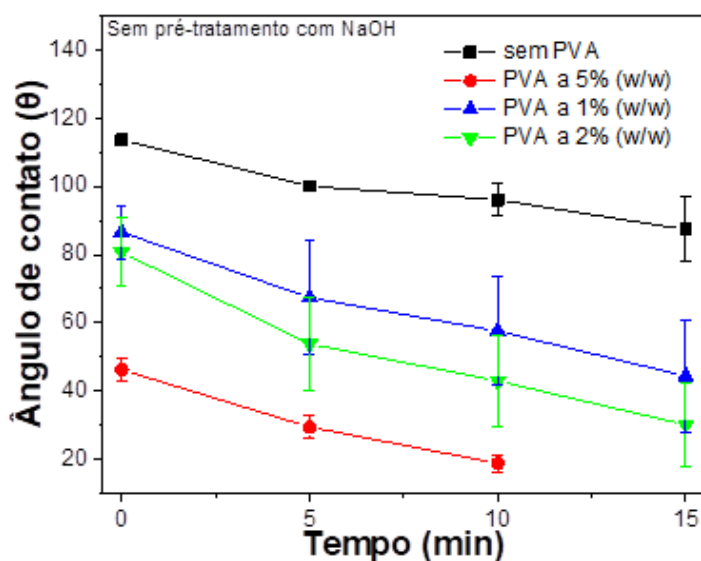


**Figura 27.** Comparação entre os ângulos de contacto obtidos em amostras de PDMS pré-tratadas com NaOH para diferentes tempos ( $t=0$ ,  $t=5$ ,  $t=10$  e  $t=15$  min) na ausência de PVA e na presença de PVA a diferentes concentrações.

Analisando a Figura 27 verifica-se que há uma diminuição considerável do ângulo de contacto nos canais microfluídicos revestidos com PVA em comparação com o controlo. Este resultado comprova a natureza hidrofílica do PVA pois as gotas de água desionizada conseguiram espalhar-se melhor pela superfície dos canais microfluídicos diminuindo o ângulo de contacto. A presença de NaOH também têm influência neste processo pois atua como base forte libertando grupos hidroxilo (OH) que estabelecem ligações covalentes com o PVA tendo um efeito semelhante à

câmara oxigênio-plasma [146]. Estabelecendo a comparação entre as diferentes concentrações de PVA testadas, verifica-se que o ângulo de contacto é menor no instante  $t=0$  quando se tem PVA a 1% (w/w), o que constitui uma vantagem pois indica que a hidrofilição do PDMS ocorreu de forma mais rápida. Com o decorrer do tempo verifica-se que os valores de ângulo de contacto com as diferentes concentrações de PVA vão convergindo ( $t=15$  s). À partida, se a presença de PVA é sinónimo de maior facilidade na hidrofilição dos canais e conseqüentemente menor ângulo de contacto, seria de esperar que o ângulo de contacto fosse menor para concentrações mais elevadas de PVA. Como tal não se verifica, isto poderá indicar que no processo de hidrofilição dos canais não se deve ter em conta apenas fatores químicos, mas também fatores topográficos como a rugosidade da superfície dos canais que influenciam o espalhamento da gota de água desionizada.

Na Figura 28 é apresentada a comparação entre os ângulos de contacto obtidos, ao longo do tempo, para amostras de PDMS sem tratamento prévio com NaOH e com diferentes concentrações de PVA.

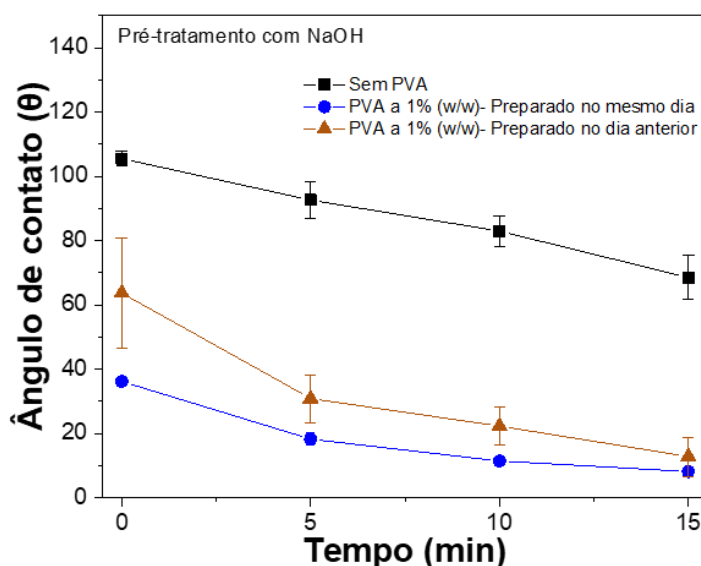


**Figura 28.** Comparação entre os ângulos de contacto obtidos em amostras de PDMS sem pré-tratamento com NaOH para diferentes tempos ( $t=0$ ,  $t=5$ ,  $t=10$  e  $t=15$  min) na ausência de PVA e na presença de PVA a diferentes concentrações.

Analisando a Figura 28 verifica-se que mesmo sem pré-tratamento com NaOH, ocorre hidrofilição dos canais, pois o ângulo de contacto é menor para todas as concentrações de PVA comparativamente com o controlo. Estes resultados devem-se à natureza hidrofílica do PVA. Verifica-se ainda que os valores de ângulo de contacto são maiores inicialmente nos filmes de

PDMS que não foram tratados previamente com NaOH (Figura 28) em comparação com os filmes de PDMS previamente tratados com NaOH (Figura 27). Estes resultados reforçam a ação catalisadora do NaOH na hidrofilição dos canais. Na Figura 28 é observável (a vermelho) que os ângulos de contacto obtidos ao longo do tempo são menores na presença de PVA a 5% (w/w) e maiores na presença de PVA a 1% (w/w) o que contraria os resultados obtidos na Figura 27. Esta diferença comprova, mais uma vez, que deverão ser tidos em consideração outros fatores, como a rugosidade, e que a hidrofilição dos canais não está exclusivamente relacionada com as concentrações de PVA.

Foi também estabelecida uma comparação entre dois filmes de PDMS pré-tratadas com NaOH e com PVA a 1% (w/w) mas um deles foi preparado no mesmo dia e outro foi preparado no dia anterior (Figura 29).



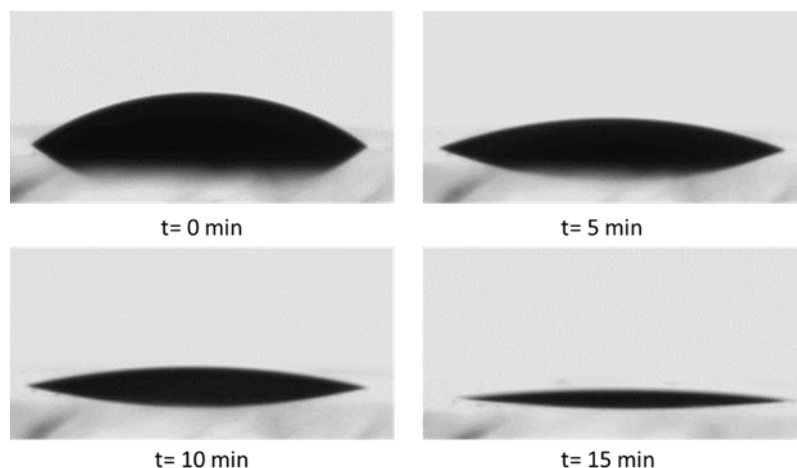
**Figura 29.** Comparação entre os ângulos de contacto obtidos em amostras de PDMS pré-tratadas com NaOH no próprio dia (a azul) VS no dia anterior (a castanho) e com a mesma concentração de PVA – 1% (w/w).

