

Sara Sofia dos Santos Quelhas

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

- Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina -

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Sara Sofia dos Santos Quelhas

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

- Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina -

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

- Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina -

Orientadora: Professora Doutora Eliana Souto

Co-orientadora: Dra. Ana Macedo

Autor: Sara Sofia dos Santos Quelhas

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte integrante dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Resumo

O conceito de nanoencapsulação, para a projeção de novos sistemas de liberação de fármacos, tem emergido nos últimos anos oferecendo novas oportunidades para o diagnóstico e tratamento de várias situações patológicas.

Na Indústria Farmacêutica e na Medicina Moderna está bem patente a relação entre as propriedades físico-químicas de um produto e a sua entrada no mercado. Por exemplo, as dificuldades do fármaco atingir concentrações terapêuticas no local alvo estão relacionadas com a fraca solubilidade da molécula ou a sua rápida eliminação da corrente sanguínea.

Os flavonoides constituem uma classe de compostos naturais com atividade farmacológica, designadamente, ação venotrópica e antioxidante, com particular interesse para o desenvolvimento de novos sistemas que possam atuar no alívio de sintomas associados a doença venosa.

No presente trabalho foi desenvolvida uma nanoemulsão de rutina mediante a utilização do método de Homogeneização de Alta Pressão, (“*High Pressure Homogenization*”, HPH). Os resultados demonstraram que é possível obter dispersões à escala nanométrica, tendo sido produzidas gotículas de diâmetro médio de, aproximadamente, 100 nm. A nanoemulsão apresentou estabilidade física durante os 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Foi obtido um valor de eficácia de encapsulação da rutina de aproximadamente 85%.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Abstract

The concept of nanoencapsulation for the design of new drug delivery systems emerged a few years ago, and the rapid advances in nanotechnology have offered a wealth of new opportunities for diagnosis and treatment of several diseases.

In the pharmaceutical industry and in modern medicine, it is well known the ratio between many promising drugs that are discovered and the fact that they will never make it to the market. This is due to their physical and chemical properties and difficulties in delivery, followed by the lack of solubility or effective clearance from the blood.

Flavonoids are a class of natural compounds with pharmacological activities, particularly standing out the vasoactive and antioxidant actions, of particular interest for the development of new systems that can act to relieve symptoms associated with venous disease.

A nanoemulsion of rutin was developed using a High Pressure Homogenization (HPH). Results show that it is possible to obtain dispersions at a nanoscale range, and the size of the particles obtained round approximately 100 nm. Nanoemulsion showed physical stability during 15 days of storage at room temperature. The encapsulation efficiency obtained for rutin was approximately 85%.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Eliana Souto e à Dra. Ana Macedo por todo o apoio, orientação científica e disponibilidade prestada durante a realização e revisão final do presente trabalho.

À minha mãe agradeço o apoio incondicional e a oportunidade que me foi dada para conseguir tirar proveito deste percurso académico.

À restante família por todo o apoio em todos os momentos durante e no final de todos estes anos.

Aos meus amigos agradeço toda a amizade e preocupação.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

ÍNDICE GERAL

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
I. Introdução ao conceito de Nanotecnologia e Nanomedicina	3
1. Conceito de Nanotecnologia e Nanomedicina	3
II. Nanoemulsões.....	7
1. Conceito de Nanoemulsão	7
2. Nanoemulsões <i>versus</i> Microemulsões	10
3. Constituintes das Nanoemulsões	15
4. Métodos de produção de Microemulsões e Nanoemulsões	20
5. Caraterização de uma nanoemulsão.....	24
III. Vias de administração passíveis de serem utilizadas para administração de produtos de nanotecnologia	30
1. Via de administração tópica.....	30
2. Via de administração oral	36
3. Via de administração parenteral.....	37
IV. Flavonoides.....	38
1. Importância dos Flavonoides	38
2. Rutina.....	41
3. Aplicações terapêuticas da rutina	42
4. Produtos comercializados contendo rutina	43
V. Estados patológicos associados ao desenvolvimento de nanoemulsões com rutina.....	45
1. Doença venosa crónica	45
VI. Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina.....	49
1. Materiais	49

