UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração
transdérmica de remifentanil**

Glauco Henrique Balthazar Nardotto

**Ribeirão Preto
2009**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração
transdérmica de remifentanil**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

**Orientado: Glauco Henrique Balthazar
Nardotto**

Orientador: Osvaldo de Freitas

**Ribeirão Preto
2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nardotto, Glauco Henrique Balthazar

Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração transdérmica de remifentanil. Ribeirão Preto, 2009.
97 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo.

1. Lipossomas deformáveis. 2. Promotor de permeação. 3. Transporte de substâncias encapsuladas. 4. Elasticidade de membrana. 5. Permeação 6. Etossomas. 7. Remifentanil. 8. Administração transdérmica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Glauco Henrique Balthazar Nardotto

Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração transdérmica de remifentanil.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Osvaldo de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

**Aos meus pais Luiz Antonio e Ivone ao
meu irmão Gustavo, à Paula, à minha
família e aos meus amigos, dedico.**

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Osvaldo de Freitas pela confiança no trabalho, pela compreensão, pelos ensinamentos e por ter assumido a orientação deste projeto o que foi fundamental para a sua execução.

À Prof.^a Dr. Maria José Vieira Fonseca, cuja orientação, conhecimento, ensinamentos, dedicação e compreensão foram fundamentais para a execução desta tese e seus experimentos. E ainda pela excelente recepção em seu laboratório e por permitir a utilização de fundamentais equipamentos.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pela excelente recepção em seu laboratório e pela importante contribuição na preparação dos lipossomas deformáveis tanto com conhecimento quanto por permitir a utilização de importantes equipamentos de seu laboratório.

Aos alunos do laboratório de tecnologia farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Arnóbio, Cris, Fabrício, Gustavo, Ju Farinelli, Kelly, Pri Ferrari, Velma, Francisco que muito bem me receberam no laboratório, ajudaram.

Aos alunos do laboratório de controle de qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Carolina Catini, Fernanda Maria Vilela, Mariana Rampim, Silvia de Siqueira, Simone Takemoto, Vanessa Silveira Fortes, Yris Fonseca que muito bem me receberam no laboratório e ajudaram com troca de experiências.

Ao técnico do laboratório de controle de qualidade José Roberto Jabor pela grande ajuda nos experimentos realizados neste laboratório, principalmente na operação do HPLC.

Ao técnico José Orestes pela realização dos experimentos no analisador de tamanho de partículas.

À Prof.^a Dr. Maria vitória Brada Bentley por permitir a utilização importantes equipamentos principalmente o difusor de fluxo estático.

À doutoranda Fabíola Silva Garcia Praça que muito ajudou na condução dos experimentos de permeação.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Remifentanil.....	4
1.2 Via de administração transdérmica.....	7
1.3 Lipossomas.....	10
1.4 Lipossomas deformáveis.....	12
1.5 Etossomas.....	16
1.6 Patch transdérmico de fentanil.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS.....	22
3.1 Equipamentos.....	23
3.2 Matérias primas e reagentes.....	23
4. MÉTODOS.....	24
4.1 Determinação do teor de remifentanil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
4.1.1 Preparação das soluções.....	25

4.1.2 Validação do método analítico.....	25
4.1.3 seletividade.....	25
4.1.4 Linearidade do método analítico.....	25
4.1.5 Curva analítica.....	26
4.1.6 Precisão e exatidão do método.....	26
4.1.7 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	27
4.2 Dispersões de lipossomas deformáveis.....	27
4.2.1 Preparação das dispersões de lipossomas deformáveis sem fármaco.....	27
4.2.2 Método de hidratação de filme e sonicação (método 1).....	28
4.2.3 Método de sonicação (método 2).....	29
4.2.4 Preparação das dispersões de lipossomas deformáveis com remifentanil.	29
4.3 Caracterização das dispersões de lipossomas deformáveis.....	30
4.3.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanho dos lipossomas deformáveis..	30
4.3.2 Eficiência de encapsulação do remifentanil pelos lipossomas deformáveis.....	30
4.3.3 Determinação da elasticidade dos lipossomas deformáveis por filtração em membrana.....	31
4.3.4 Estudos de permeação cutânea de remifentanil “in vitro” promovida por dispersões de lipossomas deformáveis.....	31
4.3.4.1 Estudo de “sink conditions” do experimento de permeação cutânea.....	33
4.3.5 Avaliação da retenção cutânea de remifentanil “in vitro”	33

4.3.6 Permeação de remifentanil por dispersão de lipossomas deformáveis não encapsulados.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Determinação do teor de remifentanil por CLAE.....	36
5.1.1 Validação do método analítico.....	36
5.1.2 Curva analítica.....	36
5.1.3 Precisão e exatidão do método analítico.....	37
5.1.4 Limites de detecção e quantificação.....	38
5.2 Caracterização das dispersões de lipossomas deformáveis.....	39
5.2.1 Tamanho médio e distribuição de tamanho dos lipossomas deformáveis..	39
5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação do remifentanil pelos lipossomas nas dispersões preparadas.....	46
5.2.3 Avaliação da elasticidade da membrana dos lipossomas deformáveis.....	50
5.2.4 Estudos de permeação cutânea de remifentanil “in vitro” promovida por dispersões de lipossomas deformáveis.....	51
5.2.4.1 Estudo de “sink conditions”	52
5.2.4.2 Avaliação da permeação do remifentanil.....	52
5.2.5 Retenção cutânea do remifentanil proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis.....	61
6. Conclusão.....	63
7. Referências bibliográficas.....	66
8. Apêndice.....	79

RESUMO

NARDOTTO, G. H. B. **Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração transdérmica de remifentanil**. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O remifentanil é um opióide potente comparável ao fentanil, mas, possui rápida eliminação plasmática e por isso necessariamente deve ser administrado por infusão contínua. A administração transdérmica pode liberar fármacos de forma prolongada, contínua e controlada. Características que facilitariam a administração do remifentanil, contornariam sua limitação farmacocinética e ampliariam os casos em que este fármacos seria útil. Lipossomas deformáveis são formados por fosfolipídios e por tensoativo que normalmente é um surfactante de cadeia simples que aumenta a flexibilidade da bicamada lipídica da membrana e torna os lipossomas deformáveis. Os lipossomas deformáveis são capazes de disponibilizar, de forma expressiva, várias substâncias transdermicamente incluindo macromoléculas e podem ser um eficiente sistema de liberação controlada de remifentanil. O presente estudo desenvolve diferentes dispersões de lipossomas deformáveis de remifentanil e caracteriza essas dispersões quanto a tamanho de diâmetro dos lipossomas, eficiência de encapsulação dos lipossomas, elasticidade da membrana, permeação e retenção cutânea “in vitro”. As dispersões de lipossomas deformáveis preparadas foram compostas por remifentanil, fosfatidilcolina de soja, tensoativo tween 80 ou tween 20 e etanol a 10% ou a 20% e foram preparadas por dois métodos: sonicação e hidratação de filme e sonicação. O tamanho e a distribuição de tamanho foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz, a eficiência de encapsulação por diálise, a elasticidade por filtração, seguido de determinação do tamanho. Células de difusão de Franz e pele de orelha de porco foram usadas para estudar a permeação e a retenção cutânea “in vitro”. Os lipossomas deformáveis preparados apresentaram pequeno diâmetro (40 a 71 nm) quando comparado a outros na literatura e seus tamanhos foram dependentes da formulação. Todos os lipossomas deformáveis preparados apresentaram boa elasticidade e permeação dependente da eficiência de encapsulação e do tamanho de diâmetro. A solução hidroetanólica com remifentanil e a mistura física dos excipientes com remifentanil não apresentaram permeação e retenção. A eficiência de encapsulação dos lipossomas deformáveis é coerente com outros resultados na literatura e foi dependente da formulação e do método de preparação. A avaliação da permeação de dispersões de lipossomas deformáveis com remifentanil não encapsulado foi feita para se obter informações sobre os mecanismos de ação pelos quais estes lipossomas agem. Verificou-se que o transporte de substâncias encapsuladas nos lipossomas foi o mecanismo de maior importância.

Palavras chave: Lipossomas deformáveis, Promotor de permeação, Transporte de substâncias encapsuladas, Elasticidade de membrana, Permeação, Etossomas, Remifentanil, Administração transdérmica.

ABSTRACT

NARDOTTO, G. H. B. **Deformable liposomes development for remifentanil transdermal administration**. 2009. 97f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Remifentanil is a potent opioid comparable to fentanyl. Remifentanil has rapid systemic elimination and, therefore, it necessarily has to be administered by continuous parenteral infusion. Transdermal delivery can provide extended, continuous and controlled delivery of drug. Characteristics that could make the remifentanil administration easier, could resolve its pharmacokinetics limitation and could enlarge the cases that this drug would be useful. Deformable liposomes consist of phospholipid and surfactant that is often a single chain surfactant that increases the membrane lipid bilayer flexibility and makes the liposome deformable. Deformable liposomes are able to expressively improve skin delivery of many drugs, including macromolecules and could be an efficient controlled delivery system of remifentanil. The aim of this study has been to develop different deformable liposomes dispersions of remifentanil and to characterize those dispersions by liposome diameter size, liposome entrapment efficiency, membrane elasticity and “in vitro” skin permeation and deposition. The deformable liposomes consisted of remifentanil, soybean phosphatidylcholine, surfactant tween 80 or tween 20, and ethanol at 10% or 20%. They have been prepared by two methods: sonication or conventional mechanical dispersion and sonication. The size was determined by light scattering, the entrapment efficiency by dialysis, the membrane elasticity by filtration and size determination. Franz diffusion cells and ear porcine skin were used to evaluate the “in vitro” skin permeation and the skin deposition. The deformable liposomes showed small size (40 a 71 nm) compared with others from literature and their sizes were dependent of the formulation. All deformable liposomes showed good membrane elasticity and showed permeation that was dependent of the formulation and diameter size. The remifentanil hydroethanolic solution and the excipients physical mixture with remifentanil did not have any permeation and retention. The deformable liposomes entrapment efficiency has been coherent with others literature results and also was dependent of the formulation and preparation method. The permeation of deformable liposomes dispersions were evaluated to get information about the deformable liposome action mechanisms. The transport of encapsulated substances on liposome was the action mechanism of major importance.

Key words: Deformable liposomes, Permeation promoter, Transport of encapsulated substances, Membrane elasticity, Permeation, Exosomes, Remifentanil, Transdermal delivery

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do remifentanil, do seu principal metabólito, do seu metabólito secundário, do fentanil, do alfentanil, e do sufentanil..... 5
- Figura 2:** Representação da estrutura do estrato córneo, da estrutura lamelar da matriz intercelular, sua organização em bicamada lipídica, e os principais lipídios. Mostra as formas de permeação transcelular e intercelular..... 9
- Figura 3:** Representação esquemática dos lipossomas. Estrutura do lipossoma convencional à direita. Estrutura do lipossoma deformável à esquerda..... 11
- Figura 4:** Separação da glicina e do remifentanil em coluna de fase reversa C18 pelo método cromatográfico desenvolvido. A: Cromatograma de solução de glicina padrão a 0,03 mg/ml. B: Cromatograma da mistura física com 0,2 mg/ml de remifentanil (glicina a 0,6 mg/ml), 45 mg/ml de fosfatidilcolina, 5 mg/ml de Tween 80 e 5 mg/ml de tween 20. C: Cromatograma da mistura física sem remifentanil com fosfatidilcolina a 0,23 mg/ml e Tween 80 a 0,05 mg/ml. Condições cromatográficas: Coluna LiCHROCart C-18 (125x250 nm; 5 µm); fase móvel: metanol 14 %, acetonitrila 15 %, 71 % de solução tampão fosfato pH 3 0,1 mol/L, fluxo de 1,0 mL/min; volume injetado 20 µL; detecção em 210 nm..... 37
- Figura 5:** Curva analítica de remifentanil por CLAE. As concentrações utilizadas foram 0,05; 0,1; 0,16; 0,2; 0,25 mg/ml. Condições cromatográficas: Coluna LiCHROCart C-18 (125x250 nm; 5 µm); Fase móvel: 15 % de acetonitrila, 14 % de metanol, 71 % de solução tampão fosfato pH 3; 0,1 mol / L. Fluxo: 1,0 mL/min. volume injetado: 20 µL; detecção em 210 nm..... 38
- Figura 6:** Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 10 % de etanol por hidratação de filme e sonicação (método 1). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20)..... 43

Figura 7: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 10 % de etanol por sonicação (método 2). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).....	44
Figura 8: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 20 % de etanol por hidratação de filme e sonicação (método1). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).....	45
Figura 9: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 20 % de etanol por sonicação (método 2). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).....	46
Figura 10: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 9:1, tween 20 e 80, etanol a 10% e a 20%.....	55
Figura 11: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1, tween 20 e 80, etanol a 10% e a 20%.....	56
Figura 12: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20 e 80, etanol a 10% e a 20%.....	56
Figura 13: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com sem e com remifentanil encapsulado.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de fosfatidilcolina e de tensoativo (Tween 80 ou 20) das formulações.....	28
Tabela 2 - Precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de CLAE para a quantificação de remifentanil (0,2 mg/ml) adicionado as formulações com tween 80 e tween 20.....	38
Tabela 3 – Determinação, em duplicata, do diâmetro médio dos lipossomas deformáveis sem remifentanil, nas dispersões preparadas.....	40
Tabela 4 – Determinação, em duplicatada, do diâmetro médio dos lipossomas deformáveis com remifentanil nas dispersões de lipossomas.....	42
Tabela 5 – Medida, em porcentagem, da eficiência de encapsulação do remifentanil pelos lipossomas deformáveis das dispersões.....	47
Tabela 6 – Medida dos diâmetros antes e depois da filtração por membrana de micro-poro das dispersões de lipossomas deformáveis com 10% de etanol preparadas para o estudo de elasticidade.....	51
Tabela 7 – Medida dos diâmetros antes e depois da filtração por membrana de micro-poro das dispersões de lipossomas deformáveis com 20% de etanol preparadas para o estudo de elasticidade.....	51
Tabela 8 - Parâmetros da permeação do remifentanil proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis.....	54
Tabela 9 - Parâmetros da permeação do remifentanil proporcionada pela dispersão de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20, etanol a 10% com remifentanil não encapsulado...	60
Tabela 10 - Retenção do remifentanil na pele proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis em 24 horas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cv	Concentração de remifentanil da formulação aplicada sobre a pele no experimento de permeação.
CV(%)	Coeficiente de variação.
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano
dpr	Desvio padrão relativo
E(%)	Exatidão
ED ₉₉	Dose efetiva para 99% de uma amostra
Ep	Eficiência de encapsulação é a quantidade peremada por área dividida pela quantidade de remifentanil aplicado por área
Fc	Fosfatidilcolina
Fc/P	Proporção de fosfatidilcolina e tensoativo
GI-90291	Código do principal metabolito do remifentanil
GI-94219	Código do metabolito secundário do remifentanil
Js	Fluxo no steady-state
Kp	Coeficiente de permeabilidade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
T	Tensoativo

Qm	Quantidade permeada no tempo necessário para que a quantidade permeada de remifentanil chegue a níveis mensuráveis pelo método analítico.
Qp	Qp: quantidade total permeada pela área de permeação
Tp	Tp: tempo quando a permeação se encerra
Tqm	Tempo necessário para que a quantidade permeada de remifentanil chegue a níveis mensuráveis pelo método analítico.

1. Introdução

A dor é uma das sensações mais desagradáveis da nossa existência. Até na vida fetal há estímulos nocivos que causam stresse detectável. A prevenção da dor é um direito humano básico e necessária em diversos casos, além da óbvia necessidade de analgesia profunda em procedimentos cirúrgicos.

Anestesia, estado de inconsciência induzido farmacologicamente, é composta de três eventos: analgesia, estado de ausência de dor na presença de um estímulo normalmente doloroso; amnésia, perda de memória e imobilização.

Os fármacos usados na indução da anestesia possuem, normalmente, efeitos variados nesses três eventos. Alguns fármacos podem ser usados individualmente para se conseguir os três eventos, outros têm apenas efeitos analgésicos ou sedativos e podem ser usados para sedação ou combinado com outros fármacos para se atingir analgesia completa (Guignard, 2006; Ranali, 2003).

No pós-operatório pode ocorrer aumento da frequência e do débito cardíaco e ainda aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio devido a dor. A analgesia pós-operatória adequada evita esses eventos e reduz os índices de complicações pulmonares, cardiovasculares, gastrintestinais e tromboembólicas. A analgesia profunda protege o miocárdio (Rawal et al., 2001; Auler Junior, 2006).

A diminuição da atividade gastrintestinal no pós-operatório pode levar a paralisação do íleo que gera desconforto e dores abdominais e são evitadas por analgesia adequada. Acredita-se que o estresse e a ansiedade gerados no período operatório e no pós-operatório podem ocasionar aumento da viscosidade sangüínea, aumento da fibrinólise e distúrbios de agregação plaquetária, com conseqüente aumento do tempo de coagulação, problemas que também podem ser evitados por boa analgesia (Rawal et al., 2001).

Apesar dos avanços para o entendimento da fisiologia da dor, no desenvolvimento de novas drogas e de novos sistemas de liberação, a maioria dos pacientes cirúrgicos continua a receber terapia inadequada para dor pós-cirurgia. (Figueiró et al., 2002). A dor é aceita ainda como parte necessária da experiência pós-cirurgia. O manejo da dor consiste na administração, quando necessária, de doses adequadas de drogas analgésicas, com rota e sistema de liberação apropriados, por uma equipe treinada.

A base para qualquer procedimento de analgesia pós-cirurgia de baixo custo é administração por via de tradicional, principalmente a via oral, de paracetamol, suplementado com fármacos anti-inflamatórias não esteroidais ou codeína (McQuay

& Moore, 1998).

Os opióides suplementados com analgésicos básicos também se enquadram nos procedimentos de via de administração tradicional e de baixo custo. Os receptores opióides, μ , δ e κ , pertencem à família do receptor proteína G-acoplada. A ligação do agonista a receptores opióides causa mudança conformacional, resultando na ativação de proteína intracelular e inibição da atividade de adenil ciclase. A inibição da atividade de adenil ciclase induz a diminuição de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que indiretamente inibe canais de cálcio voltagem dependente em neurônios pré-sinápticos. Os receptores opióides, localizados nas terminações pré-sinápticas das fibras C nociceptivas, quando ativados por agonista opióide, indiretamente inibem os canais de cálcio voltagem dependente por diminuição dos níveis de AMPc (Hardman et al., 1996).