Com base nos resultados apresentados na Figura 29 verifica-se um ângulo de contacto menor nos filmes com PVA preparados no mesmo dia em comparação com o do dia anterior. A partir destes resultados é possível inferir que a hidrofilição dos canais é mais eficiente no próprio dia no qual se processa a hidrofilição dos canais. Ou seja, a propriedade hidrofílica dos microcanais vai-se perdendo com o tempo.



Tendo em conta os resultados obtidos, concluiu-se que neste trabalho seria mais vantajoso revestir os canais com PVA a 1% (w/w), pois no caso de pré-tratamento com NaOH, obteve-se um ângulo de contacto menor de forma mais rápida. Dos resultados aqui apresentados também se conclui que a deposição das bicamadas lipídicas nos microcanais deve ser feita imediatamente a seguir ao processo de hidrofilição, a fim de aproveitar o ponto máximo desta propriedade.

Na Figura 30 estão representadas as imagens obtidas da gota de água desionizada nas condições escolhidas para este trabalho nos instantes  $t=0$  min,  $t=5$  min,  $t=10$  min e  $t=15$  min.



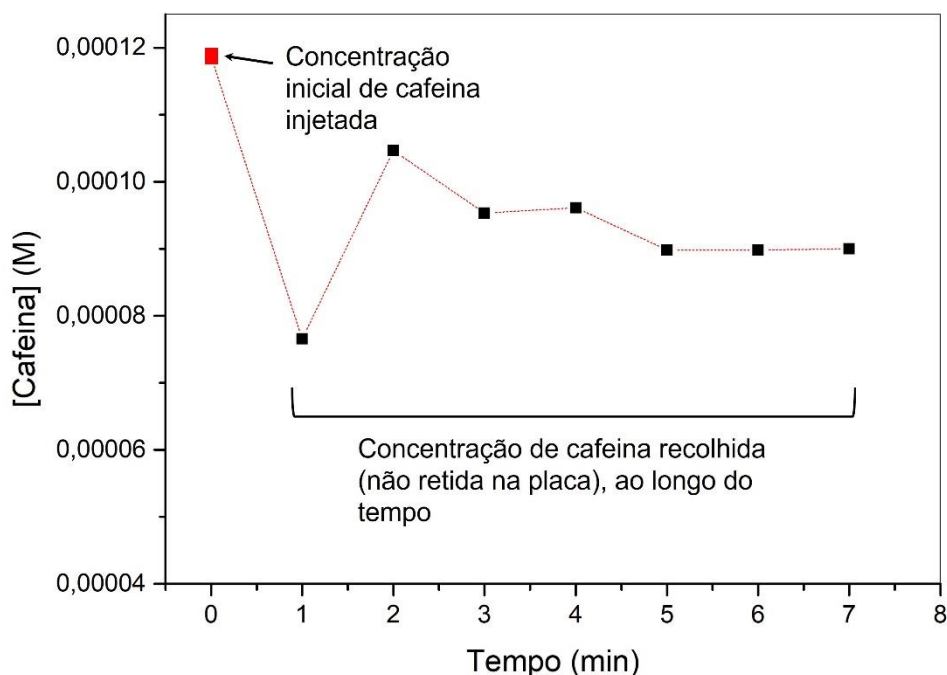
**Figura 30.** Imagem obtida da gota de água desionizada ao longo do tempo com pré-tratamento com NaOH e na presença de PVA a 1% (w/w).

#### **4.6.3. Determinação *in vitro* do coeficiente de distribuição da cafeína usando uma plataforma microfluídica**

Após a confirmação, através das determinações do ângulo de contacto, de que a hidrofilição dos microcanais tinha sido bem-sucedida procedeu-se à formação das SLBs de DPPC no interior dos microcanais com largura de  $100\ \mu\text{m}$  (como primeira abordagem) através do protocolo SALB descrito no capítulo 3, secção 3.11.

Para determinação do  $\log D$  na plataforma microfluídica hidrofiliada e com canais revestidos de SLBs de DPPC foi testado o composto cafeína. Para o efeito, foi injetada nos canais uma solução de cafeína com concentração de  $1,2 \times 10^{-4}$  M (em tampão universal a pH 5.5). A solução de cafeína foi injetada na entrada dos canais microfluídicos e alíquotas desta solução foram recolhidas a cada minuto na saída dos canais. A quantificação de cafeína em cada alíquota foi efetuada pelo método de doseamento por espectrofotometria UV/Vis previamente validado e a Figura 31, mostra a

concentração inicial injetada e a variação da concentração de cafeína recolhida que não ficou retida nos canais.



**Figura 31.** Concentração da solução de cafeína (pH 5.5) injetada nos canais da plataforma microfluidica hidrofílica e revestida de SLB de DPPC e concentração da cafeína que não ficou retida nos canais e foi recolhida a vários tempos.

Analisando a Figura 31 é possível verificar que parte da cafeína injetada fica retida nos canais provavelmente decorrente da distribuição deste composto nas membranas suportadas de DPPC. No primeiro tempo após injeção a retenção da cafeína é maior, mas nos períodos subsequentes há uma menor concentração retida até que se atinge um equilíbrio e a concentração recolhida é praticamente constante. Nesse ponto a partir da diferença entre a concentração inicial e a concentração não retida foi possível determinar a concentração distribuída nas membranas de DPPC e como também é conhecida a concentração de composto não retida presente na fase aquosa, foi possível, a partir da equação 10 da secção 3.12., determinar  $\log D=1,13$ .

Este foi um ensaio preliminar que necessita ser repetido quer para a cafeína, quer para os restantes compostos e dimensões de canais, mas permitiu verificar que o  $\log D$  da cafeína

determinado em microplaca com o modelo de DPPC é inferior ao log D da cafeína determinado no modelo de DPPC por espectrofotometria derivativa. Tal poderá ocorrer pelo facto de o método de espectrofotometria derivativa ser um método estático, que permite um maior contacto entre o composto e o modelo membranar, enquanto o método da microplaca implica um fluxo de composto que pode diminuir a sua interação com as membranas lipídicas. De qualquer forma os processos de permeação *in vivo* dependem de processos de difusão que são influenciados pelo fluxo sanguíneo e aquoso existente ao nível cutâneo, pelo que uma vez otimizada a determinação do coeficiente de distribuição em placas microfluidicas, este procedimento poderá apresentar maior capacidade mimética com o processo de distribuição membranar biológica. Inclusivamente, usando o valor de  $\log D=1,13$  da cafeína determinado em placa de microfluidica para prever o  $J_{\text{máx}}$  teórico (equações 8 e 9 do capítulo 3), obtém-se um valor de  $J_{\text{máx}}$  de  $1,79 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^2/\text{h}$ , ainda indicativo de uma permeação elevada, mas mais próximo do valor experimental reportado.

## **CAPÍTULO 5**

---

# **CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

Através da previsão *in silico* realizada para os três compostos-modelo é possível classificar a cafeína como um composto hidrofílico ( $\log D = -0,55$ ) e por isso, com baixa capacidade de permear as membranas lipídicas da pele. A mesma previsão sugere que o diclofenac ( $\log D = 2,75$ ) e a testosterona ( $\log D = 3,37$ ) são compostos com maior lipofilicidade e, portanto, maior capacidade de permearem a pele.

Recorrendo aos estudos *in vitro* dos compostos-modelo observa-se que os valores de  $\log D$  do diclofenac e da testosterona obtidos em sistemas miméticos membrana/água não diferem significativamente dos valores de  $\log D$  obtidos *in silico* e em ambos os casos permitem classificar estes dois compostos como lipofílicos reforçando a capacidade destes compostos para permear a matriz lipídica do SC. No caso da cafeína, o  $\log D$  obtido *in vitro* é significativamente superior e classificam a cafeína como um composto lipofílico ( $\log D > 3$ ). Esta diferença considerável em relação aos valores obtidos em estudos que recorrem ao sistema octanol/água poderá estar relacionada com o facto de estes sistemas, ao contrário de sistemas lipídicos biomiméticos das membranas celulares, não terem em conta as interações entre os compostos e os grupos polares dos fosfolípidos, ou outras interações presentes nas membranas biológicas como ligações iónicas, pontes de hidrogénio ou interações dipolo-dipolo.

