

MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÉUTICA

Preparação e caracterização de óvulos para a libertação prolongada de progesterona encapsulada em nanopartículas lipídicas

Armanda do Carmo Correia

M
2019



Preparação e caracterização de óvulos para a libertação prolongada de progesterona encapsulada em nanopartículas lipídicas

Armanda do Carmo Correia





**Preparação e caracterização de óvulos para a libertação prolongada de
progesterona encapsulada em nanopartículas lipídicas**

DISSERTAÇÃO DO 2º CICLO DE ESTUDOS CONDUCENTE AO GRAU DE
MESTRE EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Armanda do Carmo Ferreira Abreu de Sousa Correia

2019

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor José Manuel Correia Neves de Sousa Lobo

Professora Doutora Ana Catarina da Cruz Rodrigues da Silva

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

AGRADECIMENTOS

Mesmo os caminhos mais difíceis se tornam passeios agradáveis com a companhia certa. Esta caminhada foi feita com várias pessoas, a quem deixo o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, ao Professor Doutor Sousa Lobo, meu orientador. Agradeço toda a ajuda, incentivo e disponibilidade. Agradeço profundamente todo o conhecimento que me transmitiu, com a paciência e a calma que só os sábios possuem. Foi uma honra tê-lo como orientador.

Agradeço ainda por me ter disponibilizado todos os recursos necessários à execução deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Catarina Silva, minha co-orientadora, agradeço profundamente a força e dinamismo que me transmitiu. Agradeço a partilha de conhecimento científico, a total disponibilidade e a capacidade admirável de solucionar todas as minhas “pedras no caminho”.

À Cláudia, por todo o apoio que me deu na execução do trabalho experimental, por todas as orientações e pela amizade e generosidade com que o fez. Agradeço ainda aos restantes alunos de Doutoramento do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial à Sara e ao João.

À Professora Doutora Renata Silva, agradeço a sua colaboração neste trabalho com os ensaios de citotoxicidade e análise dos respetivos resultados.

Agradeço a todos os docentes do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, pelo conhecimento transmitido ao longo deste percurso.

Aos Serviços de Gestão Académica e Expediente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em particular à Dra. Andrea Gouveia, agradeço por toda a disponibilidade e ajuda.

A todos os colegas do Mestrado, em especial à Teresa e ao Rubén, pela amizade, e pela força e incentivo que me deram para concluir o trabalho.

Por último, e porque estão sempre em primeiro, aos meus pais e às minhas irmãs: a minha equipa da vida, a quem dedico este trabalho.

Resumo

A progesterona é uma hormona que desempenha um papel crucial no sistema reprodutor feminino, sendo responsável pela implantação do embrião no útero e pela manutenção da gravidez. A via vaginal é a mais utilizada para a administração de progesterona, uma vez que este fármaco sofre um extenso efeito de primeira passagem hepática, o que torna a sua biodisponibilidade oral baixa. Atualmente, a forma farmacêutica vaginal comercializada em Portugal (cápsula mole vaginal) para a administração da progesterona origina uma libertação imediata do fármaco, o que leva à necessidade de efetuar administrações repetidas para garantir a manutenção dos níveis terapêuticos desta hormona. Nesse sentido, a preparação de formas de libertação modificada, em particular, formas de libertação prolongada de progesterona é desejável, uma vez que estas permitem reduzir o número de tomas e assim facilitar a administração fármaco. Entre os sistemas de libertação prolongada de fármacos, os nanossistemas, em particular, os vetores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers* - NLC), têm sido amplamente estudados, tendo em conta as suas características particulares que lhes conferem vantagens na promoção da biodisponibilidade dos fármacos. Por outro lado, os óvulos continuam a ser as formas vaginais de eleição, tendo em conta a facilidade de aplicação, o rigor na dose administrada (unidade) e o baixo custo de produção. Com efeito, a preparação de óvulos de libertação prolongada de progesterona é vantajosa.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de óvulos para libertação prolongada de progesterona encapsulada em NLC. Para o efeito foi inicialmente preparada e caracterizada uma dispersão aquosa de NLC que foi posteriormente incorporada em óvulos.

Os NLC foram caracterizados relativamente ao tamanho de partícula, tendo-se observado a existência de 90% de partículas com tamanhos iguais ou inferiores a 316 nm. De seguida, verificou-se que a eficácia de encapsulação da progesterona nos NLC foi de 96,4% e que a libertação do fármaco a partir dos NLC foi prolongada. A biocompatibilidade das formulações de NLC com e sem progesterona foi avaliada em culturas celulares de queratinócitos através dos ensaios de incorporação do vermelho neutro (*Neutral Red* - NR) e de redução da resazurina. Os resultados demonstraram uma maior sensibilidade do ensaio de redução da resazurina para avaliar a citotoxicidade das formulações, permitindo verificar a existência de diferenças significativas mais marcadas para concentrações superiores a 25 µg/mL no ensaio de redução da resazurina e superiores a 50 µg/mL no ensaio de redução do NR.

Os óvulos contendo progesterona encapsulada nos NLC foram caracterizados de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9, através dos ensaios de dissolução, variação de massa, uniformidade de massa e análise de características organolépticas e físicas. Os resultados destes ensaios revelaram que os óvulos apresentaram um aspeto consistente, liso, brilhante, sem rugosidades ou fissuras após 2 meses de armazenamento. Verificou-se ainda que as formas farmacêuticas testadas satisfazem os ensaios de variação de massa e uniformidade de massa. Relativamente à libertação do fármaco, os resultados não foram totalmente conclusivos, embora indiquem a existência de uma libertação prolongada de progesterona.

Palavras-chave: via vaginal, nanossistemas, nanopartículas lipídicas, vetores lipídicos nanoestruturados, óvulos, progesterona.

Abstract

Progesterone is a hormone that plays a crucial role in the female reproductive system, being responsible for the embryo implantation and the maintenance of pregnancy. The vaginal route is the most commonly used for the administration of progesterone, as this drug has an extensive hepatic first pass effect, which makes its oral bioavailability low.

Currently, vaginal dosage forms marketed in Portugal (vaginal soft capsules) for the administration of progesterone give rise to immediate release of the drug, which requires repeated administration to ensure the maintenance of therapeutic levels of this hormone. In this sense, the preparation of modified release forms, in particular prolonged release forms of progesterone is desirable, since they allow to reduce the number of doses and thus facilitate the vaginal administration of the drug. Among prolonged drug delivery systems, nanosystems, in particular nanostructured lipid carriers (NLCs), have been widely studied, due to their particular characteristics that give them advantages in promoting drug bioavailability. On the other hand, pessaries remain the vaginal forms of choice, given the ease of application, the strictness of the administered dose (single dose) and the low cost of production. Indeed, the preparation of progesterone prolonged release pessaries is advantageous.

The objective of this work was the development of pessaries for prolonged release of NLC encapsulated progesterone. For this purpose, an aqueous NLC dispersion was initially prepared and characterized by the ultrasound technique which was later incorporated into pessaries.

NLCs were characterized by particle size and 90% nanoparticles of 316 nm or less were observed. Next, it was found that the encapsulation efficiency of progesterone on the NLCs was 96.4% and that drug release from the NLCs was prolonged. The biocompatibility of NLC formulations with and without progesterone was evaluated in keratinocyte cell cultures (HaCat cells) by the neutral red incorporation (Neutral Red - NR) and resazurin reduction assays. Reduction of resazurin to assess the biocompatibility of formulations, allowing for significant differences to be found at concentrations greater than 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in the resazurin reduction assay and greater than 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in the NR reduction assay.

Pessaries containing progesterone encapsulated in the NLC were characterized according to Portuguese Pharmacopoeia 9 by dissolution assays, mass variation, mass uniformity and organoleptic analysis.

Keywords: vaginal route, nanosystems, lipid nanoparticles, nanostructured lipid vectors, pessaries, progesterone.

Índice

Parte I - Introdução.....	2
1. Objetivo	2
2. Preparações vaginais	3
2.1. Vagina	6
2.1.1. Anatomia e fisiologia vaginais.....	6
2.1.2. Muco cervicovaginal	9
2.1.3. Alterações da mucosa vaginal	10
2.2. Administração vaginal de fármacos	11
2.2.1. Ação local.....	11
2.2.2. Ação sistémica	11
2.2.3. Efeito da primeira passagem uterina	15
2.2.4. Vantagens e limitações.....	16
2.3. Óvulos	18
2.4. Preparações vaginais de libertação modificada	20
3. Nanossistemas	23
3.2. Nanopartículas lipídicas.....	27
3.2.1. Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC).....	28
4. Progesterona	29
Parte II – Experimental.....	34
1. Matérias-primas	34
2. Métodos.....	37
2.1. Desenvolvimento e preparação da formulação de NLC	37
2.1.1. Seleção dos excipientes	37
2.1.2. Ensaio de solubilidade	37
2.1.3. Otimização	37
2.1.4. Preparação da dispersão de NLC.....	38
2.1.5. Caracterização da formulação de NLC.....	39
2.1.5.1. Tamanho de partícula	39
2.1.5.2. Eficácia de encapsulação	40
2.1.5.3. Estabilidade	41
2.1.6. Estudos de biocompatibilidade.....	41
2.1.6.1. Ensaio de incorporação do vermelho neutro	41
2.1.6.2. Ensaio de redução da resazurina	42
2.1.6.3. Análise estatística	42

2.2.	Desenvolvimento e preparação dos óvulos contendo NLC com progesterona.....	43
2.2.1.	Seleção do excipiente e otimização da fórmula	43
2.2.2.	Preparação dos óvulos	43
2.2.2.1.	Calibração dos moldes	44
2.2.2.2.	Cálculo do fator de deslocamento.....	44
2.2.3.	Ensaio de controlo da qualidade dos óvulos de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.....	45
2.2.3.1.	Ensaio da dissolução	46
2.2.3.1.1.	Comparação dos resultados com modelos cinéticos	50
2.2.3.2.	Variação de massa	51
2.2.3.3.	Uniformidade de massa	52
2.2.3.4.	Caraterísticas organoléticas e físicas.....	52
2.2.3.5.	Estabilidade	53
3.	Resultados e discussão.....	54
3.1.	Desenvolvimento e preparação da formulação de NLC	54
3.1.1.	Seleção dos excipientes	54
3.1.2.	Ensaio de solubilidade	55
3.1.3.	Otimização	55
3.1.4.	Preparação da dispersão de NLC.....	58
3.1.5.	Caraterização da formulação de NLC.....	59
3.1.5.1.	Tamanho de partícula	59
3.1.5.2.	Eficácia de encapsulação	60
3.1.5.3.	Estabilidade	62
3.1.5.4.	Avaliação da biocompatibilidade.....	62
3.2.	Óvulos.....	65
3.2.1.	Seleção do excipiente e otimização da fórmula	65
3.2.2.	Preparação dos óvulos	67
3.2.2.1.	Calibração dos moldes	68
3.2.2.2.	Cálculo do fator de deslocamento.....	68
3.2.3.	Ensaio dos óvulos.....	70
3.2.3.1.	Estudo de dissolução.....	70
3.2.3.1.1.	Comparação dos resultados através da aplicação de diferentes modelos cinéticos de libertação.....	76
3.2.3.2.	Uniformidade de massa	80
3.2.3.3.	Variação de massa	81
3.2.3.4.	Caraterísticas organoléticas e físicas.....	83
3.2.3.5.	Estabilidade dos óvulos	84

4. Perspetivas futuras	86
5. Conclusão	88
6. Referências bibliográficas	90

Índice de figuras

Figura 1: Representação do dispositivo metálico para administração vaginal de fármacos inventado por Ambroise Paré (século XVI) [4][4].	3
Figura 2: Cronograma representativo da evolução das preparações farmacêuticas vaginais.	4
Figura 3: Anatomia do trato vaginal [12][14].	6
Figura 4: Fluxograma representativo das vantagens da administração vaginal de fármacos.	16
Figura 5: Exemplo de moldes metálicos usados para preparar óvulos.	19
Figura 6: Representação esquemática da possível concentração de fármaco após administração oral de uma preparação de libertação imediata (linha fina) e de uma preparação de libertação prolongada (linha a negrito). Adaptado de [43][43].	21
Figura 7: Representação da estrutura interna cristalina das SLN (esquerda) em oposição à estrutura interna amorfa dos NLC (direita) (adaptado de [65,66]).	28
Figura 8: Estrutura química da progesterona [79].	29
Figura 9: Representação esquemática do método de preparação da dispersão de NLC pela técnica dos ultrassons.	39
Figura 10: Moldes metálicos para óvulos.	43
Figura 11: Placa magnética com poços múltiplos de agitação.	47
Figura 12: Aparelho de dissolução com pá agitadora.	49
Figura 13: <i>Aspetto da dispersão de NLC acondicionada em vial de vidro.</i>	58
Figura 14: Resultados da análise da distribuição de partículas da medição 2 (t=30).	60
Figura 15: Curva de calibração dos padrões de progesterona com concentrações entre 0,005 e 0,04 mg/mL.	61
Figura 16: Biocompatibilidade das formulações NLC com progesterona e NLC placebo (0-100 µg/mL) avaliada em células HaCat pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24 h após exposição. Os resultados são apresentados como média + SD de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método de Two-way ANOVA, seguido pelo Sidak's multiple comparison post hoc test (**** p <0,0001 vs. controlo (0 µg/mL)).	63
Figura 17: Biocompatibilidade das formulações NLC PRG e NLC placebo (0-100 µg/mL) avaliada em células HaCat pelo ensaio de redução da resazurina, 24 h após exposição. Os resultados são apresentados como média + SD de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método de Two-way ANOVA, seguido pelo Sidak's multiple comparison post hoc test (** p <0,001; **** p <0,0001 vs. controlo (0 µg/mL)).	64
Figura 18: <i>Aspetto dos óvulos obtidos.</i>	67
Figura 19: Curva de calibração construída para o estudo de dissolução.	71
Figura 20: Perfil de dissolução da progesterona a partir da dispersão de NLC.	74
Figura 21: Perfil de dissolução da progesterona a partir da forma comercial Progeffik®.	75
Figura 22: Comparação dos perfis de dissolução da formulação NLC PRG e PFK.	76
Figura 23: <i>Aspetto final dos óvulos contendo NLC com progesterona encapsulada (ONLC PRG).</i>	83

Índice de tabelas

Tabela 1: Camadas da parede vaginal [13, 15].	7
Tabela 2: Estratégias no desenvolvimento de preparações vaginais de libertação modificada.	22
Tabela 3: Descrição de alguns tipos de nanossistemas [47, 49-52].	25
Tabela 4: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de nanossistemas [47, 49-53].	26
Tabela 5: Medicamentos com progesterona comercializados em Portugal [81].	30
Tabela 6: Exemplos de preparações para uso vaginal contendo progesterona aprovadas na União Europeia.	31
Tabela 7: Preparações vaginais com progesterona aprovadas pela FDA [80].	32
Tabela 8: Matérias-primas utilizadas na preparação da formulação.	34
Tabela 9: : Matérias-primas utilizadas na preparação dos meios de dissolução.	34
Tabela 10: Matérias-primas utilizadas nos ensaios de biocompatibilidade.	35
Tabela 11: Principais características das matérias-primas utilizadas.	36
Tabela 12: Composição das diferentes fórmulas testadas.	38
Tabela 13: Condições usadas para a medição do tamanho dos NLC.	40
Tabela 14: Ensaios da Farmacopeia Portuguesa 9 para o controlo da qualidade dos óvulos [9].	45
Tabela 15: Composição do fluido vaginal simulado (FVS) [22, 94-97].	47
Tabela 16: Condições do primeiro ensaio de dissolução.	48
Tabela 17: Concentração de progesterona no meio de dissolução nas diferentes formulações.	48
Tabela 18: Condições do 2º ensaio de dissolução.	49
Tabela 19: Concentração de progesterona no meio de dissolução nas diferentes formulações.	50
Tabela 20: matérias-primas consideradas para a formulação.	54
Tabela 21: Estudo da solubilidade da progesterona no lípido Compritol 888 ATO®.	55
Tabela 22: Estudo da solubilidade da progesterona no Miglyol 812 ® e no ácido oleico.	55
Tabela 23: Composição da fórmula 1 de NLC.	56
Tabela 24: Composição da fórmula 2 de NLC.	56
Tabela 25: Composição da fórmula 3.	57
Tabela 26: Tamanhos de partícula das 3 formulações de NLC testadas.	58
Tabela 27: Resultados da medição do tamanho de partícula (medição 1, t=0).	59
Tabela 28: Resultados da medição do tamanho de partícula (medição 2, t= 30).	59
Tabela 29: Resultados da medição da absorvência das diferentes soluções-padrão de progesterona.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 30: Resultados da medição da absorvência da amostra.	61
Tabela 31: Tamanhos da determinação do tamanho das nanopartículas, medidos no tempo t=0 e t=30.	62
Tabela 32: Testes de diferentes bases e proporções de base e dispersão aquosa de NLC e os seus efeitos na obtenção dos óvulos.	65
Tabela 33: Resultados da pesagem dos óvulos constituídos só por base.	68
Tabela 34: Resultados da determinação de massa dos óvulos com a dispersão de NLC.	69
Tabela 35: Concentração e valores das absorvências das soluções padrão de progesterona.	70
Tabela 36: Resultados dos testes de solubilidade da progesterona nos diferentes meios de dissolução.	73

Tabela 37: Resultados da absorvência, concentração e quantidade de progesterona libertada a partir da dispersão de NLC progesterona.	74
Tabela 38: Resultados da absorvência, concentração e quantidade de progesterona libertada a partir da cápsula Progeffik®.	75
Tabela 39: Parâmetros dos modelos cinéticos de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas para as formulações NLC progesterona e PFK.	78
Tabela 40: Massas individuais dos óvulos utilizados para o ensaio de uniformidade de massa.	80
Tabela 41: Massas individuais dos óvulos utilizados para o ensaio de uniformidade de massa e % de desvio relativamente à massa media.	81
Tabela 42: Valores obtidos para a massa dos óvulos (w_i), média das massas (W), teor em percentagem do valor indicado (A), teor individual estimado (x_i), média (X) e desvio padrão do teor individual estimado (s).	82
Tabela 43: Avaliação do aspeto dos óvulos após 30 e 60 minutos do início do ensaio de dissolução.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS – Absorvência

BSA – Albumina bovina sérica (*bovine serum albumin*)

DMEM - *Dulbecco's modified Eagles medium*

DSC - *Differential scanning calorimetry*

FBS – Soro bovino fetal (*fetal bovine serum*)

FD – Fator de diluição

FDA – *Food and drug administration*

FVS – Fluido vaginal simulado

LD – *Laser diffraction*

LSS – Laurilssulfato de sódio

NLC – *Nanostructured lipid carriers*

NR - Vermelho neutro (*Neutral Red*)

PEG – Polietilenoglicol

PRG – Progesterona

SLN – *Solid lipid nanoparticles*

Parte I - Introdução

1. Objetivo

A progesterona (progesterona) é uma hormona endógena esteroide que desempenha um papel fundamental na função reprodutora feminina. Em algumas mulheres os níveis de progesterona são insuficientes para o desenvolvimento do endométrio e, por isso é necessária a suplementação durante a gravidez. Entre as possíveis vias para a administração de progesterona, a via vaginal é a mais adequada uma vez que a biodisponibilidade oral é muito baixa, devido à extensa metabolização hepática e à insolubilidade aquosa da progesterona. Além disso, vários estudos demonstram que, quando administrada por via vaginal, a progesterona é direcionada para o útero, atingindo concentrações mais elevadas neste local apesar de concentrações séricas subfisiológicas. Assim, é possível administrar doses mais baixas e evitar os efeitos adversos sistêmicos [1, 2]. A administração vaginal de cápsulas de progesterona de libertação convencional requer uma frequência de administração de 2 a 3 vezes por dia, o que compromete a adesão à terapêutica [3].

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de óvulos contendo progesterona encapsulada em vetores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers* – NLC). Este sistema foi desenvolvido no sentido de promover a biodisponibilidade da progesterona e de prolongar a sua libertação, avaliando a possibilidade de efetuar uma administração em dose única diária.

2. Preparações vaginais

A via vaginal é vista muitas vezes como uma via menos tradicional quando comparada com a via oral ou parentérica. Mas, de facto, as referências a preparações vaginais aparecem no documento que se conhece como o mais antigo a incluir registos de medicamentos, o Papiro Kahun (1850 a.C.). Neste documento há várias referências a preparações vaginais, principalmente para o tratamento de infeções vaginais ou para fins contraceptivos [4]. Outro documento da época, o Papiro Ebers, recomenda a introduções de certas partes de plantas que contêm goma arábica. Em contacto com o meio aquoso da vagina, a goma arábica liberta ácido láctico. O ácido láctico contribui para a manutenção do pH vaginal, prevenindo e tratando infeções vaginais [5]. Hipócrates (370 a. C.) e outros autores da Antiguidade descrevem várias preparações vaginais como os óvulos. Na Roma Antiga, Galeno (131-200 d.C.) também incluía preparações vaginais na sua classificação de preparações farmacêuticas.

No século XVI, foram desenvolvidas várias formas para administração de fármacos por via vaginal. Um exemplo (figura 1) é o dispositivo metálico inventado pelo cirurgião francês Ambroise Paré [4]. Estão descritos ainda dispositivos para lavagem, para irrigação e para vaporização de preparações farmacêuticas na vagina [4].

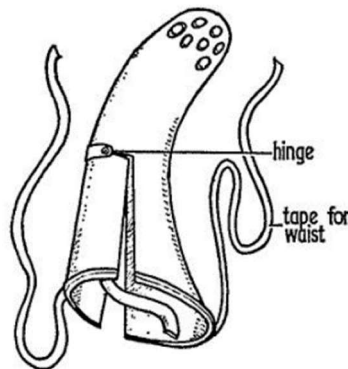


Figura 1: Representação do dispositivo metálico para administração vaginal de fármacos inventado por Ambroise Paré (século XVI) [4][4].

No século XIX, o químico britânico Walter John Rendell desenvolveu, na sua farmácia, um método contraceptivo que consistia em óvulos de quinina. Em 1886, após verificar os

excelentes resultados da sua invenção, Rendell decidiu registar o produto. Assim, esta data marca o início da comercialização do primeiro contraceptivo intravaginal [4].