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

2. Métodos	50
3. Resultados.....	54
4. Discussão	60
2.CONCLUSÃO.....	62
3.BIBLIOGRAFIA	64

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Índice de Figuras

- Figura 1** - Representação logarítmica do tamanho de estruturas características da pele, invasores da pele e transportadores de substâncias (adaptado de Cevc e Vierl, 2010). ... 3
- Figura 2** - Aumento da hidratação do estrato córneo 1 e 24 horas após o tratamento com diferentes produtos, notando que a nanoemulsão confere maior hidratação comparativamente aos outros sistemas. (adaptado de Sonnevile-Aubrun et alii., 2004). 8
- Figura 3** - Exemplos de surfactantes, cosurfactantes e cosolventes utilizados em formulações comerciais lipídicas. (adaptado de Narang et alii., 2007). 13
- Figura 4** - Efeito de Ostwald a 25°C em função da natureza do lípido (adaptado de Sonnevile-Aubrun et alii., 2004). 16
- Figura 5** - Comparação das curvas de fluxo de uma nanoemulsão rica em lípido e associação de uma nanoemulsão com polímero (adaptado de Sonnevile-Aubrun et alii., 2004). 19
- Figura 6** - Dispositivos mecânicos de alta energia para produção de nanoemulsões: 1) Misturador de alta velocidade; 2) Ultrassons; 3) Microfluidizadores; 4) Ultrassons; 5) Moinho Coloidal; 6) Homogeneizador de Membrana; 7) Homogeneizador de Alta Pressão (adaptado de McClements, 2012). 21
- Figura 7** - Exemplos de métodos de produção de baixa energia utilizados para produzir nanoemulsões: 1) Emulsificação Espontânea; 2) Método de inversão de fase; 3) Método de inversão do ponto da emulsão (adaptado de McClements, 2012). 23
- Figura 8** - Avaliação da diminuição do valor de pH e potencial zeta ao longo do tempo. (adaptado de Cui et alii., 2006). 26

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Figura 9 - Fórmula da Eficácia de Encapsulação (E.E) (adaptado de Laos et alii., 2007).	28
Figura 10 - Perfis de libertação de um fármaco a partir de nanoemulsões (adaptado de Fathi et alii., 2012).....	29
Figura 11 - Componentes e funções da pele. (adaptado de Morganti et alii., 2001).....	33
Figura 12 - Estrutura química nuclear dos flavonoides. (adaptado de Heim et alii., 2002).....	39
Figura 13 - Estrutura e grau de hidroxilação dos vários flavonoides (adaptado de Formica e Regelson, 1995).....	40
Figura 14 - Classificação, estrutura e fontes alimentares de flavonoides na dieta. (Heim et al., 2002).....	41
Figura 15 - Estrutura molecular da rutina. (adaptado de Mauludin et alii., 2009).....	42
Figura 16 - Estrutura de uma veia e representação das válvulas. (adaptado de Seeley et alii., 2003).....	46
Figura 17 - Veias varicosas. (Hinchliffe et alii., 2006).....	47
Figura 18 - Visualização das partículas da nanoemulsão placebo ao microscópio ótico	54
Figura 19 - Análise de distribuição das partículas da nanoemulsão placebo no dia 1 ..	55
Figura 20 - Análise de distribuição das partículas da nanoemulsão placebo no dia 15.	55

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Figura 21 - 1) Aspeto físico da nanoemulsão 10 mg de rutina; 2) Observação a uma ampliação de 400 vezes. 56

Figura 22 - 1) Aspeto físico da nanoemulsão 20 mg de rutina; 2) Observação a uma ampliação de 400 vezes. 56

Figura 23 - 1) Aspeto físico da nanoemulsão 30 mg de rutina; 2) Observação a uma ampliação de 400 vezes. 57

Figura 24 - Gráfico do varrimento do comprimento de onda da rutina..... 57

Figura 25 - Gráfico da curva de calibração. 58

Figura 26 - Libertação in vitro da rutina a partir da nanoemulsão pelo método do saco de diálise (n=3). 59

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação clínica da Doença Venosa Crónica (CEAP). (adaptado de Tran e Meissner, 2002).	48
Tabela 2 - Composição qualitativa e quantitativa da formulação placebo	50
Tabela 3 - Avaliação de parâmetros físico-químicos da formulação placebo	55
Tabela 4 - Composição qualitativa e quantitativa da nanoemulsão com 10 mg de rutina.....	52
Tabela 5 - Composição qualitativa e quantitativa da nanoemulsão com 20 mg de rutina.....	52
Tabela 6 - Composição qualitativa e quantitativa da nanoemulsão com 30 mg de rutina.....	52
Tabela 7 - Ensaio de determinação da eficácia de encapsulação (E.E.) da rutina.....	58
Tabela 8 – Eficácia de encapsulação (E.E.)	58