A caracterização biofísica dos modelos membranares mostrou que quando incorporados, o diclofenac ou a testosterona, nos lipossomas de DPPC promoveram uma maior difusão lateral desses lípidos, provocando um aumento da fluidez membranar com conseqüente redução do valor de  $T_m$  tendo também influência no empacotamento lipídico. Em modelos membranares contendo CHOL verificou-se uma redução na  $T_m$  no caso da cafeína e no diclofenac (ação fluidizante dos compostos) ao contrário da testosterona que promoveu a rigidez das membranas lipídicas. É necessário referir que a presença de CHOL provocou um aumento significativo do  $\log D$  para todos os compostos comparativamente com a previsão *in silico*, o que atesta a sua importância ao nível das membranas nas interações estabelecidas entre estas e os compostos que nela se distribuem. Também foram analisados os valores de permeação e de fluxo máximo que permitiram retirar ilações ao nível da permeação cutânea dos diferentes compostos. A classificação da permeação cutânea do diclofenac na literatura é semelhante à sua classificação obtida *in silico*, o que indica que esta previsão pode ser uma ferramenta interessante no estudo da permeação cutânea, mas a discrepância verificada nos casos da cafeína e da testosterona provam que, embora sejam úteis, os preditores *in silico* baseados em sistemas octanol/água não substituem metodologias experimentais que contenham modelos miméticos de membranas lipídicas. Através da

comparação dos valores de permeação descritos na literatura e os valores de permeação obtidos *in vitro* constata-se que os valores de  $J_{\text{máx}}$  são superiores *in vitro* o que poderá ser explicado pela presença de uma elevada percentagem de CHOL nos ensaios *in vitro*. No entanto, este aumento do  $J_{\text{máx}}$  nos modelos membranares contendo CHOL não foram tão significativos, pois a classificação da permeação dos compostos é concordante com a literatura. Este facto poderá estar relacionado com as condições da temperatura da pele.

A determinação experimental dos valores do  $J_{\text{máx}}$  dos compostos-modelo com recurso à metodologia clássica das células de Franz usando um modelo sintético era outro objetivo deste trabalho. Neste ensaio, verificou-se uma elevada permeação cutânea para a cafeína e fraca permeação cutânea para o diclofenac e testosterona que, comparativamente com os  $J_{\text{máx}}$  experimentais obtidos *ex vivo* em ensaios com pele humana ou animal, apresentam uma grande discrepância na classificação da permeação dos compostos. Esta diferença deve-se ao facto da membrana sintética de polissulfona utilizada neste ensaio, tal como os sistemas octanol/água, não conseguirem mimetizar completamente a interação composto/membrana.

Para a incorporação dos modelos membranares numa plataforma microfluídica foi necessário proceder à hidrofilição dos canais microfluídicos devido à natureza hidrofóbica do PDMS (material constituinte da plataforma). Para tal, foi necessário otimizar o processo de hidrofilição dos canais através da medição do ângulo de contacto, tendo-se obtido maior sucesso neste propósito quando os canais sofreram pré-tratamento com NaOH e foram revestidos com PVA a 1% (w/w). O facto de na presença de maior concentração de PVA não se terem obtido ângulos de contacto menores indicia que para otimizar este processo deve-se ter em conta, não só fatores químicos, mas também topográficos como a rugosidade dos canais.

Por último, realizou-se um ensaio preliminar de determinação do log D da cafeína numa plataforma microfluídica já hidrofiliada e verificou-se um log D menor em relação ao log D obtido através do método de espectrofotometria derivativa. Este resultado poderá dever-se ao facto de o ensaio por espectrofotometria derivativa ser um ensaio estático, permitindo mais tempo de interação composto/membrana, ao contrário do ensaio na plataforma microfluídica que tem um fluxo associado. No entanto, verificou-se um valor mais próximo do valor experimental o que sugere que este tipo de ensaios, uma vez otimizados, poderão ser muito promissores na mimetização das membranas lipídicas. O ensaio em plataformas microfluídicas apresenta outra vantagem pois não é um ensaio estático, o que representa o que acontece *in vivo* onde o fluxo sanguíneo e aquoso influencia os processos de difusão ao nível cutâneo.

De salientar que o ensaio na plataforma microfluídica é um ensaio preliminar que deverá ser otimizado e repetido quer para a cafeína, quer para o diclofenac, a testosterona e outros compostos com propriedades físico-químicas diversas. De forma a proceder à otimização do sistema, seria interessante testar canais microfluídicos com diferentes dimensões e com fluxos menores de forma a promover uma maior interação composto/modelo membranar e consequente retenção do composto nos canais. Poder-se-á também reduzir os tempos de recolha das alíquotas de forma a conseguir perceber de forma mais pormenorizada o processo de formação das bicamadas nos canais microfluídicos e a sua interação com os compostos.

Futuramente, é importante continuar a otimizar a incorporação de modelos miméticos das membranas lipídicas com recurso à microfluídica devido às vantagens desta tecnologia como ensaio de triagem rápida de HTS de forma a aprimorar o processo de descoberta de fármacos para aplicações farmacêuticas e cosméticas.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- [1] MacArron, R. *et al.* , “Impact of high-throughput screening in biomedical research,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, pp. 188-195, 2011.
- [2] Chan, G.*et al.* , “A High Throughput Screening Platform for Skin Tuning Properties from Natural Products: Identification of Skin Tanning Compounds.,” *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.*, vol. 6, pp. 199-209, 2016.
- [3] Alkilani, A.Z. *et al.* , “Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum.,” *Pharmaceutics*, vol. 7, n° 4, pp. 438-470, 2015.
- [4] Schoellhammer, C.M. *et al.* , “Skin Permeabilization for Transdermal Drug Delivery: Recent Advances and Future Prospects.,” *Expert Opinion Drug Delivery*, vol. 11, pp. 393-407, 2014.
- [5] Lopes, C.M. *et al.* “Chapter 14: Lipid-based colloidal carriers for topical application of antiviral drugs”.,” em *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications*, edited by Alexandru Mihai Grumezescu, Oxford: Willian Andrew, Elsevier Inc., 2018, pp. 565-622.
- [6] Sharma, P. *et al.* , “Novel drug delivery approaches on antiviral and antiretroviral agents,” *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, vol. 3, pp. 147-159, 2012.
- [7] Gonzalez, H. *et al.* , “Percutaneous absorption with emphasis on sunscreens,” *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 9, pp. 482-488, 2010.
- [8] Foldvari, M. *et al.* , “DNA Delivery for Vaccination and Therapeutics Through the Skin”, *Current Drug Delivery*, vol. 3, n° 1, pp. 17-28, 2005.
- [9] Wong, R. *et al.* , “The dynamic anatomy and patterning of skin,” *Experimental Dermatology*, vol. 25, pp. 92-98, 2016.
- [10] Nafisi, S. *et al.* , “Chapter 3. Skin penetration of nanoparticles,” *Emerging Nanotechnologies in Immunology*, pp. 47-88, 2018.
- [11] Losquadro, W. D. “Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer,” *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* , vol. 25, pp. 283–289, 2017.
- [12] Menon, G. K. *et al.* , “New insights into skin structure : scratching the surface,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 1, 2002.
- [13] Narasimha Murthy, S. *et al.* , “CHAPTER 1 - Topical and Transdermal Drug Delivery. Editor(s):Vitthal S. Kulkarni.,” em *In Personal Care & Cosmetic Technology, Handbook of Non- Invasive Drug Delivery Systems.*, William Andrew Publishing, 2010, pp. 1-36.