Em Portugal, a primeira farmacopeia a incluir óvulos como forma farmacêutica foi a *Farmacopeia Portuguesa IV* (1935), com a monografia “Óvulos de bitiol” [6, 7]. O registo do medicamento Pimafucin®, em 1967, marcou a introdução da forma farmacêutica “comprimido vaginal” em Portugal [8]. Nos anos que se seguiram foram surgindo no mercado farmacêutico português várias formas farmacêuticas vaginais convencionais, como óvulos, cremes, soluções e cápsulas moles vaginais, entre outras. O primeiro sistema de libertação vaginal comercializado em Portugal foi o anel vaginal Estring® (estradiol), em 1996 [8]. No cronograma da figura 2 estão representados alguns dos principais acontecimentos que marcaram a evolução das formas farmacêuticas vaginais.

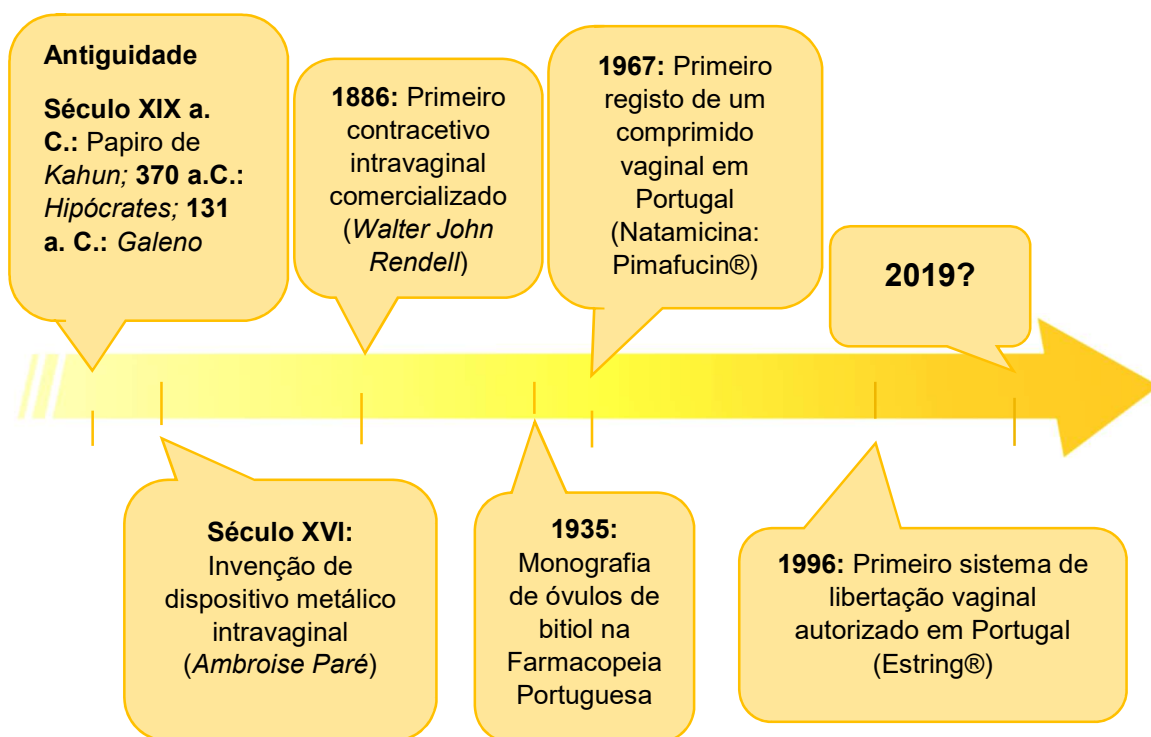


Figura 2: Cronograma representativo da evolução das preparações farmacêuticas vaginais.

A *Farmacopeia Portuguesa 9* (2008) apresenta uma monografia relativa às preparações vaginais. Estas definem-se como: “preparações líquidas, semissólidas ou sólidas destinadas a serem administradas por via vaginal, geralmente para uma ação local. Contêm uma ou várias substâncias ativas num excipiente apropriado” [9].

Classicamente, as preparações vaginais eram utilizadas sobretudo para fins contraceptivos (por ação de barreira) ou para o tratamento de infecções vaginais, contendo essencialmente compostos com propriedades antissépticas e calmantes [5, 10]. Em 1918, foi publicado, por David Macht, o primeiro artigo que confirma a absorção sistêmica de substâncias como alcalóides, ésteres, sais inorgânicos e antissépticos [5, 11].

A evolução das preparações vaginais passou pelo aprofundamento do conhecimento da forma como as substâncias interagem com a parede vaginal e pela própria evolução da tecnologia farmacêutica. A via vaginal começou a ser utilizada, não só para o tratamento de afeções vaginais, mas também para a administração sistêmica de fármacos, como hormonas para fins reprodutivos, de contraceção ou de reposição hormonal. A sua capacidade de absorção transforma-a numa importante alternativa às vias mais convencionais, tendo-se já demonstrado que, para certos fármacos, a via vaginal é a que promove maior eficácia e menor toxicidade. Desta forma, a vagina é hoje estudada como uma possível via para a administração de variadíssimos fármacos.

2.1. Vagina

2.1.1. Anatomia e fisiologia vaginais

A vagina (figura 3), um dos órgãos reprodutores femininos internos, consiste num canal com cerca de 9 cm de comprimento, que liga o útero ao órgão reprodutor externo, a vulva, e localiza-se entre a bexiga e o reto. É responsável por receber o pénis e o esperma durante o ato sexual, pela eliminação de fluidos menstruais e pela passagem do bebé durante o parto [12, 13].

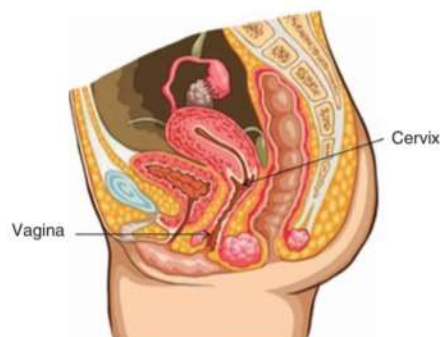


Figura 3: Anatomia do trato vaginal [12][14].

Na mulher adulta, a parede anterior da vagina tem aproximadamente 7,5 cm, enquanto a parede posterior tem um comprimento de cerca de 9 cm. O seu diâmetro é maior na parte superior, junto ao colo do útero e vai diminuindo progressivamente até ao orifício externo. A vagina tem uma ligeira curvatura, que lhe confere a forma de “s” [12, 13, 15].

A parede vaginal é composta por três camadas (tabela 1): mucosa vaginal, camada muscular e camada adventícia. A mucosa vaginal não constitui efetivamente uma mucosa, uma vez que não possui células secretoras de mucina; o muco presente na vagina provém das secreções cervicais – muco cervical – e é o principal componente do fluido vaginal. A sua superfície é recoberta por epitélio de descamação estratificado, não queratinizado, que forma uma camada protetora e que sofre alterações durante o ciclo menstrual. A parte interna da mucosa é uma camada de lâmina própria. A espessura da mucosa vaginal resulta da soma da espessura variável do epitélio que a recobre (150 a 200 µm) e da espessura da lâmina própria, alcançando assim uma espessura de cerca de 1 mm [5, 12, 13, 15-18].

Tabela 1: Camadas da parede vaginal [13, 15].

Parede Vaginal		
Mucosa vaginal	Epitélio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apresenta diferentes tipos de células; ▪ Distinguem-se 5 camadas: basal, parabasal, intermédia, transitória e superficial; ▪ A superfície do epitélio contém material lipídico que serve de barreira às moléculas hidrossolúveis.
	Lâmina própria	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tecido conjuntivo fibroso; ▪ Irrigada por capilares sanguíneos e linfáticos; ▪ Não possui glândulas secretoras de muco.
Camada muscular	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Constituída por fibras musculares que permitem o alongamento da vagina no parto; ▪ Constituída por uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa. 	
Camada adventícia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tecido conjuntivo; ▪ Vasos sanguíneos e linfáticos; ▪ Células nervosas. 	

O epitélio vaginal está em constante renovação, graças à produção contínua de células na camada basal. Este *turnover* é estimulado pelos níveis hormonais e pela comunicação intracelular e contribui para a defesa contra agentes patogénicos. Nesta camada, as células estão intimamente ligadas por ligações apertadas e desmossomas, o que impede a existência de vasos entre elas. A lâmina própria é a camada imediatamente abaixo do epitélio vaginal, que contacta diretamente com a camada basal do epitélio. Esta camada de tecido conjuntivo é irrigada por vasos sanguíneos e linfáticos. Assim, para um agente patogénico conseguir atingir a circulação sanguínea, tem de atravessar o epitélio vaginal e atingir esta camada. Se, por um lado, este obstáculo é útil como uma defesa à invasão por

microrganismos, por outro, constitui um desafio à administração de fármacos por via vaginal [19].

A irrigação sanguínea na vagina ocorre, por norma, a partir da artéria ilíaca interna, mas, em alguns casos, pode surgir da artéria uterina [14]. As veias ilíacas internas que drenam a vagina ligam-se às veias ilíacas externas dos membros inferiores para formar as veias ilíacas primitivas que, por sua vez, se unem, originando a veia cava inferior. No sistema linfático, os troncos linfáticos lombares drenam a parede pélvica [16].

A flora vaginal é predominantemente composta por bactérias do género *Lactobacillus*. As células de descamação do epitélio vaginal servem como fonte de glicogénio, que é convertido em ácido láctico pelos *Lactobacillus*, levando à acidificação do pH vaginal. Estes microrganismos produzem também peróxido de hidrogénio, que é tóxico para outros microrganismos, o que resulta numa proteção do epitélio vaginal contra microrganismos patogénicos. Os níveis de estrogénio estimulam a produção de glicogénio pelas células descamativas, favorecendo a presença dos *Lactobacillus* [20].

A produção de estrogénio diminui na pré-menopausa e vai decrescendo gradualmente, levando a níveis cada vez menores de glicogénio e limitando, conseqüentemente, a presença de *Lactobacillus*. Assim, na menopausa é comum que a flora vaginal possua um conjunto de vários microrganismos sem particular predominância de *Lactobacillus*, o que explica também o aumento do pH vaginal nesta fase [20, 21].

2.1.2. Muco cervicovaginal

A mucosa vaginal é revestida pelo muco cervicovaginal, um fluido com propriedades viscoelásticas, que serve como barreira fisiológica, protegendo a vagina de agentes patogénicos [12,14]. Este muco resulta de uma mistura de componentes originados na vagina e de outros que fluem através desta, como o muco cervical. O estudo da sua composição e das possíveis alterações, relacionadas sobretudo com o ciclo menstrual e a atividade sexual, reveste-se de enorme importância quando se pretende desenvolver preparações vaginais, visto que, primeiramente, a preparação irá interagir com este muco [22].

O muco cervicovaginal é composto por muco cervical, fluido endometrial, transudação dos tecidos, secreções das glândulas vestibulares de Bartholin e de Skene, células epiteliais e imunológicas e resíduos de urina. Bioquimicamente, é constituído essencialmente por água e por uma pequena quantidade de mucina que provém do muco cervical [19]. As mucinas são proteínas de grandes dimensões (10 a 40 MDa) constituintes do muco. Estas proteínas conferem viscosidade ao muco e são as responsáveis pelas suas propriedades coesivas e adesivas [23].

Devido ao teor de água deste fluido, para que um fármaco consiga ser absorvido através do epitélio vaginal terá de ter um certo grau de hidrossolubilidade [22].

O muco cervicovaginal é ácido (pH 3,5 a 4,5) devido ao ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus*, mas este pH pode ser aumentado pela presença de sémen (\approx pH 7,5) e de muco cervical (\approx pH 8) [22]. O pH vaginal é outro aspeto a ter em conta na absorção de fármacos, em particular naqueles que possuem grupos ionizáveis [12,14].

A função de barreira do muco assenta em dois mecanismos [24]:

- Filtro físico, uma vez que impede a penetração de pequenas partículas e moléculas com um tamanho superior aos poros existentes na rede formada pelas mucinas. O tamanho destes poros é cerca de 50 a 1800 nm;
- Barreira química, visto que, pela complexidade da sua composição, o muco é capaz de diminuir a velocidade de difusão das pequenas moléculas que conseguem atravessar os referidos poros.

O muco está constantemente a ser produzido e eliminado, e por isso, mesmo quando um fármaco o consegue atravessar, o seu tempo de atuação é limitado. Pela sua natureza adesiva, este muco tem também a capacidade de reter partículas. Assim, as formas farmacêuticas vaginais são geralmente formuladas para serem mucoadesivas de forma a aumentar o tempo de contacto entre o fármaco e o epitélio vaginal [25].

2.1.3. Alterações da mucosa vaginal

As alterações na mucosa decorrentes de fatores hormonais incluem variações de espessura do epitélio e modificações na composição do fluido que reveste a mucosa [12,14].

Durante a ovulação, o muco cervical torna-se mais líquido e as mucinas posicionam-se de forma a facilitar a passagem do esperma diretamente da vagina até ao útero. A presença de grandes quantidades de fluido vaginal, por outro lado, leva a que mais facilmente quaisquer partículas sejam removidas, o que dificulta a absorção de substâncias. Na fase não ovulatória ou em mulheres a tomar contraceptivos hormonais, as mucinas formam um muco espesso que funciona como uma barreira à penetração de quaisquer partículas [5, 12,14].

A presença de estrogénio leva a um aumento da atividade metabólica das células epiteliais, aumentando os níveis de glicogénio e o número de camadas celulares. Assim, o aumento dos níveis de estrogénio leva ao aumento da espessura epitelial – o que pode comprometer a permeabilidade das substâncias - e à acidificação do fluido vaginal. A quantidade de fluido vaginal é máxima quando há um pico de estrogénio e é mínima nas fases do ciclo em que a concentração de estrogénio é baixa e a quantidade de progesterona é elevada [19, 21, 26].

O pH vaginal pode ser afetado por fatores como a presença de sémen, infeções bacterianas ou a destruição da flora bacteriana [12,14].

A atividade enzimática no meio vaginal é baixa quando comparada com a de outros locais do organismo, o que constitui uma vantagem para a administração de fármacos suscetíveis à ação enzimática [19, 26]. Embora baixa, a atividade enzimática na mucosa vaginal não é inexistente, verificando-se a presença de algumas enzimas, como peptidases [26].

2.2. Administração vaginal de fármacos

A administração de fármacos através da vagina pode ser feita com o intuito de se obter uma ação local ou uma ação sistémica.

2.2.1. Ação local

Dependendo das características físico-químicas do fármaco, este pode ser administrado na vagina sem ser absorvido sistemicamente. Ora, este facto é muito útil no tratamento de doenças que afetem a vagina ou outros órgãos do aparelho reprodutor e que possam ser alcançados através da vagina. Assim, é possível obter, maior eficácia e menor toxicidade, por se evitarem os efeitos adversos resultantes da absorção sistémica. Esta estratégia pode ser usada na administração de antibióticos para tratamento de infeções vaginais ou em quimioterapia para tratamento de cancro cervical, por exemplo [26, 27].

Para que haja absorção local, o fármaco, após ter sido introduzido na vagina, tem de se libertar da forma farmacêutica, dissolver-se no fluido vaginal e, desta forma, interagir com os recetores que aí se encontram [5]. O processo de dissolução de um fármaco no meio vaginal pode ser explicado pela equação de Noyes-Whitney, descrita em pormenor no subcapítulo seguinte.

2.2.2. Ação sistémica

A estrutura do epitélio vaginal e a sua envolvência com o sistema circulatório revela que a vagina possui a capacidade de proporcionar a absorção de substâncias para a corrente sanguínea. De facto, a mucosa vaginal é muito irrigada e serve assim de porta de entrada a várias substâncias, tendo sido publicados estudos que demonstram que determinadas substâncias permeiam melhor a mucosa vaginal do que a mucosa gastrintestinal [20, 28, 29].

Para que haja absorção de fármacos pela via vaginal, é necessário que ocorram os seguintes fenómenos [5, 30]:

1. libertação do fármaco da forma farmacêutica;
2. dissolução do fármaco nos fluidos vaginais;
3. absorção na mucosa vaginal.

Assim, o fármaco utilizado deverá ter uma certa hidrodispersibilidade, para que se consiga libertar da forma farmacêutica para os fluidos vaginais, ricos em água. Por outro lado, é aceite que, para atravessar a parede vaginal, um fármaco deverá ser idealmente lipófilo - visto que a barreira epitelial é predominantemente lipídica - e de baixa massa molecular (menos de 500 Da) [5, 30].

Na fase de dissolução, o fármaco dissolve-se no fluido vaginal. A **equação de Noyes-Whitney modificada** descreve o processo de dissolução, elucidando os fatores intervenientes [31, 32]:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{KDS}{h} \times (C_s - C)$$

dC/dt = massa de fármaco dissolvida na unidade de tempo

K = constante de proporcionalidade

D = coeficiente de difusão do fármaco no seio da solução

S = área da partícula de fármaco

C_s = concentração na camada de difusão (concentração à saturação)

C = concentração no seio da solução

h = espessura da camada de difusão

A dissolução é influenciada pelo tamanho da partícula (sendo tanto maior a velocidade de dissolução quanto menor for o tamanho da partícula), pela diferença de concentração nos dois locais do meio de dissolução, pela constante de proporcionalidade e pela espessura da camada de difusão [31-34].

Esta equação pode ser simplificada quando consideramos um dado fármaco em determinadas condições (por exemplo, a dissolução no meio vaginal). Neste caso, a espessura da membrana (h) e o coeficiente de difusão do fármaco (D) serão constantes e podem ser incluídos numa constante de proporcionalidade específica (K') [33].

Assim, teremos:

$$\frac{dC}{dt} = K'S(C_s - C)$$

Com base nesta expressão, compreende-se mais facilmente que o tamanho da partícula de determinado fármaco pode ser controlado de forma a gerar uma maior área exposta (S), aumentando a massa de fármaco dissolvida na unidade de tempo (dC/dt) [33][33].

A constante aparente de proporcionalidade (K') mantém-se para condições específicas, mas depende também da temperatura, agitação, volume de solvente e até da forma do meio [33].

A difusão passiva pressupõe o movimento das moléculas de fármaco de uma zona de maior concentração para uma zona de menor concentração de fármaco. A força motriz da difusão de fármaco entre os dois lados da membrana é proporcional à diferença de concentração entre os dois meios, ou seja, é proporcional ao gradiente de concentração.

A difusão através de uma membrana, em particular, a absorção através do epitélio vaginal, é explicada matematicamente pela **lei de Fick** [33]:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{K_o/aSD(Cd - Cr)}{h}$$

dC/dt = massa de fármaco absorvida na unidade de tempo

D = coeficiente de difusão do fármaco através da membrana

S = área da membrana

KO/A = coeficiente de partilha O/A do fármaco

Cd = concentração no compartimento dador (neste caso, meio vaginal)

Cr = concentração no compartimento recetor (neste caso, corrente sanguínea)

h = espessura da camada de difusão

Esta lei explica que a difusão é influenciada pela área da membrana (no caso da vagina, esta área é variável – 80 a 110 cm²), pelo coeficiente de difusão, pelo coeficiente de partilha O/A do fármaco, pelo gradiente de concentração e pela espessura da membrana, neste caso a espessura da parede vaginal [33].

Quando consideramos um determinado fármaco em determinado meio (meio vaginal, por exemplo), podemos simplificar esta equação eliminando o coeficiente de difusão e o coeficiente de partilha, que são constantes para determinado fármaco, e eliminando a área

e a espessura da membrana, que são constantes para um meio específico. Assim, obtemos:

$$\frac{dC}{dt} = K'(Cd - Cr)$$

Ora, o volume dos fluidos vaginais é pequeno quando comparado com o volume sanguíneo, e assim, qualquer fármaco que passa para a corrente sanguínea é rapidamente diluído. Além disso, a partir do momento em que um fármaco passa para a corrente sanguínea está constantemente a ser sujeito a processos de ligação e de excreção, o que contribui para a reduzida concentração do fármaco livre no sangue. Desta forma, a concentração no compartimento dador é muito maior do que a concentração no compartimento recetor e assim, esta última pode ser considerada nula [33]:

$$\frac{dC}{dt} = K'Cd$$

Esta equação descreve um processo em que a massa de fármaco absorvida na unidade de tempo é dependente da concentração de fármaco no meio vaginal, que é obviamente influenciada pela dose de fármaco administrada.

A biodisponibilidade de um fármaco administrado na vagina pode ser modificada através da adição de promotores químicos que atuam nas junções intercelulares do epitélio, possibilitando a ocorrência de uma penetração intercelular alternativa, que pode ser especialmente importante quando se pretende administrar substâncias com elevada massa molecular, como péptidos e proteínas [26].

De uma forma geral, a permeabilidade do epitélio vaginal é superior à das vias retal, bucal ou transdérmica, mas inferior à nasal e pulmonar [35].

Num estudo *in vitro*, Pieter van der Bijl *et. al.* demonstraram que a permeabilidade à água é superior na mucosa vaginal, quando comparada com as mucosas do intestino grosso e intestino delgado [29].

2.2.3. Efeito da primeira passagem uterina

Vários estudos têm demonstrado uma superioridade da biodisponibilidade da progesterona quando administrada por via vaginal em comparação com a que se verifica quando é administrada por via oral [36]. A baixa biodisponibilidade oral da progesterona estará relacionada com a sua insolubilidade aquosa e com o extenso metabolismo de primeira passagem hepática a que é sujeita [37]. Quando administrada por via vaginal, a progesterona é detetada em grandes concentrações no útero (comparativamente à via oral) e este facto poderá dever-se ao efeito de primeira passagem uterina [2]. Este fenómeno é descrito como uma passagem preferencial de determinadas substâncias para o útero, após administração vaginal [12,14, 38, 39]. De acordo com este princípio, as substâncias são direcionadas para o útero, sendo que a sua concentração aumenta neste local e, portanto, a concentração sistémica é menor do que a esperada, o que leva também à diminuição de efeitos adversos sistémicos. Esta passagem de substâncias para o útero dever-se-á a um mecanismo de contracorrente. Este efeito pode ser muito útil quando se pretende a atuação de determinado fármaco no útero, como é o caso da administração da progesterona. Vários estudos apontam para o efeito de transporte direto vagina – útero após a administração de progesterona, que será devido à proximidade do local de aplicação com o útero. Devido a esta atuação quase local, o metabolismo fica limitado à zona de administração, o que permite a administração de doses muito mais baixas [2, 39-41]. A administração vaginal de progesterona produz as modificações benéficas no endométrio (indução da fase secretora), com níveis plasmáticos abaixo dos que seriam necessários para tal [40, 41]. Este efeito constitui uma enorme vantagem na administração vaginal da progesterona, levando a uma maior eficácia e segurança, uma vez que se contornam os efeitos adversos sistémicos.