O princípio chave para o uso seguro e efetivo dos opióides é o controle da dose em relação ao efeito desejado, evitando os efeitos colaterais como, náusea, vômito, sedação, coceira, retenção urinária e depressão da respiração. A via mais usual para a administração dos opióides é a intravenosa. O ideal é que os opióides tenham rápida ação inicial, alta potência para conferir profundo alívio e proporcionem segura e rápida restauração da resposta normal a estímulos ao terminada a necessidade de analgesia (Guignard, 2006; Rawal et al., 2001; Michelsen et al., 1996; Bürkle et al., 1996; Komatsu et al., 2007).

Nos últimos anos tem aumentado as pesquisas para o desenvolvimento de vias alternativas para administração não invasiva de opióides potentes como, morfina, fentanil, oxicodona, e buprenorfina. Dentre as alternativas investigadas destacam-se a transdermal, a transmucosal oral e a nasal, como também formulações orais modificadas. Esses fármacos com via de administração alternativa e de liberação modificada têm sido extensivamente usados no manejo de todos os tipos de dor, aguda, crônica, neuropática e não neuropática (Druglib.com, Drug information portal).

A morfina, por exemplo, esta disponível no mercado em formas de apresentação por via oral de liberação imediata e de liberação prolongada. O fentanil esta disponível na forma de apresentação transdérmica de liberação prolongada. A buprenorfina também existe por via oral. As vias de administração não invasivas e de liberação modificada aumentaram o numero de casos em que os fármacos citados são uteis (Druglib.com, Drug information portal).

O desenvolvimento farmacêutico tem fornecido aos anestesiologistas novos medicamentos opióides, como o remifentanil, um opióide sintético, introduzido em 1997 para analgesia durante a anestesia geral, com potência similar a do fentanil e possui efeitos típicos desta classe de fármacos. Até o momento a única forma de apresentação deste fármaco é a infusão endovenosa contínua. Novas formas de administração do remifentanil, principalmente por via não invasiva e que modifique sua liberação, poderia tornar esse fármaco útil em um maior número de casos.

1.1 Remifentanil

Remifentanil é o sal cloridrato do ácido 3-(4-metoxicarbonil-4-[(1-oxopropil)-fenilamino]-1-piperidina) metil éster propanóico (figura 1) (RxList - The Internet Drug Index, 2008).

Como todos os anilidopiperidinos, o remifentanil é agonista, principalmente, do receptor μ -opióide que via proteína G-acoplada (proteína ligada a nucleotídeo guanina) causa simultaneamente uma inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissor excitatório, inibição pós-sináptica da adenosina monofosfatase cíclica, supressão pós-sináptica dos canais de cálcio sensíveis a voltagem e hiperpolarização da membrana pós-sináptica pelo aumento da condutância de potássio. Possui seletividade e afinidade ao receptor μ -opióide significativamente maior comparado aos receptores δ - e κ - opióide e não se liga apreciavelmente a receptores não opióides (Bürkle et al., 1996; Michelsen et al., 1996).

O remifentanil possui 412,91 Dalton, coeficiente de partição octanol / água de 17,9 em pH 7,4, e pKa 7,07. Em meio ácido, devido à presença dos átomos de nitrogênio é capaz de capturar prótons, adquirir carga e tornar-se bastante solúvel. Por isso, pode ser comercializado, para administração endovenosa, na forma de preparação extemporânea liofilizada para ser reconstituída em uma solução tamponada em pH 3. Até o momento sua única forma de apresentação (RxList - The Internet Drug Index, 2008).

Figura 1: Estrutura do remifentanil (1), do seu principal metabólito (2), do metabólito secundário (3), do fentanil (4), alfentanil (5), sufentanil (6).

Embora quimicamente semelhante ao fentanil, alfentanil e sufentanil, o remifentanil possui uma modificação na estrutura anilidopiperidina. Há a introdução de um grupo metil éster na cadeia lateral N-acil do anel piperidina (figura 1). O grupo éster é sensível a hidrólise por esterases presentes no plasma e tecidos gerando o

principal metabólito do remifentanil (o GI-90291) que também é agonista μ -opióide, mas possui potência de 2 a 4 mil vezes menor e por isso não possui nenhum efeito clínico mesmo em infusões prolongadas em pacientes com anúria. Portanto, a depuração sistêmica do remifentanil é rápida quando comparado aos seus semelhantes químicos e a duração da ação, embora potente, é curta. (Bürkle et al., 1996; Michelsen et al., 1996; Auler Junior, 2006).

Não se conhece inteiramente as esterases responsáveis pela metabolização do remifentanil, mas aparentemente não é substrato para a butirilcolinesterase (pseudocolinesterase), pois seu clearance não é afetado pela deficiência de colinesterase, anticolinérgicos ou outros inibidores de esterases. Estima-se que 90% da excreção do GI-90291 seja renal. Há também um segundo metabólito (GI-94219) originado em menor extensão por N-desalquilação (figura 1) (Bürkle et al., 1996; Michelsen et al., 1996).

O metabolismo por esterases e a baixa potência do GI-94219 torna a farmacocinética e ação do remifentanil independentes da função hepática e renal. Estudos não mostraram diferença significativa no clearance entre pacientes com doença hepática e com fígado sadio. Portanto, seu uso é adequado em pacientes com falência renal e hepática (Auler Junior, 2006).

O volume de distribuição em humanos foi estimado ser de 33 litros. Seu clearance dos compartimentos centrais é independente do sexo e estimado ser 2,9 L/min. Sua meia vida sistêmica é cerca de 9 a 11 min, enquanto as do fentanil, sufentanil e alfentanil são respectivamente 219, 164, 94 minutos. (Auler Junior, 2006; RxList - The Internet Drug Index, 2008; Halliburton, 1988).

O alfentanil, sufentanil e fentanil possuem meia vida (tempo necessário para uma redução de 50 % da concentração depois do fim da infusão) alta e que aumenta com o tempo da infusão devido ao acúmulo nos tecidos e à lenta metabolização. No entanto, a meia vida do remifentanil é curta (2 a 5 min) e independente da duração da infusão conforme demonstrado por simulação computacional baseado na sua farmacocinética em pacientes e pela medida direta em animais e em pessoas (Bürkle et al., 1996; Michelsen et al., 1996). Um resultado similar foi apontado em outro estudo (Kapila et al., 1995). Depois de 3 horas de infusão a meia vida do remifentanil foi de 3 min e a do alfentanil de 44 min.

A concentração plasmática do remifentanil e a intensidade de seu efeito são proporcionais a dose e velocidade de infusão. Uma infusão de 1 mg/kg/min produz

uma concentração plasmática de aproximadamente 40 ng/ml. A concentração plasmática terapêutica do remifentanil varia de 1, 5 ng/ml para sedação a 50 ng/ml para efeitos anestésicos (RxList - The Internet Drug Index, 2008; Komatsu et al., 2007; Marsh et al., 2009; Auler Junior, 2006).

O remifentanil, portanto, possui rápido término do efeito opióide e farmacocinética independente da dose. Também não apresenta acúmulo ou mudança na intensidade dos efeitos depois de repetidas doses ou infusão contínua. Estas características são oriundas da rápida hidrólise do fármaco pelas esterases e também do fato desta reação ocorrer em muitos tecidos (Komatsu et al., 2007; Marsh et al., 2009; Auler Junior, 2006; RxList - The Internet Drug Index, 2008).

Diferentemente de outros opióides, o remifentanil pode ser administrado em doses altas o suficiente para atingir alívio da dor em aproximadamente todos os pacientes (ED_{99}) por muitas horas sem o problema de causar, em pacientes mais sensíveis, excessivo acúmulo do fármaco, prolongada depressão do sistema nervoso além do necessário para o alívio da dor e demora na recuperação da resposta normal aos estímulos dolorosos (Bürkle et al., 1996; Michelsen et al., 1996; Auler Junior, 2008).

Remifentanil causa efeitos adversos típicos dos μ -opióides, como: náusea, vômito, prurido, rigidez muscular e supressão cardiopulmonar. Não apresenta maior incidência de náusea ou vômito comparado ao alfentanil e em relação ao fentanil possui menor frequência de náuseas pós-operatória. A incidência de rigidez muscular após administração intravenosa é similar a de alfentanil. Efeitos adversos mais sérios como rigidez torácica, bradicardia, hipotensão ou apnéia do remifentanil não diferem significativamente de outros μ -opióides. Os efeitos adversos foram resolvidos ao descontinuar ou diminuir a infusão. O remifentanil não leva a liberação de histamina o que é interessante em situações clínicas com história de alergia (Komatsu et al., 2007; Marsh et al., 2009; Auler Junior, 2008; RxList - The Internet Drug Index, 2008; Bürkle et al., 1996; Michelsen et al., 1996).

1.2 Via de administração transdérmica

A via de administração transdérmica é uma alternativa para disponibilizar fármacos de ação sistêmica pela pele. Esta via pode proporcionar muitas vantagens como liberação prolongada, constante e controlada de substâncias e com isso diminuir a variação dos níveis plasmáticos e os efeitos colaterais, principalmente, de

fármacos com estreito índice terapêutico. (Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Choi et al., 2005).

Pode ainda evitar as variáveis que influenciam a absorção gastrointestinal como pH, volume de alimento, mobilidade gastrointestinal, etc também pode evitar o metabolismo pré-sistêmico que diminui a biodisponibilidade de muitas substâncias como propranolol, melatonina, metotrexato, salbutamol, etc. (Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Choi et al., 2005; Mishra et al., 2007; Dubey et al., 2006; Bendas et al., 2007). A via transdérmica, portanto pode ser capaz de aumentar o número de casos em que estes fármacos seriam úteis (Dubey et al., 2006).

Apesar das vantagens da pele como via de administração sistêmica, apenas poucos fármacos hoje são disponíveis em dispositivos transdérmicos, como clonidina, estradiol, nitroglicerina, fentanil, testosterona, escopolamina, nicotina e oxibutina. Isso ocorre porque a pele é uma barreira à penetração de drogas muito eficiente e criar estratégias capazes de disponibilizar fármacos pela pele é difícil (Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Choi et al., 2005; Magnusson et al., 2001).

A pele humana é composta por uma série de camadas pelas quais atravessam colunas de pelos e ductos glandulares. A derme tem 3 a 5 mm de espessura e é composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina), gel interfibrilar de glicosaminoglicanos, íons e água. Vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas estão incrustadas em seu interior. A epiderme não contém vasos sanguíneos e os nutrientes e resíduos se difundem através da junção dérmico-epidérmica. Consiste de quatro camadas: o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granulosa), estrato lúcido e estrato córneo. Como as células do estrato córneo estão mortas, as outras camadas são chamadas de epiderme viável (Magnusson et al., 2001; El Maghraby et al., 2008).

O estrato córneo é uma barreira lipofílica que possui baixa permeabilidade e previne a excessiva perda de água para o ambiente e protege contra a penetração de compostos aplicados sobre a pele de forma acidental ou premeditada. Constitui-se de 15 a 20 camadas de corneócitos, quando seca possui espessura de 10 a 15 μm . Sob hidratação as células intumescem e sua espessura pode chegar a 40 μm . É uma camada altamente organizada e compacta onde corneócitos, ricos em queratina, estão incrustados na matriz intercelular, rica em lipídios (Choi et al., 2005; Barry, 2001).

Para qualquer molécula, há essencialmente 2 formas de permeação cutânea definidas. A trans-apêndica e a trans-epidérmica. A primeira é considerada a forma secundária e abrange a permeação através de glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (Barry, 2001).

A permeação trans-epidérmica é definida como a forma em que as moléculas permeiam o estrato córneo intacto. Esta permeação pode se dar por 2 vias. Na via intercelular, as moléculas permeiam através da matriz intercelular contornando os corneócitos. E na via transcelular, as moléculas permeiam através dos corneócitos e também pela matriz intercelular em um caminho sem contornos, como representado na figura 2. Como visto, os dois caminhos necessitam que as moléculas atravessem a matriz intercelular e este é, portanto, um fenômeno fundamental na permeação de substâncias pela pele (Elsayed et al., 2007; Magnusson et al., 2001; Barry, 2001).

Figura 2: Representação da estrutura do estrato córneo, da estrutura lamelar da matriz intercelular, sua organização em bicamada lipídica, e os principais lipídios. Mostra as formas de permeação transcelular e intercelular (El Maghraby et al., 2008).

O papel dos lipídios da matriz intercelular foi investigado por estudos de permeação com estrato córneo que tiveram seus lipídios extraídos e a permeabilidade a água é significativamente maior. A permeabilidade da pele a

substâncias está relacionada à quantidade e composição da matriz lipídica intercelular. A capacidade de passar através dessa matriz é fundamental à permeação de moléculas. Moléculas pequenas e lipofílicas podem interagir com os lipídios da matriz e pequenas quantidades podem penetrar pela pele. Já a capacidade de passar através dos corneócitos não é fundamental para permeação de moléculas. Então a principal via de penetração de moléculas pela pele é a intercelular. (Honeywell-Nguyen et al., 2005; El Maghraby et al., 2008; Barry, 2001).

Moléculas pequenas com ligeira polaridade e hidrofiliabilidade não podem permear a pele por si só nem em pequenas quantidades. Portanto usar estratégias para aperfeiçoar a permeação de fármacos lipofílicos e hidrofílicos é fundamental para viabilizar a administração transdérmica na maioria dos casos. (Honeywell-Nguyen et al., 2005; Choi et al., 2005; El Maghraby et al., 2008; Barry, 2001; Magnusson et al., 2001; Csóka et al., 2005; Elsayed et al., 2007).

Para promover a permeação cutânea surgiram os promotores de penetração. Substâncias cuja ação ainda não foi elucidada por completo, mas está claro que têm múltiplas ações que desestrutura a organizada e coesa matriz lipídica intercelular aumentando a fluidez das bicamadas lipídicas lamelares que compõem a matriz, removendo componentes lipídicos da matriz, mudando a polaridade e formando bolsas aquosas ou lipídicas na matriz. Esses efeitos levam a formação de caminhos, a maior afinidade, partilha e movimento de substâncias externas na matriz intercelular. Eventos que aumentam a permeabilidade da pele e permite maior fluxo de fármacos (Magnusson et al., 2001; Elsayed et al., 2007; Honeywell-Nguyen et al., 2005; Csóka et al., 2005).

1.3 Lipossomas

A busca por estratégias para aperfeiçoar a disponibilidade transdérmica de fármacos despertou o interesse em investigar a ação dos lipossomas, cuja estrutura esta ilustrada na figura 3. São partículas formadas por membrana (ou lamela) constituída por moléculas anfifílicas de dupla cadeia carbônica (fosfolipídios) organizadas em bicamada lipídica e que possuem um interior aquoso (poço aquoso) (Honeywell-Nguyen et al., 2005; Choi et al., 2005; El Maghraby et al., 2006, 2008; Barry, 2001; Elsayed et al., 2007; Bouwstra et al., 2002).

As moléculas anfifílicas podem formar uma única bicamada externa (lipossomas uni-lamelares) ou mais bicamadas concêntricas (lipossomas multi-

lamelares). Moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas no interior aquoso. Moléculas anfifílicas, lipofílicas e carregadas podem ser retidas nas lamelas por interações hidrofílicas e ou eletrostáticas (figura 3) (Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2003, 2005; El Maghraby et al., 1999, 2000, 2001, 2006, 2008; Cevc et al., 2002, 2003, 2004).

Figura 3: Representação esquemática dos lipossomas. Estrutura do lipossoma convencional à direita. Estrutura do lipossoma deformável à esquerda (Honeywell-Nguyen et al., 2005).

Os primeiros lipossomas avaliados quanto à eficácia como dispositivo transdérmico eram constituídos por fosfolipídios com ou sem adição de colesterol. O colesterol se inclui na bicamada lipídica e pode aumentar a interação entre as cadeias carbônicas dos fosfolipídios, a viscosidade da bicamada lipídica e a rigidez da membrana, diminuir a permeabilidade a moléculas hidrofílicas e aumentar a estabilidade do lipossoma. Muitos métodos de preparação estão descritos na literatura, mas o mais comum é a hidratação de filme seguido de sonicação em sonificador de sonda (ou haste) (Elsayed et al., 2007; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006).

Os primeiros resultados publicados sugerem que os lipossomas aumentam a permeação de substâncias como triancinolona acetinado, progesterona e econazol

(Mezei et al., 1980, 1982). No entanto, depois destes os que se seguiram até hoje na grande maioria verificam permeação mais lenta de compostos polares nas preparações de lipossomas que nos controles, já quanto o transporte de substâncias lipofílicas, permeações similares foram encontradas para as preparações de lipossomas e controles. É evidente, portanto, que lipossomas convencionais são de pouca ou nenhuma utilidade na promoção da permeação de fármacos (Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2005; El Maghraby et al., 1999, 2000, 2001, 2006, 2008; Elsayed et al., 2006, 2007; Dubey 2006, 2007, 2007b).

No entanto, os estudos com lipossomas tradicionais mesmo com resultados negativos mostraram que alguma alteração poderia ser feita para torná-los eficientes promotores de permeação. A composição lipídica, o método de preparação, as propriedades termodinâmicas das bicamadas lipídicas das membranas afetam o comportamento dos lipossomas. A disponibilidade transdérmica é maior em lipossomas que contém lipídios dérmicos na composição. A retirada ou redução na quantidade de colesterol aumenta a fluidez da bicamada lipídica e o transporte pelo estrato córneo. Substâncias fluorescentes apresentam maior permeação em lipossomas convencionais com membranas em estado menos gelificado. A carga superficial, lamelaridade e tamanho também influenciam (Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2005, 2006; El Maghraby et al., 1999, 2000, 2001, 2006, 2008; Elsayed et al., 2006, 2007; Bouwstra et al., 2002; Cevc et al., 2002, 2003a, 2003, 2004; Dubey 2006, 2007a, 2007b, Choi et al., 2005).