- [14] Bento, B.S. (2015). "Fotoenvelhecimento cutâneo: Processo/Produtos,". (Tese de mestrado), Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- [15] Van Smeden, J. *et al.* , "Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients," *Current Problems in Dermatology (Switzerland)*, vol. 49, pp. 8-26, 2016.
- [16] Elias, P.M. , "Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, pp.2131-2133 , 2012.
- [17] White, S. *et al.* , "Structure of Lamellar Lipid Domains and Corneocyte Envelopes of Murine Stratum Corneum. An X-ray Diffraction Study," *Biochemistry*, vol. 27, pp. 3725-3732, 1988.
- [18] Schaefer, H. *et al.* , "Chapter 12: Skin Penetration," em *Contact Dermatitis (Fifth Edition)*, Basel, 2011, pp. 43-44.
- [19] Bouwstra, J.A. , "Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering", *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 1005-1012, 1991.
- [20] Groen, D. *et al.* , "New Insights into the Stratum Corneum Lipid Organization by X-Ray Diffraction Analysis," *Biophysics.*, vol. 97, pp. 2242-2249, 2009.
- [21] Neubert, H. *et al.* , "Overcoming the Stratum Corneum: The modulation of skin penetration," *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 19, pp. 106-121, 2006.
- [22] Avdeef, A. *et al.* , "Physicochemical profiling in drug research: A brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 59, pp. 1681-1689, 2002.
- [23] Fernandes, E. *et al.* , "Spectroscopic studies as a toolbox for biophysical and chemical characterization of lipid-based nanotherapeutics," *Frontiers in Chemistry*, vol. 6, pp. 1-20, 2018.
- [24] Hale, T. *et al.* , "Chapter 23: Drug Transfer During Breast-Feeding," em *Fetal and Neonatal Physiology*, Elsevier Inc, 2017, pp. 239-248.
- [25] Fluhr, J.W. *et al.* , "Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'," *Exogenous Dermatology*, vol. 1, pp. 163-175, 2002.
- [26] Deleu, M. *et al.* , "Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1838, pp. 3171-3190, 2014.
- [27] Seddon, A. *et al.* , "Drug interactions with lipid membranes," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, pp. 2509-2519, 2009.
- [28] Neupane, R. B., "Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities," *Pharmaceutics*, vol. 12, pp.152, 2020.

- [29] Ottaviani, G.M. *et al.* , “Parallel artificial membrane permeability assay: A new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 49, pp. 3948-3954, 2006.
- [30] Flaten, G. *et al.* , “In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 75, pp. 10-24, 2015.
- [31] Berben, P. *et al.* , “European Journal of Pharmaceutical Sciences Drug permeability profiling using cell-free permeation tools : Overview and applications,” vol. 119, pp. 219-22, 2018.
- [32] Engesland, A. *et al.* , “Phospholipid vesicle-based permeation assay and EpiSkin ® in assessment of drug therapies destined for skin administration,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, pp. 1119-1127, 2015.
- [33] Miranda, G. *et al.* , “Preparation and characterization of a stratum corneum substitute for in vitro percutaneous penetration studies,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1758, pp. 636-644, 2006.
- [34] Maget-Dana, R. , “The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1462, pp. 109-140, 1999.
- [35] Brezesinski, G. *et al.* , “Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 100–102, pp. 563–584, 2003.
- [36] Li, H. *et al.* , “Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions,” *Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 1-23, 2017.
- [37] Knobloch, J.S. *et al.* , “Membrane-drug interactions studied using model membrane systems,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 22, pp. 714-718, 2015.
- [38] Eloy, J. *et al.* , “Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 25, pp. 606-635, 2018.
- [39] Elsayed, M. *et al.* , “Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 332, pp. 1-16, 2007.
- [40] Goñi, F.M. , “The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1838, n° 1467-1476, 2014.
- [41] Tyrrell, D.A. *et al.* , “New aspects of liposomes,” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, vol. 457, pp. 259-302, 1976.
- [42] Lasic, D.D. , "Applications of liposomes", California. Elsevier Masson SAS, 1995.

- [43] Akbarzadeh, A. *et al.* , "Liposome: classification, preparation , and applications", *Nanoscale Research Letters*, vol. 1, pp. 1-9, 2013.
- [44] Kilic, A.K. *et al.* , "Biomimetic lipid bilayers on solid surfaces : models for biological interactions", *Surface Innovations*, vol. 4, pp. 1-17, 2016.
- [45] Castellana, E.T. *et al.* , "Solid supported lipid bilayers : From biophysical studies to sensor design", *Surface Science Reports*, vol. 61, pp. 429-444, 2006.
- [46] Hanna, P. *et al.* , "Formation of supported phospholipid bilayers via co-adsorption with h-dodecyl maltoside," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1668, pp. 17-24, 2005.
- [47] Sanderson, M. *et al.* , "Resolving the kinetics of lipid, protein and peptide diffusion in membranes", *Molecular membrane biology*, pp. 1-26, 2012.
- [48] Telaprolu, K. *et al.* , "Skin models for the testing of transdermal drugs", *Clinical Pharmacology*, vol. 8, pp. 163-176, 2016.
- [49] Tsakovska, I. *et al.* , "Quantitative Structure- Skin permeability relationships", *Toxicology*, vol. 387, pp. 27-42, 2017.
- [50] Niculescu, A.G. *et al.* , "Fabrication and applications of microfluidic devices: A review", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, pp. 1-26, 2021.
- [51] George, M.W. , "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, 2006.
- [52] Sung, H. , "Organ-on-a-chip technology and microfluidic whole-body models for pharmacokinetic drug toxicity screening", *Biotechnology*, vol. 8, pp. 1258-1266, 2013.
- [53] Neuzil, P.S. *et al.* , "Revisiting lab-on-a-ship to technology for drug discovery", *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 11, pp. 620-632, 2012.
- [54] Karabacak, N. *et al.* , "Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples", *Nature Protocols*, vol. 9, pp. 694-710, 2014.
- [55] D. L. D. Erickson, "Integrated microfluidic devices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 507, pp. 11-26, 2004.
- [56] Srinivasan, V. *et al.* , "An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids", *Lab-on-a-ship*, vol. 4, pp. 310-315, 2004.
- [57] Abgrall P. *et al.* , "Lab-on-chip technologies: Making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem-A review", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, 2007.
- [58] Ren, K. *et al.* , "Materials for microfluidic chip fabrication", *Accounts of Chemical Research*, vol. 46, pp. 2396-2406, 2013.

- [59] Nge, P. *et al.* , "Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integrations and Applications.", *Chemical Reviews*, vol. 113, pp. 2580-2583, 2013.
- [60] Jensen, F. *et al.* , "Aminolysis of epoxides in a microreactor system: A continuous flow approach to  $\beta$ -Amino alcohols", *Organic Process Research and Development*, vol. 14, pp. 432-440, 2010.
- [61] Laurencin, C.T. *et al.* em *Nanotechnology and regenerative engineering: the scaffold*., CRC Press, 2014.
- [62] Ghanekar, A. *et al.* , "Dynamic optical response of SU-8 upon UV treatment," *Optical Materials Express*, vol. 8, pp. 2017-2025, 2018.
- [63] Moreau, W.M. , "Semiconductor lithography: principles, practices, and materials.", *Springer Science & Business Media*, 2012.
- [64] Pinto, V.C. *et al.* , "Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities", *Micromachines*, vol. 5, pp. 738-755, 2014.
- [65] Dey, P.K. *et al.* , "Microstructuring of SU-8 resist for MEMS and bio-applications", *International Journal on Smart Sensing and Intelligent Systems*, vol. 3, pp. 118-129, 2010.
- [66] Zhang, J. *et al.* , "Characterization of the polymerization of SU-8 photoresist and its applications in micro-electro-mechanical systems (MEMS)", *Polymer Testing*, vol. 20, pp. 693-701, 2001.
- [67] Seidemann, V. *et al.* , "SU8-micromechanical structures with in situ fabricated movable parts," *Microsystems Technology*, vol. 8, pp. 348-350, 2002.
- [68] Martinez-Duarte, R. *et al.* , em *SU-8 photolithography and its impact on microfluidics*., Florida, USA, CRC Press: Boca Raton, 2011, pp. 231-268.
- [69] Anderson, J.R. *et al.* , "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)", *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 27-40, 2000.
- [70] Fujii T. *et al.* , "PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications", *Microelectronic Engineering*, vol. 61, n° 2, pp. 907-914, 2002.
- [71] Mata, A. *et al.* , "Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems", *Biomeicd Microdevices*, vol. 7, pp. 281-293, 2005.
- [72] Tan, S.H. *et al.* , "Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel.," *Biomicrofluidics*, vol. 4, 2010.
- [73] Dearden, *et al.* , "In silico prediction of drug toxicity," *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, vol. 17, pp. 119-127, 2003.