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Lista de abreviaturas e símbolos

nm – Nanómetros

SLN- Nanopartículas de Lípidos Sólidos (do Inglês, *Solid Lipid Nanoparticles*)

UV – Ultravioleta

O/A – Óleo/Água

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

% - Percentagem

°C- Graus Celsius

HPH – Homogeneização de Alta Pressão (do Inglês, *High Pressure Homogenization*)

PI – Índice de Polidispersão

µm- Micrómetros

A/O- Água/Óleo

GRAS – Geralmente Reconhecido como Substância Segura (do Inglês, *Generally Recognized As Safe*)

EHL – Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

m/m – Unidade de Concentração de massa/massa

DSC – Calorimetria Diferencial de Varrimento (do Inglês, *Differential Scanning Calorimetry*)

NMR – Ressonância Magnética Nuclear (do Inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*)

PZ – Potencial Zeta

GI – Gastrintestinal

mg/l – Unidade de Concentração de Miligramas por Litro

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade (do Inglês, *Low Density Lipoproteins*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do Inglês, *Reactive Oxygen Species*)

mg – Miligramas

IVC – Insuficiência Venosa Crônica

mg/g – Unidade de Concentração Miligramas por Grama

g – Gramas

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

CEAP – Sistema de Classificação de Doença Venosa Crônica

DVT – Trombose Venosa Profunda (do Inglês, *Deep Venous Thrombosis*)

μL – Microlitros

mL – Mililitros

$\mu\text{g/mL}$ – Unidade de Concentração de Microgramas por Mililitro

F.D. – Fator de Diluição

Rpm – Rotações por Minuto

UV-vis – Ultravioleta-visível

mV – Milivolts

λ – Comprimento de onda

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

1. INTRODUÇÃO

No âmbito da Nanotecnologia, o presente trabalho visa a apresentação de uma revisão sistemática de nanomateriais biodegradáveis e a sua aplicação no desenvolvimento de formulações de libertação controlada à escala manométrica. Como prova de conceito, desenvolveu-se e caracterizou-se físico-quimicamente uma nanoemulsão contendo rutina.

O intuito da realização deste trabalho aborda a importância e a necessidade atual do desenvolvimento de novas formulações, que possam facilitar o tratamento de diversas patologias, através da encapsulação de fármacos em sistemas de dimensões nanométricas.

Inicialmente procedeu-se à pesquisa de informação científica possibilitando uma melhor compreensão do tema abordado. Com base na relação entre as falhas existentes nos diversos tipos de tratamento (fraca biodisponibilidade do fármaco, rápida eliminação do organismo, falhas no direcionamento para o local alvo) e a necessidade do aparecimento de novos sistemas terapêuticos, torna-se essencial fortalecer a área da terapêutica através da adoção de novas estratégias que permitam ultrapassar estas limitações.

Assim, foi realizada uma abordagem aos fundamentos teóricos que constituem o tema desta dissertação, remetendo para conceitos como a “Nanotecnologia” e a “Nanomedicina”, facilitando o entendimento dos seguintes capítulos que se direcionam para o desenvolvimento de novas formulações.

Numa primeira parte, a discussão centrou-se na definição de nanotecnologia e nanomedicina, bem como os métodos de produção e matérias-primas utilizadas para o desenvolvimento de novas formulações. Numa segunda vertente, abordou-se a importância e a caracterização de nanoemulsões face a outras formulações existentes, e de que forma as primeiras contribuem para a melhoria dos sistemas clássicos. Seguidamente, aprofundou-se a discussão sobre as vias de administração mais associadas à utilização destes produtos. Nos capítulos posteriores, foram referidos o interesse e aplicações terapêuticas dos Flavonoides, tanto como os estados patológicos associados à sua utilização. Finalmente, e com uma abordagem laboratorial, são referenciados os estudos associados ao desenvolvimento e caracterização de uma

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

nanoemulsão de rutina, apresentando os resultados obtidos, e concluindo em que sentido o desenvolvimento destes sistemas influenciam a terapêutica, podendo constituir uma nova estratégia para os profissionais de saúde.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

I. Introdução ao conceito de Nanotecnologia e Nanomedicina

1. Conceito de Nanotecnologia e Nanomedicina

Segundo Horton e Khan (2006), “a nanotecnologia é uma tecnologia fundamental que nos permite ver, manipular e fabricar em menor escala”.