2.2.4. Vantagens e limitações

O interesse em explorar a via vaginal prende-se com diversos fatores, explicitados no fluxograma apresentado na figura 4.

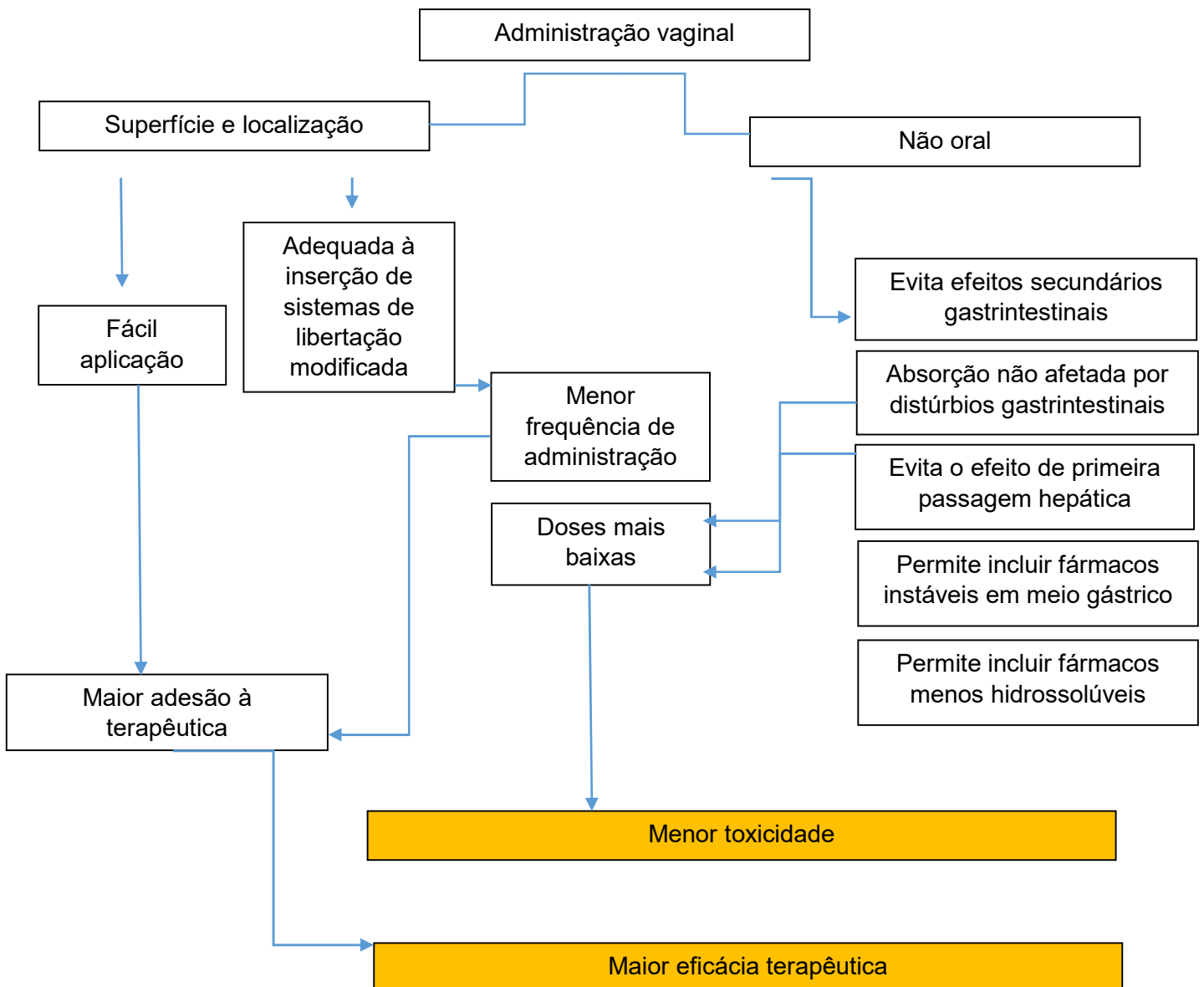


Figura 4: Fluxograma representativo das vantagens da administração vaginal de fármacos.

A administração vaginal apresenta uma série de vantagens decorrentes de dois fatores principais: o facto de evitar o trato gastrintestinal (atendendo a que a via oral é a mais utilizada) e o facto de possuir dimensões e superfície adequadas a uma fácil administração e deposição de sistemas de libertação vaginal. Desta forma, a administração vaginal não submete os fármacos à variabilidade decorrente da via oral que está relacionada com diversos fatores, tais como as interações com alimentos, o tempo de esvaziamento gástrico e as diferentes características de pH ao longo do trato digestivo, entre outros. Não sujeitando o fármaco a esta travessia complexa, a administração vaginal permite a utilização de doses mais baixas e administrações menos frequentes, o que leva a uma maior adesão à terapêutica, menor toxicidade e maior eficácia [20, 30].

Pelas suas características de dimensão e superfície, a via vaginal permite o uso de formas farmacêuticas de fácil aplicação, o que promove o cumprimento da terapêutica, e ainda permite a inserção de sistemas de libertação de dimensões e formas mais diversas, quando comparada com outras vias, como a oral ou a retal. Os sistemas de libertação, por sua vez, permitem administrar doses mais baixas e diminuir a frequência das administrações, o que leva a uma maior adesão à terapêutica, maior eficácia e menor toxicidade [20].

Por outro lado, esta via de administração apresenta algumas limitações. O facto de estarmos perante uma via que se destina apenas a um género e, portanto, a cerca de metade da população é, desde logo, uma limitação. Por essa razão, a maioria dos estudos feitos até agora direccionam-se para fármacos unicamente ou sobretudo administrados a mulheres, como é o caso dos anticoncepcionais, medicamentos para reposição hormonal ou tratamentos de fertilidade [12,14].

As variações hormonais que ocorrem no ciclo menstrual e que se alteram consoante a fase da vida da mulher são o outro grande problema da administração de fármacos por esta via. O resultado é uma considerável variação de fatores como o pH, a espessura do epitélio vaginal, a quantidade e a composição dos fluidos vaginais, que vão, em menor ou maior escala, alterar a absorção de fármacos através da vagina. A atividade sexual e eventuais infeções vaginais também alteram as condições fisiológicas da vagina, e consequentemente a resposta farmacológica [12,14,30].

2.3. Óvulos

Os óvulos são definidos na Farmacopeia Portuguesa 9 como sendo “preparações sólidas unidose, de forma variável, mas geralmente ovoide; o volume e a consistência estão adaptados à administração por via vaginal. Contêm uma ou várias substâncias ativas dispersas ou dissolvidas numa base apropriada que é, segundo os casos, solúvel ou dispersível na água, ou funde à temperatura corporal. Podem igualmente conter, se necessário, outros excipientes como agentes diluentes, absorventes, tensioativos, lubrificantes, conservantes antimicrobianos e corantes autorizados pela Autoridade competente” [9].

Os óvulos podem ser administrados quando se pretende uma absorção local ou sistémica dos fármacos, embora sejam mais usados para obter uma ação local. Estes são formulados com excipientes que se fundem (excipientes lipófilos) ou dispersam (excipientes hidrófilos) após serem introduzidos na vagina. As características tecnológicas dos óvulos são as mesmas das dos supositórios, diferindo a via de administração e a forma, que no caso dos óvulos é ovoide e geralmente mais larga, o que determina também uma massa superior [10, 42].

A preparação dos óvulos envolve a dispersão ou dissolução do(s) fármaco(s) no excipiente liquefeito (previamente aquecido acima de 37°C), sendo a massa obtida vertida em moldes de formato apropriado (figura 5).



Figura 5: Exemplo de moldes metálicos usados para preparar óvulos.

As vantagens dos óvulos em relação a outras preparações vaginais são [10, 42]:

- A uniformidade de dose: pode ser administrada uma dose exata (em oposição à administração de creme vaginais, por exemplo);
- A facilidade de administração;
- A menor probabilidade de expulsão da preparação (quando comparada com as formas semissólidas, por exemplo).

Tem sido descrito que os óvulos apresentam alguns problemas de conservação. Esta constitui a principal limitação da sua utilização [10].

2.4. Preparações vaginais de liberação modificada

Para que um fármaco atue no organismo é necessário que ocorram dois fenômenos: a sua liberação da forma farmacêutica e a sua dissolução nos fluidos orgânicos. Muitas substâncias possuem um grande potencial para exercer benefícios terapêuticos, mas, na prática, não são bem-sucedidas nestas etapas e, por isso, os efeitos *in vivo* são difíceis de atingir. Este insucesso pode ser devido, por exemplo, a uma baixa solubilidade nos fluidos orgânicos, ou a uma semivida tão curta que exija frequências de administração impraticáveis. Para modificar as características de liberação de um fármaco podem ser empregues diversas estratégias que promovam melhorias nas características de farmacocinética, estratégias essas que tanto poderão agir no sentido de aumentar como de diminuir a taxa de liberação do fármaco. Se considerarmos uma substância pouco hidrossolúvel, será benéfico aumentar a sua taxa de liberação, para que, após administração, o efeito terapêutico seja alcançado mais rapidamente. Por outro lado, quando após administração, uma substância é rapidamente excretada, é necessário prolongar o seu tempo de residência no organismo. Ainda que a velocidade de liberação não seja tão curta que condicione o efeito terapêutico, a possibilidade de controlar e prolongar a liberação leva a uma maior segurança (evita picos de concentração) e promove a adesão à terapêutica pela comodidade de espaçar as administrações [43].

A margem terapêutica de um fármaco situa-se entre a concentração mínima efetiva e a concentração mínima que produz toxicidade (figura 6). Assim, as condições ideais são aquelas que permitem que, após administração, uma substância atinja a concentração específica que é suficiente para produzir efeito terapêutico, mas não tão elevada que a torne tóxica. Numa grande parte dos casos, se permitirmos que o fármaco siga o seu percurso natural, esta concentração ideal manter-se-á por um período demasiado curto. Atingir a concentração mínima efetiva e manter esse valor por tanto tempo quanto o exigido para alcançar benefício terapêutico é o grande desafio no desenvolvimento farmacêutico [43].

Assim, em suma, as formas farmacêuticas de liberação modificada permitem [43]:

- Atingir e manter a concentração situada na janela terapêutica;
- Reduzir a frequência de administrações;
- Administrar novos agentes terapêuticos;

- Libertar o fármaco em horários específicos (libertação retardada ou pulsátil).

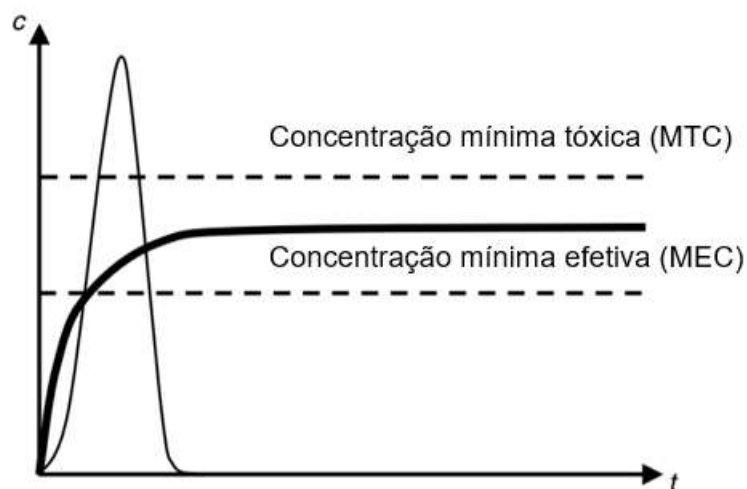


Figura 6: Representação esquemática da possível concentração de fármaco após administração oral de uma preparação de liberação imediata (linha fina) e de uma preparação de liberação prolongada (linha a negrito). Adaptado de [43][43].

Atualmente, existem sistemas de liberação vaginal que permitem, por exemplo, a liberação de fármaco durante um mês, numa cinética de ordem zero, como é o caso do anel vaginal anticoncepcional [30, 44].

Na tabela 2 estão resumidas as estratégias para o desenvolvimento de formas de liberação modificada para administração vaginal [5, 45]:

Tabela 2: Estratégias no desenvolvimento de preparações vaginais de liberação modificada.

Estratégia	Descrição
Sistema mucoadesivo	Aumento do tempo de permanência através da adesividade criada entre a preparação e a mucosa vaginal.
Anel vaginal	Sistema matricial em que a taxa de liberação do fármaco é controlada pela matriz polimérica.
Película vaginal	Esta forma farmacêutica não possui capacidade intrínseca de prolongar a liberação. Pelo contrário, após a inserção da película, há uma rápida dissolução da matriz. O prolongamento da liberação é conseguido através da sua associação a nanossistemas.
Nanossistema	Aumento do tempo de circulação do fármaco e vetorização para os recetores terapêuticos.

3. Nanossistemas

A vetorização de fármacos é um conceito que surge da necessidade de atuar no local certo, durante o período necessário, interagindo o menos possível com outros locais do organismo, daí resultando maior eficácia e menor toxicidade. A vetorização consiste no acoplamento de fármacos a outras moléculas ou na sua encapsulação em partículas que tenham a capacidade de alcançar os locais-alvo e que consigam proteger o fármaco, impedindo a sua degradação e, desta forma, possibilitando a sua permanência no organismo durante mais tempo. Para tal, a utilização de estruturas nanométricas tem-se mostrado preponderante, uma vez que estas apresentam dimensões da mesma ordem de grandeza dos componentes das células, facilitam a interação com recetores celulares e, conseqüentemente, a obtenção de melhores resultados terapêuticos [46, 47].

No corpo humano os componentes das células têm um tamanho nanométrico e este é o principal motivo pelo qual as nanopartículas são tão interessantes no campo terapêutico. Tendo a mesma escala de grandeza, as nanopartículas de fármaco podem efetivamente competir com as substâncias endógenas e interagir com novos alvos terapêuticos. Além disso, o tamanho nanométrico promove um tempo de circulação prolongado, porque partículas deste tamanho são mais facilmente incorporadas dentro das células, ao passo que um sistema maior, nas mesmas condições, seria rapidamente excluído ou eliminado do organismo pelas células do sistema imunológico [46, 48].


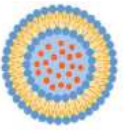
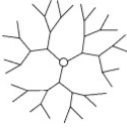

De modo geral, os nanossistemas são sistemas coloidais com tamanho inferior a 1 μm . O tamanho nanométrico promove a biodisponibilidade dos fármacos e permite obter um elevado tempo de permanência no organismo, tempo esse que pode ser aumentado através da adição de cadeias de polímeros, como por exemplo, o PEG (processo conhecido como peguilação) que dificultam o reconhecimento dos nanossistemas pelo sistema mononuclear fagocitário. Assim, a utilização de nanossistemas pode proporcionar [28, 47]:

- A libertação prolongada dos fármacos;
- A sua vectorização para os locais-alvo da terapêutica;
- A melhor distribuição dos fármacos nas células e nos tecidos;
- A proteção dos fármacos da degradação;
- O aumento da eficácia dos tratamentos.

Diferentes tipos de nanossistemas (tabelas 3 e 4) têm sido estudados para melhorar a biodisponibilidade dos fármacos administrados pela via vaginal, como lipossomas,

nanopartículas lipídicas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, entre outros. Em todos os casos, o fármaco pode estar disperso, dissolvido ou quimicamente ligado ao nanossistema [47].

Tabela 3: Descrição de alguns tipos de nanossistemas [47, 49-52].

Nanossistema	Descrição	Representação esquemática
Nanopartículas lipídicas *	<ul style="list-style-type: none"> Partículas esféricas de tamanho nanométrico, sólidas à temperatura ambiente e corporal. Constituídas por um lípido sólido (SLN) ou por misturas de lípidos sólidos e líquidos (NLC) e estabilizadas por agentes tensioativos. 	
Lipossomas	<ul style="list-style-type: none"> Estruturas vesiculares formadas por moléculas anfifílicas. 	
Dendrímeros	<ul style="list-style-type: none"> Macromoléculas poliméricas com estrutura tridimensional ramificada. Podem veicular fármacos no núcleo, ramificações ou superfície. Obtidas por síntese química a partir de diferentes polímeros. 	
Nanopartículas poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> Partículas de origem polimérica, biodegradáveis e biocompatíveis. Estrutura pode ser a de uma nanocápsula (fármaco no núcleo rodeado por cápsula polimérica) ou de uma nanoesfera (fármaco homogeneamente disperso ou dissolvido na matriz). 	 Nanoesfera Nanocápsula
Nanopartículas inorgânicas	<ul style="list-style-type: none"> Resultam de alterações da superfície de óxidos inorgânicos, como óxidos de ferro, ouro, prata ou sílica. Geralmente com tamanhos abaixo dos 20 nm. 	

*Nanopartículas de lípidos sólidos - SLN e vetores lipídicos nanoestruturados - NLC

Tabela 4: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de nanossistemas [47, 49-53].

Nanossistema	Vantagens	Desvantagens
Nanopartículas lipídicas*	<ul style="list-style-type: none"> - Matriz sólida permite a proteção e libertação prolongada dos fármacos. - Métodos de preparação simples e reprodutíveis à escala industrial. - Biocompatibilidade. - Produção pouco dispendiosa. - Baixa toxicidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Natureza líquida das preparações dificulta a sua retenção quando considerada a administração vaginal.
Lipossomas	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatíveis. - Possibilidade de produzir lipossomas mucoadesivos. - Possibilidade de produzir lipossomas deformáveis, que atravessam poros de dimensões inferiores às suas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Natureza líquida das preparações dificulta a sua retenção quando considerada a administração vaginal. - Eficácia de incorporação limitada. - Produção dispendiosa. - Pouca estabilidade ao longo do tempo.
Dendrímeros	<ul style="list-style-type: none"> - Podem funcionar como vetores ou podem ser sintetizados com efeito terapêutico intrínseco. - Possibilidade de controlar a síntese: diferentes tamanhos, formas e propriedades. - Tamanhos pequenos permitem elevado tempo de circulação. - Interessantes para veicular ácidos nucleicos para o núcleo das células-alvo da terapêutica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Processo de síntese complexo e de difícil reprodutibilidade.
Nanopartículas Poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de efetuar modificações da superfície para facilitar o direcionamento ou prolongar o tempo de permanência na circulação geral. - Propriedades mucoadesivas ou mucopenetrantes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menos biocompatíveis.

Nanopartículas inorgânicas	- Efeito terapêutico intrínseco.	- Toxicidade; - Imunogenicidade.
----------------------------	----------------------------------	-------------------------------------

**Nanopartículas de lípidos sólidos - SLN e vetores lipídicos nanoestruturados - NLC*

3.2. Nanopartículas lipídicas

Os sistemas lipídicos são estudados há vários anos como possíveis transportadores de fármacos, especialmente interessantes para aqueles com menor hidrossolubilidade [53, 54, 55]. A grande vantagem destes vetores lipídicos em relação aos estudados até ao momento assenta no facto de a mobilidade de um fármaco num lípido sólido ser muito mais baixa, quando comparada com a sua mobilidade num lípido líquido, o que se torna particularmente interessante quando se pretende uma libertação retardada [48, 49, 55-57].

As nanopartículas de lípidos sólidos (*solid lipid nanoparticles* – SLN) surgiram em 1991 como uma vantajosa alternativa em relação aos outros sistemas que estavam a ser mais estudados nessa altura, como as emulsões, os lipossomas e as nanopartículas poliméricas. As SLN, compostas por lípidos sólidos à temperatura ambiente e tensioativos, têm as mesmas vantagens dos restantes sistemas coloidais, mas conseguem superar as limitações mais importantes [57,58]. Este tipo de nanopartículas também promove a biodisponibilidade, permitindo um direccionamento do fármaco e o controlo da sua libertação, mas, em geral, as SLN têm uma estabilidade superior e os seus métodos de produção possibilitam uma produção em larga escala. Os métodos de produção das SLN são reprodutíveis, económicos e garantem qualidade dos produtos resultantes.

Comparadas com os transportadores coloidais tradicionais, as SLN apresentam as seguintes vantagens [48, 56, 58-61]:

- Produção menos dispendiosa que a dos lipossomas.
- Mais estabilidade (especialmente quando comparadas com as nanoemulsões).
- Melhor perfil de segurança quando comparadas com as nanopartículas poliméricas.

As SLN também ajudam a proteger os fármacos encapsulados contra a degradação, promovendo a estabilidade e prolongando o tempo de circulação do fármaco no organismo [48, 59, 62].

Apesar das inúmeras vantagens, as SLN também apresentam algumas limitações [48,60]:

- A solubilidade do fármaco no lípido sólido compromete a capacidade de carga.
- Na fase de arrefecimento, a cristalização do lípido para a sua forma estável β pode levar à saída de fármaco do interior das nanopartículas, o que compromete a estabilidade do sistema durante o armazenamento.

3.2.1. Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC)

Os vetores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers - NLC*) foram desenvolvidos no sentido de melhorar alguns aspetos das SLN, como a capacidade de carga e a eficácia de encapsulação. O princípio dos NLC reside no facto deste tipo de transportador ser composto por uma mistura de um lípido sólido com um lípido líquido. Ao contrário do que acontece com as SLN em que ocorre a cristalização do lípido sólido e a matriz resultante não deixa muito espaço para que as moléculas de fármaco se acomodem, os componentes dos NLC são fisicamente diferentes e, por isso, não se dá uma cristalização perfeita, produzindo-se uma matriz desorganizada que tem muito mais espaço para acomodar as moléculas de fármaco (Figura 7) [61-65].