- [74] Kerns, E. H. *et al.* , “High throughput physicochemical profiling for drug discovery,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 90, pp. 1838-1858, 2001.
- [75] Avdeef, A. *et al.* , “Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State),” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 1, pp. 277-351, 2005.
- [76] Kerns, H. *et al.* , “Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME”, *Journal of Experimental Psychology: General* 136, 2008.
- [77] Simões, A. *et al.* , “A Tutorial for Developing a Topical Cream”, *Journal of Pharmaceutical Sciences* , pp. 2653-2662, 2018.
- [78] Yu, L.X. *et al.* , “Understanding Pharmaceutical Quality”, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, pp. 771-783, 2014.
- [79] Yu, L. X. , “Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding”, *Pharmaceutical Research*, vol. 25, pp. 781-791, 2008.
- [80] Viswanadhan, V.N. *et al.* , “Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain,” *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, vol. 29, pp. 163-172, 1989.
- [81] Edwards, D.A. *et al.* , “A linear theory of transdermal transport phenomena,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 83, pp. 1315-1334, 1994.
- [82] Szumala, P. *et al.* , “Transdermal transport of collagen and hyaluronic acid using water in oil microemulsion,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 572, pp. 118738-118745 2019.
- [83] Walsh, L. *et al.* , “Nanotopography Facilitates in Vivo Transdermal Delivery of High Molecular Weight Therapeutics through an Integrin-Dependent Mechanism,” *Nano Letters*, vol. 15, pp. 2434-2441, 2015.
- [84] Martinho, J.M.G ., “Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível,” *Porta Química*, vol. 52, pp. 44-46, 1994.
- [85] Agency European Medicines, “ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology”, pp. 1-15, 1995.
- [86] Andrews, W.H. *et al.* , “AOAC INTERNATIONAL's: Three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods”, *Trends in Food Science and Technology*, vol. 7, pp. 147-151, 1996.
- [87] Teasdale, A. *et al.* , “2017-BORMAN Q2 R1 Validation of Analytical procedures”, vol. 2, pp. 127-166, 2018.

- [88] Weissig, V. , “Liposomes: Methodes and Protocols”, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1522, pp. 1-15, 2017.
- [89] Yaroslavov, A. A. *et al.* , “Multi-liposomal containers”, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 226, pp. 54-64, 2015.
- [90] Karmakar, S. *et al.*, “Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering : Techniques to Characterise Stability and Surface distribution of Charged Colloids Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering : Technique”, *Recent Trends in Materials: Physics and Chemistry*, pp. 117-159, 2019.
- [91] Scopes, R.K. *et al.* , “Analysis of Proteins,” *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 44, pp. 1-14, 1998.
- [92] (ISO), International Organization for Standardization, “Particle Size Analysis- Dynamic Light Scattering (DLS)”, vol. 2, n° ISO 22412, pp. 1-34, 2017.
- [93] Hiemenz, P.C. *et al.* , "Principles of Colloid and Surface Chemistry, Revised and Expanded", 3rd edition. CRC Press, 1997.
- [94] Mouritsent, O.G. *et al.* , “Micro-, nano- and meso-scale heterogeneity of lipid bilayers and its influence on macroscopic membrane properties”, *Molecular Membrane Biology*, vol. 12, pp. 15-20, 1995.
- [95] Charrier, A. *et al.* , “Main phase transitions in supported lipid single-bilayer”, *Biophysical Journal*, vol. 89, pp. 1094-1101, 2005.
- [96] Michel, N. *et al.* , “Determination of phase transition temperatures of lipids by light scattering,” *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 139, pp. 11-19, 2006.
- [97] Fernandes, E. *et al.* , “A molecular biophysical approach to diclofenac topical gastrointestinal damage”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, pp. 1-26, 2018.
- [98] Santos, N.C. *et al.* , “Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods”, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1612, pp. 123-135, 2003.
- [99] Kitamura, K. *et al.* , “Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chlorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 304 , pp. 101-106, 1995.
- [100] Magalhães, L.M. *et al.* , “High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients”, *Nature Protocols*, vol. 5, pp. 1823-1830, 2010.
- [101] Saad, P. *et al.*, “Infrared spectroscopic studies of sodium dodecyl sulphate permeation and interaction with stratum corneum lipids in skin” , *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 34, pp. 36–43, 2012.

- [102] “Food and Drug Administration. SUPAC-SS: Nonsterile Semisolid Dosage Forms, Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation; Food and Drug Administration,” Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 1997. , 1997. [Online]. Available: Food and Drug Administration. SUPAC-SS: Nonsterile Semisolid Dosage Forms, Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation; . [Acedido em 15th March 2022].
- [103] Shioh Fern, N. G. *et al.* , “Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies”, *American Association of Pharmaceutical Scientists* vol. 11, pp. 1432–1441, 2010.
- [104] “<https://apps.ncl.ac.uk/edetox/searchinvitro.aspx>,”[Online].Available: <https://apps.ncl.ac.uk/edetox/searchinvitro.aspx>.. [Acedido em 24 th March 2022].
- [105] Ferhan, A. *et al.* , “Solvent-assisted preparation of supported lipid bilayers”, *Nature Protocols*, vol. 14, pp. 2091-2118, 2019.
- [106] Hebbar, R.S. *et al.* , “Membrane Characterization, Chapter 12 - Contact Angle Measurements Editor(s): Nidal Hilal, Ahmad Fauzi Ismail, Takeshi Matsuura, Darren Oatley-Radcliffe,” *Elsevier*, pp. 219-255., 2017.
- [107] Tabaei, S. *et al.* , “Biomembrane fabrication by the solvent-assisted lipid bilayer (SALB) method”, *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2015, pp. 1-12, 2015.
- [108] Lambers, H. *et al.* , “Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora,” *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 28, pp. 359-370, 2006.
- [109] Palareti, G. *et al.* , “Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study,” *International Journal of Laboratory Hematology*, vol. 38, pp. 42-49, 2016.
- [110] Abd, E. *et al.* , “Deformable liposomes as enhancer of caffeine penetration through human skin in a Franz diffusion cell test”, *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 43, pp. 1-10, 2021.
- [111] Hitchcock, S.A. *et al.* , “Structure-brain exposure relationships”, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 49 pp. 7559-7583, 2006.
- [112] Lipinski, C.A. *et al.* , “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 4-17, 2012.
- [113] Brown, M.B. *et al.* , “Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects”, *Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, pp. 175-187, 2006.