Trata-se de um campo multidisciplinar que abrange um vasto e diversificado leque de dispositivos derivados de ciências como a Engenharia, Física, Química e Biologia (Sahoo et alii., 2007). O impacto nestas áreas é amplo e de longo alcance, não só proporcionando otimização do custo e melhoria do desempenho de processos e de produtos atuais, mas, a longo prazo, rendendo novas abordagens face a problemas sociais e de saúde (Horton e Khan, 2006).

Pode ser definida como a ciência e engenharia envolvidas no projeto, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional, em pelo menos uma dimensão, é a escala nanométrica (um bilionésimo de metro) (Sahoo et alii., 2007). O tamanho da partícula é a propriedade de definição de um nanomaterial e a gama entre 1-1000 nm é comumente utilizada (Figura 1) (Mihriyan et alii., 2012).

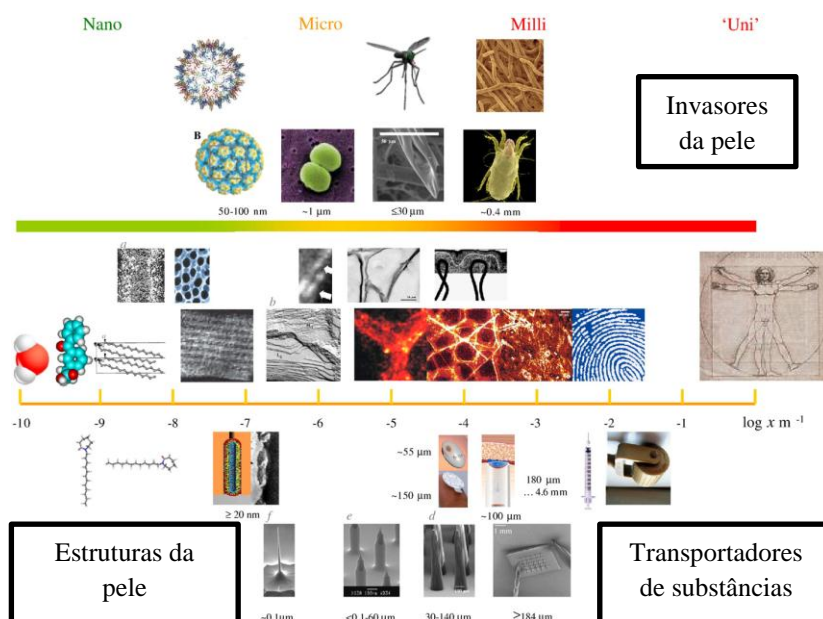


Figura 1 - Representação logarítmica do tamanho de estruturas características da pele, invasores da pele e transportadores de substâncias (adaptado de Cevc e Vierl, 2010).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

As nanopartículas com dimensões menores do que 300 nm têm recebido um interesse crescente para aplicações em nanomedicina e nano-farmacêutica (Anton e Vandamme, 2009). O novo campo emergente da nanotecnologia, caracterizado por rápidos avanços na ciência e tecnologia, cria uma infinidade de novas oportunidades para avanço da ciência médica e conseqüente tratamento de doenças na saúde humana. Assim, a associação da nanotecnologia à medicina e à fisiologia implica materiais e dispositivos concebidos para interagir com o corpo à escala molecular com um elevado grau de especificidade, com o objetivo de atingir o efeito terapêutico máximo com efeitos secundários mínimos (Sahoo et alii., 2007).

Fora da comunidade científica, o termo “nano” tem sido amplamente utilizado como ferramenta de *marketing* para promover produtos miniaturizados, incluindo por exemplo pequenos eletrodomésticos (iPod NanoTM) ou pequenos carros (Tata NanoTM), gerando atitudes entre os consumidores, negativas e positivas, face à nanotecnologia. Atualmente existe uma aplicação gratuita disponível para o iPhone designada por “findNano” que se baseia na identificação de produtos contendo nanocomponentes (Mihriyan et alii., 2012).

Nos últimos anos a nanotecnologia tem crescido exponencialmente passando por um desenvolvimento explosivo aliado ao facto de se tornar cada vez mais evidente que a produção de novos fármacos por si só não é suficiente para garantir o progresso de uma terapia (Sahoo et alii., 2007; Mehnert e Mäder, 2001). De facto, a obtenção de bons resultados em testes experimentais *in vitro* é muitas vezes seguida de resultados *in vivo* desapontantes. A concentração insuficiente de fármaco devido a uma fraca absorção, rápido metabolismo e eliminação; a sua distribuição para outros tecidos combinada com a sua toxicidade; a baixa solubilidade do fármaco excluindo a aplicação intravenosa de soluções aquosas; a elevada flutuação dos níveis plasmáticos devido à imprevisível biodisponibilidade após administração oral, são alguns dos fatores cruciais que podem provocar a falha de um sistema terapêutico (Mehnert e Mäder, 2001).