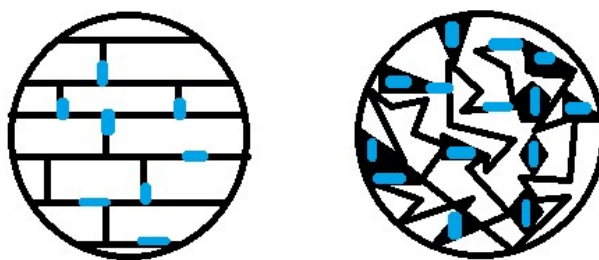


Figura 7: Representação da estrutura interna cristalina das SLN (esquerda) em oposição à estrutura interna amorfa dos NLC (direita) (adaptado de [65,66]).

4. Progesterona

A progesterona (figura 8) é um fármaco lipófilo utilizado para substituir a progesterona endógena nos casos de irregularidade menstrual, infertilidade e risco de aborto. Este fármaco induz a fase secretora do ciclo menstrual, converte o endométrio proliferativo em endométrio secretor, permitindo a implantação do embrião e a manutenção da gravidez [66,67]. Durante a gestação, é responsável por reduzir a contratilidade do útero e pelo desenvolvimento mamário [67, 68, 69].

Quando administrada por via oral, a progesterona sofre uma extensa metabolização hepática (efeito de primeira passagem), o que torna a sua biodisponibilidade muito baixa. Além disso, os metabolitos resultantes da administração oral têm um marcado efeito sedativo [36, 69-71]. A administração intramuscular de progesterona é inconveniente por não permitir a autoadministração e por ser dolorosa, o que põe em causa o cumprimento dos tratamentos com este fármaco. Além disso, alguns estudos que comparam a administração intramuscular com a administração vaginal concluem que a última permite obter maiores níveis do fármaco no endométrio [71-74]. De facto, o efeito da primeira passagem uterina está documentado por vários autores que concluem que a administração vaginal de progesterona leva a uma absorção preferencial do fármaco nos tecidos alvo, com níveis séricos abaixo do que seria esperado para se obter benefício terapêutico, como descrito no subcapítulo 2.2.3. [2, 73]. De modo geral, a administração vaginal de progesterona apresenta poucos efeitos secundários, permite a autoadministração, é altamente eficaz e, por isso, é atualmente a via mais usada para a administração deste fármaco [75-78].

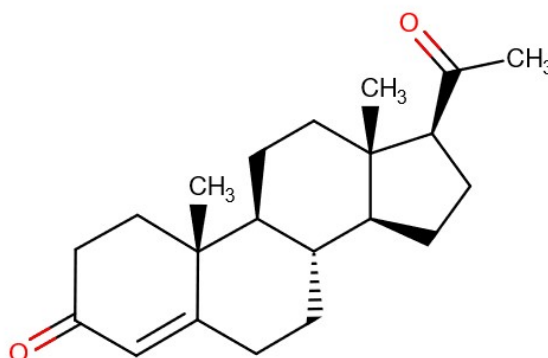


Figura 8: Estrutura química da progesterona [79].

Neste momento, em Portugal, a progesterona está disponível sob a forma de cápsulas moles que podem ser administradas por via vaginal ou oral (tabela 5), embora para mulheres grávidas esteja indicada apenas a via vaginal [3].

Tabela 5: Medicamentos com progesterona comercializados em Portugal [80].

Nome comercial	Dose	Forma farmacêutica
Progeffik® Utrogestan®	100 mg	Cápsula mole
Progeffik®	200 mg	Cápsula mole

A administração vaginal está indicada nos seguintes casos, segundo o resumo das características do medicamento Progeffik®[3]:

- Substituição da progesterona em mulheres ovarioprivadas em situação de deficiência total de progesterona (programas de doação de ovócitos);
- Suplemento na fase lútea no decurso de ciclos de fecundação *in vitro*;
- Suplemento na fase lútea no curso de ciclos espontâneos ou induzidos, no caso da hipofertilidade ou esterilidade primária ou secundária nomeadamente por disovulação;
- No caso de ameaça de aborto ou de prevenção de abortos de repetição por insuficiência lútea, até à 12ª semana de amenorreia.

Em todas as outras indicações da progesterona, a via vaginal representa uma alternativa à via oral em caso de:

- Efeitos secundários devidos à progesterona (sonolência após absorção por via oral);
- Contra-indicações da via oral (hepatopatia);

As indicações da progesterona oral são perturbações associadas ao défice de progesterona, particularmente:

- Síndrome pré-menstrual;
- Irregularidades menstruais por disovulação ou anovulação;
- Mastopatias benignas;
- Pré-menopausa;
- Tratamento de substituição da menopausa (como complemento do tratamento estrogénico). “

Noutros países a progesterona está comercializada para as mesmas indicações e está disponível em diferentes formas farmacêuticas.

A tabela 6 apresenta exemplos de diferentes preparações vaginais que contêm progesterona comercializadas na Europa [81].

Tabela 6: Exemplos de preparações para uso vaginal contendo progesterona aprovadas na União Europeia.

Forma farmacêutica	Exemplos
Óvulo	Cyclogest®
Cápsula mole	Progeffik® Utrogestan® Progesteron Kade/Besins®
Gel vaginal	Crinone-Gel®
Comprimido vaginal	Lutinus®

A tabela 7 mostra uma lista de preparações vaginais que contêm progesterona, aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*).

Tabela 7: Preparações vaginais com progesterona aprovadas pela FDA [79].

Nome comercial	Forma farmacêutica	Dose
Crinone®	Gel	90 mg/1,125g
Prochieve®	Gel	45 mg/1,125g
Endometrin®	Inserto	100 mg
Crinone®	Gel	45 mg/1,125g
Endometrin®	Inserto	100 mg/1
Crinone®	Gel	8 %
Utrogestan®	Cápsula	200 mg
Prochieve®	Gel	90 mg/1,125g

Modificar a libertação de um fármaco é um processo útil para obter uma concentração mais estável, promover a eficácia, diminuir efeitos secundários e permitir administrações menos frequentes, o que aumenta a adesão à terapêutica [43].

No tratamento com progesterona, a obtenção de uma concentração estável é particularmente crítica, uma vez que a manutenção de determinados níveis é crucial para a viabilidade da gravidez. Além disso, a administração vaginal é particularmente difícil de cumprir uma vez que requer privacidade. O momento preferível para a administração de uma preparação vaginal é imediatamente antes de deitar, devido à expulsão de fármaco que pode ocorrer e que é, obviamente, mais notória na posição de pé [41, 82].

Em Portugal, as formas farmacêuticas vaginais de progesterona comercializadas apresentam um perfil de libertação convencional, o que implica uma frequência de administração elevada (2 a 3 vezes por dia). A possibilidade de desenvolver uma forma

vaginal de liberação prolongada permitiria aumentar a adesão à terapêutica e a eficácia dos tratamentos, diminuindo a frequência de administrações e, eventualmente, aumentando a biodisponibilidade do fármaco.

Parte II – Experimental

1. Matérias-primas

Para a elaboração do trabalho experimental foram utilizadas as matérias-primas apresentadas nas tabelas 8, 9 e 10:

Tabela 8: Matérias-primas utilizadas na preparação da formulação.

Matéria-prima	Fornecedor
Behenato de glicerilo (Compritol ATO 888®)	Gattefossé (França)
Triglicerídeos de cadeia média do ácido cáprico e caprílico (Miglyol 812®)	Acofarma (Portugal)
Cetrimida	José M. Vaz Pereira, SA (Portugal)
Progesterona	Sigma (Alemanha)
Polissorbato 80 (Tween 80®)	Acofarma (Espanha)
Água ultrapura	Direct-Q® Systems, (Alemanha) Ultrapure Merck Water Millipore
Mistura sólida de triglicerídeos (Witepsol H 32®)	Oxi-med (Barcelona)

Tabela 9: : Matérias-primas utilizadas na preparação dos meios de dissolução.

Matéria-prima	Fornecedor
Laurilssulfato de sódio	Acofarma (Espanha)
Ácido clorídrico	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Cloreto de sódio	Acofarma (Espanha)
Ácido acético	Pronalab (Portugal)
Glucose	Himedia (Alemanha)
Glicerol	Fragon (Espanha)
Hidróxido de cálcio	Merck (Alemanha)
Ureia	Acofarma (Espanha)
Hidróxido de potássio	Acofarma (Espanha)
Albumina bovina sérica	Sigma (Alemanha)
Ácido láctico	Acofarma (Espanha)

Tabela 10: Matérias-primas utilizadas nos ensaios de biocompatibilidade.

Matéria-prima	Fornecedor
<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i> (DMEM) com GlutaMAX™ e 4,5g/L glucose	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Soro bovino fetal (FBS)	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Tripsina 25%/ EDTA 1mM	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Solução de antibiótico (10,000 U/mL penicilina, 10,000 µg/mL estreptomicina)	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Solução salina de <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> HBSS (+/+) (com cálcio e magnésio)	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Solução salina de <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> HBSS (-/-) (sem cálcio e magnésio)	Thermo Fisher Scientific (EUA)
Solução de vermelho neutro	Sigma (Alemanha)
Resazurina	Sigma (Alemanha)
Triton™ X-100	Sigma (Alemanha)

Na tabela 11 encontra-se uma breve descrição das principais características das matérias-primas utilizadas na preparação dos óvulos contendo progesterona encapsulada nos NLC.

Tabela 11: Principais características das matérias-primas utilizadas.

Matéria-prima	Função	Caraterísticas principais
Compritol ATO 888 [®] (behenato de glicerilo)	Lípido sólido	Lípido utilizado como lubrificante e viscosificante. Ponto de fusão entre 65 e 77°C.
Miglyol 812 [®] (triglicéridos de cadeia média dos ácidos cáprico e caprílico)	Lípido líquido	Mistura de triglicéridos utilizada como agente suspensor e emulsificante. Melhor estabilidade quando comparado com outros triglicéridos, como os de cadeia longa.
Progesterona	Fármaco	Hormona responsável pela regulação do sistema reprodutor feminino.
Tween 80 [®] (Polissorbato 80)	Tensioativo	Tensioativo não iónico. Agente dispersante, solubilizante e emulsificante.
Cetrimida	Tensioativo e conservante	Ação antimicrobiana. Incompatibilidade com metais.
Witepsol H32 (Mistura de triglicéridos)	Base lipófila para óvulos e supositórios	Pequeno intervalo entre a temperatura de solidificação e a temperatura de liquefação. Ponto de fusão entre 31 e 33 °C.

2. Métodos

2.1. Desenvolvimento e preparação da formulação de NLC

2.1.1. Seleção dos excipientes

Para preparar a dispersão dos NLC foram selecionados os excipientes habitualmente usados na preparação de nanopartículas lipídicas, ou seja, excipientes considerados seguros ou excipientes *GRAS* (*generally recognized as safe*). A dispersão de NLC preparada é composta por cerca de 10 % de fase lipídica, que contém o fármaco e os lípidos, e o restante corresponde à fase aquosa, que contém água e dois tensioativos [83].

2.1.2. Ensaios de solubilidade

Depois de uma pré-seleção dos componentes da formulação, a progesterona foi submetida a testes de solubilidade com os lípidos usados para preparar os NLC [57, 84, 85]. No caso do lípido sólido, os estudos consistiram na adição de diferentes massas (0,05, 0,1, 0,2, 0,25 e 0,3 g) de fármaco, perfazendo um total de 1 g. As misturas foram de seguida colocadas numa estufa a 80 °C, durante uma hora. A solubilização da progesterona foi verificada em intervalos de 15 minutos através da observação da existência ou ausência de cristais de fármaco.

Para o estudo da solubilidade da progesterona no lípido líquido foi efetuada a adição de diferentes massas do fármaco (0,05, 0,1, 0,2, 0,25 e 0,3 g) a 1 g de lípido, seguida de agitação vigorosa e observação para avaliar a presença ou ausência de cristais.

2.1.3. Otimização

Para otimizar a formulação, foram testadas diferentes quantidades das matérias-primas na preparação da dispersão e foi analisado o efeito das diferentes composições no tamanho de partícula obtido. As quantidades e composições testadas (tabela 12) foram escolhidas com base na revisão da literatura científica, nos estudos de solubilidade acima descritos e em estudos de compatibilidade entre lípido sólido e lípido líquido [86,87].

A compatibilidade entre os lípidos selecionados foi avaliada através de testes que incluíam a mistura dos dois componentes em diferentes proporções (lípidos sólido: líquido - 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 e 90:10) e a averiguação da miscibilidade quando aquecidos a 80°C.

Tabela 12: Composição das diferentes fórmulas testadas.

Composição (%m/m)	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3
Compritol ATO 888®	6,65	-	5,7
Miglyol 812®	2,85	-	3,8
Progesterona	0,5	0,5	0,5
Cetrimida	0,5	0,5	0,5
Tween 80	2,5	2,5	3
Monoestearina	-	3,42	-
Ácido esteárico	-	5,13	-
Ácido oleico	-	0,475	-
Água	87	87	86,5

2.1.4. Preparação da dispersão de NLC

A preparação dos NLC foi efetuada pela técnica dos ultrassons (figura 9) [88] [88,89]. As matérias-primas da fase oleosa e da fase aquosa foram pesadas e colocadas em dois gobelés (um para cada fase). Seguidamente, foram aquecidos em banho a 5-10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido (65 a 77°C). Quando o lípido fundiu e a fase aquosa estava à mesma temperatura, esta última foi adicionada à fase oleosa e misturada a alta velocidade, com o auxílio de um Ultra-turrax®, durante 5 minutos a 13600 rpm. De seguida, a emulsão óleo-em-água (O/A) obtida foi imediatamente submetida à energia dos ultrassons, através de uma sonda de sonicação, durante 15 minutos a uma amplitude de 70%. Por fim, a nanoemulsão O/A obtida foi acondicionada em vials de vidro e colocada em gelo para arrefecer até à temperatura ambiente [88][88].



Figura 9: Representação esquemática do método de preparação da dispersão de NLC pela técnica dos ultrassons.

2.1.5. Caracterização da formulação de NLC

2.1.5.1. Tamanho de partícula

No caso da formulação dos NLC, a análise do tamanho de partícula obtido é crucial para confirmar a obtenção de partículas com tamanhos nanométrico. Os NLC não são nanopartículas perfeitamente esféricas, o que torna o processo de análise de tamanhos difícil, uma vez que não existe um valor único para o diâmetro de uma partícula irregular. Desta forma, os instrumentos de medição de partículas medem o tamanho inferindo a medida do que seria uma esfera equivalente [89,90]. O método de difração a laser é um dos métodos mais completos e adequados à medição de partículas, possibilitando que os dados de difração sejam correspondentes à amostra no seu todo e dando, por isso, uma noção muito real da distribuição dos tamanhos. O princípio da técnica de difração a laser assenta no facto de que quando uma luz incide num objeto, o ângulo resultante da dispersão da luz é inversamente proporcional ao tamanho da partícula [90,91].

O Mastersizer 3000® foi o aparelho usado para medir os tamanhos dos NLC, sendo capaz de medir partículas cujo tamanho se situe entre 0,01 e 3500 μm , através da técnica de difração a laser. Este aparelho rege-se pelo princípio de medição da teoria de Mie,

sendo necessário que se conheçam as propriedades óticas da amostra e do dispersante. Os resultados do tamanho de partícula são apresentados em percentis, obtendo-se um volume de distribuição de 10, 50 e 90 % (D_{10} , D_{50} e D_{90}). O valor de D_{90} , por exemplo, indica o valor máximo de diâmetro das partículas de 90 % da amostra analisada. As condições da medição do tamanho de partícula no aparelho Mastersizer 3000® estão descritas na tabela 13:

Tabela 13: Condições usadas para a medição do tamanho dos NLC.

Dispersante	Índice de refração do dispersante	Índice de refração da partícula	Índice de absorção da partícula
Água ultrapura	1,33	1,46	0,001

Para efetuar uma medição, a amostra foi adicionada ao meio de dispersão até cerca de 6 % de obscuração. Os resultados do tamanho de partícula (D_{10} , D_{50} e D_{90}) foram calculados a partir da média de 5 medições. Foram consideradas apenas as medições com um residual próximo dos 2%.

2.1.5.2. Eficácia de encapsulação

Para avaliar a eficácia de encapsulação da progesterona nos NLC foram preparadas soluções-padrão com diferentes concentrações de fármaco dissolvido em etanol a 96°, a partir de uma solução-mãe. A absorvência dos padrões foi medida a 241 nm num espectrofotômetro UV/Visível [9].

A dispersão de NLC foi submetida a um processo de centrifugação e o filtrado obtido foi doseado e analisado mediante os resultados da curva de calibração. Este método de determinação da eficácia de encapsulação é indireto, uma vez que para calcular a quantidade de fármaco que ficou encapsulada, o doseamento é feito na porção de dispersão em que este não está encapsulado (filtrado) e o valor obtido é subtraído à totalidade de fármaco utilizado na formulação. Para tal, 1000 μ L da dispersão aquosa de NLC foram diluídos em 4000 μ L de água ultrapura. Desses 5000 μ L, 4000 μ L foram retirados para um tubo de centrifuga Ultracell – 10K (Amicon®), sendo a amostra centrifugada a 3500 rpm, durante 1 hora. O filtrado resultante foi dissolvido (1:1) em etanol 96°, sendo de seguida medida a sua absorvência e a partir da qual se calculou a quantidade

de progesterona na amostra. De seguida, foi calculada a eficácia de encapsulação através da seguinte equação:

$$\text{Eficácia de encapsulação (\%)} = \frac{Q \text{ total de fármaco} - Q \text{ fármaco livre}}{Q \text{ total de fármaco}} \times 100$$

2.1.5.3. Estabilidade

A estabilidade da formulação foi avaliada através da medição do tamanho de partícula das dispersões de NLC armazenadas no frigorífico (2 - 8°C), 30 dias após a produção.

2.1.6. Estudos de biocompatibilidade

Para avaliar a biocompatibilidade da dispersão dos NLC foram realizados ensaios de citotoxicidade através de dois métodos: o ensaio de incorporação do vermelho neutro (*Neutral Red* - NR) e o ensaio da redução da resazurina. Foram testadas duas dispersões: NLC com progesterona (NLC PRG) e NLC sem fármaco (NLC placebo), com a finalidade de poder comparar os resultados e associá-los à presença ou ausência do fármaco.

A citotoxicidade das dispersões NLC PRG e NLC placebo foi avaliada em queratinócitos humanos imortalizados, as células HaCaT. As células HaCat foram rotineiramente cultivadas em frascos de 75 cm², usando meio DMEM com 4,5 g/L de glucose e GlutaMAX™, suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico. As células foram mantidas a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5% CO₂ - 95 % de ar, e o meio de cultura mudado de dois em dois dias. As culturas celulares foram passadas semanalmente por tripsinização (tripsina 0,25%/EDTA 1mM). A citotoxicidade das dispersões NLC PRG e NLC placebo foi avaliada, 24 h após exposição, pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR) e pelo ensaio de redução da resazurina. As células usadas em todas as experiências realizadas encontravam-se entre as passagens 42 e 52.

2.1.6.1. Ensaio de incorporação do vermelho neutro

O ensaio de incorporação do NR baseia-se na capacidade de as células viáveis incorporarem o corante NR nos lisossomas, fornecendo, assim, uma estimativa do número de células viáveis em cultura. Para o efeito, as células HaCat foram semeadas em placas

de 96 poços a uma densidade de 20000 células/poço e 24 horas após sementeira expostas às dispersões de NLC PRG e NLC placebo (0-100 µg/mL) em meio de cultura fresco. Vinte e quatro horas após exposição, o meio de cultura foi removido e as células incubadas com NR (50 µg/mL, preparado em meio de cultura fresco), a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5% CO₂ - 95 % de ar, durante 90 minutos. Terminado o período de incubação com o NR, o meio de cultura foi removido, e o corante incorporado pelas células viáveis foi extraído com solução de lise (álcool etílico absoluto/água destilada (1:1) com 5% de ácido acético). A absorvência foi posteriormente lida a 540 nm, num leitor de placas (PowerWave-X, BioTek Instruments). A percentagem de incorporação de NR relativamente às células controlo (0 µg/mL) foi utilizada como medida de citotoxicidade. Foram realizadas duas experiências independentes, em triplicado. Em todas as experiências, o Triton™ X-100 (1%) foi usado como controlo positivo.

2.1.6.2. Ensaio de redução da resazurina

O ensaio de redução da resazurina é usado para avaliar a capacidade metabólica das células em cultura e baseia-se na capacidade das enzimas celulares em converter a resazurina azul em resorufina rosa. Para o efeito, as células HaCat foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 20000 células/poço e, 24 horas após sementeira, expostas às dispersões NLC PRG e NLC placebo (0-100 µg/mL) em meio de cultura fresco. Vinte e quatro horas após exposição, o meio de cultura foi removido, seguindo-se a adição de meio de cultura fresco contendo 10 µg/mL de resazurina. As células foram posteriormente incubadas a 37 ° C, numa atmosfera humidificada de 5% CO₂ - 95% de ar, durante 90 minutos. No final do período de incubação, a fluorescência da resorufina formada foi medida a comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm, num leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments). A citotoxicidade foi avaliada pela percentagem de redução da resazurina relativamente às células de controlo (0 µg/mL). Foram realizadas duas experiências independentes, em triplicado. Em todas as experiências, o Triton™ X-100 (1%) foi usado como controlo positivo.

2.1.6.3. Análise estatística

O GraphPad Prism 6 para Windows foi usado para realizar as análises estatísticas. As comparações estatísticas foram efetuadas usando Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparison post hoc test*. Na secção dos resultados (3.1.5.) são apresentados os gráficos de resultados. Em cada um dos gráficos, a respetiva legenda contém a análise

estatística realizada. Em todos os casos, valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

2.2. Desenvolvimento e preparação dos óvulos contendo NLC com progesterona

2.2.1. Seleção do excipiente e otimização da fórmula

A preparação de óvulos contendo a dispersão aquosa de NLC envolveu um cuidadoso estudo da técnica de incorporação da dispersão, dos parâmetros a adotar (temperatura de ambos os componentes, homogeneização, tempo de solidificação). Para escolher o excipiente usado na produção dos óvulos foram testadas diferentes bases, misturadas com diferentes proporções da dispersão dos NLC (23 a 45,5 %) e avaliada a sua interferência na capacidade de solidificação dos óvulos. Os excipientes testados foram uma mistura de PEG 4000 e 1500 (numa proporção de 30/70%, respetivamente), o Softisan® 154 e o Witepsol® H32.