1.4 Lipossomas deformáveis

Pesquisas posteriores levaram ao desenvolvimento dos lipossomas deformáveis, que também são chamados de lipossomas flexíveis, lipossomas elásticos e transferossomos. São como os lipossomas convencionais, mas suas membranas são constituídas de fosfolipídios e de pelo menos um tensoativo de cadeia simples com alto raio de curvatura (figura 3) capaz de diminuir a interação entre as cadeias carbônicas, aumentar a fluidez, reduzir o estado geleificado da bicamada lipídica e dar flexibilidade à membrana lamelar. Isso permite que a membrana se dobre e altere a forma do lipossoma (Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2005, 2006; El Maghraby et al., 1999, 2000, 2001, 2006, 2008; Elsayed et al., 2006, 2007; Bouwstra et al., 2002; Cevc et al., 2002, 2003a, 2003, 2004; Dubey 2006, 2007a, 2007b, Choi et al., 2005).

Lipossomas deformáveis com glicirrizinato dipotássico submetido à calorimetria diferencial de varredura apresentou redução na temperatura e na entalpia de transição de fase quando comparados com lipossoma convencional (Trotta et al., 2002, Elsayed et al., 2007). Isso sugere um estado mais fluido da membrana. Colato e deoxicolato de sódio, tween 20, 60, 80, Span 60, 65, 80, e glicirrizinato dipotássico são os tensoativos mais usados. A preparação dos lipossomas deformáveis se dá pelos mesmos métodos dos convencionais, sendo mais comum o da hidratação de filme seguido de sonicação em sonicador de sonda (Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2005, 2006; El Maghraby et al., 1999, 2000, 2001, 2006, 2008; Elsayed et al., 2006, 2007).

Estudos “in vitro” relatam que estes lipossomas aperfeiçoam a disponibilidade transdérmica de muitas substâncias químicas como oestradiol, ciclosporina A, metotrexato, melatonina, fumarato de cetotifeno, aciclovir, idoxurudina, propranolol, etinilestradiol, lamivudina, hidrocortisona, dexametasona, levonorgestrel, lidocaina, rotigotina, 5-fluoracil entre outros (El Maghraby et al., 2001, 2000, 1999; Trotta et al., 2002, Ita et al., 2007, Dubey et al., 2006, Mishra et al., 2007, Garg et al., 2006; Cevc et al., 2004b, Elsayed et al., 2006, 2007b, 2007, Jain et al., 2005; Honeywell-Nguyen et al., 2003, 2005). Estudos “in vivo” confirmam que os lipossomas deformáveis são capazes de disponibilizar níveis terapêuticos de fármacos, incluindo macromoléculas, com eficiência comparável a da administração subcutânea (Honeywell-Nguyen et al., 2005, Elsayed et al., 2007; Cevc et al., 2003a El Maghraby et al., 2008).

Os lipossomas deformáveis também foram eficientes em disponibilizar peptídeos, como insulina (Cevc, 2003), com eficácia comparável à administração subcutânea. Isso levou ao estudo desses lipossomas como dispositivos transdérmicos para macromoléculas como DNA e antígenos (Honeywell-Nguyen et al., 2005; Elsayed et al., 2007; El Maghraby et al., 2008).

Lipossomas deformáveis preparados com um derivado de fosfolípido catiônico (1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP)) e colato de sódio em teste “in vitro” foram capazes de transfectar várias linhagens celulares. E o Teste “in vivo”, em camundongo sem pelos, verificou que foram capazes de transportar genes para órgãos (Kim et al 2004).

Em outro estudo lipossomas deformáveis preparados com fosfatidilcolina e com colato ou deoxicolato de sódio foram capazes de promover a permeação de material

genético em camundongos (Lee et al., 2004). Lipossomas deformáveis também foram usados na permeação não invasiva de toxóide tetânico e a resposta imune foi comparável à administração intramuscular (Gupta et al., 2005).

Lipossomas deformáveis também foram investigados quanto a resposta induzida ao antígeno da hepatite B. Os resultados mostraram robusta resposta imunológica sistêmica e dérmica da administração transdérmica dos lipossomas comparado à administração intramuscular e a outras formulações. Os resultados sugerem eficiente permeação, biodistribuição e disponibilidade de antígenos a células imunocompetentes (Mishra et al., 2006).

A capacidade dos lipossomas deformáveis de aperfeiçoar a disponibilidade transdérmica de macromoléculas leva a considerar a possibilidade da existência de um mecanismo de ação peculiar dos lipossomas deformáveis diferente do mecanismo dos promotores de penetração que é eficiente para transportar apenas moléculas de baixa massa molecular. Estudos nesse sentido sugerem a existência de 2 mecanismos para os lipossomas deformáveis promoverem a permeação (Honeywell-Nguyen et al., 2005; Elsayed et al., 2007, 2006; El Maghraby et al., 2008, Bouwstra et al., 2002).

Mecanismo 1: Os lipossomas deformáveis transportam moléculas encapsuladas e ao penetrarem intactos o estrato córneo as levam através da pele. Mecanismo 2: os lipossomas agem como um promotor de penetração como já citado. O primeiro mecanismo propõe que os lipossomas deformáveis podem penetrar por “canais” ou “caminhos” no estrato córneo sob a influência osmótica do gradiente de hidratação cutâneo natural. Esses canais são menores que o diâmetro médio dos lipossomas e a penetração só é possível porque esta classe de lipossoma é flexível e pode ser comprimido no interior desses caminhos sem se romper, já os lipossomas convencionais não podem penetrar a pele porque não possuem suficiente flexibilidade na membrana (Honeywell-Nguyen et al., 2005; Elsayed et al., 2007, 2006; El Maghraby et al., 2008, Bouwstra et al., 2002).

Cada corneócito está envolvido por bicamadas lipídicas lamelares. Essas estruturas são mantidas coesas por junções protéicas, mas pequenos espaços entre elas (ou seja, espaços intercelulares) existem e são canais ou caminhos por onde estruturas flexíveis podem ficar espremidas nesses canais e fluir (Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Elsayed et al., 2007, 2006; El Maghraby et al., 2008, Bouwstra et al., 2002).

Muitos relatos sustentam o primeiro mecanismo. Estudos de permeação em que a pele é pré-tratada com dispersões aquosas de lipossomas deformáveis sem fármaco, que é aplicado depois, não promoveram a permeação de oestradiol, pergolida, rotigotina, já a aplicação destas substâncias encapsuladas teve eficiente promoção da permeação (Maghraby et al., 1999, 2000; Honeywell-nguyen et al., 2002, 2003).

Referências bibliográficas ainda sugerem que lipossomas deformáveis com os diâmetros médios menores transpõem o estrato córneo de forma mais eficiente devido a menor resistência à penetração e são promotores de permeação melhores (Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Elsayed et al., 2007, 2006; El Maghraby et al., 2008, Bouwstra et al., 2002).

Um estudo examinou a mudança de carga cutânea sob administração de lipossoma deformável contendo lipídio catiônico encapsulado com heparina de baixa massa molecular. A carga superficial da pele tratada foi alterada de -7,5 para 13,7 mV em 12 h enquanto na pele não tratada a carga permaneceu constante em -10 mV, sugerindo que este lipossoma catiônico ultrapassa a pele intacta já que lipídios catiônicos não são capazes de fazê-lo por si só (Song et al., 2005).

Estudos com microscopia eletrônica demonstraram rápida partição de lipossomas intactos no estrato córneo humano, mas quase nenhum foi observado nas camadas mais profundas do estrato córneo. Microscopia eletrônica de transmissão e de crio-fratura demonstraram grandes modificações morfológicas na estrutura lamelar lipídica intercelular do estrato córneo mais profundo e nenhuma mudança na epiderme viável (Elsayed et al., 2007; Honeywell-nguyen et al., 2002b).

Mas, há outros estudos sugerindo que os lipossomas deformáveis agem pelo mecanismo 2. Evidências mostram que o gradiente aquoso pelo estrato córneo não é uniforme e pode até haver uma região seca. Mesmo o estrato córneo totalmente hidratado, o conteúdo aquoso nas camadas mais profundas é menor que o das camadas centrais. Devido à pressão osmótica, espera-se que os lipossomas não penetrem além do nível das camadas mais profundas do estrato córneo. A partir daí, para chegar à epiderme viável, o fármaco deve ser liberado ou os lipossomas devem agir como promotores de penetração. Além disso, há estudos sugerindo que uma liberação ruim do fármaco resulta em retenção da droga nas camadas profundas do estrato córneo e os lipossomas se tornam um sistema depósito com liberação lenta do fármaco (Bouwstra et al., 2002; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Elsayed et

al., 2007, 2006; El Maghraby et al., 2008).

O pré-tratamento da pele de camundongo sem pêlos com lipossomas deformáveis aumentou a penetração de água oxigenada mais do que o pré-tratamento com etanol (Van Den Bergh et al., 1999). Dispersão de lipossomas deformáveis com carboxifluoriceína (um composto hidrofílico fluorescente) encapsulada e ausente no meio dispersante apresentou eficiente promoção da permeação e outra dispersão igual, mas com carboxifluoriceína não encapsuladas nos lipossomas também apresentou permeação semelhante (Verma et al., 2003).

Lipossoma deformável composto por fosfatidilcolina e tween 80 com cetotifeno não encapsulado (presente apenas no meio dispersante) mostrou promoção da permeação e retenção cutânea. Preparações iguais, mas com o fármaco encapsulado não foram capazes do mesmo, sugerindo que na disponibilidade transdérmica e dérmica do cetotifeno a ação promotora da penetração é mais importante (Elsayed et al., 2006, 2007b).

As publicações sugerem que ambos os mecanismos agem no aprimoramento da permeação de moléculas pelos lipossomas deformáveis e que um pode predominar sobre o outro dependendo das características físico-químicas da substância e dos lipossomas (Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Elsayed et al., 2007, 2006; El Maghraby et al., 2008, Bouwstra et al., 2002).

1.5 Etossomas

Etossomas é outra classe de lipossomas que apresentam permeação transdérmica. São compostos de fosfolipídios, etanol e água e não possuem tensoativo. Devido à interdigitação do etanol na bicamada lipídica acreditava-se que altas concentrações de etanol trariam instabilidade aos lipossomas. No entanto, os etossomas possuem altas concentrações (20 a 40 %) de etanol e ainda assim são lipossomas pequenos, estáveis e viáveis.

Os etossomas são na maioria dos casos preparados da seguinte forma. Os fosfolipídios e o fármaco são dissolvidos em etanol. Os componentes aquosos são adicionados lentamente numa fina corrente constante em um contêiner bem fechado sob agitação contínua, depois do fim da adição a agitação continua por alguns minutos (El Maghraby et al., 2008; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Elsayed et al., 2007; Lodzk et al., 2003, Touitou et al., 2000, Jain et al., 2007; Rao et al., 2008; Maurer, 2001, Barry et al., 2001). Mas também há trabalhos que preparam

etossomas por método de hidratação de filme e sonicação (como na preparação de lipossomas deformáveis) (Dubey et al., 2007a, 2007b; López-Pinto et al., 2005; Bendas et al., 2007).

Estudos investigaram o efeito do etanol nos lipossomas. E foi relatado que os etossomas possuem menor diâmetro quando comparado aos lipossomas convencionais e que o diâmetro aumenta com a redução na quantidade de etanol. Estas características são resultados da malha superficial negativa que o etanol confere aos etossomas (Touitou et al., 2000; López-pinto et al., 2005). Etossomas mostraram alta eficiência de encapsulação para uma grande variedade de moléculas, incluindo lipofílicas, o que pode ser explicado pela multilamellaridade observada em algumas preparações e pela ação solubilizante do etanol (Touitou et al., 2000).

A administração do marcador anfifílico D-289 através de lipossomas convencionais não apresentou penetração do marcador na pele, mas formou reservatórios nas camadas mais superficiais. Enquanto que a solução hidroetanólica promoveu alguma penetração do marcador anfifílico, mas com baixa intensidade da fluorescência. No entanto, os etossomas proporcionaram o aumento de ambos, profundidade de penetração e intensidade de fluorescência (Dayan et al., 2000).

Diferentemente do que ocorre ao lipossoma deformável, o etossoma com cetotifeno encapsulado apresentou grande fluxo transdérmico do fármaco (Elsayed et al., 2006). O minoxidil, sulfato de salbutamol, lamivudina, melatonina também tiveram grande permeação aplicados em dispersões de etossomas (Touitou et al., 2000; Bendas et al., 2007; Jain et al., 2005; Dubey et al., 2007a). Testosterona apresentou maior disponibilidade transdérmica em preparação de etossomas que o “patch” comercializado com o nome testoderm (Touitou et al., 2000).

Assim como para os lipossomas deformáveis o modo de ação dos etossomas não está completamente elucidado e provavelmente seja uma combinação dos mecanismos 1 e 2. O etanol é um promotor de permeação bem conhecido, e estudos que comparam o desempenho de etossomas com solução etanólica mostram maior disponibilidade promovida pelos etossomas. Portanto, é bem possível que os etossomas agem pelos dois mecanismos, no entanto faltam dados da literatura que mostram isso claramente (El Maghraby et al., 2008; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Cevc et al., 2004; Elsayed et al., 2006, 2007; Bouwstra et al., 2002).

1.6 Patch transdérmico de fentanil

Existe no mercado um dispositivo transdérmico de fentanil cuja análise merece atenção, pois se trata de um opióide semelhante ao remifentanil, potente e fornecido pela via de administração agora em questão. É um “patch” que fornece fluxo médio de 25, 50, 75 ou 100 $\mu\text{g/h}$ por até 3 dias. É retangular, transparente e composto de um filme protetor removível e de 3 camadas funcionais. O reservatório com fentanil é separado da camada adesiva a base de silicone por uma membrana de copolímero de etileno vinil acetato. O fármaco se difunde pela membrana e pelo adesivo para alcançar a pele. O reservatório contém fentanil e álcool geleificados com hidroxietilcelulose. As quantidades de fentanil variam conforme o fluxo de fármaco (Varvel et al., 1989, Thompson et al., 1998).

Este dispositivo leva muitas horas até que concentrações de fentanil necessárias para aliviar a dor sejam atingidas. Depois deste tempo de latência é atingida a fase de liberação sustentada de 3 dias, no entanto, o fluxo de fentanil não é constante, é maior no primeiro dia e decresce nos 2 seguintes. Após o terceiro dia a permeação cessa e o “patch” pode ser retirado. Neste período (fase de declínio) o fluxo cai lentamente, pois fentanil retido na pele até este momento permeia devagar, isso proporciona baixo clearance e aumenta a meia vida do fentanil.

Estas características farmacocinéticas ocorrem devido à baixa eficiência de permeação que este dispositivo proporciona, pois caso contrário o tempo de latência seria menor, o fluxo constante e o fentanil depositado na pele não demoraria a permear. Esta farmacocinética limita o uso do patch de fentanil no tratamento da dor que chega a ser contra-indicado na dor pós-operatória e na dor crônica não estável. (Grond et al., 2000; Gourlay et al 1989, 1990, 2001).

Este sistema transdérmico trouxe algumas melhorias a ação do fentanil, no entanto ainda apresenta limitações. Como já citado o grande tempo de latência, a flutuação dos níveis na fase de equilíbrio, a lenta redução dos níveis na fase de declínio e a considerável variabilidade inter-individual.

Além disso, a apresentação na forma de “patch” limita a variação da dosagem do medicamento o que dificulta a individualização da posologia. Portanto pesquisa por dispositivos capazes de eliminar ou reduzir tais problemas se faz necessária.

Os lipossomas deformáveis podem representar uma evolução na administração transdérmica de opióide, pois podem proporcionar boa permeação de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos e assim melhorar as características

farmacocinéticas comparado ao patch.

Outra alternativa é desenvolver dispositivos transdérmicos de remifentanil, pois ao contrário do fentanil apresenta ação independente da idade, peso corporal, falência orgânica. Além disso, o remifentanil atende melhor às características de um fármaco para ser administrado transdermicamente, pois é igualmente potente e lipofílico e tem meia vida mais curta, o que o torna mais indicado para liberação prolongada.

Portanto, um dispositivo transdérmico composto de lipossomas deformáveis contendo remifentanil pode usufruir das características de ambos e proporcionar administração transdérmica de opióide superior ao dispositivo de fentanil transdérmico existente no mercado.

2. Objetivos

Desenvolver dispersões de lipossoma deformáveis capazes de promover a permeação cutânea de remifentanil preferencialmente de forma prolongada e controlada.

Obter dispersões de lipossomas deformáveis de remifentanil por diferentes métodos de preparação e com diferentes formulações.

Caracterizar estas dispersões quanto ao tamanho de diâmetro, distribuição de tamanho, eficiência de encapsulação e elasticidade da membrana dos lipossomas deformáveis.

Avaliar a capacidade promotora da permeação e a retenção cutânea de remifentanil pelos lipossomas deformáveis, por meio do teste de permeação e retenção “in vitro” em células de difusão de Franz empregando pele de orelha de porco.

A partir dos resultados obtidos, conseguir informações sobre quais são as características e componentes da formulação que influenciam a promoção da permeação e como o fazem.

Sugerir o mecanismo pelo qual os lipossomas deformáveis promovem a permeação de remifentanil através dos resultados obtidos pela permeação de lipossomas deformáveis com remifentanil não encapsulado (no qual o fármaco é adicionado depois dos lipossomas prontos) e da permeação das outras dispersões.

3. Materials

3.1 Equipamentos

Evaporador rotativo da marca fisatom, modelo 801; analisador de tamanho de partícula por difração da marca Malvern modelo Zetasizer nano ZS; Sonicador de sonda de titânio modelo titanium micro-tip da marca Ultrasonic Systems de 500 W de potência; cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por bomba da marca Shimadzu modelo LC-10AS, injetor de 20 µl da marca Rheodyne modelo 7125, detector UV-Vis da Shimadzu modelo SPD-10A, coluna C-18 LiCHROCart de 125x250 nm e partículas de 5 µm, pré-coluna C-18 LiCHROCart de 125x250 nm e partículas de 5 µm. Membranas de diálise Dialysis Tubing Cellulose Membrane da marca sigma, difusor de fluxo estático com bomba de seringa Microette da marca Hanson Research, células de difusão de Franz modificadas da Hansaon Reserch, agitador magnético Variomag da Hanson Research, filtros de membrana de policarbonato 0,05 µm da marca Isopore; ultra-turrax da marca Marconi MA 102. Sonicador de banho T50 da marca Thornton. Bomba a vácuo da marca Primar modelo 141.