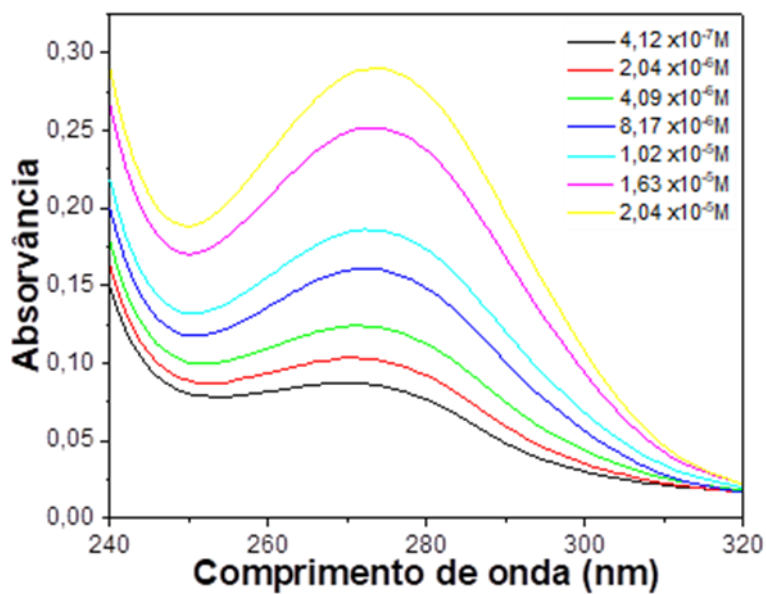
- [114] Singh, P. *et al.* , "Skin permeability and local tissue concentrations of non-steroidal antiinflammatory drugs after topical application", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 1612, pp. 123-135, 2003.
- [115] Cordero, J.A. *et al.* "A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 86, pp. 503-508, 1997.
- [116] Sengupta, C. *et al.* em "*Antiinflammatory and anti-rheumatic drugs, volume II: newer anti-inflammatory drugs*", vol. 2, In: Rainsford K, editor., 1985, pp. 49-63.
- [117] Altman, R. *et al.* , "Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology", *Drugs*, vol. 75, pp. 859-877, 2015.
- [118] Takács-Novák, K. *et al.* , "Lipophilicity of amphoteric molecules expressed by the true partition coefficient", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 12, pp. 47-55, 1995.
- [119] Shah, V. *et al.* , "Bioanalytical method validation - A revisit with a decade of progress", *Pharmaceutical Research*, vol. 17, pp. 1551-1557, 2000.
- [120] Boisguérin, P. *et al.* , "Peptide-based nanoparticles for therapeutic nucleic acid delivery," *Biomedicines*, vol. 9, 2021.
- [121] Maswadeh, H. *et al.* , "In-vitro cytotoxic/cytostatic activity of anionic liposomes containing vinblastine against leukaemic human cell lines", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 54, pp. 189-196, 2010.
- [122] Leonenko, Z.V. *et al.* , "Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy.," *Biophysical Journal*, vol. 86, pp. 3783-3793, 2004.
- [123] Wen, C. *et al.* , "Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing", *Scientific Reports*, vol. 8 , pp. 1-11, 2018.
- [124] Jain, M.K. *et al.* , "Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 34, pp. 157-201, 1977.
- [125] Biruss, B. *et al.* , "The influence of selected steroid hormones on the physicochemical behaviour of DPPC liposomes", vol. 148, pp. 84-90, 2007.
- [126] Ohvo-Rekilä, H. *et al.* , "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes", *Progress in Lipid Research*, vol. 41, pp. 66-97, 2002.
- [127] Raffy, S. *et al.* , "Control of lipid membrane stability by cholesterol content", *Biophysical Journal*, vol. 76, pp. 2072-2080, 1999.

- [128] Sierra-Valdez, F. *et al.* , “The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers”, *PLoS ONE*, vol. 8, n° 4, pp. 1-6, 2013.
- [129] Biltonen, R.L. *et al.* , “The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations”, *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 64, pp. 129-142, 1993.
- [130] Khondker, A. *et al.* , “Partitioning of caffeine in lipid bilayers reduces membrane fluidity and increases membrane thickness”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 19, pp. 7101-7111, 2017.
- [131] Min, H. *et al.* , “Effects of phosphoethanolamine supplementation on mitochondrial activity and lipogenesis in a caffeine ingestion caenorhabditis elegans model”, *Nutrients*, vol. 12, pp. 1-21, 2020.
- [132] Ramsden, J. J. , “Partition coefficients of drugs in bilayer lipid membranes”, *Experientia*, vol. 49 pp. 688-692, 1993.
- [133] Budai, L. *et al.* , “Liposomes for topical use: A physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin”m *Scientia Pharmaceutica*, vol. 81, pp. 1151-1166, 2013.
- [134] Klopman, G. *et al.* , “Recent methodologies for the estimation of N-octanol/water partition coefficients and their use in the prediction of membrane transport properties of drugs.,” *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 5, pp. 127-133, 2005.
- [135] Oprea, T.I. *et al.* , “Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective”, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, vol. 41 , pp. 1308-1315, 2001.
- [136] Hansch, C. *et al.* , “Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants”, Washington DC, American Chemical Society, 1995, p. 44.
- [137] Gaspari, F. *et al.* , “Correlation between n-octanol/water partition coefficient and liquid chromatographic retention for caffeine and its metabolites, and some structure-pharmacokinetic considerations,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 39, pp. 252-260, 1987.
- [138] Ferreira, H. *et al.* , “Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: A spectrophotometric and fluorescence study”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377 pp. 293-298, 2003.
- [139] Andrade, S. *et al.* , “Interaction of natural compounds with biomembrane models: A biophysical approach for the Alzheimer's disease therapy”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 180, pp. 83-92, 2019.
- [140] Dias, M. *et al.* , “Topical delivery of caffeine from some commercial formulations”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 182, pp. 41-47, 1999.

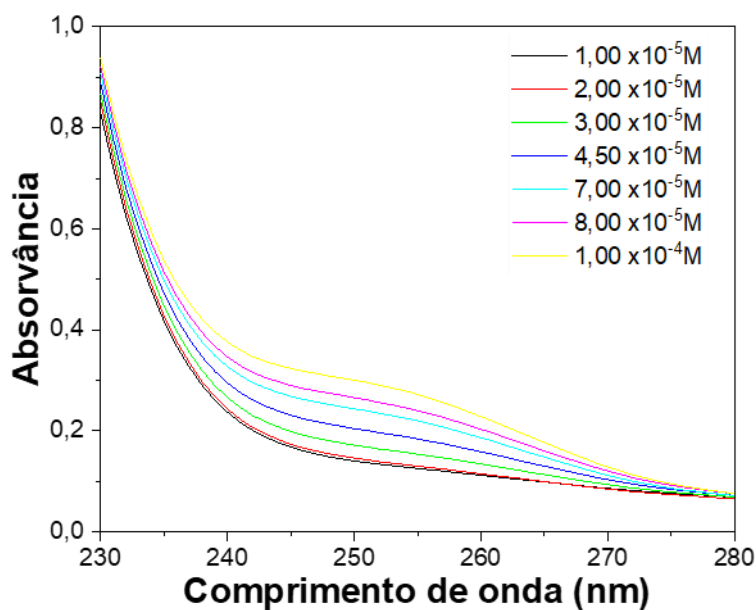
- [141] Degim, I. *et al.* , “Skin permeability data: Anomalous results”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 170 pp. 129-133, 1998.
- [142] Kim, M. *et al.* , “Skin Permeation of Testosterone and its Ester Derivatives in Rats”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 52, pp. 369-375, 2010.
- [143] Lúcio, M. *et al.* , “Drug-Membrane Interactions: Molecular Mechanisms Underlying Therapeutic and Toxic Effects of Drugs”, *Ideas in Chemistry and Molecular Sciences: Where Chemistry Meets Life*, pp. 191-214, 2010.
- [144] Maghraby, G. *et al.* , “Penetration enhancers in proniosomes as a new strategy for enhanced transdermal drug delivery”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 23, pp. 67-74, 2015.
- [145] Sochorová, M. *et al.* , “Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum”, *Journal of Colloid And Interface Science*, 2018.
- [146] Trantidou, T. *et al.* , “Hydrophilic surface modification of pdms for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via pva deposition”, *Microsystems and Nanoengineering*, vol. 3, 2017.
- [147] Potts, R. *et al.* “ Predicting Skin Permeability,” *Pharmaceutical Research*, vol. 9, pp. 663-669, 1992.