2.2.2. Preparação dos óvulos

Os óvulos foram preparados pelo método de fusão, aquecendo o excipiente a 38 °C, ou seja, acima do seu ponto de fusão e seguidamente foi adicionada lentamente a dispersão aquosa, com agitação. A mistura obtida foi vertida em moldes metálicos (figura 10), seguindo-se o arrefecimento à temperatura ambiente e a extração dos óvulos finais dos moldes.

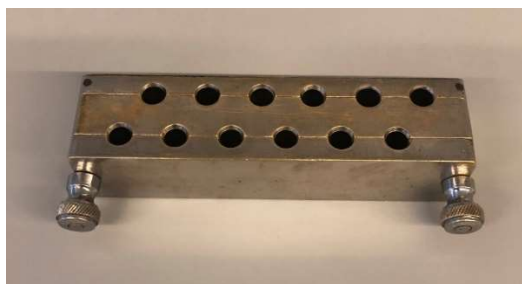


Figura 10: Moldes metálicos para óvulos.

2.2.2.1. Calibração dos moldes

De modo a determinar a massa da mistura de fármaco e excipiente que pode ser acomodada em cada molde, procedeu-se à calibração dos moldes. Para tal foram preparados 10 óvulos constituídos apenas por excipiente e foi determinada a sua massa individual, a massa média e o desvio-padrão [10].

2.2.2.2. Cálculo do fator de deslocamento

O fator de deslocamento pode ser definido como a massa de excipiente que é deslocada (ou substituída) pela adição da(s) substância(s) ativa(s). Mais concretamente, o fator de deslocamento define-se como a massa de excipiente, em gramas, que corresponde ao volume ocupado por um grama de fármaco [6]. Neste caso, a massa de fármaco corresponde à massa de dispersão de NLC.

Para calcular o fator de deslocamento foram consideradas as massas determinadas individualmente de 4 óvulos constituídos apenas por excipiente e de 4 óvulos constituídos por excipiente e dispersão aquosa na proporção estipulada na fase de otimização da fórmula. O fator de deslocamento foi determinado pela fórmula:

$$f = \frac{(Pe - 0,7 \times Pp)}{(0,3 \times Pp)}$$

f = fator de deslocamento

Pe = massa do óvulo constituído apenas por excipiente

Pp = massa do óvulo com fármaco (excipiente e dispersão de NLC)

Depois de determinado o fator de deslocamento foi calculada a quantidade de excipiente a utilizar em cada óvulo, através da seguinte fórmula:

$$\text{Massa de excipiente} = Pp - (f \times \text{massa de fármaco})$$

2.2.3. Ensaio de controlo da qualidade dos óvulos de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9

Os ensaios da Farmacopeia exigidos para os óvulos, apresentados na tabela 14, estão descritos na monografia geral das preparações vaginais e na monografia específica dos óvulos.

Tabela 14: Ensaio da Farmacopeia Portuguesa 9 para o controlo da qualidade dos óvulos [9][9].

Monografia geral das preparações vaginais	
Uniformidade das preparações unitárias	Variação de massa (preparações sólidas em recipiente unidose do tipo mono-composto)
Uniformidade de teor	Dispensado (aplica-se ensaio de variação de massa)
Uniformidade de massa	Dispensado (aplica-se ensaio de variação de massa)
Dissolução	Indicado
Ensaio dos óvulos	
Desagregação	Dispensado (no caso de ser feito um ensaio de dissolução)

2.2.3.1. Ensaio da dissolução

Um ensaio de dissolução é exigido sempre que o fármaco se apresente na forma sólida. Tal exigência deve-se ao facto de que apenas as substâncias dissolvidas conseguem atravessar as membranas biológicas [91].

Para o estudo de libertação foram testadas diferentes condições de ensaios de dissolução. O estudo foi efetuado com a dispersão de NLC contendo fármaco (NLC PRG), os óvulos contendo NLC e fármaco encapsulado (ONLC PRG), os óvulos apenas com progesterona (OPRG) e uma forma comercial de progesterona vaginal Progeffik® (PFK). Os óvulos contendo apenas progesterona foram preparados pesando a mesma quantidade de progesterona (13 mg) e adicionando com agitação à base aquecida a cerca de 40 °C. Depois de homogeneizada a mistura, esta foi vertida nos moldes dos óvulos.

1º Ensaio

O primeiro ensaio foi conduzido apenas para a formulação dos óvulos com progesterona (OPRG) e do Progeffik® (PFK) (tabela 17) nas condições descritas na tabela 16. Neste ensaio o meio de dissolução foi colocado em gobelés de 250 mL numa placa magnética com poços múltiplos de agitação (figura 11). Sobre esta placa foi colocado um recipiente de acrílico contendo um banho termostaticado, que garantiu a manutenção da temperatura a 37°C [92].

Para mimetizar as condições *in vivo*, o 1º ensaio de dissolução foi executado num meio que pretendeu simular o fluido vaginal humano. A composição do fluido vaginal simulado (FVS) preparado foi baseada na revisão da literatura científica e corresponde ao modelo proposto por Owen e Katz e está descrita na tabela 15 [22, 93-96]:

Tabela 15: Composição do fluido vaginal simulado (FVS) [22, 93-96].

Fluido vaginal (pH 4,2)	
Composição	Massa (g/L)
Cloreto de sódio	3,510
Hidróxido de potássio	1,400
Hidróxido de cálcio	0,222
Albumina (BSA)	0,018
Ácido láctico	2,000
Ácido acético	1,000
Glicerol	0,160
Ureia	0,400
Glucose	5,000
Água	q.b.p. 1L

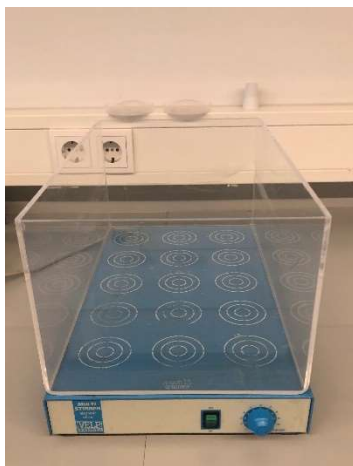


Figura 11: Placa magnética com poços múltiplos de agitação.

Tabela 16: Condições do primeiro ensaio de dissolução.

Temperatura	37°C
Volume do meio de dissolução	250 mL
Composição do meio de dissolução	FVS
Duração do estudo	24 h

As concentrações de progesterona no meio de dissolução de cada formulação analisada foram as seguintes:

Tabela 17: Concentração de progesterona no meio de dissolução nas diferentes formulações.

Formulação	Quantidade analisada	Massa de progesterona	Concentração de progesterona* no meio de dissolução (V=250 mL)
OPRG	1 unidade	13 mg	0,052 mg/mL
PFK	1 unidade	100 mg	0,4 mg/mL

* Considerando a dissolução total da progesterona no meio de dissolução.

Cada formulação foi estudada em triplicado, sendo que no total foram recolhidas amostras de 6 recipientes. Em intervalos de tempo pré-determinados (inicialmente aos 30 minutos e 1 hora de ensaio, depois de hora em hora até às 4 horas de ensaio e, a partir daí, de 2 em 2 horas) foi recolhido 1 mL do meio de dissolução e foi repostado o mesmo volume de novo meio de dissolução. A amostra retirada foi filtrada em filtro de seringa de 0,45 µm e diluída em etanol 96 % (1:1) para posteriormente se proceder à medição da absorvência.

2º Ensaio

O segundo ensaio de dissolução foi efetuado no aparelho de dissolução com pá agitadora *Sotax AT 7* (figura 12), nas condições descritas na tabela 18. A técnica de recolha das amostras foi a mesma da efetuada no 1º ensaio.

Tabela 18: Condições do 2º ensaio de dissolução.

Temperatura	37°C
Volume do meio de dissolução	1000 mL
Velocidade de agitação	50 rpm
Composição do meio de dissolução	Água + 0,5% LSS (com adição de HCl até pH = 4,5)
Duração do estudo	24 h



Figura 12: Aparelho de dissolução com pá agitadora.

As formulações foram colocadas diretamente no meio de dissolução, à exceção da dispersão de NLC, que foi introduzida numa membrana de diálise (MWCO 3,5 kD). As formulações foram testadas nas quantidades indicadas na tabela 19.

Tabela 19: Concentração de progesterona no meio de dissolução nas diferentes formulações.

Formulação	Quantidade analisada	Massa de progesterona	Concentração de progesterona* no meio de dissolução (V=1000 mL)
NLC	10 mL*	50 mg	0,05 mg/mL
ONLC	1 unidade	13 mg	0,013 mg/mL
OP	1 unidade	13 mg	0,013 mg/mL
PFK	1 unidade	100 mg	0,1 mg/mL

* Considerando a dissolução total da progesterona no meio de dissolução.

** O volume de amostra colocado na membrana de diálise foi escolhido de tal forma que o volume do meio de dissolução fosse pelo menos 100 x o volume da amostra, como indicado pelo fabricante (Spectrumlabs).

A composição do meio de dissolução baseou-se em revisão da literatura científica, em recomendações da FDA e em testes de solubilidade efetuados em várias soluções tampão com tensoativo e progesterona. Estes testes são descritos em pormenor na secção 3.2.

3º Ensaio

Foi ainda efetuado um terceiro estudo, apenas para os óvulos (ONLC PRG e OPRG) que diferiu dos anteriores, uma vez que neste caso os óvulos foram previamente fundidos e a massa liquefeita foi colocada na membrana de diálise. Esta fusão prévia foi realizada uma vez que os óvulos não cabiam nas membranas de diálise disponíveis.

As condições do ensaio foram as mesmas do ensaio 2.

2.2.3.1.1. Comparação dos resultados com modelos cinéticos

A partir dos resultados obtidos, foi estabelecida uma relação com os modelos cinéticos de libertação de ordem zero (quantidade de fármaco libertada diretamente proporcional ao tempo decorrido), Higuchi (quantidade de fármaco libertada diretamente proporcional à raiz quadrada do tempo decorrido), e Korsmeyer-Peppas (comportamento anómalo, não Fickiano). O estudo da relação da libertação obtida com os modelos cinéticos foi realizado através do programa *Microsoft® Excel*.

2.2.3.2. Variação de massa

O ensaio de uniformidade de preparações unitárias (2.9.40) da Farmacopeia Portuguesa 9 prevê diferentes abordagens mediante a preparação a analisar. Estas abordagens incluem o ensaio de uniformidade de teor e o ensaio de variação de massa. Para o caso específico dos óvulos preparados, o ensaio adequado é o de variação de massa, uma vez que se trata de uma preparação sólida acondicionada em recipiente unidose e do tipo mono-composto. No caso desta especificação, independentemente da quantidade e proporção de substância ativa, o ensaio prescrito é o de variação de massa. Para efetuar este ensaio, foram consideradas 10 unidades, pesadas individualmente em balança analítica. Seguidamente, o teor de substância ativa foi determinado individualmente, tendo em conta a massa de cada unidade e o resultado do doseamento. Para efetuar o doseamento, cada unidade foi aquecida a cerca de 60 ° C em banho termostático. Seguiu-se a adição de 100 mL de etanol a 96 % com agitação. Desta solução foram retirados 5 mL e filtrados em filtro de 0,45 µm e depois diluídos em igual quantidade de etanol (1:1). A absorvência da solução foi medida e comparada com uma curva de calibração feita a partir de padrões com concentrações entre 0,005 e 0,04 mg/mL de progesterona. A partir dos valores obtidos do doseamento foi calculado o teor individual estimado (xi):

$$xi = wi \times \frac{A}{W}$$

E a partir da média dos valores de xi, foi calculado o valor de aceitação.

$$VA = |M - X| + ks$$

xi = teor individual estimado

A = teor em percentagem do valor indicado

wi = massa dos óvulos

W = média das massas dos óvulos

VA = valor de aceitação

M = valor de referência

X = média dos teores individuais

k = constante de aceitabilidade

s = desvio padrão

2.2.3.3. Uniformidade de massa

A uniformidade de massa foi avaliada numa amostra de 10 unidades de óvulos, através da determinação da massa individual, da média das massas e do desvio-padrão.

2.2.3.4. Características organoléticas e físicas

As características físicas dos óvulos foram analisadas por observação visual e análise sensorial dos óvulos obtidos.

A observação dos óvulos teve como objetivo o controlo organolético e permitiu:

- a caracterização do aspeto (homogeneidade, brilho, cor);
- a verificação da presença de fissuras, que se devem geralmente a um arrefecimento rápido.

As características relacionadas com a textura e capacidade de liquefação quando em contacto com o ambiente do local de administração (temperatura corporal 37°C) podem ser avaliadas através de um ensaio de desagregação.

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9, o ensaio de desagregação é satisfeito desde que:

- “a) a dissolução seja completa,
- b) os componentes dos supositórios ou óvulos estejam separados: os compostos lipídicos fundidos e reunidos à superfície da água, os pós insolúveis depositados no fundo e os compostos solúveis na forma dissolvida. Consoante o tipo de preparação, os componentes podem estar repartidos por um ou vários destes estados,
- c) se produza um amolecimento, acompanhado eventualmente de uma modificação do formato primitivo do supositório ou do óvulo, sem completa separação dos constituintes. O amolecimento é tal que o supositório ou o óvulo não contém qualquer núcleo que resista à pressão de uma vareta de vidro).

d) o invólucro de gelatina das cápsulas rectais e vaginais apresente uma rutura e comece a libertar o seu conteúdo. “

A Farmacopeia Portuguesa 9 refere a possibilidade de dispensar este ensaio caso seja recomendado o ensaio de dissolução. Nesse sentido, durante o ensaio de dissolução, foi verificado o estado dos óvulos ao fim de 30 e de 60 minutos.

2.2.3.5. Estabilidade

A estabilidade dos óvulos foi avaliada através da observação das características organolépticas como o aspeto (presença de fissuras, rugosidade), cor e odor, em diferentes momentos (dia de preparação e até dois meses após preparação). Para o efeito, os óvulos foram armazenados à temperatura ambiente ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e no frigorífico ($2 - 8^{\circ}\text{C}$).

3. Resultados e discussão

3.1. Desenvolvimento e preparação da formulação de NLC

3.1.1. Seleção dos excipientes

Do estudo da seleção dos excipientes para a formulação da dispersão de NLC foram considerados os apresentados na tabela 20.

Tabela 20: Matérias-primas consideradas para a formulação.

Fase lipídica	Lípidos sólidos	Compritol ATO 888 ® (behenato de glicerilo) Precirol ® (palmitoestearato de glicerilo) Monoestearina Ácido esteárico
	Lípidos líquidos	Miglyol 812 ® (Triglicerídeos de cadeia média do ácido cáprico e caprílico) Ácido oleico
Fase aquosa	Tensioativos	Tween 80 ® Cetrimida
	Conservantes	Cetrimida Cloroeto de benzalcónio

3.1.2. Ensaio de solubilidade

Os ensaios de solubilidade foram efetuados para selecionar a quantidade máxima de fármaco que é possível solubilizar nos lípidos (tabelas 21 e 22).

Tabela 21: Estudo da solubilidade da progesterona no lípido Compritol 888 ATO®.

Tempo em minutos	Progesterona % (m/m)				
	5 %	10%	20%	25%	30%
15	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+
45	-	+	+	+	+
60	-	-	+	+	+

(+) presença de cristais de fármaco; (-) ausência de cristais de fármaco

Tabela 22: Estudo da solubilidade da progesterona no Miglyol 812 ® e no ácido oleico.

Lípidos testados	Progesterona % (m/m)				
	5 %	10%	20%	25%	30%
Miglyol®	-	-	-	-	+
Ácido oleico	-	+	+	+	++

(+) presença de cristais de fármaco; (-) ausência de cristais de fármaco

3.1.3. Otimização

Mediante as informações obtidas da revisão da literatura científica e dos estudos de solubilidade e miscibilidade foram selecionados os excipientes adequados e foram desenvolvidas 3 formulações.

Os testes de miscibilidade dos lípidos Compritol ATO 888[®] e Miglyol[®] revelaram que as proporções ideais são aquelas em que a quantidade de lípido sólido está acima de 60%, ou seja, as proporções 60:40, 70:30, 80:20 e 90:10.

A composição da primeira fórmula testada encontra-se na tabela 23.

Tabela 23: Composição da fórmula 1 de NLC.

Fórmula 1		
Matérias-primas		Massa (% m/m)
Lípido sólido	Compritol ATO 888 [®]	6,65
Lípido líquido	Miglyol 812 [®]	2,85
Fármaco	Progesterona	0,50
Agente tensioativo/conservante	Cetrimida	0,50
Agente tensioativo	Tween 80 [®]	2,50
Dispersante	Água	87,00

Como os tamanhos de partícula obtidos inicialmente não foram totalmente satisfatórios, foi testada uma segunda formulação contendo outros lípidos, baseada no estudo de Yuan H. *et al.* acerca da preparação de progesterona encapsulada em NLC (tabela 24) [86].

Tabela 24: Composição da fórmula 2 de NLC.

Fórmula 2		
Matérias-primas		Massa (%m/m)
Lípidos sólidos (numa proporção de 2:3, respetivamente)	Monoestearina + ácido esteárico	8,55
Lípido líquido	Ácido oleico	0,48
Fármaco	Progesterona	0,50
Agente tensioativo/conservante	Cetrimida	0,50
Agente tensioativo	Tween 80 [®]	2,50
Dispersante	Água	87,00

Os resultados obtidos na formulação 2 foram menos satisfatórios que os obtidos na fórmula 1. Com base no estudo de Yang Y. *et al.*, foram ajustadas as quantidades do lípido

líquido e do tensoativo relativamente à fórmula 1. Este estudo refere que a estabilidade da dispersão de NLC é particularmente afetada pela quantidade e tipo do lípido líquido utilizado. As conclusões do estudo revelam que quantidades crescentes de lípido líquido promovem um aumento da estabilidade da dispersão de NLC [97,98].

Uma das possíveis causas para os resultados anteriores é a instabilidade da dispersão, que poderá levar à formação de agregados sólidos. Neste sentido, a fórmula 3 (tabela 25) foi desenvolvida com uma maior quantidade do polissorbato 80 [88, 98].

Tabela 25: Composição da fórmula 3.

Fórmula 3		
Matérias-primas		Massa (%m/m)
Lípido sólido	Compritol ATO 888 [®]	5,70
Lípido líquido	Miglyol 812 [®]	3,80
Fármaco	Progesterona	0,50
Agente tensoativo/conservante	Cetrimida	0,50
Agente tensoativo	Tween 80	3,00
Dispersante	Água	86,50

A tabela 26 apresenta o quadro geral dos resultados da medição do tamanho de partícula das 3 formulações testadas, destacando a fórmula 3, uma vez que foi esta a escolhida como formulação final.

Tabela 26: Tamanhos de partícula das 3 formulações de NLC testadas.

Tamanho de partícula (μm)	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3
Dv (50)	0,090	29,281	0,070
Dv (90)	1,696	905,000	0,316

3.1.4. Preparação da dispersão de NLC

A fórmula final de NLC foi preparada segundo o método descrito na secção 2.1.4., tendo sido obtida uma dispersão com o aspeto da figura 13.



Figura 13: Aspeto da dispersão de NLC acondicionada em vial de vidro.

3.1.5. Caracterização da formulação de NLC

3.1.5.1. Tamanho de partícula

Os resultados da análise da distribuição do tamanho de partícula são apresentados nas tabelas 27 e 28 e na figura 14.

Tabela 27: Resultados da medição do tamanho de partícula (medição 1, t=0).

(μm)	Dv (50)	Dv (90)
Dia 1	0,0746	0,3156

Os resultados obtidos indicam que, aquando da preparação, 90 % dos NLC (Dv90) apresentam um tamanho não superior a 316 nm e que o tamanho mediano destas partículas é de 75 nm.

Tabela 28: Resultados da medição do tamanho de partícula (medição 2, t= 30).

(μm)	Dv (50)	Dv (90)
Dia 30	0,0676	0,2192

Os resultados permitem-nos concluir que, 30 dias após a preparação, 90 % dos NLC (Dv90) apresentam um tamanho não superior a 220 nm e que o tamanho mediano (Dv50) destas partículas é de 68 nm.

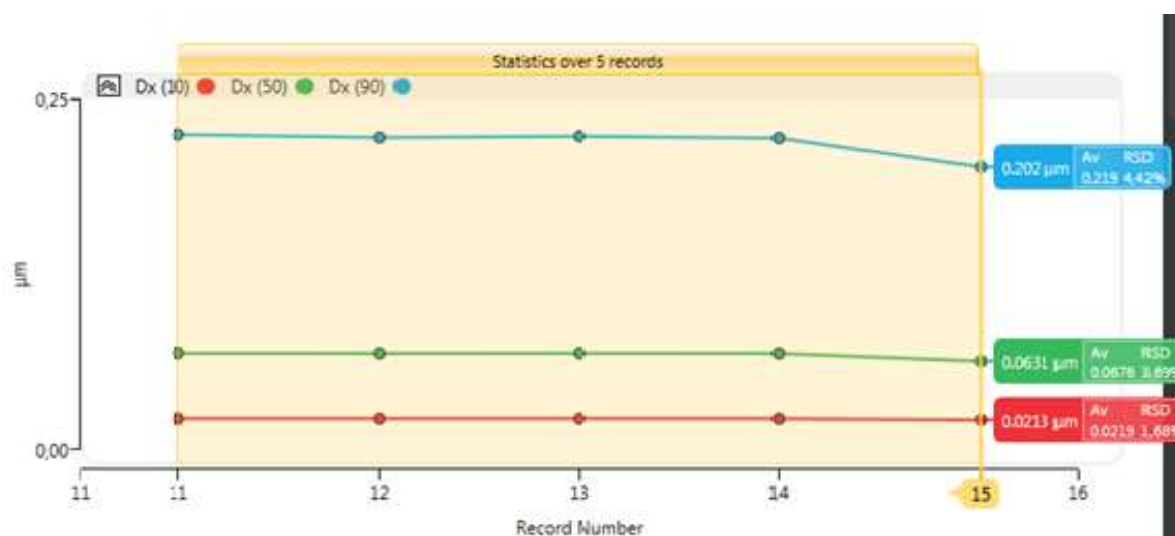
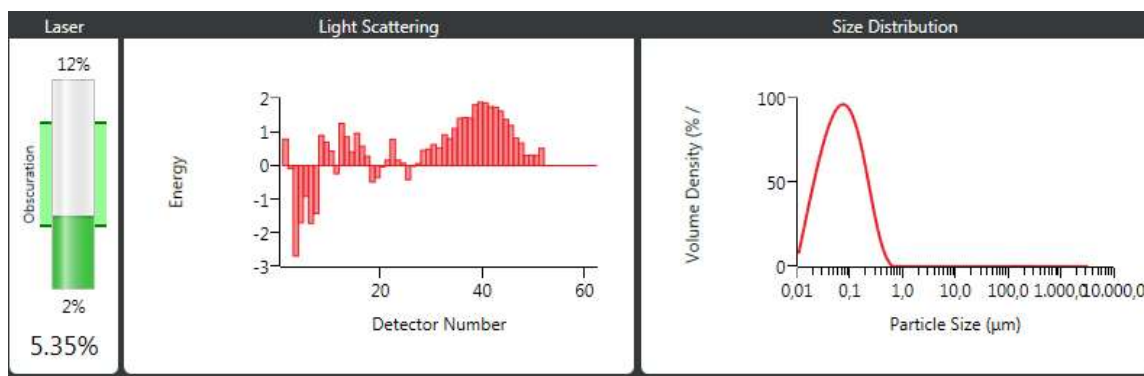


Figura 14: Resultados da análise da distribuição de partículas da medição 2 (t=30).