3.2 Matérias primas e reagentes

Todas as matérias primas e reagentes utilizados possuíam grau analítico. Ácido fosfórico da marca VETEC química fina LTDA. Acetonitrila e metanol da marca Mallinckrodt Baker, S.A.. Polioxietileno (80) monooleato de sorbitano (Tween 80) e Polioxietileno (20) monolaurato de sorbitano (Tween 20) da marca Synth. Álcool etílico, fosfato de sódio nonobásico anidro e fosfato de sódio dibásico anidro da marca Synth. Ultiva (cloridrato de remifentanil) frasco ampola da marca GlaxoSmithKline. Fosfatidilcolina derivada da soja (Phospholipon 90 G) da marca Nattermann Phospholipid GMBH. Padrão de glicina da marca sigma.

4. Métodos

4.1 Determinação do teor de remifentanil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A quantificação do remifentanil foi realizada por CLAE em cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de uma bomba modelo LC-10AS, injetor Rheodyne modelo 7125 com injetor de 20 µL. Detector de absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A, operando em 210 nm.

O processo cromatográfico de separação de remifentanil foi realizado a 22 ± 2 °C em coluna de fase reversa LiCHROCart C-18 (125x250 nm), partículas de 5 µm, acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A fase móvel constituía-se de 15% de acetonitrila, 14% de metanol, 71% de solução de tampão fosfato pH 3; 0,01 mol / L (Selinger et al., 1994; Haidar et al., 1996; Kabbaj et al., 2003, Bossù et al., 2006).

4.1.1 Preparação das soluções

O remifentanil liofilizado é produzido pela GlaxoSmithKline e contém 15 mg de glicina e 5 mg de remifentanil e foi empregado como matéria prima, para preparação das formulações, e como padrão, pois o padrão de referência do remifentanil não foi encontrado comercialmente. Uma solução padrão estoque de 1 mg/mL de remifentanil foi preparada e a partir desta outras soluções nas concentrações de 0,0064; 0,01; 0,016; 0,05; 0,1; 0,16; 0,2; 0,25, 0,5 mg/mL de remifentanil foram preparadas.

4.1.2 Validação do método analítico

O método analítico foi validado de acordo com os parâmetros analíticos: linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e seletividade, conforme a Resolução RE nº: 893 de 29 de Maio de 2003 (versão republicada em 07.11.2003).

4.1.3 Seletividade

A seletividade do método foi testada verificando-se a interferência da mistura física dos componentes das formulações no método analítico e também a interferência da pele homogeneizada e do padrão de glicina.

4.1.4 Linearidade do método analítico.

Para avaliar a linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade

entre a concentração de remifentanil e a área dos picos cromatográficos, alíquotas de 20 µL das soluções de remifentanil, acima preparadas, foram analisadas empregando o sistema cromatográfico proposto. A linearidade foi obtida plotando as concentrações no eixo das abscissas e as áreas no eixo das ordenadas.

4.1.5 Curva analítica

Após avaliar a linearidade do método, as soluções de remifentanil nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,16; 0,2 e 0,25 mg/ml foram analisadas pelo método analítico desenvolvido. A curva de analítica foi construída plotando as concentrações de remifentanil no eixo das abscissas e no eixo das ordenadas as áreas dos picos cromatográficos.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde (a) corresponde o coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. A linearidade foi verificada pelo cálculo do coeficiente de correlação (r) como critério mínimo de aceitável de $(r) = 0,99$ (ANVISA, 2003; Causon, 1997; Ribani et al., 2007).

4.1.6 Precisão e exatidão do método

A precisão, avalia a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio, e a exatidão, a variação entre o valor de concentração obtido experimentalmente e o valor de concentração teórico da amostra, foram determinados em estudos intra e inter-ensaios, utilizando a mistura física dos componentes das formulações empregados na preparação dos lipossomas (45 mg/ml de fosfatidilcolina, 5 mg/ml de tween 20 e 5 mg/ml de tween 80) adicionada de 1 mg/ml de remifentanil. As misturas físicas adicionadas de remifentanil foram diluídas na fase móvel para uma concentração final de 0,2 mg/ml, esse ponto foi analisado no mínimo nove vezes, no mesmo dia, e em três dias alternados (USP 30 / NF 25).

A precisão do método foi expressa matematicamente pelo desvio padrão relativo (dpr), calculado da seguinte maneira:

$$\text{dpr}(\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{média das leituras}} \cdot 100$$

A exatidão (E) foi calculada pela fórmula:

$$E(\%) = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \cdot 100$$

4.1.7 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para determinação do LD e LQ utilizou-se o método do desvio padrão. (ANVISA, 2003). Foram preparadas soluções de remifentanil matéria prima em fase móvel nas concentrações de 0,0064; 0,01; 0,016 e 0,05 mg/ml. Estas soluções foram preparadas em triplicata, então a média das áreas dos picos obtidos e os respectivos desvios padrões foram calculados. Duas curvas foram construídas, uma plotando as concentrações no eixo das abscissas e as áreas dos picos obtidos no eixo das ordenadas, e outra plotando as concentrações no eixo das abscissas e os desvios padrões obtidos no eixo das ordenadas. As seguintes equações foram utilizadas para a determinação dos LD e LQ:

$$LD = b + 3 \cdot \frac{bpd}{a}$$

$$LQ = b + 10 \cdot \frac{bpd}{a}$$

(b) é o intercepto y obtido da equação da reta das médias das áreas dos picos, (a) é a inclinação obtida da equação da reta das médias das áreas dos picos e bdp é o intercepto no eixo das ordenadas obtido na curva da concentração x desvio padrão.

4.2 Dispersões de lipossomas deformáveis.

4.2.1 Preparação das dispersões de lipossomas deformáveis sem fármaco

Diferentes dispersões de lipossomas deformáveis sem fármaco foram preparadas. As formulações foram constituídas de fosfatidilcolina (Fc), de um tensoativo (T), tween 20 ou tween 80, e de etanol. Formulações foram preparadas com 3 diferentes proporções de fosfatidilcolina e tensoativo cujas quantidades estão indicadas na tabela 1. A concentração total de material lipídico (fosfatidilcolina mais tensoativo) foi de 50 mg/ml. O etanol foi adicionado a 10% ou 20% (v/v) do volume total das dispersões de lipossomas deformáveis.

Tabela 1 - Quantidade de fosfatidilcolina e de tensoativo (Tween 80 ou 20) das formulações.

Proporção	Fosfatidilcolina	Tensoativo
4,0:1	40 mg/ml	10 mg/ml
5,6:1	42,5 mg/ml	7,5 mg/ml
9,0:1	45 mg/ml	5 mg/ml

Foram preparadas 12 formulações de lipossomas deformáveis combinando as 3 proporções 4:1; 5,6:1 e 9:1 com um dos dois tensoativos (tween 20 ou 80) e uma das duas concentrações de etanol (10% ou 20% (v/v)). A partir de cada uma das 12 formulações, foram preparadas dispersões de lipossomas deformáveis por dois métodos diferentes, método de hidratação de filme e sonicação (método 1) ou método da sonicação (método 2), sendo preparadas 24 dispersões de lipossomas deformáveis.

4.2.2 Método de hidratação de filme e sonicação (método 1).

As quantidades de fosfatidilcolina e tensoativo indicadas na tabela 1 foram transferidas para um balão de 50 ml, seguido pela adição de 1,5 ml de etanol e agitação até a mistura completa dos componentes. O conteúdo alcoólico foi evaporado até a secura em evaporador rotativo a 200 rpm, 600 mmhg, 50 °C (temperatura acima da temperatura de transição de fase dos lipídios) por 30 minutos para a formação do filme seco na parede do balão.

As dispersões de lipossomas deformáveis com etanol a 20% (v/v) foram hidratadas com 0,8 ml de etanol e 3,2 ml de solução tampão fosfato pH 8; 1 mol/L. As dispersões com etanol a 10% (v/v) foram hidratadas com 0,4 ml de etanol e 3,6 ml do tampão fosfato. O balão foi agitado sob rotação de 10 rpm, por 20 min afim de que a solução adicionada pudesse atingir toda a extensão do filme lipídico nas paredes do balão. Depois, a hidratação continuou por 2h em condição de repouso. Assim os lipossomas grandes multi-lamelares começam a se formar.

O conteúdo do balão, transferido para um recipiente adequado e sonicado em sonicador de sonda (ou haste) sob potência de 105 W por 1 minuto de sonicação seguido por 1 minuto de repouso. Esta forma de sonicação foi repetida 20 vezes totalizando 20 min de sonicação e 20 minutos de repouso. O recipiente foi mantido em banho de gelo. O titânio liberado da sonda do sonicador foi removido por centrifugação a 3830 rpm por 15 minutos (Canto et al., 1999; Souza et al., 2004; El

Maghraby et al., 1999, 2001; Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2003; Yu-Kyoung et al., 2006; Wang et al., 2007; Dragicevic-Curic et al., 2008; Song et al., 2006; Dubey et al., 2006; Cevc et al., 2002; Lau et al., 2005; Brgles et al., 2007).

4.2.3 Método de sonicação (método 2).

As quantidades de fosfatidilcolina e tensoativo indicadas na tabela 1 foram transferidas para béquer de 10 ml. Em seguida, 0,4 mL de etanol foram adicionados às dispersões de lipossomas com etanol a 10% (v/v) ou 0,8 mL às dispersões com etanol a 20% (v/v). Os conteúdos foram agitados, manualmente, até a mistura completa dos componentes.

Depois, 3,6 ml de solução tampão fosfato pH 8; 1 mol/L foram adicionados às dispersões com etanol a 10% ou 3,2 ml da mesma solução às dispersões com etanol a 20%. Os conteúdos foram agitados em vórtex por 1 minuto e depois submetidos à sonicação em sonicador de sonda sob as mesmas condições descritas no item 4.2.2 (Canto et al., 1999; Souza et al., 2004; El Maghraby et al., 1999, 2001; Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2003; Yu-Kyoung et al., 2006; Wang et al., 2007; Dragicevic-Curic et al., 2008; Song et al., 2006; Dubey et al., 2006; Cevc et al., 2002; Lau et al., 2005; Brgles et al., 2007).

4.2.4 Preparação das dispersões de lipossomas deformáveis com remifentanil.

Dispersões de lipossomas deformáveis com remifentanil também foram preparadas a partir das 12 formulações descritas no item 4.2.1 do mesmo modo descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.3, mas no momento da adição do tampão fosfato pH 8, 1 mol/L, 1 ml do mesmo foi substituído por 1ml de solução de remfentanil 4 mg/ml.

Nas dispersões preparadas por hidratação de filme e sonicação o filme lipídico é hidratado por 0,8 ml de etanol; 2,2 ml de solução de tampão fosfato pH 8, 1 mol / L e 1ml de solução de remifentanil 4mg/ml; ou o filme lipídico é hidratado por 0,4 ml de etanol, 2,6 ml do tampão fosfato e 1 ml dessa solução de remifentanil.

Nas dispersões preparadas por sonicação, são adicionados ao béquer com os componentes lipídicos 0,8 ml de etanol; 2,2 ml do tampão fosfato e 1 ml da alíquota de remifentanil ou são adicionados 0,4 ml de etanol; 2,6 ml do tampão e 1 ml da alíquota de remifentanil.

4.3 Caracterização das dispersões de lipossomas deformáveis.

4.3.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanho dos lipossomas deformáveis.

O tamanho dos lipossomas deformáveis foi avaliado por espalhamento dinâmico de luz (Malvern Zetasizer nano ZS), sob temperatura de 25 °C, duração de 70 s, atenuação 5, em cubeta de calibração descartável, com água como meio dispersante. As medidas foram conduzidas em duplicata para as 24 dispersões de lipossomas deformáveis sem e com remifentanil. (Lee et al., 2005; Mishra et al., 2006, 2007; Qiu et al., 2008, Garg et al., 2006; Kim et al., 2004; Jain et al., 2005, 2007; Honeywell-Nguyen et al., 2003, 2002; Song et al., 2006; Dubey et al., 2006, 2007a, 2007b; Cevc et al., 2002; Lau et al., 2005, Touitou et al., 2000; Maurer et al., 2001).

4.3.2 Eficiência de encapsulação do remifentanil pelos lipossomas deformáveis

A eficiência de encapsulação foi realizada por diálise (Trotta et al., 2003; Gallarate et al., 2006; Qiu, et al., 2008; López-Pinto et al., 2005; Jain et al., 2007; Rao et al., 2008; Maurer et al., 2001). As 24 dispersões de lipossomas deformáveis adicionadas de remifentanil já citadas foram submetidas a este teste.

Uma solução tampão fosfato salino de pH 8,0; 1 mol/L foi usada como meio de diálise. As membranas de diálise de acetato de celulose foram imersas neste meio por 1 h para garantir completa hidratação.

Amostras de 1,5 mL de cada dispersão de lipossomas deformáveis, preparadas em triplicata, foram transferidas para as membranas de diálise. O restante do volume das amostras foi reservado para a análise posterior.

As membranas de acetato de celulose com as dispersões de lipossomas deformáveis foram submersas em 500 mL do meio de diálise e mantidas sob agitação por três horas e meia. Após esse tempo, o remifentanil não encapsulado passou para o meio de diálise.

O conteúdo das membranas de diálise com dispersões de lipossomas com remifentanil somente encapsulado foi coletado e a quantidade do fármaco determinada por CLAE, conforme descrito no item 4.1.

Para a determinação da concentração total do fármaco, encapsulado e não encapsulado, amostras das dispersões de lipossomas deformáveis que foram reservadas e não sofreram diálise também foram analisadas por CLAE (Item 4.1).

4.3.3 Determinação da elasticidade dos lipossomas deformáveis por filtração em membrana.

Especialmente para este teste, foram preparadas dispersões de lipossomas deformáveis com remifentanil pelo método de hidratação de filme e sonicação, a partir das 12 formulações descritas no item 4.2.4.

Houve também 1 minuto de sonicação seguido de 1 minuto de repouso, mas neste caso o tempo total foi reduzido para 10 minutos de sonicação e 10 minutos de repouso. Os demais passos da preparação dos lipossomas deformáveis para este experimento são os mesmos do item 4.2.4.

O diâmetro dos lipossomas das dispersões de lipossomas deformáveis preparadas foi medido como no item 4.3.1. Depois, 3 ml das dispersões foram filtrados em membrana de filtro com poros de 50 nm de diâmetro com ajuda de suportes de membrana de filtros para seringas e de seringa de vidro por 10 vezes. Após as filtrações, o tamanho dos lipossomas das dispersões foi medido novamente pelo mesmo método. Este experimento foi feito em triplicata (Trotta et al., 2003; Gallarate et al., 2006; Mishra et al., 2006, 2007; Yu-Kyoung Oh et al., 2006; Wang et al., 2007; Song et al., 2006; Dubey et al., 2006; Honeywell-Nguyen et al., 2002; Jain et al., 2007).

4.3.4 Estudos de permeação cutânea de remifentanil “in vitro” promovida por lipossomas deformáveis.

A permeação cutânea “in vitro” do remifentanil a partir de dispersões de lipossomas deformáveis foi realizada em células de difusão de Franz modificadas (Microette-Hanson Research, Chatsworth, CA, USA) com área de difusão de 1,77 cm², volume da célula receptora de 7 ml, e utilizando pele de porco (Pierre et al., 2006).

A pele usada foi proveniente do dorso da orelha do animal, extirpada da cartilagem subjacente, dermatomizada a uma espessura de aproximadamente 500 µm, cortada em pedaços que foram embrulhados em folha de alumínio e

conservados em -20 °C, até seu uso dentro de 4 semanas (Garcia et al., 2006; Trotta et al., 2002, 2004; Gallarate et al., 2006).

Para permitir a hidratação da pele antes de iniciar o experimento, o compartimento receptor foi preenchido com meio de hidratação, tampão fosfato salino, pH 6,0 com 0,11% de formaldeído, desgaseificado por sonicação e vácuo. Os pedaços de pele foram colocados nas células de difusão com a porção dérmica em contato com o meio de hidratação, mantido sob agitação de 300 rpm e temperatura de 37 °C $\pm$ 2 °C por 1 hora (Rao et al., 2008; Pierre et al., 2006; Bendas et al., 2007; Elsayed, et al., 2006, 2007 b; Trotta et al., 2002, 2004; Gallarate et al., 2006; El Maghraby et al., 1999, 2000).

Os pedaços de pele e o meio de hidratação foram retirados das células Franz, as células e os pedaços de pele foram enxaguadas com o meio receptor, tampão fosfato salino, pH 5,0, desgaseificado por sonicação e vácuo. As peles foram recolocadas nas células de difusão, da mesma forma, com a porção dérmica em contato com o meio receptor e foram fixadas sobre as células por fechos, com uma área de difusão de 1,77 cm².

A partir das 12 formulações com remifentanil a 1mg/ml descritas no item 4.2.4 preparou-se 12 dispersões de lipossomas deformáveis pelo método da formação de filme e sonicação (item 4.2.2). 2 ml dessas dispersões foram homogeneamente aplicadas sobre a superfície epidérmica da área de difusão das peles. O meio receptor foi mantido sob agitação de 300 rpm e temperatura de 37 °C $\pm$ 2 °C. A superfície epidérmica (meio doador) foi apenas coberta com uma folha de papel laminado para evitar sujeira, possível contaminação e oclusão, pois para a permeação dos lipossomas deformáveis é necessária aplicação não oclusiva da preparação (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005; El Maghraby et al., 2008; Elsayed et al., 2007; Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002; Cevc, 2004 a, 2004 b; Honeywell-Nguyen et al., 2006).

Após a aplicação das dispersões de lipossomas deformáveis, o aparelho Microette Seringe Pump Hanson Research automaticamente coletou amostras de 1 ml do meio receptor em 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 9 h; 12 h; 15 h; 18 h e 24 h. O volume de 1 ml de meio receptor retirado em cada amostragem foi repostado, imediatamente e automaticamente, por igual volume de meio fresco e desgaseificado (Dubey et al., 2007a, 2007b; López-Pinto et al., 2005; Tuitou et al.,

2000; Jain et al., 2005, 2007; Ita et al.; Mishra et al., 2006; El Maghraby et al., 2001). Cada amostra coletada foi analisada por CLAE conforme o item 4.1.

O experimento de permeação descrito foi conduzido em triplicata para cada dispersão de lipossomas deformáveis. Como controle, 2 ml de solução hidroetanólica a 20% com remifentanil 1 mg/ml foi submetida ao mesmo experimento em duplicata.

Amostras das 12 formulações com remifentanil 1mg/ml descritas no item 4.2.1, mas que não passaram por método de preparação de lipossomas, também foram submetidas ao experimento de permeação em duplicata.