## Anexo A

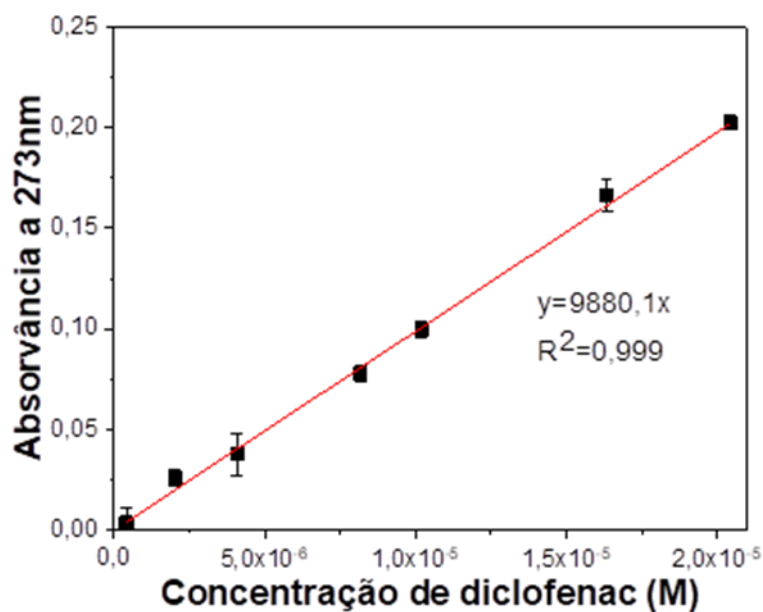


**Figura 1.** Espectro de absorvância das soluções padrão com concentrações crescentes de diclofenac em tampão universal a pH 5.5.

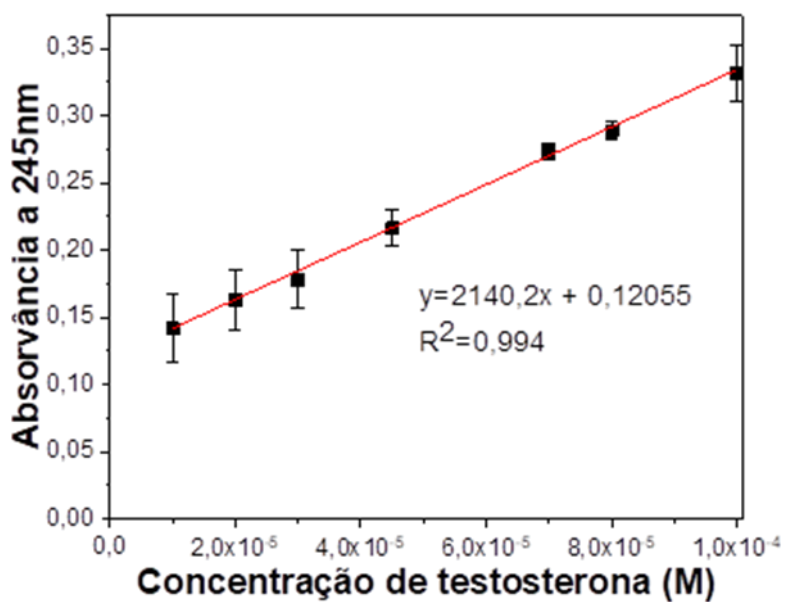


**Figura 2.** Espectro de absorvância das soluções padrão com concentrações crescentes de testosterona em tampão universal a pH 5.5.

## Anexo B

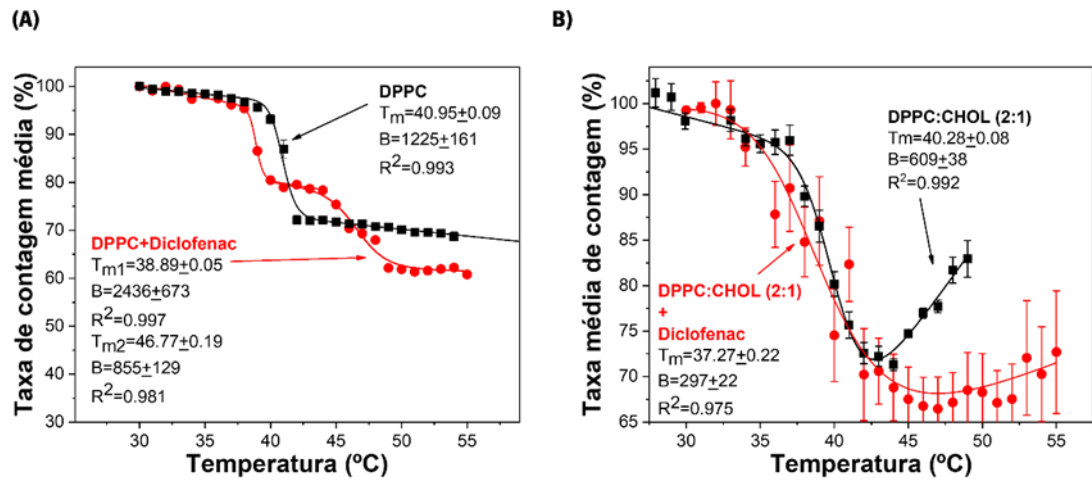


**Figura 1.** Retas de calibração do diclofenac em tampão universal (pH 5.5) ao comprimento de onda de absorção máxima de 273nm.

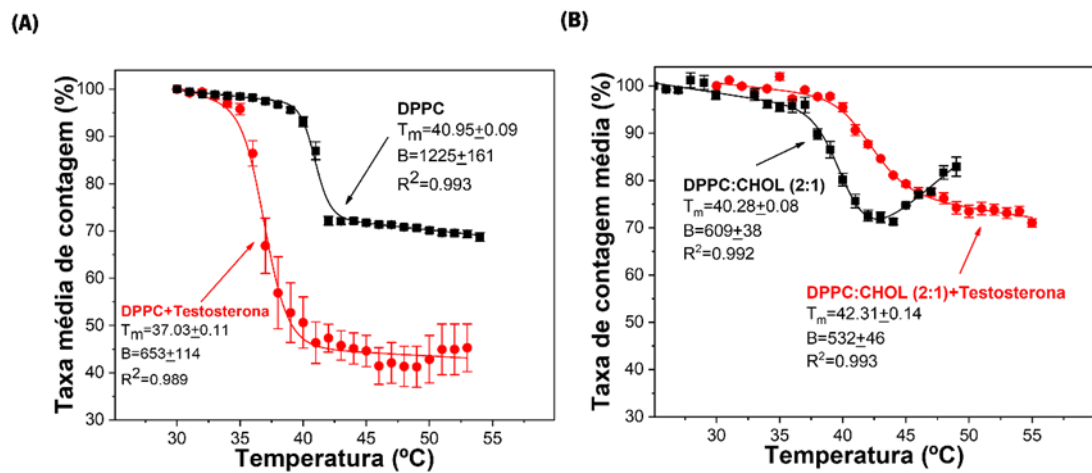


**Figura 2.** Retas de calibração da testosterona em tampão universal (pH 5.5) ao comprimento de onda de absorção máxima de 245nm.