Uma estratégia promissora para superar as limitações relacionadas com o fármaco envolve o desenvolvimento de sistemas de transporte adequados. Deste modo, o seu destino não é determinado pelas propriedades do mesmo, mas sim pelo seu sistema de transporte, que deverá permitir a libertação localizada e controlada do fármaco, de

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

acordo com as necessidades específicas da terapêutica. O tamanho do transportador depende da via de administração e varia entre alguns nanómetros (transportadores coloidais), micrómetros (micropartículas) e milímetros (implantes), sendo que os implantes e as micropartículas não podem ser administrados por via intravenosa devido às suas dimensões (Mehnert e Mäder, 2001).

Segundo Wang e Chen (2011), “ a nanomedicina é a aplicação da nanotecnologia ao tratamento de patologias, diagnóstico, monitorização e controlo dos sistemas biológicos ao nível molecular. ” O seu principal objetivo prende-se com o desenvolvimento de novos sistemas de libertação e direcionamento a um local alvo de compostos farmacêuticos, terapêuticos e para fins de diagnóstico. Deste modo, estão associadas diversas vantagens à sua utilização, como a proteção contra a degradação e aumento da estabilidade de fármacos, prolongamento do tempo na circulação sistémica, redução de efeitos secundários e aumento da distribuição e processos metabólicos nos tecidos, ultrapassando as limitações dos sistemas convencionais.

Encontram-se descritos na literatura vários sistemas à escala nanométrica tais como lipossomas, micropartículas poliméricas, nanopartículas de lípido sólido, microemulsões e nanoemulsões. As vesículas fosfolipídicas, mais conhecidas por lipossomas, marcaram um grande avanço para o mercado cosmético com o lançamento de um produto antienvhecimento, levando ao desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos como um agente tensioativo sintético para instilação pulmonar, um produto tópico para utilização terapêutica antimicótica e também produtos para administração intravenosa. Contudo, a quantidade existente no mercado é limitada devido aos elevados custos de produção e também possíveis problemas tecnológicos associados (Müller et alii., 2000).

Após a introdução dos primeiros produtos baseados em micropartículas poliméricas, houve um aumento ligeiro dos mesmos no mercado. Relativamente às nanopartículas poliméricas, após trinta anos de investigação, e à exceção de um agente de diagnóstico, o uso destes sistemas é ainda muito limitado. Os motivos que suplementam o insucesso destes dois tipos de sistemas de libertação de fármacos são a citotoxicidade dos polímeros e a falta de um método de produção adequado em grande escala (Müller et alii., 2000).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

As SLN têm sido introduzidas como novos sistemas de liberação de fármacos em diversas áreas de aplicação, nomeadamente para aplicação cosmética uma vez que são descritas como promissores sistemas de transporte face às formulações convencionais. Combinam vantagens das nanopartículas poliméricas como a capacidade de proteção de compostos lábeis contra degradação química devido à presença de uma matriz sólida e também a possibilidade de obter sistemas de liberação controlada, e das nanoemulsões e lipossomas sendo constituídas por lípidos biocompatíveis, bem tolerados e aceites. A sua ação oclusiva que permite um aumento da hidratação da pele ou o seu potencial de bloqueio às radiações ultravioleta (UV), funcionando por si só como protetor solar físico, justificam também a preferência face aos sistemas convencionais (Wissing e Müller, 2003; Cirri et alii., 2012).

As microemulsões diferem das nanoemulsões uma vez que são dispersões transparentes, termodinamicamente estáveis, caracterizadas por uma fase interna altamente dispersa, onde o tamanho das partículas varia entre 5 a 50 nm (Peira et alii., 2008).

As nanoemulsões O/A definem-se como sistemas de pequenas gotículas lipídicas (< 100nm) dispersas numa fase aquosa contínua, particularmente adequados para encapsular e posteriormente permitir a liberação de fármacos lipófilos. À semelhança das emulsões convencionais, as nanoemulsões também carecem de estabilidade termodinâmica uma vez que as gotículas tendem a redistribuir-se ao longo do tempo. No entanto, revelam potenciais vantagens, uma vez que aumentam a biodisponibilidade de substâncias lipófilas, são estáveis e podem ser incorporadas em produtos transparentes já que possuem pouca dispersão de luz (Qian et alii., 2011).