Verificou-se, portanto, uma diminuição pouco significativa do tamanho de partícula ao fim de 30 dias de armazenamento em frigorífico (2 - 8 °C).

3.1.5.2. Eficácia de encapsulação

Para determinar a quantidade de progesterona encapsulada foi preparada uma curva de calibração a partir da leitura da absorvência de 4 soluções padrão com concentrações entre 0,005 e 0,04 mg/mL (tabela 29) de progesterona em etanol a 96%, ou seja, soluções com concentração de 0,1% e 0,8 % em relação à concentração de progesterona nos NLC (5mg/mL).

Concentração do Padrão (mg/mL)	Absorvência (média ± desvio-padrão)
0,005	0,2787 ± 0,0001
0,02	0,9643 ± 0,0009
0,03	1,4202 ± 0,0012
0,04	1,9014 ± 0,0029

Dos resultados obtidos, construiu-se a seguinte curva de calibração:

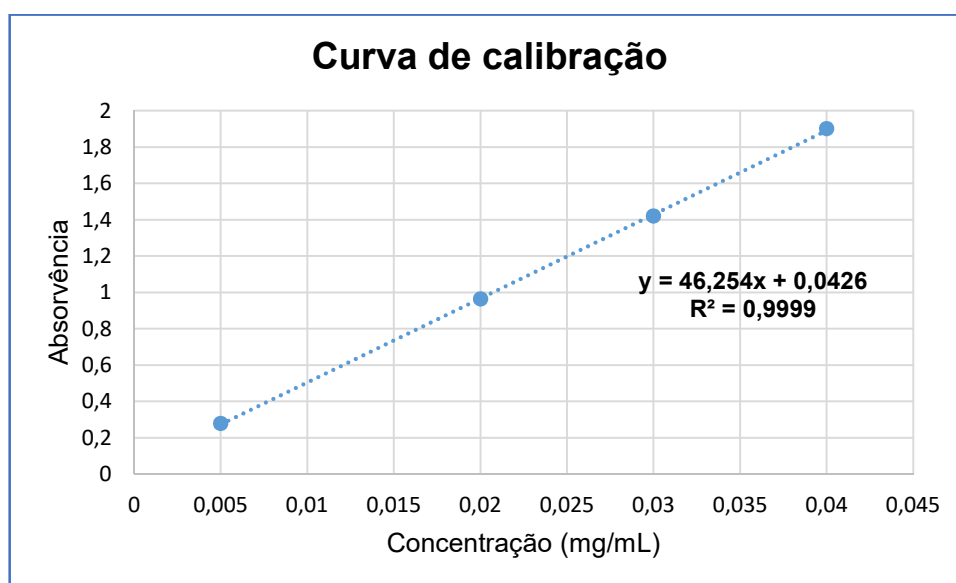


Figura 15: Curva de calibração dos padrões de progesterona com concentrações entre 0,005 e 0,04 mg/mL..

Após a obtenção da curva de calibração, a amostra foi analisada conforme descrito na secção 2.1.4. e os resultados encontram-se na tabela 30.

Tabela 29: Resultados da medição da absorvência da amostra.

Curva de calibração	$y = 46,254x + 0,0426$
Média das absorvências (análise de 3 filtrados)	0,8718
Concentração (mg/mL)	0,0179

Cálculo da eficácia de encapsulação:

$$\text{Eficácia de encapsulação (\%)} = \frac{5 - (0,0179 \times 10)}{5} \times 100 = 96,4 \%$$

Assim, obtém-se uma eficácia de encapsulação de 96,4%, o que reflete o sucesso da incorporação da progesterona nos NLC.

3.1.5.3. Estabilidade

Os estudos de estabilidade dos NLC tiveram por base a análise da distribuição do tamanho de partículas em diferentes momentos e são apresentados na tabela 31.

Tabela 30: Tamanhos da determinação do tamanho das nanopartículas, medidos no tempo $t=0$ e $t=30$.

	D(x)50	D(x)90
Dia 1	0,0746	0,3156
Dia 30	0,0676	0,2192

Os resultados revelam que a dispersão se manteve dentro da mesma ordem de tamanho. Caso se obtivesse um aumento do tamanho de partícula, este poderia traduzir a formação de agregados de partículas que indicaria instabilidade. Pelo contrário, os valores obtidos foram até ligeiramente inferiores aos determinados no momento da preparação da dispersão. De forma geral, pode concluir-se que os tamanhos de partícula obtidos sugerem uma boa estabilidade da formulação.

3.1.5.4. Avaliação da biocompatibilidade

A biocompatibilidade das dispersões NLC com progesterona e NLC placebo (0-100 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliada através de estudos de citotoxicidade em células HaCat pelos ensaios de incorporação do vermelho neutro (*Neutral red* – NR) e de redução da resazurina, 24 h após exposição. Tal como se pode verificar pela análise da figura 16, a exposição às dispersões NLC com progesterona e NLC placebo resultou numa diminuição significativa na incorporação do NR para concentrações superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com as células controlo (0 $\mu\text{g/mL}$). De facto, verificou-se que a percentagem de

incorporação do NR reduziu significativamente, e de uma forma dependente da concentração testada, para 80,6 %, 73,4 % e 68,7 % 24 h após exposição a 50, 75 e 100 µg/mL de NLC com progesterona, respetivamente, e para 80,6 %, 76,5 % e 72,0 % 24 h após exposição a 50, 75 e 100 µg/mL de NLC placebo, respetivamente. É de salientar a ausência de diferenças significativas na percentagem de incorporação do NR entre as duas dispersões testadas (figura 16).

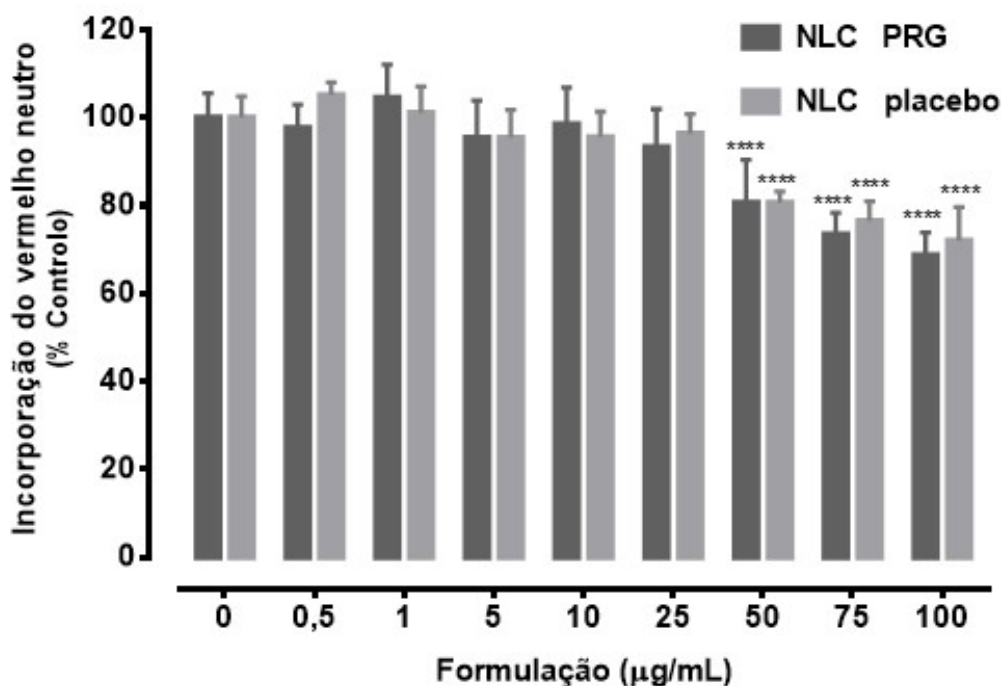


Figura 16: Biocompatibilidade das formulações NLC com progesterona e NLC placebo (0-100 µg/mL) avaliada em células HaCat pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24 h após exposição. Os resultados são apresentados como média + SD de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método de Two-way ANOVA, seguido pelo Sidak's multiple comparison post hoc test (**** $p < 0,0001$ vs. controlo (0 µg/mL)).

No que respeita ao ensaio de redução da resazurina, foram obtidos resultados semelhantes aos observados no ensaio de incorporação do NR, verificando-se uma diminuição significativa na redução da resazurina para concentrações de dispersão superiores a 25 µg/mL e quando comparado com as células controlo (0 µg/mL). De destacar que a diminuição observada na capacidade metabólica das células ocorreu, igualmente, de uma forma dependente da concentração de dispersão testada (figura 17). De facto, verificou-se uma diminuição significativa na redução da resazurina para 79,3 %, 62,8 %, 61,4 % e 58,7% 24 h após exposição a 25, 50, 75 e 100 µg/mL de NLC com progesterona, respetivamente, e para 87,0 %, 63,7 %, 59,0 % e 58,0% 24 h após exposição a 25, 50, 75 e 100 µg/mL de NLC placebo, respetivamente. É de salientar, igualmente, a

ausência de diferenças significativas na porcentagem de redução da resazurina entre as duas dispersões testadas (figura 17). Por último, pela análise dos resultados obtidos foi possível verificar uma maior sensibilidade do ensaio de redução da resazurina para avaliar a biocompatibilidade das dispersões desenvolvidas, permitindo verificar a existência de diferenças significativas mais marcadas comparativamente com as células controle (0 $\mu\text{g/mL}$), diferenças essas detetadas para concentrações mais baixas (detecção de diferenças significativas para concentrações superiores a 25 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de redução da resazurina e superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de redução do NR).

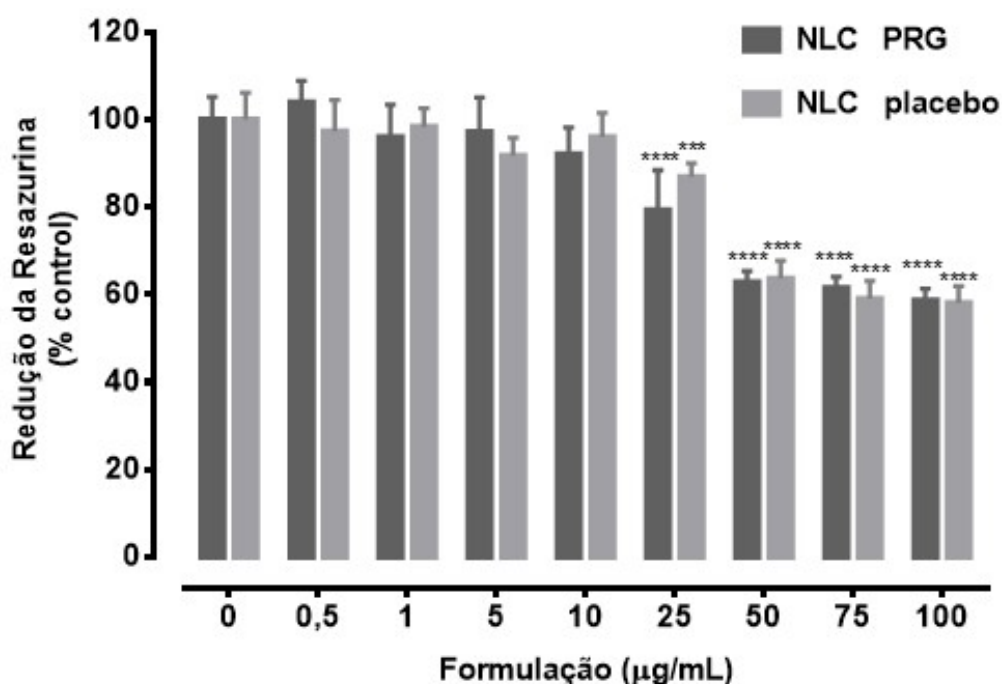


Figura 17: Biocompatibilidade das formulações NLC PRG e NLC placebo (0-100 $\mu\text{g/mL}$) avaliada em células HaCat pelo ensaio de redução da resazurina, 24 h após exposição. Os resultados são apresentados como média + SD de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método de Two-way ANOVA, seguido pelo Sidak's multiple comparison post hoc test (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. controle (0 $\mu\text{g/mL}$).

3.2. Óvulos

3.2.1. Seleção do excipiente e otimização da fórmula

No sentido de determinar a quantidade máxima da dispersão de NLC que era possível adicionar à base dos óvulos, foram testadas diferentes quantidades. Devido à natureza aquosa da dispersão de NLC, a sua adição à base dos óvulos dificulta a solidificação. A tabela 32 descreve as proporções e formulações testadas.

Tabela 31: Testes de diferentes bases e proporções de base e dispersão aquosa de NLC e os seus efeitos na obtenção dos óvulos.

Teste	Base utilizada	Quantidade de base (g)	Quantidade de NLC (g)	Resultados
1	PEG 4000 + PEG 1500	1, 47g de PEG 4000 + 3,98g de PEG 1500 – total de 54,5 %	45,5 %	Óvulos não solidificaram.
2	PEG 4000 + PEG 1500	1, 72g de PEG 4000 + 4,64g de PEG 1500 – total de 63,6 %	36,4%	
3	PEG 4000 + PEG 1500	1,96g de PEG 4000 + 5,31g de PEG 1500 – total de 72,7 %	27,3 %	
4	Softisan	72,7 %	27,3 %	Óvulos não solidificaram.
5	Witepsol H 32	77,0 %	23,0 %	Obtenção de óvulos sólidos.
6	Witepsol H 32	75,0 %	25,0 %	Obtenção de óvulos sólidos.
7	Witepsol H 32	70 %	30 %	Obtenção de óvulos sólidos.

8	Witepsol H 32	68%	32 %	Óvulos não solidificaram
---	---------------	-----	------	--------------------------

A proporção escolhida foi aquela que permitiu a incorporação de uma maior quantidade de NLC, ou seja, a formulação 7. Com o objetivo de evitar a solidificação após a adição da dispersão de NLC, a temperatura das duas fases foi controlada antes da mistura.

Num estudo que pretendeu preparar e avaliar as características físico-químicas de supositórios de progesterona, em que foi efetuado um ensaio de dissolução da preparação obtida, Tavakoli N., *et al.* demonstraram que as bases hidrófilas como os PEGs levam a uma libertação mais rápida da progesterona do que as bases lipófilas, como, no caso do estudo em concreto, o Witepsol H35 [98]. Estes resultados são concordantes com outro estudo em que foi avaliada a influência da base dos óvulos no perfil de libertação da progesterona e em que se conclui que a base condiciona a libertação e que as bases hidrófilas levam a uma libertação mais rápida [99].

Uma vez que se pretende prolongar a libertação da progesterona, a escolha da base Witepsol H 32 mostra-se vantajosa.

3.2.2. *Preparação dos óvulos*

A preparação dos óvulos pelo método de fusão resultou em óvulos com o aspeto apresentado na figura 18.



Figura 18: Aspeto dos óvulos obtidos.

3.2.2.1. Calibração dos moldes

Para calibrar os moldes dos óvulos foram preparados, individualmente, 10 óvulos apenas com base (Witepsol H32®) e foi determinada a massa de cada um individualmente. Os resultados apresentam-se na tabela 33:

Tabela 32: Resultados da pesagem dos óvulos constituídos só por base.

Óvulo	Massa (g)
1	8,6404
2	8,6394
3	8,6090
4	8,6451
5	8,6125
6	8,7351
7	8,7054
8	8,5531
9	8,4935
10	8,6377
Análise dos resultados	
Média	8,6271
Desvio padrão	0,0687

3.2.2.2. Cálculo do fator de deslocamento

O valor P_e foi considerado 8,60 g, valor obtido na calibração dos moldes dos óvulos. O valor P_p foi determinado através da pesagem de 4 óvulos da formulação com dispersão de NLC

O resultado da determinação da massa dos 4 óvulos com a dispersão de NLC (P_p) são apresentados na tabela 34:

Tabela 33: Resultados da determinação de massa dos óvulos com a dispersão de NLC.

Pesagem	Massa (g)
1	8,70
2	8,61
3	8,62
4	8,59
Média	8,63

Assim, substituindo os valores na equação, temos:

$$f = \frac{8,60 - 0,7 \times 8,63}{8,63 \times 0,3} \Leftrightarrow f = 0,988$$

Substituindo na fórmula de cálculo da massa de excipiente:

$$PE = 8,60 - (2,6 \times 0,988) = 6,03$$

E, conseqüentemente a composição da mistura final para preparar os óvulos será:

Componente	Massa (g)
NLC	2,57 g
Witepsol H32	6,03 g

Na preparação dos óvulos a massa pesada foi sempre calculada com uma sobrecarga de 10%, dado que se está a usar um excipiente lipófilo, para compensar eventuais perdas.

3.2.3. Ensaios dos óvulos

3.2.3.1. Estudo de dissolução

O ensaio de dissolução tem por objetivo o estudo da libertação do fármaco da forma farmacêutica. É uma etapa fulcral no processo de desenvolvimento de um novo medicamento, permitindo de certa forma recriar, *in vitro*, as condições da libertação *in vivo* do fármaco. Estes ensaios não substituem a avaliação do perfil de libertação *in vivo*, mas nas fases iniciais do processo de desenvolvimento de uma preparação farmacêutica, conseguem dar uma previsão do maior ou menor sucesso do sistema em que o fármaco está inserido [100].

O ensaio de dissolução foi executado com as seguintes formulações:

- Óvulos com progesterona encapsulada em NLC (ONLC PRG);
- Dispersão aquosa de NLC (NLC PRG);
- Óvulos com progesterona não encapsulada (OPRG);
- Progeffik[®], cápsula vaginal (e oral) comercializada em Portugal (PFK).

A fim de poder determinar a quantidade de fármaco libertada, recorreu-se ao método dos mínimos quadrados, tendo-se feito uma curva de calibração a partir de soluções padrão (tabela 35 e figura 19).

Tabela 34: Concentração e valores das absorvências das soluções padrão de progesterona.

Concentração (µg/mL)	Absorvência (media ± desvio-padrão)
1	0,0348 ± 0.0001
5	0,2639 ± 0.0004
10	0,5444 ± 0.0001
20	0,8573 ± 0.0010
40	1,9190 ± 0.0002
60	2,8546 ± 0.0001

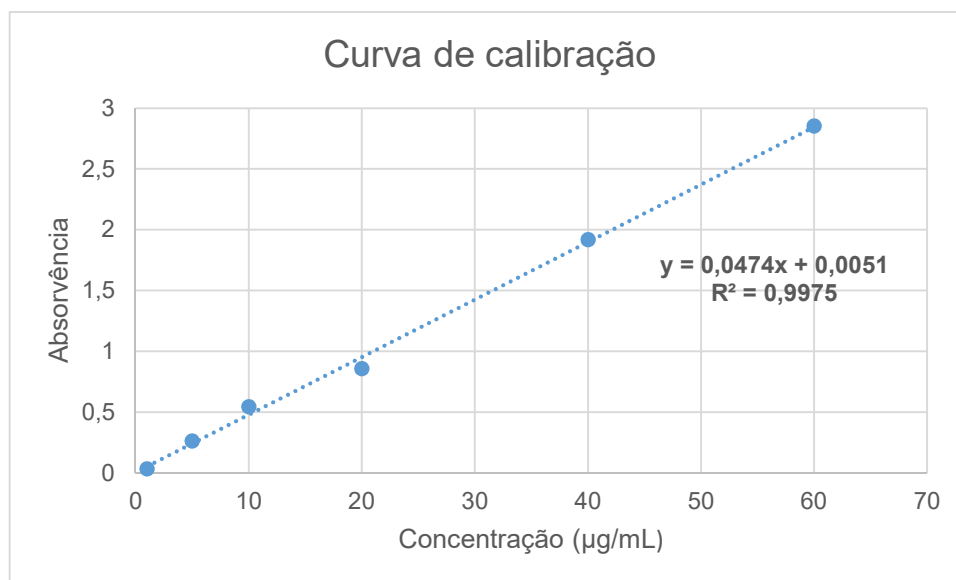


Figura 19: Curva de calibração construída para o estudo de dissolução.

1º Ensaio

Os resultados do 1º ensaio revelaram valores inconsistentes e, tornando impossível inferir um perfil de libertação. Considerando a equação da curva de calibração e o fundamento teórico de um ensaio de dissolução, é esperado que os valores de absorvência obtidos pela análise espectrofotométrica das amostras recolhidas ao longo do tempo do ensaio sejam crescentes, revelando assim o expectável, um aumento da concentração de fármaco no meio de dissolução.

Uma explicação possível para estes resultados é o facto de a concentração obtida naquele volume de dissolução ser próxima da concentração de saturação da progesterona e por isso não estarem garantidas as condições *sink*. A progesterona é um efetivamente um fármaco praticamente insolúvel em água e as dificuldades na obtenção das condições *sink* são previsíveis. Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9, as condições do ensaio devem ser estudadas de forma a que o produto dissolvido não interfira significativamente na velocidade de dissolução do produto remanescente. Está referido ainda que, por norma, estas condições conseguem-se quando o volume do meio de dissolução é 3 a 10 vezes superior ao volume de saturação [9]. A garantia destas condições é essencial uma vez que aproxima o ensaio de dissolução das condições observadas *in vivo*, em que a libertação e dissolução do fármaco no fluido vaginal é acompanhada pela constante absorção de fármaco através da parede vaginal, o que vai continuamente reduzindo a concentração de fármaco no fluido vaginal [101]. Se o volume do meio de dissolução é reduzido (próximo do volume de saturação), então será mais difícil que o fármaco dissolvido não interfira na dissolução do fármaco remanescente.