## Anexo C

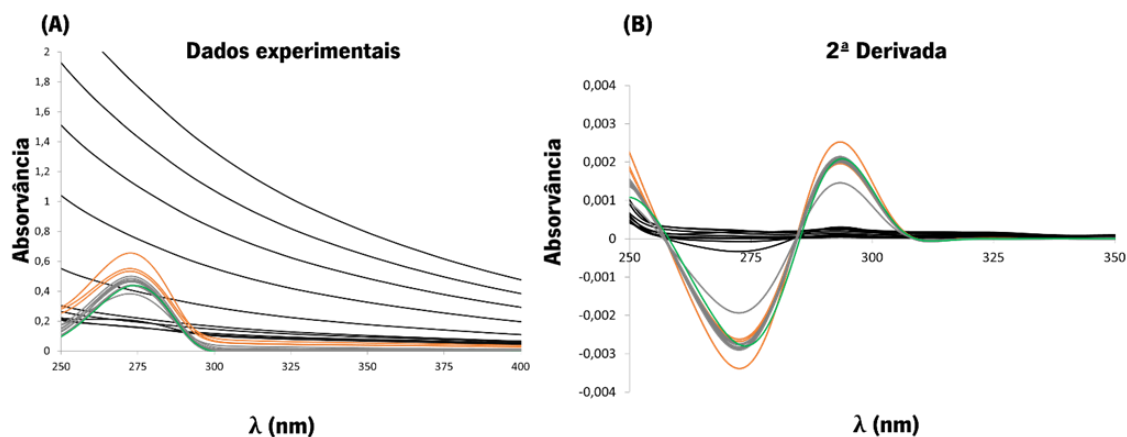


**Figura 1.** A)  $T_m$  e B de DPPC e DPPC +Diclofenac. (B)  $T_m$  e B de DPPC: CHOL (2:1) e DPPC: CHOL (2:1) +Diclofenac.

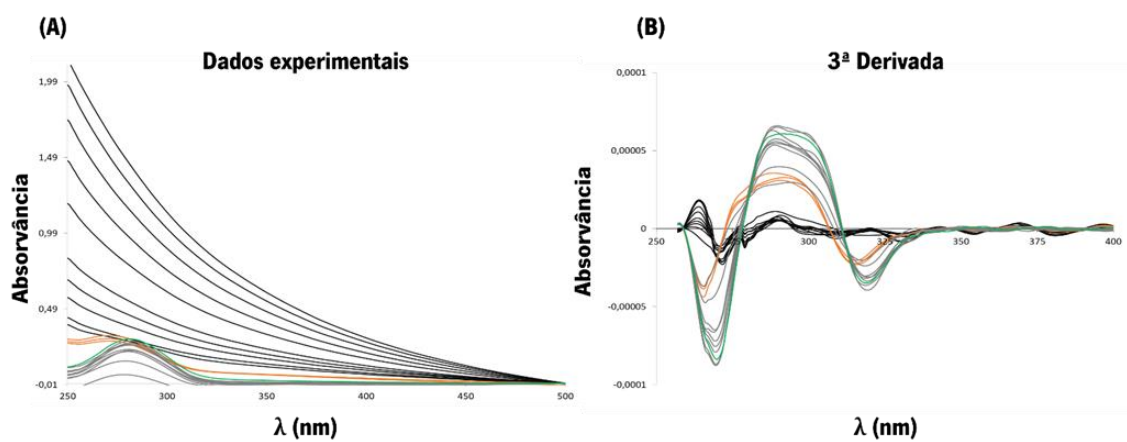


**Figura 2.** (A)  $T_m$  e B de DPPC e DPPC+ Testosterona. (B)  $T_m$  e B de DPPC: CHOL (2:1) e DPPC: CHOL (2:1) + Testosterona.

## ANEXO D



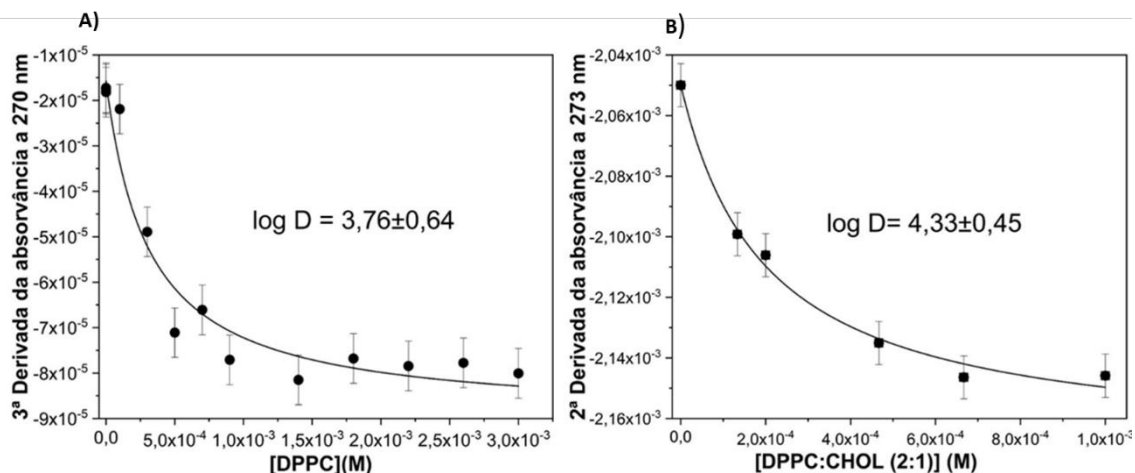
**Figura 1.** A) Espectro de absorvância das amostras e referências preparadas para a determinação log D da cafeína em LUVs de DPPC. B) 2ª derivada do espectro, importante para eliminar as interferências espectrais e a dispersão de luz.



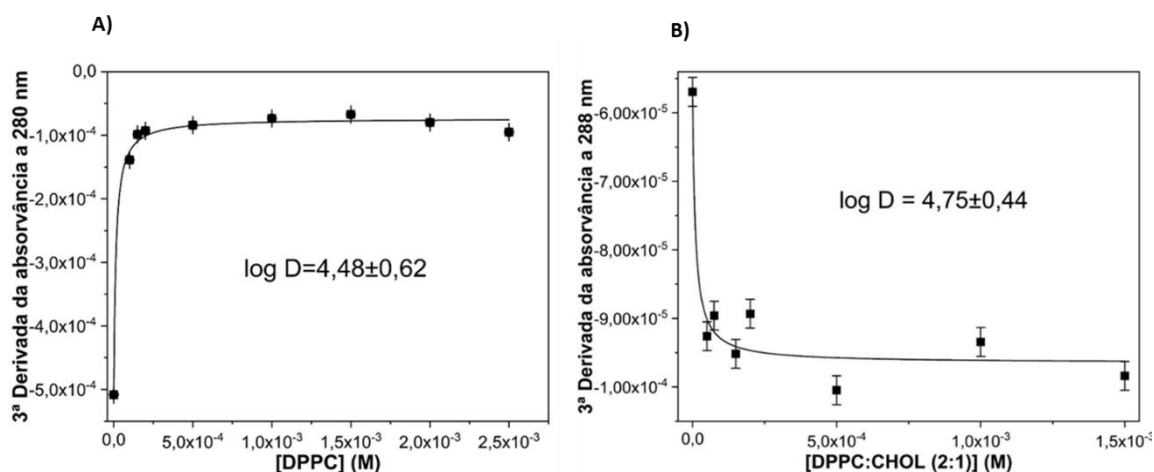
**Figura 2.** A) Espectro de absorvância das amostras e referências preparadas para a determinação log D do diclofenac em LUVs de DPPC. B) 3ª derivada do espectro, importante para eliminar as interferências espectrais e a dispersão de luz.



## Anexo E



**Figura 1.** Ajuste não linear dos valores da derivada das absorvâncias a 270 nm e 273 nm em função da concentração de modelos membranares: (A) DPPC e (B) DPPC: CHOL (2:1). A partir deste ajuste não linear foi possível determinar o log D do composto diclofenac ao pH 5.5.



**Figura 2.** Ajuste não linear dos valores da derivada das absorvâncias a 280 nm e 288 nm em função da concentração de modelos membranares: (A) DPPC e (B) DPPC: CHOL (2:1). A partir deste ajuste não linear foi possível determinar o log D do composto testosterona ao pH 5.5.