O considerável interesse e potencial para crescimento e desenvolvimento futuro da utilização da nanotecnologia na área farmacêutica sugerem o aparecimento de uma secção especializada em Nanotecnologia Farmacêutica no *International Journal of Pharmaceutics* (Florence, 2004).

Em ciências farmacêuticas, a nanotecnologia tem sido utilizada em diversas áreas tais como:

- a. Descoberta de fármacos;
- b. Análise (incluindo o uso de sondas miniaturizadas);

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

- c. Abordagens usadas pelo corpo em fluxo de fluido e direcionamento;
- d. Sistemas em escala nanométrica de libertação de fármacos (lipossomas, nanopartículas, microemulsões, nanoemulsões);
- e. Dispositivos implantáveis passíveis de detetar os níveis sanguíneos e libertar fármacos automaticamente;
- f. Biomaterias à nanoescala incluindo biomiméticos;
- g. Macromoléculas biológicas (proteínas, enzimas, DNA e RNA nanoestruturados, biomoléculas, células, biochips);
- h. Sensores moleculares e biossensores, técnicas de diagnóstico clínico;
- i. Libertação e expressão de genes.

A importância da utilização da nanotecnologia na área da Saúde está focada na possibilidade de produção de sistemas de libertação modificada de fármacos (Florence, 2004), onde o crescente interesse depende das várias e únicas propriedades físicas e químicas associadas aos nanomateriais (Mihrianyan et alii., 2012). É importante realçar que, quando fármacos são manipulados à escala nanométrica muitas características (ópticas, elétricas, magnéticas, estruturais e de desempenho) podem sofrer alterações significativas pelo que se torna necessária a caracterização do sistema (Florence, 2004).

II. Nanoemulsões

1. Conceito de Nanoemulsão

Uma abordagem que pode ser utilizada para aumentar a solubilidade e dispersibilidade em água de fármacos pouco solúveis, e consequentemente a sua biodisponibilidade, passa pela sua incorporação em gotículas finas de uma nanoemulsão (Yuan et alii., 2008a). Recentemente, tem havido um interesse acrescido na encapsulação de compostos naturais com capacidade antioxidante, como os tocoferóis, carotenóides e os flavonóides, em nanoemulsões O/A pela biodisponibilidade destes compostos ser aumentada e posterior aumento da sua atividade biológica (Atarés et alii., 2012; Qian et alii., 2011; Silva et alii., 2011).

Por outro lado, o poder de hidratação de uma nanoemulsão é muito superior à

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

hidratação conferida por outras formulações, como cremes corporais (Figura 2). As reduzidas dimensões das suas gotículas conferem-lhe propriedades características que são facilmente avaliadas em produtos cosméticos. Sendo transparentes são facilmente associadas a frescura, pureza, simplicidade e a água, sendo facilmente absorvidas pela pele. Podem ser utilizadas por uma grande variedade de produtos desde fluidos aquosos a géis (Sonneville-Aubrun et alii., 2004). Devido à sua eficácia para solubilizar compostos, oferecem uma alternativa para a administração de fármacos pouco solúveis em água levando a uma diminuição de efeitos secundários (Hoeller et alii., 2009).