4.3.4.1 Estudo de “sink conditions” do experimento de permeação cutânea.

21 mg de remifentanil foram solubilizadas em 7 ml da solução receptora descrita no item 4.3.4 no compartimento receptor da célula de Franz. A solução foi mantida nas mesmas condições que a descrita no item 4.3.4 por 1 hora. Alíquotas das soluções foram submetidas à análise por CLAE, conforme o item 4.1. Este experimento foi realizado em triplicata.

4.3.5 Avaliação da retenção cutânea de remifentanil “in vitro”

Ao final da permeação, as peles foram removidas, cuidadosamente, lavadas com água para retirada de formulação residual, depois foram enxutas com lenço de papel e fixadas em uma superfície plana. O estrato córneo da superfície de difusão foi removido por “tape stripping”, onde 10 fitas tipo “durex” foram utilizadas.

A pele remanescente foi picada em pequenos pedaços em um tubo falcon. Foram adicionados 5 ml de tampão fosfato pH 3 ao tubo. O conteúdo do tubo foi homogeneizado em um homogeneizador de tecidos por 5 minutos. Sonicado em ultrassom de banho por 30 minutos.

O homogeneizado foi filtrado em papel de filtro, sob vácuo, em funil de büchner e kitassato. O filtrado obtido foi novamente filtrado em membrana de 0,45 µm. As amostras obtidas foram analisadas em CLAE conforme o item 4.1.

A recuperação deste método de extração do remifentanil foi previamente avaliada em triplicata. 500 µl de solução aquosa de remifentanil a 4 mg/ml foram aplicados, aos poucos, sobre uma superfície da pele circular de 1,77 cm². O local da aplicação foi recortado e picotado em um tubo falcon e em seguida se procedeu como descrito anteriormente. Obteve em média 1,8014 ± 0,194 mg de remifentanil,

90,07% da quantidade original aplicada, portanto a extração é eficiente (Pierre et al., 2006; Garcia et al., 2006; Steluti et al., 2005).

4.3.6 Permeação de remifentanil por dispersão de lipossomas deformáveis não encapsulados.

Dispersão de lipossomas deformáveis com proporção entre fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20, etanol a 10%, foi preparada por hidratação de filme e sonicação conforme os itens 4.2.1. Após a preparação, foram adicionados 4 mg de remifentanil para se obter uma dispersão de lipossomas com 1 mg/ml de remifentanil não encapsulado. Esta dispersão foi submetida a teste de permeação conforme o item 4.3.4. Este experimento foi realizado em triplicata (Elsayed et al., 2006, 2007, 2007b; El Maghraby et al., 1999).

5. Resultados e Discussão

5.1 Determinação do teor de remifentanil por CLAE

A preparação liofilizada de remifentanil produzida pela GlaxoSmithKline têm como quantidades marcadas por unidade, glicina 15 mg e remifentanil 5 mg, e foi utilizada como matéria prima para a preparação das dispersões de lipossos. A matéria prima remifentanil foi analisada qualitativamente pelo método analítico desenvolvido, dois picos cromatográficos foram detectados (figura 4). O pico eluído em 1,13 minutos foi identificado como sendo o da glicina, por comparação com o tempo de retenção obtido para a glicina padrão (99% de pureza - Sigma). O outro pico detectado, eluído em 10 minutos, foi identificado como sendo do remifentanil por exclusão, pois o padrão de remifentanil não é encontrado comercialmente.

O método cromatográfico desenvolvido foi capaz de separar adequadamente o remifentanil da glicina. Todos os componentes das formulações e resíduos de pele foram eluídos no mesmo tempo de retenção da glicina ou não absorvem a luz UV em 210 nm (figura 4). Portanto, não interferiram na eluição do remifentanil, os dados sugerem que o método é seletivo para a detecção e quantificação do fármaco nas dispersões de lipossomas deformáveis.

5.1.1 Validação do método analítico

A validação de um método assegura que o desempenho dos parâmetros analíticos, curva de calibração; linearidade; precisão; exatidão; recuperação; limites de detecção e quantificação; e seletividade são adequados nas condições em que a metodologia será utilizada. Desta forma, a validação confere maior confiabilidade aos resultados obtidos pelo método analítico desenvolvido (Swartz, et al., 1996).

5.1.2 Curva analítica

A melhor relação de linearidade foi encontrada na faixa de concentração de remifentanil de 0,05 a 0,25 mg/ml, aplicando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi obtido a equação $y = 2 \cdot 10^7 x - 7119,6$ que representa a relação linear entre as concentrações de remifentanil e as respectivas alturas, com coeficiente de correlação linear (R^2) = 0,9998 (figura 5).

Figura 4: Separação da glicina e do remifentanol em coluna de fase reversa C18 pelo método cromatográfico desenvolvido. A: Cromatograma de solução de glicina padrão a 0,03 mg/ml. B: Cromatograma da mistura física com 0,2 mg/ml de remifentanol (glicina a 0,6 mg/ml), 45 mg/ml de fosfatidilcolina, 5 mg/ml de Tween 80 e 5 mg/ml de tween 20. C: Cromatograma da mistura física sem remifentanol com fosfatidilcolina a 0,23 mg/ml e Tween 80 a 0,05 mg/ml. Condições cromatográficas: Coluna LiCHROCart C-18 (125x250 nm; 5 µm); fase móvel: metanol 14 %, acetonitrila 15 %, 71 % de solução tampão fosfato pH 3 0,1 mol/L, fluxo de 1,0 mL/min; volume injetado 20 µL; detecção em 210 nm.

5.1.3 Precisão e exatidão do método analítico

Os parâmetros precisão e exatidão intra e inter-ensaios avaliados para a concentração de 0,2 mg/ml de remifentanol adicionado às misturas físicas das formulações com tween 80 e tween 20 pela metodologia de CLAE (conforme descrito no item 4.1.6), estão expressos na Tabela 2.

Os resultados demonstram que o coeficiente de variação (que expressa a precisão) não ultrapassou 2% (maior coeficiente de variação obtido foi de 1,7%) a exatidão, expressa em % de recuperação, permaneceu na faixa de 100,2% a 99,08.

Esses dados demonstram que o método analítico desenvolvido é preciso e

exato para a quantificação de remifentanil nas diferentes formulações.

Figura 5: Curva analítica de remifentanil por CLAE. As concentrações utilizadas foram 0,05; 0,1; 0,16; 0,2; 0,25 mg/ml. Condições cromatográficas: Coluna LiCHROCart C-18 (125x250 nm; 5 μ m); Fase móvel: 15 % de acetonitrila, 14 % de metanol, 71 % de solução tampão fosfato pH 3; 0,1 mol / L. Fluxo: 1,0 mL/min. volume injetado: 20 μ L; detecção em 210 nm.

Tabela 2 - Precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de CLAE para a quantificação de remifentanil (0,2 mg/ml) adicionado as formulações com tween 80 e tween 20.

	Tween 80		Tween 20	
	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão
	(%)	CV (%)	(%)	CV (%)
Dia 1	100,00	1,63	99,94	0,27
Dia 2	99,99	0,256	99,95	0,80
Dia 3	99,80	0,457	100,20	1,76
Inter-dia	99,94	1,3	100,03	1,42

5.1.4 Limites de detecção e quantificação

Como o método analítico será empregado para a avaliação da quantidade de remifentanil encapsulado pelos lipossomas preparados, o método foi também validado quanto aos limites de detecção e quantificação (conforme o item 4.1.7). O Limite de quantificação determina a menor quantidade de fármaco que pode ser quantificada com certa precisão e exatidão.

Os limites de detecção e quantificação encontrados para o método analítico de quantificação de remifentanil, adicionado às misturas físicas das formulações com tween 80 e com tween 20, foram de 0,0043 mg/ml e de 0,007 mg/ml, respectivamente. O limite de quantificação de uma solução de remifentanil na concentração de 7µg/ml apresentou um coeficiente de variação de 9,4% e 9,7%, para as formulações com Tween 20 e 80 respectivamente.

5.2 Caracterização das dispersões de lipossomas deformáveis

Lipossomas deformáveis de remifentanil podem ser uma alternativa para obtenção de dispositivos transdérmicos capazes de prover o aumento da penetração e permeação do fármaco. Esse dispositivo poderá proporcionar facilidade de administração, aumento da meia vida do fármaco no organismo, diminuição dos efeitos colaterais, analgesia prolongada, sendo útil, por exemplo, no alívio rápido das dores crônicas e nas dores pós-operatórias.

5.2.1 Tamanho médio e Distribuição de tamanho dos lipossomas deformáveis.

Para a preparação das dispersões de lipossomas deformáveis foram empregados dois métodos diferentes, a hidratação de filme e sonicação e a sonicação. Para formação dos lipossomas foi selecionado o fosfolípido, fosfatidilcolina de soja (phospholipon 90 G) em diferentes quantidades, os tensoativos polissorbato 20 e 80 (tween 20 e 80), em diferentes quantidades, e solução de etanol a 10 ou 20% (v/v).

Para se investigar o potencial de uso de lipossomas deformáveis como sistema de penetração e permeação, as dispersões obtidas com as diferentes formulações apresentadas no item 4.2.1 e sem a presença de remifentanil, foram caracterizadas quanto a tamanho e distribuição de tamanho dos lipossomas.

Conforme os dados da Tabela 3 pode-se observar que independente das proporções de fosfatidilcolina e tensoativo, 4:1, 5,6:1 ou 9:1, dos tensoativos, tween 80 ou tween 20, e dos métodos de preparação, hidratação de filme e sonicação ou sonicação, quando o etanol 10% foi empregado, os lipossomas obtidos apresentaram os menores diâmetros médios ($32,7 \pm 6,3 - 47,1 \pm 4,3$ nm) em relação ao etanol 20% ($56,5 \pm 4,8 - 77,9 \pm 6,0$ nm).

A proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1 foi a que proporcionou os lipossomas com os maiores diâmetros médios quando comparado aos diâmetros

dos lipossomas obtidos com as proporções de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1 e 9:1.

Tabela 3 – Determinação, em duplicata, do diâmetro médio dos lipossomas deformáveis sem remifentanil, nas dispersões preparadas.

		Diâmetro (nm)			
		Método 1		Método 2	
Fc/P	Tensoativo	10% etanol	20% etanol	10% etanol	20% etanol
4:1	Tween 80	45,9 ± 5,2	74,7 ± 4,9	47,1 ± 4,3	77,9 ± 6,0
	Tween 20	44,1 ± 5,4	70,5 ± 5,6	45,3 ± 5,1	72,4 ± 5,9
5,6:1	Tween 80	40,0 ± 7,6	65,3 ± 6,3	39,6 ± 5,3	64,0 ± 5,5
	Tween 20	38,0 ± 6,2	63,5 ± 6,1	37,5 ± 5,8	65,6 ± 6,4
9:1	Tween 80	34,7 ± 5,0	60,3 ± 7,0	36,7 ± 6,1	61,3 ± 5,7
	Tween 20	32,7 ± 6,3	57,8 ± 6,4	34,6 ± 4,8	56,5 ± 4,8

Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) dividido pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). Método 1: hidratação de filme e sonicação. Método 2: sonicação.

Analizando os diâmetros médios dos lipossomas preparados com as diferentes proporções de fosfatidilcolina e tensoativo, etanol 10% ou 20% e pelos métodos 1 ou 2, os menores diâmetros foram obtidos mais vezes com o tensoativo tween 20, mas por uma pequena diferença (apenas 4,69%) frente os diâmetros obtidos com o tween 80. A exceção é uma dispersão, com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20, etanol a 20% preparada por sonicação, cujos os diâmetros médios foram maiores que dos lipossomas preparados nas mesmas condições, mas utilizando o tween 80 (tabela 3).

Os lipossomas preparados com as proporções de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1 e 9:1, etanol a 10%, tween 20 ou 80, por hidratação de filme e sonicação ou sonicação, foram aqueles com os menores diâmetros médios (32,7 ± 6,3 – 40,0 ± 7,6 nm). Pelos resultados obtidos pode-se sugerir que para obtenção de lipossomas com os menores diâmetros, as condições ideais seriam: proporções de fosfatidilcolina e tensoativos 5,6:1 ou 9:1, 10% de etanol, tween 20. Quanto aos métodos de preparação, a hidratação de filme e sonicação ou a sonicação não proporcionaram grande influência no diâmetro dos lipossomas.

Subheet et al.; 2007 prepararam etossomas conforme descrito por Touitou et al., 2000 em meio hidroetanólico a 60 % com 20 mg/ml de fosfatidilcolina e obtiveram lipossomas com diâmetro de 72 nm. Diâmetro semelhante ao dos lipossomas deformáveis (preparados no presente trabalho) com proporção de fosfatidilcolina e tensoativos 4:1 e 5,6:1 e 20 % de etanol e maior que aqueles com proporção de fosfatidilcolina e tensoativos 9:1 e 20% de etanol.

A presença de tween 20 ou tween 80 permitiu que a utilização de uma menor quantidade de etanol (20%) obtivesse lipossomas de diâmetros semelhantes à etossomas preparados em outros trabalhos com quantidade de etanol de pelo menos 40%, mostrando a importância do tensoativo na preparação de lipossomas com menores diâmetros (Touitou et al., 2000, Jain et al., 2007; Rao et al., 2008; Maurer, 2001, Barry et al., 2001; Dubey et al., 2007a, 2007b; López-Pinto et al., 2005; Bendas et al., 2007).

Os diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados neste trabalho foram, também, menores que de outros lipossomas deformáveis com tensoativos e sem etanol (Elsayed et al., 2006; Ita et al., 2007; Cevc et al., 2003; Mishra et al., 2006, 2007; Qiu et al., 2008; Cevc et al., 2002, Cevc et al., mai 2004; Maghraby et al., 1999, 2000, 2001; Jain et al., 2005; Honeywell-Nguyen et al., 2002, 2003; Dragicevic-Curic et al., 2008; Song et al., 2006; Dubey et al., 2006). O menor diâmetro pode ser devido a uma maior estabilidade do lipossoma atribuída pela malha superficial negativa proporcionada pelo etanol (Touitou et al., 2000; López-pinto et al., 2005).

Garg et al., 2006 preparam lipossomas deformáveis por hidratação de filme seguido de sonicação a 4 °C, 20 min, 40 W, compostos por fosfatidilcolina e diferentes tensoativos na proporção 5,7:1 e obtiveram lipossomas com diâmetro médio de 165 ± 10 nm (com deoxicolato de sódio), 160 ± 8 nm (com Tween 80), $174 \pm 9,65$ nm (Span 60), $180 \pm 8,20$ (Span 65).

Trotta et al., 2003 preparam lipossomas deformáveis compostos por fosfatidilcolina e glicirrizinato dipotássico na proporção 4:1 e 2:1 preparados por hidratação de filme seguido de sonicação a 32 W por 8 min que apresentaram diâmetro médio de 148 ± 18 nm, na proporção 2:1 e 174 ± 22 nm, na proporção 4:1.

Os diâmetros dos lipossomas deformáveis desenvolvidos no presente trabalho diminuíram com o aumento da proporção de fosfatidilcolina em relação ao

tensoativo, no entanto Mishra et al., 2007 e Trotta et al., 2003 reportam um comportamento oposto. Estes resultados mostram que a proporção de fosfatidilcolina e de tensoativo deve ser ajustada a cada caso visando obter lipossomas de menores tamanhos.

A incorporação de ramifentanil às dispersões não altera o diâmetro dos lipossomas do presente trabalho. Ao comparar os resultados da tabela 3 com os da tabela 4 observa-se que os lipossomas deformáveis adicionados de remifentanil foram, em média, apenas 4,46% maiores que os lipossomas deformáveis sem o fármaco.

Tabela 4 – Determinação, em duplicatada, do diâmetro médio dos lipossomas deformáveis com remifentanil nas dispersões de lipossomas.

		Diâmetro (nm)			
		Método 1		Método 2	
Fc/P	Tensoativo	10% etanol	20% etanol	10% etanol	20% etanol
4:1	Tween 80	48,23 ± 5,04	69,29 ± 5,42	46,47 ± 5,07	70,39 ± 5,25
	Tween 20	44,36 ± 6,50	70,90 ± 4,97	46,62 ± 4,76	69,78 ± 4,50
5,6:1	Tween 80	46,28 ± 5,44	64,61 ± 6,23	47,07 ± 4,42	63,32 ± 5,94
	Tween 20	42,40 ± 6,80	68,95 ± 6,24	43,76 ± 6,64	66,09 ± 5,75
9:1	Tween 80	40,02 ± 6,40	62,59 ± 6,34	44,07 ± 5,67	60,54 ± 5,82
	Tween 20	41,10 ± 5,24	60,09 ± 5,87	43,81 ± 6,10	61,73 ± 5,68

Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). Método1: hidratação de filme e sonicação. Método 2: sonicação.

A distribuição dos diâmetros dos lipossomas das diferentes dispersões preparadas foi influenciada pela quantidade de etanol presente. As formulações contendo etanol a 10%, sem e com remifentanil mostraram distribuição bimodal. Há uma população de lipossomas homogêna com diâmetros menores e baixa polidispersidade, e outra população de lipossomas grandes (maiores que 1000 nm em média) com alta polidispersidade (figuras 6 e 7).

Figura 6: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 10 % de etanol por hidratação de filme e sonicação (método 1). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).

Figura 7: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 10 % de etanol por sonicação (método 2). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).

Por outro lado, os lipossomas preparados a partir das formulações contendo 20% de etanol, com e sem remifentanil, mostraram distribuição monomodal com baixa polidispersidade (figuras 8 e 9).

Figura 8: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 20 % de etanol por hidratação de filme e sonicação (método1). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).

Figura 9: Distribuição dos diâmetros dos lipossomas deformáveis preparados com 20 % de etanol por sonicação (método 2). pdi: índice de polidispersão. Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20).

5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação do remifentamil pelos lipossomas nas dispersões preparadas

A eficiência do processo de encapsulação do remifentamil pelos lipossomas foi avaliada pelo método de diálise em membrana de acetato de celulose. A membrana de acetato de celulose retém proteínas de massa molecular de 65 KDalton e tamanho de 5,5 nm e, portanto é capaz de reter os lipossomas (que possuem 40,02 a 70,90 nm de diâmetro (tabela 4)) e de permitir a difusão do remifentamil (que possui 412,91 Dalton).