Outro motivo que poderá ter contribuído para o insucesso do ensaio é a composição do meio de dissolução, que pela sua complexidade, possa ter interferido na análise das amostras. Estes resultados desfavoráveis obrigaram a que o ensaio fosse redesenhado mediante uma revisão mais aprofundada da literatura científica.

2º Ensaio

Num estudo de dissolução, a utilização de um meio de dissolução simples (solução tampão com pH fisiológico) em vez de um fluido orgânico simulado leva, em regra, à obtenção de resultados da taxa de dissolução similares, desde que as características mais influentes na dissolução do fármaco se mantenham (como o pH, capacidade tampão, força iónica e osmolaridade) [102]. Partindo deste princípio, e para simplificar o ensaio e diminuir as variáveis que possam influenciar a solubilidade e a leitura da absorvência das amostras, neste segundo ensaio optou-se por não utilizar o FVS.

Uma técnica comum para desenvolver um estudo de dissolução envolve a utilização de meio aquoso, com condições de pH controladas, ao qual é adicionado um tensioativo para solubilizar substâncias com baixa hidrossolubilidade [87, 103]. No caso do segundo ensaio, o meio de dissolução foi selecionado com base nos dados recolhidos de pesquisa bibliográfica. Para o método de dissolução de um sistema vaginal com progesterona, a FDA recomenda a utilização de um meio de dissolução que consiste em água desionizada com 0,25 % de LSS [104]. Com base nesta sugestão da FDA, e após a execução de vários testes de solubilidade da progesterona em solução aquosa com diferentes percentagens de LSS, o segundo ensaio foi conduzido no aparelho de dissolução com pá agitadora (aparelho 2) em 1000 mL de meio de dissolução e composto por água e HCl até pH 4,5 com LSS a 0,5% [98, 104]. Este meio foi selecionado na sequência de vários testes de solubilidade da progesterona em diferentes meios/soluções tampão, aos quais se adicionou o tensioativo LSS (uma vez que, pela insolubilidade aquosa da progesterona, esta adição se mostrou necessária). Entre vários tensioativos possíveis, o LSS foi escolhido com base nas recomendações da FDA para os métodos de dissolução da progesterona a partir de formas farmacêuticas de administração vaginal e com base em estudos acerca da solubilidade da progesterona em meios de dissolução preparados com diferentes tensioativos [104, 105].

Os resultados dos estudos de solubilidade da progesterona nos diferentes meios de dissolução encontram-se resumidos na tabela 36.

Tabela 35: Resultados dos testes de solubilidade da progesterona nos diferentes meios de dissolução.

Teste	Composição do meio	Resultado
1	Solução tampão de fosfato monopotássico, pH 4,5 (0,05 M) + 0,25% de LSS	Precipitação (LSS + potássio [106])
2	Solução tampão de fosfato monossódico de pH 6,0 + 0,25 % de LSS	Não dissolveu a progesterona (0,01%)
3	Solução tampão de acetato de sódio de pH 4,5 + 0,25 % de LSS	Precipitação (LSS + Na > 0,4M [107])
4	Solução tampão de fosfato monossódico de pH 6,0 + 0,5 % de LSS	A progesterona (0,01%) não dissolveu
5	Água DI + HCl (até pH 4,5) + 0,25 % LSS	A progesterona (0,01%) não dissolveu
6	Água DI + HCl (até pH 4,5) + 0,5 % LSS	Dissolução da progesterona (0,01%)

De acordo com os resultados obtidos, optou-se pelo meio de dissolução correspondente ao teste 6, uma vez que foi o único que permitiu a obtenção de um meio estável e favorável à dissolução de progesterona.

Resultados da formulação NLC PRG

Partindo da equação da curva de calibração (figura 20) podemos calcular a concentração de fármaco para cada tempo (tabela 37).

Tabela 36: Resultados da absorvência, concentração e quantidade de progesterona libertada a partir da dispersão de NLC PRG.

Tempo (minutos)	Abs	Concentração (µg/mL)	Quantidade de progesterona (%)
30	0,2246	4,6337	18,5350
60	0,1925	3,9548	15,8193
180	0,1284	2,6019	10,4075
360	0,1095	2,2030	8,8118
720	0,1857	3,8113	15,2452
1440	0,3427	7,1258	28,5030

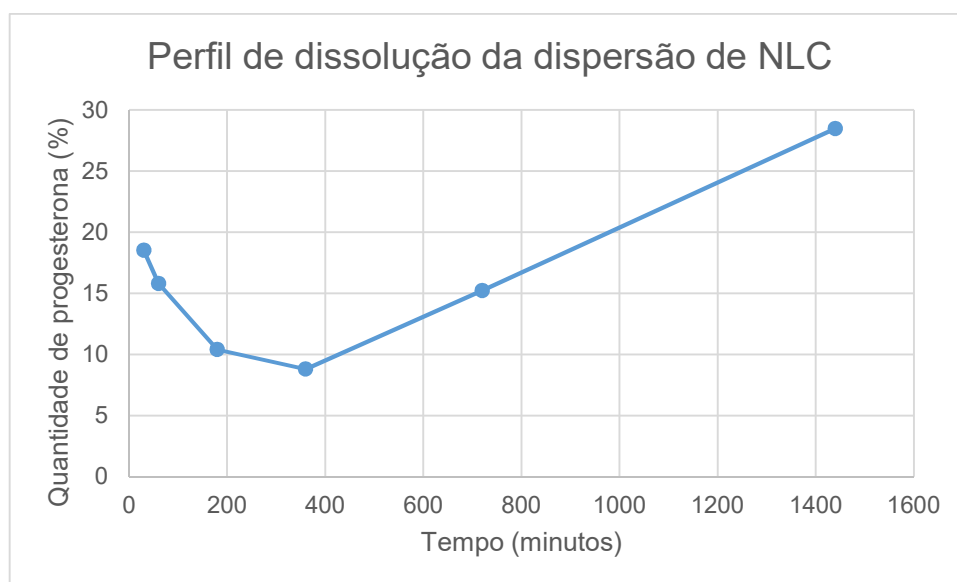


Figura 20: Perfil de dissolução da progesterona a partir da dispersão de NLC.

Resultados da formulação comercial Progeffik®

Da mesma forma, a quantidade de fármaco libertada a cada tempo foi determinada para a formulação de Progeffik® (tabela 38, figura 21).

Tabela 37: Resultados da absorvência, concentração e quantidade de progesterona libertada a partir da cápsula Progeffik®.

Tempo (minutos)	Abs	Concentração (µg/mL)	Quantidade de progesterona (%)
30	0,2989	6,2020	12,4040
60	0,3178	6,5995	13,1990
180	0,6045	12,6515	25,3030
360	0,7557	15,8428	31,6857
720	1,0217	21,4565	42,9131
1440	1,0957	23,0191	46,0383

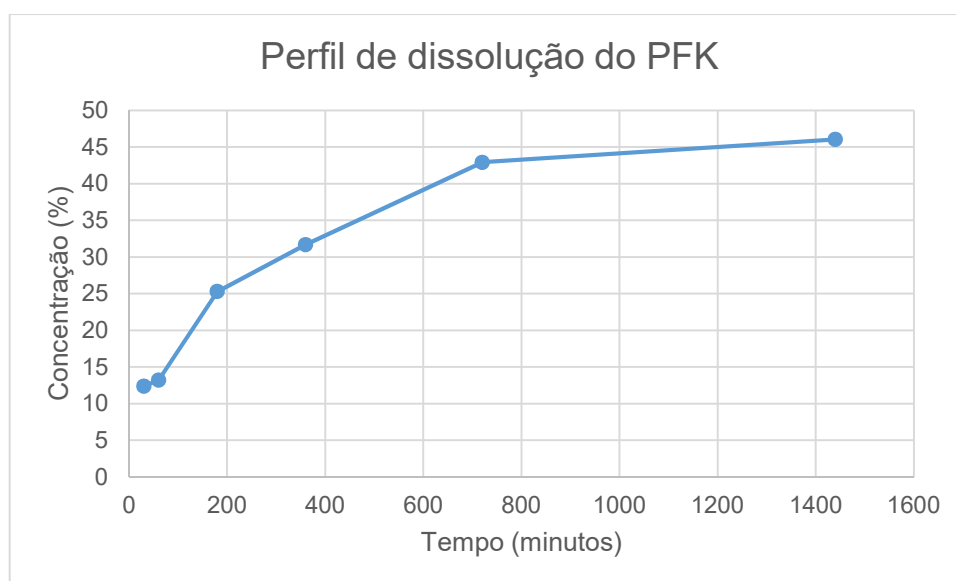


Figura 21: Perfil de dissolução da progesterona a partir da forma comercial Progeffik®.

Pela análise da figura 20, verifica-se que após 24 horas se libertou cerca de 28% de progesterona a partir dos NLC. Relativamente aos NLC, verificou-se uma libertação inicial maior que pode ser justificada pela libertação das moléculas de fármaco existentes à superfície das nanopartículas. De seguida, verificou-se uma libertação prolongada da progesterona, o que é expectável tendo em conta a matriz lipídica sólida dos NLC. Este

tipo de libertação de fármacos a partir de nanopartículas lipídicas foi reportado por outros autores [108].

Relativamente à forma comercial de progesterona, verificou-se que ao fim de 24h foram apenas libertados 46% de fármaco (figura 21), o que não era expectável. Para compreender esta baixa taxa de dissolução, deve considerar-se o meio aquoso do líquido de dissolução e o coeficiente de partilha da progesterona ($\log P$ 3,87). Os excipientes que constituem as formulações são lipófilos (NLC PRG– nanopartículas lipídicas onde o fármaco se encontra encapsulado/ PFK – óleo de amendoim). Assim, é previsível que a dissolução da progesterona no meio de dissolução, ainda que com a adição do tensioativo, não seja completa [101, 109].

Pela análise dos dois perfis de libertação (figura 22), verifica-se uma velocidade de libertação da progesterona inferior na formulação de NLC PRG.

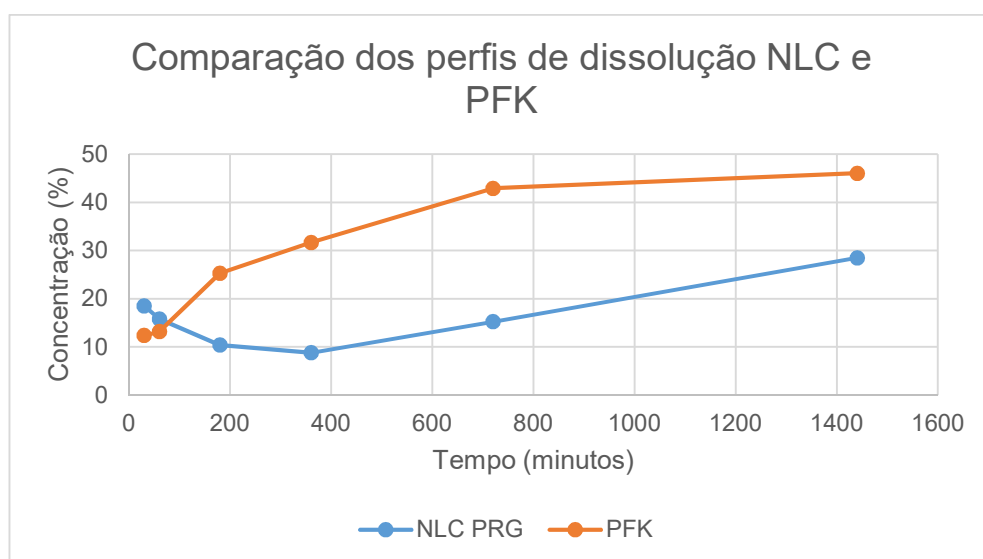


Figura 22: Comparação dos perfis de dissolução da formulação NLC PRG e PFK.

3.2.3.1.1. Comparação dos resultados através da aplicação de diferentes modelos cinéticos de libertação

Os resultados pouco claros e indicativos de problemas na execução do ensaio levam a que o tratamento dos dados seja pouco produtivo. Um dos principais entraves à análise dos resultados é o facto de as percentagens de concentração obtidas não alcançarem sequer os 80% ao fim de 24 horas. Ainda assim, com os resultados obtidos da formulação NLC PRG e PFK, procurou-se estabelecer uma relação com os modelos cinéticos de libertação de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Pelos valores de R^2 (tabela 39),

verificamos que o modelo Korsmeyer Peppas é o que melhor descreve a liberação de fármaco para ambas as formulações [34, 91, 110].

Tabela 38: Parâmetros dos modelos cinéticos de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas para as formulações NLC PRG e PFK.

Modelo cinético	NLC PRG	PFK
Ordem zero (n=1)	K = 0,0091 R ² = 0,6190	K = 0,0236 R ² = 0,7941
Higuchi (n=0,5)	K = 0,3043 R ² = 0,2857	K = 1,1242 R ² = 0,9322
Korsmeyer - Peppas	K = 8,0238 n = 0,1268 R² = 0,6845	K = 4,0911 n = 0,3419 R² = 0,9608

Para as preparações NLC PRG e PFK verificou-se, de forma geral, um aumento da quantidade de fármaco libertada ao longo do tempo do ensaio.

Já no caso dos óvulos, quer no primeiro ensaio, em que os óvulos foram colocados sem as membranas de diálise, quer no segundo, em que a massa liquefeita foi colocada no interior das membranas (como explicado na secção 2.2.4), não foi possível obter valores consistentes, pelo que os resultados não foram apresentados. Tais resultados dever-se-ão possivelmente à inadequabilidade do método utilizado para o ensaio de dissolução dos óvulos, nomeadamente devido ao facto do aparelho de dissolução utilizado não ser específico para óvulos. Ao contrário do que acontece com outras formas mais convencionais, para os óvulos (e supositórios) estão descritos poucos métodos de dissolução oficiais. Não existe nenhum teste de dissolução que seja totalmente adequado para os diferentes tipos de óvulos (ou supositórios), o que torna difícil a otimização do método [101, 111, 112].

Um dos grandes problemas dos ensaios de dissolução dos óvulos (principalmente os que contém excipientes lipófilos) é o facto de estes se desintegrarem, deformarem e fundirem no meio de dissolução, levando a uma variabilidade da superfície exposta ao meio de dissolução. A taxa de libertação depende diretamente da área interfacial e, por isso, variações neste fator levam a um resultado pouco reprodutível. A etapa de filtração é necessária para eliminar os resíduos da recolha, mas, por outro lado, a utilização do filtro pode originar erros nos resultados uma vez que é provável que fique obstruído devido à rápida solidificação dos resíduos do excipiente usado como base do óvulo.

O aparelho utilizado neste estudo de dissolução foi o aparelho de dissolução com pá giratória (aparelho 2), mas a Farmacopeia Portuguesa 9 recomenda, para as formas lipófilas, a utilização do aparelho de fluxo contínuo, uma vez que este aparelho possibilita a retenção dos excipientes lipófilos de modo a eliminar interferências na recolha das amostras [113].

No 2º ensaio, os óvulos colocados no meio de dissolução permaneceram a flutuar, não tendo sido cumprida a recomendação da Farmacopeia de inserção de um material inerte como, por exemplo, um fio metálico enrolado em hélice, para que a amostra deposite no recipiente de dissolução. Esta poderia ser uma medida a adotar num próximo ensaio, embora, dada a rápida desagregação dos óvulos no meio aquecido a 37°C (menos de 30 minutos), prevê-se que o conteúdo lipídico do óvulo emergisse do meio de dissolução, dada a diferença de densidade dos lípidos relativamente ao meio aquoso e, portanto, em princípio esta medida não solucionaria o problema de arquitetura do ensaio.

Outro fator que possivelmente influenciou os resultados negativos tem a ver com a recolha das amostras. Sendo o ensaio efetuado no aparelho 2, após a fusão do óvulo, permanece uma camada lipídica na superfície do meio de dissolução, que impede que a recolha de amostra seja correta. Ainda que tentando retirar amostra do mesmo local (a metade da profundidade do recipiente), para alcançar o meio, a pipeta atravessa a barreira de lípido, ficando, ora com mais, ora com menos lípido no interior.

No 3º ensaio, os óvulos foram fundidos e inseridos numa membrana de diálise. Apesar disso, os resultados obtidos continuaram a não ser consistentes. A utilização de uma membrana de diálise permite o controlo da área exposta, mas, por outro lado, introduz um novo elemento, que poderá também ser um fator de desvio dos resultados [113].

Como referido, de forma geral os resultados foram pouco consistentes. Para as formas farmacêuticas de libertação prolongada, a Farmacopeia Portuguesa 9 refere a utilização de 3 pontos do ensaio: um primeiro ponto, em que há uma libertação de 20 a 30 % (procura controlar um eventual “dose dumping”), um segundo ponto, que corresponderá a uma taxa de libertação de 50 % e o último ponto que verifica a libertação quase total do fármaco, quando a taxa de libertação supera os 80% [9].

Os resultados e a reflexão no método do ensaio executado revelam claramente que este teria de ser redesenhado, tendo em conta a utilização da aparelhagem recomendada pela Farmacopeia para as formas lipófilas e o estudo de um meio de dissolução mais adaptado às características particulares da progesterona (*Biopharmaceutical Classification System - BCS classe 2*) [114] .

3.2.3.2. Uniformidade de massa

Os resultados da determinação de massa das 10 unidades de óvulos analisados encontram-se na tabela 40.

Tabela 39: Massas individuais dos óvulos utilizados para o ensaio de uniformidade de massa.

Óvulo	Massa (g)
1	8,7588
2	8,6321
3	8,598
4	8,8909
5	8,8999
6	8,7986
7	8,7412
8	8,6954
9	8,6001
10	8,5431
Média	8,71581
Desvio-padrão	0,11765

Para realizar o ensaio de uniformidade de massa, a Farmacopeia Portuguesa 9 recomenda a determinação da massa de 20 unidades. Neste caso, como estamos perante um ensaio não obrigatório e como estamos a produzir em pequena escala, optou-se por realizar o ensaio apenas em 10 unidades. Para as 20 unidades, e no caso específico dos óvulos, recomenda-se que não mais do que 2 das 20 unidades difiram da massa média encontrada em percentagem superior a 5% [9].

Tabela 40: Massas individuais dos óvulos utilizados para o ensaio de uniformidade de massa e % de desvio relativamente à massa média.

Óvulo	Massa (g)	% de massa individual em relação à massa média
1	8,7588	100,4932
2	8,6321	99,03956
3	8,598	98,64832
4	8,8909	102,0089
5	8,8999	102,1121
6	8,7986	100,9499
7	8,7412	100,2913
8	8,6954	99,76583
9	8,6001	98,67241
10	8,5431	98,01843
Média	8,71581	
Desvio-padrão	0,117649	

Pela análise dos resultados da tabela 41 podemos verificar que nenhum dos resultados se desvia da massa média em valor superior a 5% e que, por isso, os óvulos satisfazem ao ensaio da uniformidade de massa.

3.2.3.3. Variação de massa

Para efetuar este ensaio foram consideradas 10 unidades da preparação que foram pesadas e doseadas. Os valores obtidos encontram-se na tabela 42.

$$x_i = w_i \times \frac{A}{W}$$

x_i = teor individual estimado

A = teor em percentagem do valor indicado

w_i = massa dos óvulos

W = média das massas dos óvulos

Tabela 41: Valores obtidos para a massa dos óvulos (w_i), média das massas (W), teor em percentagem do valor indicado (A), teor individual estimado (x_i), média (X) e desvio padrão do teor individual estimado (s).

Massa dos óvulos (w_i, g)	A (%)	Teor individual estimado (x_i)
8,7588	105,4514	105,9716
8,6321	109,4423	108,3911
8,598	100,3926	99,03562
8,8909	98,50071	100,4795
8,8999	99,65022	101,755
8,7986	100,9035	101,862
8,7412	101,2255	101,5203
8,6954	101,3798	101,1424
8,6001	101,3904	100,0444
8,5431	101,1616	99,15702
Média (W)	101,9498	Média (X)
8,71581		101,9359
Desvio-padrão		Desvio-padrão (s)
0,117649		2,993142
Número de unidades 10		
(k= 2,4)		

Uma vez que o resultado de X é superior a 101,5%, assumimos 101,5 % para o valor de M e assim obtemos:

$$VA = |M - X| + ks$$

$$VA = 7,62 \quad (VA < 15)$$

O valor de aceitação situa-se dentro do intervalo estipulado, o que comprova a uniformidade de dosagem dos óvulos.

3.2.3.4. Características organoléticas e físicas

Os óvulos obtidos apresentaram um aspeto consistente, liso, brilhante, sem rugosidades ou fissuras, conforme se pode verificar nas imagens da figura 23.

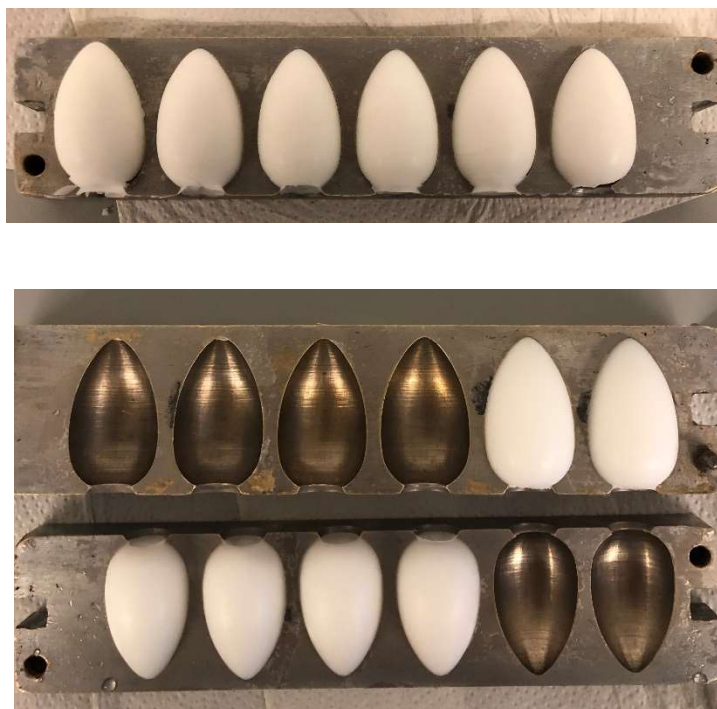





Figura 23: Aspeto final dos óvulos contendo NLC com progesterona encapsulada (ONLC PRG).