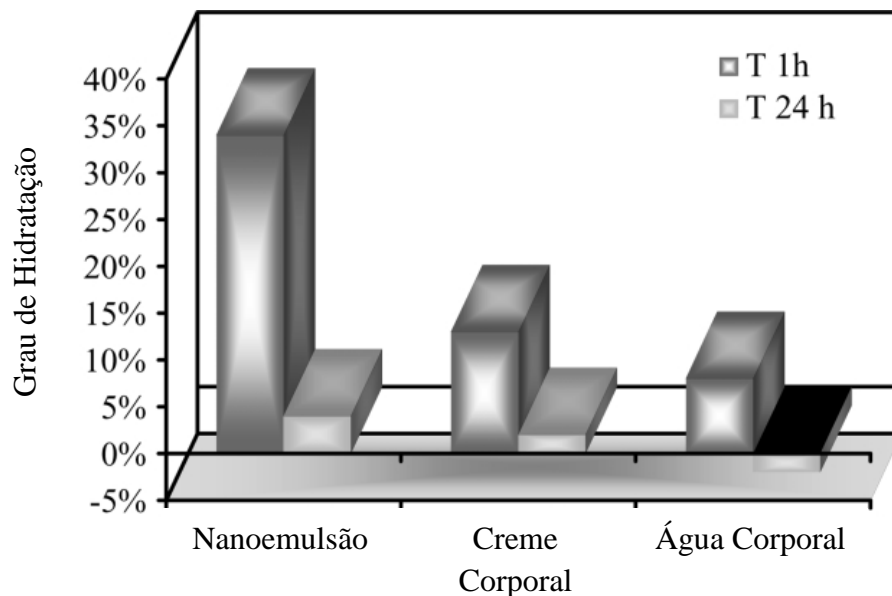


Figura 2 - Aumento da hidratação do estrato córneo 1 e 24 horas após o tratamento com diferentes produtos, notando que a nanoemulsão confere maior hidratação comparativamente aos outros sistemas. (adaptado de Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

Assim, as nanoemulsões têm recebido uma atenção redobrada no sentido de funcionarem como transportadores coloidais de moléculas hidrófobas para aplicação tópica. De facto, a encapsulação deste tipo de moléculas nestes sistemas pode aumentar a sua taxa de permeação na pele e potenciar a aplicação tópica devido ao tempo de residência prolongado do fármaco nas camadas superiores da pele, consequência da ampla área de superfície e reduzida tensão superficial das gotículas lipídicas (Fasolo et alii., 2007).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Cerca de 40% das moléculas consideradas como candidatas ao desenvolvimento de novos fármacos são de natureza hidrófoba. A solubilidade é uma medida da quantidade máxima de soluto capaz de formar uma solução homogênea com um solvente específico em condições de equilíbrio. A solubilidade aquosa de um fármaco influencia fortemente a sua atividade biológica. Assim, a exploração do potencial terapêutico dessas moléculas depende da sua solubilização em formulações não tóxicas, biocompatíveis e/ou biodegradáveis, que lhes conferem proteção durante o transporte e é suscetível de as libertar no tecido alvo. Nas últimas décadas tem-se produzido um número surpreendente de sistemas compreendendo partículas com dimensões entre 1 e 100 nm, as nanopartículas (Huynh et alii., 2012), sendo caracterizados como sistemas coloidais constituídos por pequenas partículas dispersas no interior de um transportador líquido, onde o fármaco se encontra encapsulado (McClements, 2012).

A indústria farmacêutica tem produzido sistemas coloidais de elevada variedade para as diferentes vias de administração, incluindo as microemulsões, lipossomas, nanoemulsões, emulsões, nanopartículas de natureza lipídica (SLN), suspensões de nanocristais e partículas poliméricas (McClements, 2012).

A compatibilidade entre o fármaco e os sistemas de liberação, as propriedades de superfície e o tamanho da partícula constituem parâmetros físico-químicos importantes relacionados com o desempenho deste tipo de sistemas. Tal fundamenta que, para uma dada aplicação, raramente é óbvio qual o sistema de transporte e liberação do fármaco mais apropriado, além de que para cada sistema deve haver uma otimização de modo a alcançar as propriedades desejadas. Otimizando a compatibilidade entre o fármaco e o meio de solubilização pode aumentar-se significativamente a quantidade de fármaco introduzida, a retenção do fármaco e posteriormente a estabilidade química da formulação. Além disso, as propriedades de superfície do sistema de liberação influenciam a sua estabilidade durante o armazenamento e após a administração *in vivo* (Huynh et alii., 2012).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

2. Nanoemulsões *versus* Microemulsões

As nanoemulsões e as microemulsões são dois sistemas coloidais adequados para encapsular compostos lipófilos e permitir a sua libertação. Utilizando os mesmos constituintes (fase oleosa, fase aquosa e agente tensioativo), mas alterando as suas quantidades torna-se possível produzir ambos os sistemas (Rao e McClements, 2012).

As nanoemulsões são sistemas coloidais de transporte de fármacos extremamente promissores para diversas aplicações terapêuticas (Yilmaz e Borchert, 2006), sendo definidas como pequenas gotículas lipídicas dispersas num meio aquoso, em que cada gotícula está interligada por uma barreira fina de moléculas de agente emulsivo (McClements, 2012). Ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, isto é, a energia livre das fases oleosa e aquosa separadas é menor do que a da emulsão por si só. Consequentemente, estas tendem a redistribuir-se ao longo do tempo através de processos como a floculação, coalescência, separação gravitacional, inversão de fases e suscetibilidade ao efeito de Ostwald. A velocidade a que estes processos ocorrem depende das propriedades físico-químicas de ambas as fases (polaridade, densidade e viscosidade), da natureza da barreira interfacial (espessura, carga, natureza química) e das características da partícula (tamanho da partícula, concentração e estado físico) (McClements, 2012).