O método de diálise usado foi previamente validado. 24 sacos de diálise, contendo 1,5 mL da solução de remifentamil de 1mg/mL, foram submersos em 500

mL do meio de diálise. Alíquotas do meio de diálise foram coletadas após 1, 2, 3 e 4h de diálise e foram analisadas por CLAE.

Após 3h de diálise, 96,76% da quantidade total de remifentanil presente já haviam se difundido para o meio de diálise, e após 4 horas a quantidade do fármaco difundida para o meio não mais se alterou.

A tabela 5 mostra a eficiência de encapsulação das dispersões de lipossomas deformáveis. A quantidade de componentes lipídicos (fosfatidilcolina mais tensoativo) foi de 50 mg/ml para todas as dispersões e a proporção de fosfatidilcolina e tensoativo foram 4:1, 5,6:1 e 9:1. A proporção de fosfatidilcolina e tensoativo influenciou a eficiência de encapsulação. Os lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1 apresentaram eficiência de encapsulação, em média, 20,56% e 39,24% maior que os lipossomas com as proporções 4:1 e 9:1 respectivamente (tabela 5).

De modo semelhante os lipossomas com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1 apresentaram eficiência de encapsulação, em média, 15,49% maior que os lipossomas com proporção 9:1 de fosfatidilcolina e tensoativo. A maior eficiência de encapsulação da proporção 5,6:1 pode ser devida a uma maior interação do remifentanil na bicamada lipídica dos lipossomas.

Tabela 5 – Medida, em porcentagem, da eficiência de encapsulação do remifentanil pelos lipossomas deformáveis das dispersões.

Eficiência de encapsulação (%)					
Fc/P	Tensoativo	Método 1		Método 2	
		10% etanol	20% etanol	10% etanol	20% etanol
4:1	Tween 80	35,78 ± 3,57	58,97 ± 3,20	26,50 ± 3,91	47,48 ± 4,26
	Tween 20	37,49 ± 3,63	60,24 ± 3,49	27,87 ± 3,05	47,99 ± 3,25
5,6:1	Tween 80	46,43 ± 3,69	68,95 ± 3,53	35,14 ± 2,57	54,30 ± 4,07
	Tween 20	47,28 ± 3,73	70,50 ± 3,78	35,35 ± 3,95	54,76 ± 3,76
9:1	Tween 80	27,85 ± 4,03	52,37 ± 4,56	26,51 ± 3,56	42,70 ± 3,28
	Tween 20	28,06 ± 3,84	52,02 ± 4,09	25,70 ± 4,70	41,20 ± 2,95

Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). Método 1: hidratação de filme e sonicação. Método 2: sonicação.

Nos lipossomas com mesma proporção de fosfatidilcolina e tensoativo, o aumento na quantidade de etanol e a preparação por hidratação de filme e sonicação proporcionam maior eficiência de encapsulação.

O etanol foi o componente que mais influenciou a eficiência de encapsulação, as dispersões de lipossomas deformáveis com etanol a 20% apresentaram uma eficiência média de 62,89% maior que dispersões com etanol a 10% (tabela 5). Outros trabalhos também mostraram que a presença e o aumento de etanol melhoram a eficiência de encapsulação de fármacos (Dubey et al., 2007a, 2007b; Bendas et al., 2007; Touitou et al., 2000; Jain et al., 2007; Rao et al., 2008).

Uma maior solubilização do remifentanil no interior dos lipossomas deformáveis pelo etanol pode ser responsável pela maior eficiência de encapsulação dos lipossomas com maior quantidade de etanol. Além disso, a presença do etanol pode aumentar a interação do fármaco na bicamada lipídica dos lipossomas. Logo, uma maior quantidade de etanol nas dispersões de lipossomas deformáveis, aumenta a eficiência de encapsulação.

Bendas et al., 2007 sugeriram que a encapsulação de fármacos está relacionada com a ação estabilizante do etanol sobre os lipossomas. Assim, a quantidade de etanol que proporciona a maior estabilidade aos lipossomas pode aumentar a eficiência de encapsulação de fármacos. Jain et al., 2007 e Maurer et al., 2001 sugeriram que o aumento da concentração de etanol proporciona maior fluidez das membranas dos lipossomas deformáveis facilitando a interação de fármacos na bicamada lipídica e aumentando a eficiência encapsulação.

Entretanto, Jain et al., 2007 mencionaram que o aumento na eficiência de encapsulação está limitado a uma quantidade máxima de etanol. A presença de etanol em preparações de lipossomas em concentrações superiores a concentração limite pode proporcionar diminuição na eficiência de encapsulação. O etanol em excesso poderia tornar a membrana insuficientemente rígida o que a tornaria vulnerável e causaria danos na mesma e instabilidade ao lipossoma. Preparações de lipossomas deformáveis, citadas por Jain et al., 2007 apresentaram melhor eficiência de encapsulação com quantidades de etanol até 45% (v/v).

Os lipossomas deformáveis desenvolvidos no presente trabalho possivelmente possuem uma concentração de etanol que proporciona a melhor eficiência de

encapsulação. Para determinar essa quantidade é necessária a preparação e avaliação de novas dispersões com quantidade maiores de etanol.

O método de hidratação de filme e sonicação é o mais utilizado para obtenção de lipossomas deformáveis e de lipossomas convencionais. Alguns autores também preparam lipossomas por hidratação de filme lipídico seguido de extrusão. De modo que, na grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, a formação de filme lipídico seguido de sua hidratação é um dos passos na preparação de lipossomas deformáveis (Elsayed et al., 2007).

No entanto, não há trabalhos que comparam as características da hidratação de filme e sonicação no preparo de lipossomas deformáveis frente a outros, e que avaliem a importância da obtenção e hidratação do filme lipídico na preparação de lipossomas deformáveis.

Na tentativa de obter informações neste sentido, o método de hidratação de filme e sonicação (método 1) foi comparado a um método mais simples, a sonicação (método 2). A utilização do método de sonicação facilitaria a preparação de lipossomas deformáveis, desde que apresentasse características desejáveis ao menos da mesma forma que método 1. Além disso, a comparação dos dois métodos poderia gerar informações sobre a importância do filme lipídico já que a diferença desses dois métodos é a presença do filme.

Os métodos de preparação não influenciaram o tamanho médio e a distribuição de tamanho dos lipossomas deformáveis, mas influenciaram a eficiência da encapsulação. As dispersões de lipossomas deformáveis preparadas por hidratação de filme e sonicação apresentaram eficiência de encapsulação, em média 25,88% maior do que os lipossomas preparados por sonicação (tabela 5).

Os resultados de eficiência de encapsulação mostram que a proporção de fosfatidilcolina e tensoativo ideal foi 5,6:1 que está muito próxima aos dados da literatura (Trotta et al., 2003; Mishra et al., 2006, 2007; Garg et al., 2006; Kim et al., 2004; El Maghraby et al., 2000; Jain et al., 2005; Lau et al., 2005).

Analisando os dados em conjunto, fica evidente que para maior eficiência de encapsulação do remifentanil, os lipossomas devem ser preparados por hidratação de filme e sonicação, com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1 e etanol a 20%, independente do tensoativo tween 20 ou tween80.

O tween 20 e 80 são tensoativos de uma mesma classe e possuem grande semelhança estrutural, física e química. É intuitivo, portanto, que os lipossomas deformáveis desenvolvidos com tween 20 ou 80 não possuíam diferenças nas características analisadas. O que foi confirmado pelos resultados obtidos. Os lipossomas preparados com tween 20 possuíam, em média, eficiência de encapsulação apenas 1,05% maior e diâmetro (com já citado) apenas 4,69% maior.

5.2.3 Avaliação da elasticidade da membrana dos lipossomas deformáveis

A elasticidade é uma propriedade peculiar dos lipossomas deformáveis que os diferencia dos lipossomas convencionais, cujas membranas não são elásticas e não permeiam o estrato córneo. Portanto medir a elasticidade é importante para caracterizar os lipossomas deformáveis.

A extrusão de lipossomas por membrana de poros menores que seus diâmetros promovem o rompimento dos lipossomas e os forçam a se reorganizarem em lipossomas menores. A membrana de um lipossoma deformável deve ser flexível e permitir que o lipossoma altere sua forma durante a passagem pelos poros sem se romper. Portanto, os lipossomas para serem lipossomas deformáveis não devem ter alteração significativa no diâmetro após a passagem por poros de diâmetro significativamente menor (Honeywell-Nguyen et al., 2005; Bouwstra et al., 2002; El Maghraby et al., 2008; Elsayed et al., 2007).

No entanto, a membrana disponível para realização do ensaio de elasticidade possuía diâmetro maior que o dos lipossomas preparados nesse trabalho. Para realização do experimento, lipossomas foram preparados, por hidratação de filme e sonicação, mas o tempo de sonicação foi reduzido para obter lipossomas maiores com diâmetro médio cerca de três vezes superior à porosidade da membrana.

Os resultados apresentados nas tabelas 6 e 7 mostram que os lipossomas preparados apresentaram elasticidade, pois as diferenças observadas para os diâmetros antes e depois da extrusão não foram grandes e porque os diâmetros depois da extrusão são bem maiores em relação à porosidade da membrana de filtro em pelo menos 2,94 vezes, indicando que os lipossomas não se romperam e que são deformáveis.

Tabela 6 – Medida dos diâmetros antes e depois da filtração por membrana de micro-poro das dispersões de lipossomas deformáveis com 10% de etanol preparadas para o estudo de elasticidade.

Diâmetro (nm)					
Fc/P	Tensoativo	Antes	Depois	Razão	Elasticidade
4:1	Tween 80	154 ± 8,0	152 ± 9,7	1,013	3,08
	Tween 20	152 ± 7,6	150 ± 10,0	1,013	3,04
5,6:1	Tween 80	151 ± 8,6	150 ± 10,9	1,007	3,02
	Tween 20	150 ± 8,7	149 ± 9,7	1,007	3,00
9:1	Tween 80	149 ± 8,3	147 ± 10,6	1,014	2,98
	Tween 20	150 ± 8,0	148 ± 9,9	1,013	3,00

Tabela 7 – Medida dos diâmetros antes e depois da filtração por membrana de micro-poro das dispersões de lipossomas deformáveis com 20% de etanol preparadas para o estudo de elasticidade.

Diâmetro (nm)					
Fc/P	Tensoativo	Antes	Depois	Razão	Elasticidade
4:1	Tween 80	156 ± 7,9	135 ± 10,3	1,155	3,04
	Tween 20	155 ± 7,3	135 ± 11,9	1,148	3,00
5,6:1	Tween 80	154 ± 8,0	138 ± 12,2	1,116	2,99
	Tween 20	153 ± 8,1	134 ± 10,8	1,142	2,97
9:1	Tween 80	151 ± 8,2	130 ± 11,2	1,161	2,94
	Tween 20	152 ± 8,7	132 ± 10,5	1,151	2,96

Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). Elasticidade: razão do tamanho do diâmetro dos lipossomas depois de filtrados dividido pelo tamanho do poro da membrana de extrusão usada (50 nm).

5.2.4 Estudos de permeação cutânea de remifentanil “in vitro” promovida por dispersões de lipossomas deformáveis.

A permeação de compostos através da pele tem sido um desafio, uma vez que esta se comporta como uma barreira efetiva, representando assim a primeira defesa física e biológica efetiva do organismo. A principal barreira para absorção de ativo através da pele é o estrato córneo, que com apenas alguns micrômetros de

espessura, funciona como fator limitante para penetração/permeação de ativos de características físico-químicas distintas (Vicentini, 2009).

Os estudos de permeação/penetração em células de difusão de Franz empregando pele de orelha de porco, como modelo cutâneo, são muito usados para investigar a ação promotora da permeação e penetração cutânea de diversas formulações e dispositivos farmacotécnicos para os mais diferentes fármacos e uma técnica que permite uma boa correlação com os dados “in vivo”.

5.2.4.1 Estudo de “sink conditions”

Nos estudos “in vitro” de permeação cutânea, a escolha adequada da solução receptora é importante, uma vez que deve apresentar condições “in vitro” que reproduzam, da forma mais adequada, as condições “in vivo”. Além disso, esta solução deve ser capaz de solubilizar uma quantidade do fármaco que seja mais de 10 vezes superior à concentração do fármaco presente na célula doadora, para garantir que o ensaio de permeação/retenção esteja sendo realizado em “sink condition”. Para verificar a “sink condition” 21 mg de remifentanil, quantidade 10 vezes maior que a usada nos ensaios de permeação/retenção, foi submetida a solubilização na solução receptora, tampão fosfato salina, pH 5,0, nas mesmas condições empregadas no teste de permeação/retenção. A quantidade solubilizada do fármaco, determinada por CLAE, foi de 2,9 mg/mL $\pm$ 0,17, em média, que correspondeu a 96,6 % da quantidade esperada de 3,0 mg/mL. O resultado mostra que o remifentanil foi totalmente solubilizado na solução receptora, garantindo a “sink condition” dos ensaios de permeação/retenção.

5.2.4.2 Avaliação da permeação do remifentanil

A permeação de fármacos através da pele pode ser aumentada pela maximização termodinâmica no veículo; aumento da sua solubilidade no estrato córneo mediante ao aumento da partilha de ativos nessa camada da pele ou através do aumento da difusão do fármaco pela pele. Tais efeitos são possíveis mediante o uso de diferentes técnicas farmacotécnicas e substâncias (Vicentini, 2009).

Assim, as dispersões de lipossomas deformáveis surgem como um possível carreador de fármacos através da pele. Para avaliar a eficiência que os sistemas de lipossomas deformáveis desenvolvidos possuem para promover a permeação do remifentanil através da pele, foram preparadas amostras das 12 dispersões de

lipossomas com remifentanil, como descrito no item 4.2.4, por hidratação de filme e sonicação. Essas preparações foram submetidas aos ensaios de permeação na célula de Franz (item 4.3.4).

A permeação proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis poderia ser possível devido aos componentes da formulação e não à presença dos lipossomas deformáveis. Por esse motivo, amostras das 12 formulações (item 4.2.1) não submetidas a métodos de preparação de lipossomas foram testadas quanto à permeação, assim como solução hidroetanólica de remifentanil 1 mg/mL.

No entanto, as 12 formulações não submetidas à método de preparação de lipossomas e a solução hidroetanólica não apresentaram permeação de remifentanil. Portanto, a presença do sistema de lipossomas deformáveis é fundamental para a permeação transdérmica.

As dispersões de lipossomas deformáveis apresentaram diferentes quantidades de fármaco permeado dependendo da proporção de fosfatidilcolina e tensoativo, da quantidade de etanol e do tensoativo utilizados (tabela 8).

A tabela 8 mostra o fluxo no steady-state (J_s); o tempo necessário para que o remifentanil permeado atinja níveis mensuráveis (T_{qm}), antes do qual o fármaco não pode ser identificado no meio receptor; quantidade permeada no tempo T_{qm} (Q_m); tempo quando a permeação se encerra em que a quantidade permeada por área chega ao máximo (T_p) e quantidade permeada acumulada pela área de permeação (Q_p). O apêndice 1 mostra ainda o lag time (h) e o coeficiente de permeação. As figuras 10, 11 e 12 representam os perfis de permeação, ou seja, os gráficos que relacionam a quantidade de fármaco permeada pela área de permeação (mg/cm^2) versus o tempo (h)

Os dados da tabela 8 mostram que as dispersões de lipossomas com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1 e 5,6:1; tween 20 ou 80 e etanol a 10% proporcionaram permeação com os maiores fluxos o que também é observado pela menor inclinação da porção de crescimento linear dos perfis de permeação (figuras 10, 11 e 12). Além disso, as dispersões citadas foram as que iniciaram a permeação mais rapidamente, pois possuem menor lag time (apêndice 1) e menor tempo para atingir níveis mensuráveis de remifentanil permeado (tabela 8). E ainda foram as que proporcionaram maior permeação de remifentanil (tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros da permeação do remifentanil proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis.

Fc/P	Etanol	T	Js (mg/cm ² h)	Tqm (h)	Qm (mg/cm ²)	Tp (h)	Qp (mg/cm ²)	Ep (%)
4:1	10 %	Tween 20	0,088	1,5	0,072	6	0,467	39,68
		Tween 80	0,0853	1,5	0,054	6	0,433	36,80
4:1	20 %	Tween 20	0,0593	2	0,076	6	0,301	25,60
		Tween 80	0,0579	2	0,062	6	0,282	23,98
5,6:1	10 %	Tween 20	0,089	1,5	0,168	5	0,486	41,28
		Tween 80	0,0859	1,5	0,163	5	0,469	39,87
5,6:1	20 %	Tween 20	0,0701	1,5	0,146	5	0,395	33,58
		Tween 80	0,0673	1,5	0,136	5	0,376	31,97
9:1	10 %	Tween 20	0,0549	2	0,064	5	0,241	20,51
		Tween 80	0,0553	2	0,069	5	0,252	21,43
9:1	20 %	Tween 20	0,0372	2,5	0,046	5	0,144	12,25
		Tween 80	0,0388	2,5	0,054	5	0,158	13,46

Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). 10 %: indica que a quantidade de etanol usada foi 10% (v/v). 20 %: indica que a quantidade permeada foi 20 % (v/v). Js: fluxo no steady-state, Tqm: tempo necessário para que a quantidade permeada de remifentanil chegue a níveis mensuráveis pelo método analítico. Qm: quantidade permeada no tempo Tqm. Tp: tempo quando a permeação encerra. Qp: quantidade total permeada pela área de permeação. Ep: eficiência de permeação que é a quantidade permeada por área dividida pela quantidade de remifentanil aplicado por área, em porcentagem. Obs: Os valores de Js, Qm, Qp apresentaram desvio padrão que foi igual ou menor a 0,01.

Pela tabela 5, as dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1 e 5,6:1; tween 20 ou 80, etanol a 20% preparadas por hidratação de filme e sonicação apresentaram maior eficiência de encapsulação (58,97 % – 70,50 %) que as dispersões iguais mas com etanol a 10% (35,78 % – 47,28 %). No entanto, as permeações mais eficientes foram apresentadas pelas dispersões com proporção 4:1 e 5,6:1; tween 20 ou 80 e etanol a 10%.

Portanto, esses resultados sugerem que a permeação poderia ocorrer com o fármaco não encapsulado, pois as dispersões de lipossomas com as proporções 4:1

e 5,6:1; etanol a 10 % possuem 22,92% a mais de remifentanil não encapsulado e permeiam uma quantidade de fármaco por área 36,93% a mais que as dispersões 4:1 e 5,6:1, etanol 20%.