A Farmacopeia Portuguesa 9 refere que o ensaio de desagregação dos óvulos é dispensado caso se faça o ensaio de dissolução. Nesse sentido, durante o ensaio de dissolução, foi verificado o estado dos óvulos ao fim de 60 minutos, conforme recomenda a Farmacopeia para o ensaio de desagregação, e antes desse momento, ao fim de 30 minutos.

Da verificação efetuada concluiu-se que, após 30 minutos, os óvulos tinham fundido e que era possível visualizar uma camada lipídica à superfície do líquido de dissolução, conforme apresentado na tabela 43.

Tabela 42: Avaliação do aspeto dos óvulos após 30 e 60 minutos do início do ensaio de dissolução.

TEMPO (MINUTOS)	ASPEITO	IMAGEM
0	Óvulo sólido que flutua no líquido de dissolução.	
30	Óvulo fundido. Verifica-se uma camada espessa lipídica à superfície do líquido de dissolução.	
60	Óvulo fundido. Verifica-se uma camada lipídica fina à superfície do líquido de dissolução.	

3.2.3.5. Estabilidade dos óvulos

Os óvulos mantiveram todas as características iniciais até dois meses após a preparação, no que diz respeito ao brilho, superfície lisa, sem fissuras ou rugosidades, à exceção da cor. Ao fim de 10 dias após a preparação os óvulos apresentaram uma cor azulada. Esta transformação foi investigada, tendo-se chegado à conclusão que para esta formulação

especifica os moldes a utilizar deveriam ser de outro material (por exemplo, plástico), uma vez que a solução aquosa de cetrimida reage com os metais e poderá ter sido esta reação que conferiu a coloração aos óvulos [106]. Para comprovar este facto, foi colocada nos moldes uma solução aquosa de cetrimida. Ao fim de 12 horas verificou-se a presença da cor azulada da solução de cetrimida.

4. Perspetivas futuras

Para prosseguir os estudos de desenvolvimento da formulação dos óvulos contendo NLC com progesterona encapsulada existem várias possibilidades. Começando pelo fármaco, seria interessante que a progesterona estivesse na forma micronizada, já que a dissolução desta forma é mais facilmente conseguida, o que poderá levar a um aumento da biodisponibilidade [115].

Relativamente à formulação dos NLC, seria importante aumentar a quantidade de progesterona incorporada. As formas comercializadas têm uma dosagem de 100 e 200 mg. A formulação desenvolvida conseguiu incorporar apenas 13 mg. Para tal, seria recomendado testar uma maior proporção de fase lipídica. Na formulação desenvolvida a proporção de fase lipídica é de apenas 10%. Seria plausível testar formulações até cerca de 30 % de fase lipídica [61, 62, 116]. Aumentando a fase lipídica da formulação de NLC, a natureza da dispersão obtida seria menos aquosa e, por isso, a incorporação na base dos óvulos seria possivelmente facilitada, o que poderia permitir uma proporção maior de dispersão de NLC incorporada. Para uma caracterização completa da dispersão de NLC seria importante investigar o potencial zeta (carga elétrica à superfície das partículas). A repetição desta análise em diferentes momentos do armazenamento seria um indicador da estabilidade da formulação [117]. Ainda no âmbito da caracterização da formulação, deveria ser feita a análise térmica por calorimetria de varrimento diferencial (*differential scanning calorimetry* - *DSC*), que permite a caracterização do comportamento de fusão e de cristalização dos lípidos e do fármaco usado nas nanopartículas lipídicas [62,63]. Para avaliar a morfologia das nanopartículas (forma, tamanho e estrutura da superfície) seria essencial a análise por microscopia eletrónica de varrimento (*scanning electronic microscopy* - *SEM*) [57, 118].

Relativamente à produção dos óvulos, como referido, os moldes utilizados não deveriam ser metálicos, para evitar a reação da cetrimida com este material.

Em relação à formulação final - óvulos contendo NLC com progesterona encapsulada – poderia ter sido efetuada a análise da textura recorrendo a um texturómetro para conhecer a firmeza e adesividade dos óvulos. Os ensaios de dissolução da formulação final deveriam ser executados no aparelho destinado ao ensaio de dissolução das formas lipófilas, o aparelho de fluxo contínuo. Também o meio de dissolução teria de ser mais profundamente estudado, de forma a que as condições *sink* fossem garantidas.

5. Conclusão

O desenvolvimento desta formulação foi particularmente desafiante sobretudo pelas características físico-químicas da progesterona e pelas dificuldades de incorporação da dispersão dos NLC na base dos óvulos, devido à sua natureza aquosa.

Mais estudos serão necessários para avaliar o perfil de libertação do fármaco a partir dos óvulos e provar a viabilidade desta formulação para avançar para ensaios *in vivo*.

Relativamente aos NLC, os resultados revelam um tamanho de partícula concordante com os tamanhos exigidos para uma vectorização eficaz e uma elevada eficácia de encapsulação da progesterona.

Pode-se, portanto, concluir que foi possível obter óvulos com consistência adequada à administração vaginal, contendo progesterona eficazmente encapsulada em NLC.

Referências bibliográficas

1. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Physiological action of progesterone in target tissues*. Endocrine reviews, 1997. **18**(4): p. 502-519.
2. Warren, M., *Vaginal progesterone and the vaginal first-pass effect*. Climacteric, 2018. **21**(4): p. 355-357.
3. Infarmed. *Resumo das características do medicamento Progeffik*. 2011 [cited 2019 03/09/2019]; Available from: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=49343&tipo_doc=rcm.
4. Finch, B.E. and H. Green, *Contraception through the ages* 1963, London.
5. Rathbone, M.J., et al., *Modified-Release Drug Delivery Technology, Second Edition*. 2008, Taylor & Francis.
6. Cabral, C. and J.R. Pita, *Ciclo de Exposições: Temas de Saúde, Farmácia e Sociedade. Catálogo*. 2015, Coimbra.
7. *Farmacopeia Portuguesa IV*. Edição original ed. 1935, Lisboa: Imprensa Nacional de Lisboa.
8. *Infomed*. [11/11/2018]; Available from: http://app7.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=6863&dci=&nome_comer=cGltYWZ1&dosagem=&cnpem=&chnm=&forma_farmac=&atc=&disp=&estado_aim=&pesquisa_titular=&cft=&grupo_produto=&pagina=1.
9. *Farmacopeia portuguesa 9.4*. Edição oficial ed. 2009, Lisboa INFARMED.
10. Nogueira Prista, L., *Tecnologia farmacêutica*. 1990, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa.
11. Macht, D.I., *On the absorption of drugs and poisons through the vagina*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1918. **10**(7): p. 509-522.
12. Wong, T.W., M. Dhanawat, and M.J. Rathbone, *Vaginal drug delivery: strategies and concerns in polymeric nanoparticle development*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2014. **11**(9): p. 1419-1434.
13. Lobo, R.A., et al., *Comprehensive Gynecology E-Book*. 2016: Elsevier Health Sciences.
14. das Neves, J., M.H. Amaral, and M.F. Bahia, *Vaginal Drug Delivery*, in *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*.
15. Fawcett, D.W., *Bloom & Fawcett textbook of histology*. 1998: Taylor & Francis.
16. Seeley, R.R., *Anatomia e Fisiologia*. 8ª ed. 2008, Loures: Lusociência - Edições Técnicas e Científicas, Lda.
17. Balica, A., et al., *Assessing the thickness of the vaginal wall and vaginal mucosa in pre-menopausal versus post-menopausal women by transabdominal ultrasound: A feasibility study*. Maturitas, 2017. **102**: p. 69-72.
18. Katz, D.F., A. Yuan, and Y. Gao, *Vaginal drug distribution modeling*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **92**: p. 2-13.
19. *Vaginal Mucosa and Drug Delivery*, in *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*.
20. Alexander, N.J., et al., *Why consider vaginal drug administration?* Fertility and Sterility, 2004. **82**(1): p. 1-12.
21. Valenta, C., *The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(11): p. 1692-1712.
22. Owen, D.H. and D.F. Katz, *A vaginal fluid simulant*. Contraception, 1999. **59**(2): p. 91-95.
23. Olmsted, S.S., et al., *Diffusion of Macromolecules and Virus-Like Particles in Human Cervical Mucus*. Biophysical Journal, 2001. **81**(4): p. 1930-1937.

24. Murgia, X., et al., *The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018. **124**: p. 82-97.
25. Caramella, C.M., et al., *Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015. **92**: p. 39-52.
26. Neves, J.d. and B. Sarmiento, *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals*. 2014.
27. Major, I. and C. McConville, *Vaginal drug delivery for the localised treatment of cervical cancer*. *Drug Delivery and Translational Research*, 2017. **7**(6): p. 817-828.
28. Benziger, D.P. and J. Edelson, *Absorption from the Vagina*. *Drug Metabolism Reviews*, 1983. **14**(2): p. 137-168.
29. van der Bijl, P. and A.D. van Eyk, *Comparative in vitro permeability of human vaginal, small intestinal and colonic mucosa*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003. **261**(1): p. 147-152.
30. Hussain, A. and F. Ahsan, *The vagina as a route for systemic drug delivery*. *Journal of Controlled Release*, 2005. **103**(2): p. 301-313.
31. Noyes, A.A. and W.R. Whitney, *The rate of solution of solid substances in their own solutions*. *Journal of the American Chemical Society*, 1897. **19**(12): p. 930-934.
32. Dokoumetzidis, A. and P. Macheras, *A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. **321**(1): p. 1-11.
33. Cadwallader, D.E., *Biopharmaceutics and drug interactions*. 1974: Roche Laboratories.
34. Costa, P. and J.M.S. Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2001. **13**(2): p. 123-133.
35. Sayani, A.P. and Y.W. Chien, *Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae*. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 1996. **13**(1-2): p. 85-184.
36. Levine, H. and N. Watson, *Comparison of the pharmacokinetics of Crinone 8% administered vaginally versus Prometrium administered orally in postmenopausal women* *33Crinone® 8%, Serono Laboratories, Norwell, Massachusetts*. *Fertility and Sterility*, 2000. **73**(3): p. 516-521.
37. Paulson, R.J., M.G. Collins, and V.I. Yankov, *Progesterone Pharmacokinetics and Pharmacodynamics With 3 Dosages and 2 Regimens of an Effervescent Micronized Progesterone Vaginal Insert*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014. **99**(11): p. 4241-4249.
38. Cicinelli, E., et al., *The Vascular Cast of the Human Uterus: From Anatomy to Physiology*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004. **1034**(1): p. 19-26.
39. Ziegler, D., et al., *The First Uterine Pass Effect*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997. **828**(1): p. 291-299.
40. Fanchin, R., et al., *Transvaginal administration of progesterone*. *Obstetrics & Gynecology*, 1997. **90**(3): p. 396-401.
41. Vermani, K. and S. Garg, *The scope and potential of vaginal drug delivery*. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2000. **3**(10): p. 359-364.
42. Marriott, J.F., *Pharmaceutical compounding and dispensing*. 2010, Pharmaceutical Press. p. 135-147.
43. Rathbone, M.J., et al., *Modified-Release Drug Delivery: Academic Viewpoint, in Modified-Release Drug Delivery Technology*. 2008.
44. Brannon-Peppas, L., *Novel vaginal drug release applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1993. **11**(1): p. 169-177.
45. Neves, J.d., et al., *Vaginal mucosa and drug delivery*. *Mucoadhesive materials and drug delivery systems*, 2014: p. 99-132.
46. Gupta, R.B., Kompella, U. B., *Fundamentals of Drug Nanoparticles, in Nanoparticle Technology for drug delivery*. 2006.

47. Ensign, L.M., R. Cone, and J. Hanes, *Review: Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review*. Journal of Controlled Release, 2014. **190**: p. 500-500-514.
48. Müller, R.H., K. Mäder, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 161-177.
49. Torchilin, V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nature Reviews Drug Discovery, 2005. **4**: p. 145.
50. Yang, H. and W.J. Kao, *Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. **17**(1-2): p. 3-19.
51. Leyva-Gómez, G., et al., *Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(6): p. 1549.
52. Soenen, S.J., et al., *Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation*. Nano Today, 2011. **6**(5): p. 446-465.
53. Davis, S.S., et al., *Lipid Emulsions as Drug Delivery Systems*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1987. **507**(1): p. 75-88.
54. Desai, P.P., A.A. Date, and V.B. Patravale, *Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations – opportunities and limitations*. Drug Discovery Today: Technologies, 2012. **9**(2): p. e87-e95.
55. Mehnert, W. and K. Mäder, *Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(2): p. 165-196.
56. Speiser, P., *Lipid nano-pellets as excipient system for perorally administered drugs*. 1989, Google Patents.
57. Silva, A.C., et al., *Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **86**(1): p. 158-165.
58. Singhal, G.B., et al., *Solid lipid nanoparticles and nano lipid carriers: As novel solid lipid based drug carrier*. Int Res J Pharm, 2011. **2**(2): p. 20-52.
59. Das, S., W.K. Ng, and R.B. Tan, *Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?* European journal of pharmaceutical sciences, 2012. **47**(1): p. 139-151.
60. Yadav, N., S. Khatak, and U.S. Sara, *Solid lipid nanoparticles-a review*. Int. J. Appl. Pharm, 2013. **5**(2): p. 8-18.
61. Radtke, M. and R.H. Müller, *Nanostructured lipid drug carriers*. New Drugs, 2001. **2**: p. 48-52.
62. Silva, A.C., et al., *Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations*. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **64**(3): p. 177-182.
63. Doktorovova, S. and E.B. Souto, *Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review*. Expert opinion on drug delivery, 2009. **6**(2): p. 165-176.
64. Iqbal, M.A., et al., *Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery*. Journal of Drug Targeting, 2012. **20**(10): p. 813-830.
65. C Silva, A., et al., *Lipid-based nanocarriers as an alternative for oral delivery of poorly water-soluble drugs: peroral and mucosal routes*. Current medicinal chemistry, 2012. **19**(26): p. 4495-4510.
66. Nakayama, A., et al., *Sustained-Release Progesterone Vaginal Suppositories 1—Development of Sustained-Release Granule&mdash*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009. **32**(2): p. 276-282.
67. Sweetman, S.C., *Martindale: The Complete Drug Reference*. 2009, Pharmaceutical Press.

68. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Progesterone, CID=5994, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Progesterone> (accessed on Aug. 25, 2019). [cited 2019 25/08/2019]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Progesterone>.
69. von Eye Corleta, H., E. Capp, and M.B. Cardoso Ferreira, *Pharmacokinetics of Natural Progesterone Vaginal Suppository*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2004. **58**(2): p. 105-108.
70. Arafat, E.S., et al., *Sedative and hypnotic effects of oral administration of micronized progesterone may be mediated through its metabolites*. American journal of obstetrics and gynecology, 1988. **159**(5): p. 1203-1209.
71. Miles, R.A., et al., *Pharmacokinetics and endometrial tissue levels of progesterone after administration by intramuscular and vaginal routes: a comparative study* *. Fertility and Sterility, 1994. **62**(3): p. 485-490.
72. Zarutskie, P.W. and J.A. Phillips, *A meta-analysis of the route of administration of luteal phase support in assisted reproductive technology: vaginal versus intramuscular progesterone*. Fertility and Sterility, 2009. **92**(1): p. 163-169.
73. Cicinelli, E., et al., *Direct transport of progesterone from vagina to uterus*. Obstetrics & Gynecology, 2000. **95**(3): p. 403-406.
74. Kahraman, S., S.H. Karagozoglu, and G. Karlikaya, *The efficiency of progesterone vaginal gel versus intramuscular progesterone for luteal phase supplementation in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: a prospective clinical trial*. Fertility and Sterility, 2010. **94**(2): p. 761-763.
75. Hassan, S., et al., *Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2011. **38**(1): p. 18-31.
76. Norman, J.E., et al., *Vaginal progesterone prophylaxis for preterm birth (the OPPTIMUM study): a multicentre, randomised, double-blind trial*. The lancet, 2016. **387**(10033): p. 2106-2116.
77. Romero, R., et al., *Vaginal progesterone decreases preterm birth ≤ 34 weeks of gestation in women with a singleton pregnancy and a short cervix: an updated meta-analysis including data from the OPPTIMUM study*. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2016. **48**(3): p. 308-317.
78. Stadtmauer, L. and K. Waud, *Progesterone vaginal ring for luteal support*. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India, 2015. **65**(1): p. 5-10.
79. DRUGBANK. 07/09/2019]; Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00396>.
80. *Infarmed.pt. (2019). Pesquisa do medicamento. [online] Available at: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line/pesquisa-do-medicamento> [Accessed 30 Oct. 2019].*
81. EMA. 30/10/2019]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en>.
82. Kale, V.V. and A. Ubgade, *Vaginal mucosa-a promising site for drug therapy*. British Journal of Pharmaceutical Research, 2013. **3**(4): p. 983.
83. C Silva, A., et al., *Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals*. Current pharmaceutical biotechnology, 2015. **16**(4): p. 291-302.
84. Tichota, D.M., et al., *Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 3855.
85. Mendes, A., et al., *Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **111**: p. 755-763.
86. Yuan, H., et al., *Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. **60**(2): p. 174-179.

87. Shah, V.P., et al., *In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants*. *Pharmaceutical research*, 1989. **6**(7): p. 612-618.
88. Silva, A., et al., *Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. **86**(1): p. 158-165.
89. Etzler, F.M. and R. Deanne, *Particle size analysis: A comparison of various methods ii*. *Particle & Particle Systems Characterization*, 1997. **14**(6): p. 278-282.
90. Xu, R., *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. 2006, Springer Netherlands.
91. Siepmann, J. and F. Siepmann, *Mathematical modeling of drug dissolution*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **453**(1): p. 12-24.
92. Silva, A.C., et al., *Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **436**(1): p. 798-805.
93. Tietz, K. and S. Klein, *Simulated Genital Tract Fluids and Their Applicability in Drug Release/Dissolution Testing of Vaginal Dosage Forms*. *Dissolution Technologies*, 2018. **25**(3): p. 40-51.
94. Marques, M.R., R. Loebenberg, and M. Almukainzi, *Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing*. *Dissolution Technol*, 2011. **18**(3): p. 15-28.
95. Aka-Any-Grah, A., et al., *Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010. **76**(2): p. 296-303.
96. Geshnizgani, A.M. and A.B. Onderdonk, *Defined medium simulating genital tract secretions for growth of vaginal microflora*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992. **30**(5): p. 1323-1326.
97. Yang, Y., et al., *The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014. **418**: p. 261-272.
98. Tavakoli, N., S. Daneshamouz, and F. Safaie, *Preparation and physicochemical evaluation of progesterone suppository*. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 2006. **13**(3): p. -.
99. Price, J.H., et al., *Effect of the suppository base on progesterone delivery from the vagina*. *Fertility and Sterility*, 1983. **39**(4): p. 490-493.
100. Hasan, M.M., et al., *A KEY APPROACH ON DISSOLUTION OF PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS*. *The Pharma Innovation*, 2017. **6**: p. 168-180.
101. Siewert, M., et al., *FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms*. *Aaps Pharmscitech*, 2003. **4**(1): p. 43-52.
102. Stippler, E., S. Kopp, and J. Dressman, *Comparison of US Pharmacopeia simulated intestinal fluid TS (without pancreatin) and phosphate standard buffer pH 6.8, TS of the International Pharmacopoeia with respect to their use in in vitro dissolution testing*. *Dissolution Technologies*, 2004. **11**(2): p. 6-11.
103. Krishna R., Y.L., *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, in *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. 2008, Springer.
104. *U.S. Food and Drug Administration (FDA)*. [cited 2019 20/10/2019]; Available from: <https://www.fda.gov/>.
105. Vinarov, Z., P. Dobрева, and S. Tcholakova, *Effect of surfactant molecular structure on Progesterone solubilization*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018. **43**: p. 44-49.
106. Raymond C Rowe, P.J.S.a.S.C.O., *Handbook of pharmaceutical excipients*. Fifth Edition ed. 2006.
107. Alam, A., *Agent for protein precipitation, a method of protein precipitation, a method of protein assay using protein precipitation agent, and a kit for protein assay*. 2005, Google Patents.

108. Silva, A., et al., *Risperidone release from solid lipid nanoparticles (SLN): validated HPLC method and modelling kinetic profile*. Current Pharmaceutical Analysis, 2012. **8**(4): p. 307-316.
109. Marroum, P.J., *History and evolution of the dissolution test*. Dissolution Technol, 2014. **21**(3): p. 11-16.
110. Higuchi, T., *Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1961. **50**(10): p. 874-875.
111. Ozkan, Y., et al., *Comparative dissolution testing of paracetamol commercial tablet dosage forms*. Acta poloniae pharmaceutica, 2000. **57**(1): p. 33-41.
112. Jacob, S., et al., *Comparative In Vitro Dissolution Studies between Different Types of Acetaminophen Suppository Dosage Forms Using a Novel Modified Basket Method*. 2015. **4**.
113. Roseman, T.J., et al., *Continuous Flow Bead-Bed Dissolution Apparatus for Suppositories*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1981. **70**(6): p. 646-651.
114. Scavone, C., et al., *Efficacy and Safety Profile of Diclofenac/Cyclodextrin and Progesterone/Cyclodextrin Formulations: A Review of the Literature Data*. Drugs in R&D, 2016. **16**(2): p. 129-140.
115. Michelle R. A. de Almeida, A.S.B., Samia Hamid Ahmed Hamid, Daniel Banov, Ha Tran Hong Phan, *Investigation of the Bioaccessibility of Progesterone (Micronized and Non-micronized) , Using an In Vitro Model of the Human Gastrointestinal System*. International Journal of Applied Science and Technology 2015. **Vol. 5, No. 4; August 2015**
116. Müller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**: p. S131-S155.
117. Obeidat, W.M., et al., *Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC)*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2010. **76**(1): p. 56-67.
118. Pinto, M.F., et al., *A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **477**(1): p. 519-526.