Figura 10: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 9:1, tween 20 e 80, etanol a 10% e a 20%. ■: proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 9:1, tween 80, etanol a 10%. ◆: proporção 9:1, tween 20, etanol a 10%. ▲: proporção 9:1, tween 80, etanol a 20%. ●: proporção 9:1, tween 20, etanol a 20%.

Por outro lado, os parâmetros da tabela 8 mostram que a dispersão de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 9:1, tween 20 ou 80, etanol a 10% possui permeação semelhante à da dispersão com proporção 4:1, tween 20 ou 80, etanol a 20% e permeia menos que a dispersão com proporção 5,6:1, tween 20 ou 80, etanol a 20%. Sendo que as dispersões com proporção 9:1, etanol 10% possuem 31,65% a mais de remifentanil não encapsulado, em média, que as dispersões com proporção 4:1, etanol 20% (27,96% de fármaco encapsulado na primeira comparado aos 59,61% na segunda) e possuem 41,77% a mais de remifentanil não encapsulado que as dispersões com proporção 5,6:1, etanol 20% (27,96% de fármaco encapsulado na primeira comparado aos 69,73% da terceira).

Portanto, outra característica dos lipossomas deformáveis além da eficiência de encapsulação influencia a permeação, que é o tamanho de diâmetro dos lipossomas.

Figura 11: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1, tween 20 e 80, etanol a 10% e a 20%. ■: proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 4:1, tween 20, etanol a 10%. ◆: proporção 4:1, tween 80, etanol a 10%. ▲: proporção 4:1, tween 20, etanol a 20%. ●: proporção 4:1, tween 80, etanol a 20%.

Figura 12: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20 e 80, etanol a 10% e a 20%. ■: proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20, etanol a 10%. ◆: proporção 5,6:1, tween 80, etanol a 10%. ▲: proporção 5,6:1, tween 20, etanol a 20%. ●: proporção 5,6:1, tween 20, etanol a 20%.

As dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1 e 4:1, tween 20 ou 80, etanol a 10% possuem as melhores permeações (tabela 8) e também possuem a melhor eficiência de encapsulação dentre as dispersões com os menores tamanhos (tabela 4 e 5)

As dispersões com proporção 4:1 e 5,6:1, tween 20 ou 80, etanol a 20% são as que possuem as maiores eficiências de encapsulação (tabela 5). No entanto, não permeiam tão bem quanto às dispersões iguais, mas com etanol a 10% (tabela 8), o motivo aparentemente é o fato das dispersões com etanol a 20% possuírem os lipossomas com os maiores tamanhos (tabela 4).

A dispersão com proporção 9:1, tween 20 ou 80, etanol 10% possui a segunda menos eficiente permeação (tabela 8) e também a pior eficiência de encapsulação (tabela 5). A dispersão com proporção 9:1, tween 20 ou 80, etanol a 20% possui a permeação menos eficiente e também a pior eficiência de encapsulação dentre os lipossomas com os maiores tamanhos (tabela 4 e 5).

Observa-se que a eficiência de encapsulação e o tamanho dos lipossomas deformáveis são as características que mais influenciam a promoção da permeação dérmica dos lipossomas deformáveis preparados. Os lipossomas devem ter boa eficiência de encapsulação e pequeno tamanho de diâmetro. A proporção entre fosfatidilcolina e tensoativo e a quantidade de etanol são importantes, pois influenciam a elasticidade da membrana, a eficiência de encapsulação, o tamanho dos lipossomas e, portanto a permeação.

Elsayed et al., 2007; El Maghraby et al., 2008; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Cevc, 2004; El Maghraby et al., 2008; entre outros, apontam que a presença do tensoativo é fundamental, mas que há uma quantidade de tensoativo ou proporção de fosfatidilcolina e tensoativo ideal que proporciona as melhores características. Os resultados obtidos são coerentes com esta informação, pois também mostram que há uma melhor proporção de fosfatidilcolina e tensoativo, que neste caso foi 5,6:1.

Faltam dados na literatura que comparam diferentes quantidades ou proporções de etanol e a influência na permeação. Os resultados obtidos mostram que diferentes quantidades de etanol interferem nas características dos lipossomas e que aparentemente há uma quantidade de etanol ideal. Neste caso, a melhor quantidade foi 10% do volume total da dispersão o que corrobora com Elsayed et al.,

2006; El Maghraby et al., 2000, 1999, que preparam lipossomas deformáveis com etanol a 7% possuidores de ação promotora da permeação.

Faltam dados na literatura sobre lipossomas deformáveis que mostram a porcentagem ou fração de fármaco permeado. No entanto, Bendas et al., 2007 prepararam lipossomas deformáveis que permearam de 10% a 30% de sulfato de salbutamol (um fármaco hidrofílico) através da pele de camundongo. Um resultado que corrobora com os observados no presente trabalho.

Elsayed et al., 2007; El Maghraby et al., 2008; Honeywell-Nguyen et al., 2005 entre outros, informam que os lipossomas deformáveis devem apresentar boa elasticidade, boa eficiência de encapsulação e pequeno tamanho de diâmetro para proporcionarem permeação mais eficiente e que essas características permitirem uma melhor ação do transporte de substâncias encapsuladas (mecanismo 1, item 1.4). Os resultados dos lipossomas preparados também corroboram com esta informação, pois possuem tamanho menor e eficiência de encapsulação semelhantes (exceto a dispersão com proporção 9:1, etanol 10%, tween 20 ou 80) aos lipossomas preparados por Bendas et al., 2007; Trotta et al., 2003; Mishra et al., 2007; entre outros. E elasticidade alta semelhante aos lipossomas de Trotta et al., 2002, 2003 e maiores que os lipossomas de Gallarate et al., 2006.

Os lipossomas deformáveis promovem disponibilidade transdérmica por dois mecanismos propostos na literatura. Pelo transporte das substâncias encapsuladas (mecanismo 1) e também por agir como um promotor de penetração (mecanismo 2), como citado no item 1.4.

Para uma melhor investigação sobre os mecanismos que agem na promoção da permeação do remifentanil pelas dispersões de lipossomas deformáveis, foram preparadas, então, as dispersões de lipossomas citadas no item 4.3.6 nas quais o remifentanil foi adicionado depois que os lipossomas foram preparados. Assim, todo o remifentanil não encapsulado e dispersões sem fármaco encapsulado só poderá promover permeação pelo mecanismo 2, fornecendo informação sobre a contribuição desse mecanismo para a promoção da permeação. A comparação dos resultados de permeação da dispersão em questão com os resultados das dispersões anteriormente citadas fornece informações sobre a contribuição do mecanismo 1 (Elsayed et al., 2006, 2007, 2007b; El Maghraby et al., 2001b, 2008; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006; Bouwstra et al., 2002 entre outros).

A dispersão de lipossomas com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20 ou 80, etanol a 10% foram as que apresentaram melhor permeação e por isso a dispersão com proporção 5,6:1, tween 20, etanol a 10% foi escolhida para verificar a permeação proporcionada pela dispersão de lipossomas deformáveis com remifentanil não encapsulado.

A tabela 9 mostra os parâmetros da permeação proporcionada pela dispersão com fármaco não encapsulado e a figura 13 mostra o perfil de permeação. Ao se comparar esses dados com os da tabela 8 e figuras 10, 11 e 12 observa-se que a permeação da dispersão de lipossomas com remifentanil não encapsulado apresentou permeação inferior às dispersões com proporção de fosfatidilcolina 4:1 e 5,6:1, etanol a 10% ou a 20% (que possuem remifentanil encapsulado e não encapsulado).

Figura 13: Perfis de permeação das dispersões de lipossomas deformáveis sem e com remifentanil encapsulado.

■: proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20, etanol a 10%. ●: proporção 5,6:1, tween 20, etanol a 10% com remifentanil não encapsulado (remifentanil adicionado depois dos lipossomas prontos).

Tabela 9 - Parâmetros da permeação do remifentanil proporcionada pela dispersão de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, tween 20, etanol a 10% com remifentanil não encapsulado.

Js (mg/cm²h)	Tqm (h)	Qm (mg/cm²)	Tp (h)	Qp (mg/cm²)	Ep (%)
0,039	2,5	0,0545	5	0,160907	13,68

Js: fluxo no steady-state, Tqm: tempo necessário para que a quantidade permeada de remifentanil chegue a níveis mensuráveis pelo método analítico. Qm: quantidade permeada no tempo Tqm. Tp: tempo quando a permeação encerra. Qp: quantidade total permeada pela área de permeação. Ep: eficiência de permeação que é a quantidade permeada por área dividida pela quantidade de remifentanil aplicado por área, em porcentagem. Obs: Os valores de Js, Qm, Qp apresentaram desvio padrão que foi igual ou menor a 0,01.

Além disso, as tabelas 8 e 9 e figuras 10 e 13 mostram que a permeação da dispersão com remifentanil não encapsulado também é um pouco inferior às dispersões com proporção 9:1, etanol a 10% (que possuem a menor eficiência de encapsulação e a segunda pior permeação) e é semelhante às dispersões com proporção 9:1, etanol a 20% (que possuem a menor eficiência de encapsulação dentre os maiores diâmetros e a pior permeação).

Observa-se novamente que a encapsulação do fármaco nos lipossomas é fator importante para a permeação, que o fármaco deve estar presente no momento da preparação dos lipossomas e que, aparentemente, o mecanismo 1 possui maior importância na permeação das dispersões de lipossomas deformáveis. No entanto, há também a ação do mecanismo 2, pois a dispersão com remifentanil não encapsulado também apresentou permeação, mas menos eficiente e, portanto, aparentemente, a importância do mecanismo 2 é menor.

A permeação das dispersões com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1 e 9:1, etanol a 10% ou 20% encerram em 5 horas (tabela 8, figura 10 e 12). Então, a maior promoção da permeação das dispersões 5,6:1, etanol a 10% se deve ao maior fluxo, menor Tqm, maior Qm (tabela 8), parâmetros indicativos de melhor permeação até o momento em que a permeação se encerra em 5 h. A permeação das dispersões com proporção 4:1, etanol 10% ou 20% encerra em 6h. E novamente a maior permeação das dispersões 4:1, etanol 10% se deve a maior promoção da permeação até o momento em que a permeação se encerra.

5.2.5 Retenção cutânea do remifentanil proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis.

A tabela 10 mostra a quantidade de remifentanil retido na pele por área. As dispersões preparadas proporcionaram retenção semelhante de remifentanil na pele, apesar das diferentes permeações. Além da retenção, o tempo em que as permeações se encerram (tp na tabela 8) também é semelhante. Essas duas características podem ser ocasionadas pelo mesmo motivo e não serem coincidência, no entanto mais experimentos são necessários para se compreender o motivo das retenções semelhantes e dos tempos de fim da permeação semelhantes em dispersões com promoção da permeação diferentes.

Tabela 10 – Retenção do remifentanil na pele proporcionada pelas dispersões de lipossomas deformáveis em 24 horas.

Fc/P	Etanol	Tensoativo	Qr (mg/cm ²)	Fração retida (%)
4:1	10 %	Tween 80	0,162	13,77
		Tween 20	0,168	14,28
4:1	20 %	Tween 80	0,158	13,43
		Tween 20	0,150	12,75
5,6:1	10 %	Tween 80	0,176	14,96
		Tween 20	0,178	15,13
5,6:1	20 %	Tween 80	0,151	12,84
		Tween 20	0,153	13,01
9:1	10 %	Tween 80	0,164	13,94
		Tween 20	0,148	12,58
9:1	20 %	Tween 80	0,144	12,24
		Tween 20	0,140	11,9

Fc/P: Razão proporcional da quantidade de fosfatidilcolina (Fc) pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). 10 %: indica que a quantidade de etanol usada foi 10% (v/v). 20 %: indica que a quantidade permeada foi 20 % (v/v). Qr: quantidade de remifentanil retido na pele por área em 24 horas. Fração retida: porcentagem da quantidade de remifentanil retido na pele por área dividido pela quantidade aplicada por área. Obs: Os valores de Qr apresentaram desvio padrão que foi igual ou menor a 0,01.

O estudo de retenção foi realizado após o fim do experimento de permeação (24 h), maiores informações podem ser obtidas se a retenção também for realizada no momento que a permeação cessa em 5 h ou 6h e em momentos anteriores. Experimentos de microscopia confocal a laser de varredura (Cevc, 2004; Dayan e Touitou, 2000; Elsayed et al., 2007) e de microscopia de fluorescência (van den Bergh et al., 1999b; Honeywell-Nguyen et al., 2005, 2006) podem não só trazer informações sobre o motivo das retenções semelhantes e dos tempos de fim da permeação semelhantes em dispersões com promoção da permeação diferentes, mas também informações sobre os mecanismos de ação dos lipossomas deformáveis na promoção da permeação e sobre outras características.

6. Conclusão

As dispersões de lipossomas deformáveis desenvolvidas promoveram a permeação dérmica do remifentanil.

A elasticidade da membrana dos lipossomas é importante para a permeação. Todas as dispersões apresentaram permeação e elasticidade de membrana. Portanto, a capacidade desse tipo de lipossoma de se deformar e penetrar pelos “canais” ou “caminhos” do estrato córneo que são menores que o tamanho do lipossoma parece ser fundamental.

O tamanho e a eficiência de encapsulação parecem ser as características dos lipossomas deformáveis, depois da elasticidade, que mais influenciam a permeação. O lipossoma deformável ideal aparentemente deve ser pequeno e com alta eficiência de encapsulação.

A hidratação de filme lipídico deve ser utilizada na preparação dos lipossomas deformáveis, pois essa prática embora não diminua o tamanho melhora a eficiência de encapsulação que é uma importante característica para a permeação.

Observa-se que, independente da formulação, os lipossomas com maior eficiência de encapsulação são também os com maiores tamanhos. Portanto deve haver um equilíbrio entre tamanho e eficiência e encapsulação para a melhor permeação.

A proporção de fosfatidilcolina e tensoativo, a quantidade de etanol e o método de preparação determinaram o tamanho e a eficiência de encapsulação. Portanto são estes os fatores que também determinaram a promoção da permeação dos lipossomas deformáveis.

A mistura dos excipientes que compõem os lipossomas não promoveu permeação, portanto a presença dos lipossomas deformáveis é fundamental para a promoção da permeação mesmo se o fármaco não estiver encapsulado nos lipossomas.

As dispersões de lipossomas deformáveis com proporção de fosfatidilcolina e tensoativo 5,6:1, etanol a 10%, tween 20 ou 80 preparadas por hidratação de filme e sonicação, são as dispersões que possuem a permeação de remifentanil mais eficaz

porque são as que possuem os lipossomas com maior eficiência de encapsulação entre os menores.

Maiores quantidades de etanol aumentaram a eficiência de encapsulação, mas também aumentaram o tamanho, portanto aparentemente deve haver um ajuste na quantidade ou porcentagem de etanol de forma que se consiga a melhor promoção da permeação.

A proporção de fosfatidilcolina e tensoativo influencia a característica dos lipossomas e a permeação. A proporção 5,6:1 foi a que melhor se apresentou. A maioria da literatura sobre lipossomas deformáveis também aponta que uma proporção semelhante a esta é a que leva à melhor promoção da permeação.

O uso do tensoativo tween 20 ou tween 80 não modificou a elasticidade, o tamanho de diâmetro, a eficiência de encapsulação e a permeação dos lipossomas deformáveis, mas a presença de um deles é fundamental.

Foi verificado que a encapsulação do fármaco nos lipossomas e que a preparação dos lipossomas na presença do fármaco são importante para a promoção da permeação.

Os lipossomas deformáveis promovem a permeação pelo mecanismo do transporte do fármaco encapsulado, mecanismo 1 e também pela promoção da penetração, mecanismo 2, sendo que o mecanismo 1 aparentemente possui maior importância na promoção da permeação.

7. Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas da ABNT

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 893, de 29 de maio de 2003 (Versão Republicada - 07.11.2003). D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 07 de novembro de 2003. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18819>>. Acesso em: 4 dez. 2008.

AULER JUNIOR, J. O. C. Remifentanil: Highlights. **Prática Hospitalar**, Brasil, ano VIII, numero 44, mar-abr. 2006. Disponível em: <<http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2044/pgs/materia%2013-44.html>>. Acesso em: 04 ago. 2008.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v.14, n. 2, p.101-114, set. 2001.

BENDAS, E. R.; TADROS, M. I. Enhanced transdermal delivery of salbutamol sulfate via ethosomes. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 8, n. 4, article 117, dez. 2007.

BOSSÙ, E.; MONTINARO, A.; LECCE, R.; FARINA, A.; SUPPA, E.; DRAISCI, G.; GOSTOLI, G. LC–MS Determination of remifentanil in maternal and neonatal plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 42, p. 367–371, set. 2006.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, suppl. 1, p. S41-S55, nov. 2002.

BRGLES, M.; HALASSY, B.; TOMAŠIĆ, J.; ŠANTAK, M.; FORČIĆ, D.; BARUT, M.; ŠTRANCAR, A. Determination of DNA entrapment into liposomes using short monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1144, p. 150-154, mar. 2007.

BÜRKLE, H.; DUNBAR, S.; AKEN, H. V. Remifentanil: A Novel, Short-Acting, μ -Opioid. **Anesthesia and Analgesia**, Cleveland, v.83, p.646-651, mai. 1996.

Canto, G. S.; Dalmora, S. L.; Oliveira, A. G. Piroxicam Encapsulated in Liposomes: Characterization and In Vivo Evaluation of Topical Anti-inflammatory Effect. **Drug**

Development and Industrial Pharmacy. England, v. 25, n. 12, p. 1235–1239, dez. 1999.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, New York, v.689, p. 175-180, fev. 1997.

CEVC G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 42, n. 5, p. 461-474, 2003b.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 675-711, mar, 2004.

CEVC, G.; BLUME, G. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers, Transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 2614, p. 156-164, ago. 2003.

CEVC, G.; BLUME, G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1663, p. 61-73, mai, 2004b.

CEVC, G.; SCHÄTZLEIN, A.; RICHARDSEN, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1564, p. 21-30, ago. 2002.

CHIRIO, D.; CAVALLI, R.; TROTTA, F.; CARLOTTI M. E.; TROTTA M. Deformable liposomes containing alkylcarbonates of γ -cyclodextrins for dermal applications. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* v. 57, p. 645–649, 2007.

CHOI, M. J.; MAIBACH, H. I. Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 211-221, ago. 2005.

CSÓKA, I.; CSÁNYI, E.; ZAPANTIS, G.; NAGY, E.; FEHÉR-KISS, A.; HORVÁTH, G.; BLAZSÓ, G.; ERŐS, I. In Vitro and In Vivo Percutaneous Absorption of Topical

Dosage Forms: Case Studies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 291, n. 1-2, p. 11-19, mar. 2005.

DAYAN N., TOUITOU E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. **Biomaterials**. Guilford, v. 21, n. 18, p. 1879-1885 Set. 2000.

DRAGICEVIC-CURIC, N.; SCHEGLMANN, D.; VOLKER ALBRECHT, V.; FAHR, A. Temoporfin-loaded invasomes: Development, characterization and in vitro skin penetration studies. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 127 p. 59–69, abr. 2008.

Druglib.com, Drug information portal. Localiza informações técnicas de medicamentos existentes no mercado. Sobre a morfina e buprenorfina disponível em: (<http://www.druglib.com/search?q=morphine>), sobre o fentanyl disponível em: (<http://www.druglib.com/search?q=fentanyl>). Sobre a oxicodona disponível em: (<http://www.druglib.com/search?q=oxycodone>). Acessado em 31/08/2009.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; ASTHANA, A.; JAIN, N. K. Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. **Biomaterials**, Guilford, v. 27 p. 3491-3496, jun. 2006.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; DUTTA, T.; NAHAR, M.; SARAF, D. K.; JAIN, N. K. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 123, p. 148-154, nov. 2007b.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; JAIN, N. K. Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 67, n. 2, p. 398-405, set. 2007a.

EL MAGHRABY G. M.; BARRY B. W.; WILLIAMS A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, ago. 2008.

EL MAGHRABY, G. M. M.; CAMPBELL, M. C.; FINNIN, B. C. Mechanisms of action of novel skin penetration enhancers: Phospholipid versus skin lipid liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. Amsterdam, v. 305, p. 90-104, Set. 2005.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 196, p. 63-74, fev. 2000.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Skin Delivery of Oestradiol from Deformable and Traditional Liposomes: Mechanistic Studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, p. 1123-1134, out. 1999.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, p. 1069–1077, ago. 2001.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. **International Journal of Pharmaceutics**. Amsterdam, v. 204, p. 159–169, jun. 2000b.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, v. 53, p. 1311–1322, jun. 2001b.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W.; Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 58, n. 4, p. 415-429, abr. 2006.

ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N. M. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 322, p. 60-66, set. 2006.

ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N. M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 332, p. 1-16, mar. 2007.

ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N. M. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. **Pharmazie**, v. 62, p. 133-137, 2007b.

FIGUEIRÓ, J. A. B. Dor: Histórico, estágio atual e magnitude. **Ministério da saúde**, Brasil, 2002

GALLARATE, M.; CHIRIO, D.; TROTTA, M.; CARLOTTI, M. E. Deformable Liposomes as Topical Formulations Containing α -Tocopherol. **Journal of Dispersion Science and Technology**. London v. 27, p. 703-713, Jun. 2006.

GARCIA, M. T. J.; SILVA, C. H. T. P.; OLIVEIRA, D. C. R.; BRAGA, E. C. A.; THOMAZINI, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Transdermal Delivery of Ketoprofen: The Influence of Drug-Dioleoylphosphatidylcholine Interactions. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 23, n. 8, p. 1776-1785, ago. 2006.

GARG, M.; MISHRA, D.; AGASHE, H.; JAIN, N. K. Ethinylestradiol-loaded ultraflexible liposomes: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.58, p.459-468, abr. 2006.

GOURLAY G. K.; KOWALSKI S. R.; PLUMMER J. L.; CHERRY D. A.; SZEKELY S. M.; MATHER L. E.; OWEN H.; COUSINS M. J.; The efficacy of transdermal fentanyl in the treatment of postoperative pain: a double-blind comparison of fentanyl and placebo systems. **Pain**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 21-28, jan. 1990.

GOURLAY, G. K. Treatment of cancer pain with transdermal fentanyl. **The Lancet Oncology**, London, v. 2, p. 165-172, mar. 2001.

GOURLAY, G. K.; KOWALSKI, S. R.; PLUMMER, J. L.; CHERRY, D. A.; GAUKROGER, P.; COUSINS, M. J.; The transdermal administration of fentanyl in the treatment of postoperative pain: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects. **Pain**, v. 37, n. 2, p. 193-202, mai. 1989.

GROND, S.; RADBRUCH, L. LEHMANN, L. A. Clinical Pharmacokinetics of Transdermal Opioids Focus on Transdermal Fentanyl. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 38, n. 1, p. 59-89, jan. 2000.

GUIGNARD, B. Monitoring analgesia. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v 20 (1) p. 161-168, 2006

GUPTA P. N., MISHRA V., SINGH P., RAWAT A., DUBEY P., MAHOR S., VYAS S. P. Tetanus toxoid-loaded transfersomes for topical immunization. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v. 57, n. 3, p. 295-301, mar. 2005.

HAIDAR, S. H.; LIANG, Z.; SELINGER, K.; HAMLETT, L.; EDDINGTON, N. D. Determination of remifentanyl, an ultra-short-acting opioid anesthetic, in rat blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 14, p. 1727-1732, set. 1996.

HALLIBURTON, J. R. The pharmacokinetics of fentanyl, sufentanyl and alfentanyl: a comparative review. **Journal of the American Association of Nurse Anesthetists**, Chicago, v. 56, n. 3, p. 229-233, jun. 1988.

HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., RUDDON, R. W., GOODMAN A. G., (eds.). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed.** New York, NY: McGraw-Hill, 1996.

HONEYWELL-NGUYEN P. L., DE GRAAFF A. M., GROENINK H. W., BOUWSTRA J. A. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**. v. 1572, n. 2, p. 130-140, nov. 2002b.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; ARENJA, S.; BOUWSTRA, J. A. Skin Penetration and Mechanisms of Action in the Delivery of the D2-Agonist Rotigotine from Surfactant-Based Elastic Vesicle Formulations. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 20 (10), p. 1619-1625, out, 2003.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; BOUWSTRA, J. A. Vesicles as a Tool for Transdermal and Dermal Delivery. **Drug Discovery Today: Technologies**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 67-74, mai. 2005.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; FREDERIK, P. M. BOMANS, P. H. H.; JUNGINGER, H. E.; BOUWSTRA, J. A. Transdermal Delivery of Pergolide from Surfactant-Based Elastic and Rigid Vesicles: Characterization and in Vitro Transport Studies. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 19 (7), p. 991-997, jul. 2002.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; WOUTER GROENINK, H. W.; BOUWSTRA, J. A. Elastic Vesicles as a Tool for Dermal and Transdermal Delivery. **Journal of Liposome Research**, London, v. 16, n. 3, p. 273-280, set. 2006.

ITA, K. B.; PREEZ, J. D.; LANE, M. E.; HADGRAFT, J.; PLESSIS, J. Dermal delivery of selected hydrophilic drugs from elastic liposomes: effect of phospholipid formulation and surfactants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 59, p. 1215-1222, set. 2007.

JAIN, S.; SAPRA, R.; TIWARY, A. K.; JAIN, N. K. Proultraflexible Lipid Vesicles for Effective Transdermal Delivery of Levonorgestrel: Development, Characterization, and Performance Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 6 (3), article 64, out. 2005.

JAIN, S.; TIWARY, A. K.; SAPRA, B.; JAIN, N. K. Formulation and Evaluation of Ethosomes for Transdermal Delivery of Lamivudine. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 8 (4), article 11, dez. 2007.

JAMES, F. R.; LARGE, R. G.; BUSHNELL, J. A.; WELLS, J. E. Epidemiology of pain in New Zealand. **International Association for the Study of Pain**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 279-283, mar. 1991.

KABBAJ, M.; VARIN, F. Simultaneous solid-phase extraction combined with liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of remifentanil and its metabolite in dog plasma. **Journal of Chromatography B**, New York, v. 783, p. 103–111, jan. 2003.

KAPILA A., GLASS P. S., JACOBS J. R., MUIR K. T., HERMANN D. J., SHIRAISHI M., HOWELL S., SMITH R. L. Measured context-sensitive half-times of remifentanil and alfentanil. **Anesthesiology**. United States, v. 83, n. 5, p. 968 – 975 nov. 1995.

KIM, A.; LEE, E. H.; CHOI, S.; KIM, C. *In vitro* and *in vivo* transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, p. 305–313, jan. 2004.

KOMATSU, R.; TURAN, A. M.; ORHAN-SUNGUR, M.; MCGUIRE, J.; RADKE, O. C.; APFEL, C. C. Remifentanil for general anaesthesia: a systematic review. **Anaesthesia**, London, v. 62, n. 12, p. 1266-1280, dez. 2007.

LAU, K. G.; HATTORI, Y.; CHOPRA, S.; O'TOOLE, E. A.; STOREY, A.; NAGAI, T.; MAITANI, Y. Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: In vitro stability and toxicity on human cutaneous keratinocyte cell lines. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 300, p. 4–12, ago. 2005.

LEE, E. H.; KIM, A.; OH, Y.; KIM, C. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes. **Biomaterials**, Guilford, v. 26 p. 205–210, fev. 2004.

LODZKI, M.; GODIN, B.; RAKOU, L.; MECHOULAM, R.; GALLILY, R.; E. TOUITOU, E. Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.93, n.3, p.377-387, dez. 2003.

LÓPEZ-PINTO, J. M.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L.; RABASCO, A. M. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 298 (1), p.1-12, jul. 2005.

MACQUAY H.; MOORE, A. Introduction. Paracetamol with and without codeine in acute pain. An Evidence Based Resource for Pain Relief. p. 58-63. Oxford: Oxford University Press, 1998.

MAGNI, G.; CALDIERON, C.; RIGATTI-LUCHINI, S.; MERSKEY, H. Chronic musculoskeletal pain and depressive symptoms in the general population. An analysis of the 1st National Health and Nutrition Examination Survey Data. **International Association for the Study of Pain**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 299-307, dez. 1990.

MAGNUSSON, B. M.; WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 205-227, set. 2001.

MARSH, D. F.; HODKINSON, B. Remifentanil in paediatric anaesthetic practice. **Anaesthesia**, England, v. 64, p. 301-308, 2009.

MAURER, N.; WONG, K. F.; STARK, H.; LOUIE, L.; MCINTOSH, D.; WONG, T.; SCHERRER, P.; SEAN, C.; SEMPLE, S. C.; CULLIS, P. R. Spontaneous Entrapment of Polynucleotides upon Electrostatic Interaction with Ethanol-Destabilized Cationic Liposomes. **Biophysical Journal**, New York, v. 80. p. 2310-2326, mai. 2001.

MCQUAY H.J., MOORE R.A. Postoperative analgesia and vomiting, with special reference to day-case surgery: a systematic review. **Health Technology Assessment**. England, v. 2: n. 12. p 1-236, 1998.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes - A Selective Drug Delivery System for the Topical Route of Administration. **Life Sciences**, Oxford, v. 26, n. 18, p. 1473-1477, mai. 1980.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes. A selective drug delivery system for the topical route of administration: Gel dosage form. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 34, n. 7, p. 473-474, 1982.

MICHELSSEN, L. G.; HUG, C. C. The Pharmacokinetics of Remifentanyl. **Journal of Clinical Anesthesia**, New York, v. 8, n. 8, p. 679-682, dez. 1996.

MISHRA, D.; DUBEY, V.; ASTHANA, A.; SARAF, D. K.; JAIN, N. K. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. **Vaccine**, Guildford, v. 24, p. 4847-4855, mai, 2006.

MISHRA, D.; GARG, M.; DUBEY, V.; JAIN, S.; JAIN, N. K. Elastic Liposomes Mediated Transdermal Delivery of an Anti-Hypertensive Agent: Propranolol Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 96 (1), p. 145-155, jan. 2007.

PIERRE, M. B. R.; RICCI JUNIOR, E.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Oleic Acid as Optimizer of the Skin Delivery of 5-Aminolevulinic Acid in Photodynamic Therapy. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 23, n. 2, p. 360-366, fev. 2006.

QIU, Y.; GAO, Y.; HU, K.; LI, F. Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 129, p. 144-150, jul. 2008.

RANALI, J. Sedação não é anestesia geral, mas permite um trabalho tranquilo e com segurança. **Anais do 15° conclave odontológico internacional de campinas. Campinas**, v.104, mar/abr. 2003.

RAO, Y.; ZHENG, F.; ZHANG, X.; GAO, J.; LIANG, W. *In Vitro* Percutaneous Permeation and Skin Accumulation of Finasteride Using Vesicular Ethosomal Carriers. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 9 (3), p. 860-865, jul. 2008.

RAWAL, N. Treating postoperative pain improves outcome. **Minerva Anestesiologica**, Torino, v. 67, n. 9, s. 1, p. 200-205, set. 2001.

RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1156 (1-2), p. 201-205, jul. 2007.

RxList - The Internet Drug Index. **Ultiva drug description**. Fornece a descrição de medicamentos através de uma lista alfabética. Disponível em: <<http://www.rxlist.com/ultiva-drug.htm>>. Acesso em 02 dez. 2008.

SÆTERN, A. M.; FLATEN, G. E. BRAND, M. A Method to Determine the Incorporation Capacity of Camptothecin in Liposomes. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 5 (3), article 40, jun. 2004.

SELINGER, K.; LANZO, C.; SEKUT, A. Determination of remifentanil in human and dog blood by HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 12, n. 2, p. 243-248, fev. 1994.

SONG, Y.; KIM, C. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. **Biomaterials**, Guilford, v. 27, p. 271-280. mai. 2005.

SOUZA, S. M. B., OLIVEIRA, JR., O. N., SCARPA, M. V., OLIVEIRA, A. G. Study of the diclofenac/phospholipid interactions with liposomes and monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Netherlands, v. 36 p. 13–17, mai. 2004.

STELUTI, R.; DE ROSA, F. S.; COLLETT, J.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Topical glycerol monooleate/propylene glycol formulations enhance 5-

aminolevulinic acid in vitro skin delivery and in vivo protoporphyrin IX accumulation in hairless mouse skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 60, p. 439-444, abr. 2005.

SUHONEN, M.; LI, S. K.; WILLIAM I. HIGUCHI, W. I.; HERRON, J. N. A Liposome Permeability Model for Stratum Corneum Lipid Bilayers Based on Commercial Lipids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 97 (10), p. 4278-4293, out. 2008.

SWARTZ, M. E.; MAZZEO, J. R.; GROVER, E. R.; BROWN, P. R. Validation of enantiomeric separations by micellar electrokinetic capillary chromatography using synthetic chiral surfactants. **Journal of chromatography a**, v. 735, p. 303-310, 1996.

THOMPSON J. P., BOWER S., LIDDLE A. M., ROWBOTHAM D. J. Perioperative pharmacokinetics of transdermal fentanyl in elderly and young adult patients. **British Journal of anaesthesia**. England, v. 81, n. 2, p. 152-154, ago. 1998.

TOUITOU, E.; DAYAN, N.; BERGELSON, L.; GODIN, B.; ELIAZ, M. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 403-418, abr. 2000.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 270, p. 119-125, out. 2003.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; DEBERNARDI, F.; GALLARATE, M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 241, p. 319-327, jul. 2002.

United States Pharmacopeia (USP-NF) XXX. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, mai. 2007.

VAN DEN BERGH B. A., BOUWSTRA J. A., JUNGINGER H. E., WERTZ P. W. Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. **Journal of Controlled Release**. Amsterdam, v. 62, n. 3. P. 367-379, dez. 1999.

VAN DEN BERGH B. A., VROOM J., GERRITSEN H., JUNGINGER H. E., BOUWSTRA J.A. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**. Netherlands, v. 1461, n. 1, p. 155 – 173, nov. 1999b.

VARVEL, J. R.; SHAFER, S. L.; HWANG, S. S.; COEN, P. A.; STANSKI, D. R. Absorption Characteristics of Transdermally Administered Fentanyl. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 70, n. 6, p. 928-934, jun. 1989.

VERMA D. D., VERMA S., BLUME G., FAHR A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Stuttgart, v. 55, n. 3, p. 271-277, mai. 2003

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Stuttgart, v. 55, p. 271-277, jan. 2003.

VICENTINI, F. T. M. C. Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta. 2009. 173f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

WANG, J.; HU, J.; LI, F.; LIU, G.; ZHU, Q.; LIU, J.; MA, H.; PENG, C.; SI, F. Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA–cationic deformable liposome complex. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 16, p. 724-729, set. 2007.

YU-KYOUNG OH, MI YOUNG KIM, JEE-YOUNG SHIN, TAE WOON KIM, MI-OK YUN, SUNG JOON YANG, SANG SOOK CHOI, WOON-WON JUNG, JUNG AE KIM AND HAN-GON CHOI. Skin permeation of retinol in Tween 20-based deformable liposomes: in-vitro evaluation in human skin and keratinocyte models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 58, p. 161-166, fev, 2006.

8. Apêndice(s)

Apêndice 1: Lag time, coeficiente de permeação (Kp).

Fc/P	Etanol	Tensoativo	Lag time (h)	Kp (cm/h)
4:1	10 %	Tween 20	0,5505	0,088
		Tween 80	0,5739	0,0853
4:1	20 %	Tween 20	0,6014	0,0593
		Tween 80	0,6155	0,0579
5,6:1	10 %	Tween 20	-0,5955	0,089
		Tween 80	-0,5471	0,0859
5,6:1	20 %	Tween 20	-0,6248	0,0701
		Tween 80	-0,5453	0,0673
9:1	10 %	Tween 20	0,8397	0,0549
		Tween 80	0,7116	0,0554
9:1	20 %	Tween 20	1,2876	0,0372
		Tween 80	1,000	0,0388

Fc/P: Razão proporcional entre a quantidade de fosfatidilcolina (Fc) dividido pela quantidade do tensoativo (T) (tween 80 ou 20). 10 %: indica que a quantidade de etanol usada foi 10% (v/v). 20 %: indica que a quantidade permeada foi 20 % (v/v).

OBS: lag time é o tempo quando a quantidade permeada é zero obtido pela curva de regressão linear do steady-state nos perfis de permeação. Coeficiente de permeação é obtido pela relação: $K_p = \frac{J}{C_v}$, onde C_v é a concentração de remifentanil na formulação aplicada.