Ao longo do tempo, a investigação relacionada com a degradação de nanoemulsões tem centrado a sua atenção aos fenómenos de coalescência e floculação das gotículas e contribuição da fase oleosa e da composição do agente emulsivo para os mesmos, não dando importância à suscetibilidade de uma nanoemulsão ao efeito de Ostwald. O processo adjacente à degradação de uma nanoemulsão pelo efeito de Ostwald consiste no crescimento de uma gotícula de emulsão à custa de uma gotícula menor, como resultado da diferença de potencial químico do material no interior da gotícula. Esta diferença é devida ao diferente raio de curvatura das gotículas. Pode também definir-se como o processo de redução da energia livre do sistema por meio da destruição da área interfacial da nanoemulsão. Por outras palavras, o efeito final traduz-se no aumento do raio médio das gotículas da emulsão ao longo do tempo, provocado pela dissolução e adesão das gotículas mais pequenas às gotículas de maior dimensão (Taylor, 1998).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

As nanoemulsões podem ser transparentes ou opacas dependendo da dimensão das gotículas relativamente ao comprimento de onda (McClements, 2012). Comparativamente às microemulsões, as nanoemulsões necessitam de menor quantidade de agente tensioativo (Hoeller et alii., 2009). São sistemas frágeis por natureza, como são transparentes e normalmente muito fluidos, o mais pequeno sinal de destabilização torna-se facilmente perceptível, tornando-as opacas e cremosas. As duas maiores fontes de instabilidade destes sistemas são a natureza da fase oleosa e a adição de polímeros. Podem ser esterilizadas por filtração e a sua textura pode ser alterada através do aumento da sua consistência, conseguido através do aumento do conteúdo lipídico ou por adição de agentes espessantes e gelificantes (Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

A possibilidade de libertação controlada de um fármaco, direcionamento à célula alvo, e a possibilidade de incorporação de uma grande variedade de fármacos, constituem algumas das vantagens apresentadas pelas nanoemulsões. Devido ao reduzido tamanho das gotículas, estas são capazes de penetrar facilmente através das camadas da pele e promover a penetração das substâncias ativas incorporadas (Hoeller et alii., 2009).

O desenvolvimento de formulações de nanoemulsões para libertação intravenosa, oral e ocular demonstrou ter sucesso no sentido em que apresenta reduções nos efeitos laterais de vários fármacos de grande potência e um efeito farmacológico prolongado (Yilmaz e Borchert, 2006).

No caso de nanoemulsões do tipo O/A, as principais desvantagens prendem-se com a instabilidade física que pode ser provocada pela incorporação do fármaco no sistema ou pelo simples facto de alguns lípidos demonstrarem solubilidade insuficiente para fármacos de possível interesse para incorporação em emulsões (Müller et alii., 2000).

A manifestação mais comum de deterioração das nanoemulsões é a formação de um anel esbranquiçado ou um filme de óleo brilhante em torno da superfície do recipiente. Estas manifestações são resultado de uma variedade de mecanismos físico-químicos que ocorrem no interior da emulsão. Torna-se então necessário compreender os fatores de maior impacto na formação de nanoemulsões, e determinar a influência da composição do sistema na sua estabilidade (Rao e McClements, 2012).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

As microemulsões também têm emergido como potenciais veículos para liberação de fármacos (Yuan et alii., 2008b). São sistemas contendo microestruturas aquosas e/ou oleosas que coexistem em equilíbrio termodinâmico devido à presença de um filme de agente tensioativo na interface óleo/água (Narang et alii., 2007; Yuan et alii., 2008b). Dependendo do agente tensioativo e das condições da formulação, podem ser formados diversos tipos de microemulsões incluindo microemulsões O/A (Winsor tipo I), microemulsões A/O (Winsor tipo II) e microemulsões bicontínuas (Winsor tipo III ou IV). Comparando com os hidrogéis e emulsões, as microemulsões permitem uma maior solubilidade de fármacos devido à coexistência de locais hidrófilos e lipófilos, e uma maior interface O/A (Yuan et alii., 2008b).

Não demonstram instabilidade física em termos de aglomeração ou separação de fases. Estes sistemas revelam um tamanho de fase dispersa inferior (<200 nm) ao das nanoemulsões, conferindo transparência ao sistema. Diferem das micelas pela presença de fase oleosa e das emulsões pela quantidade de fase dispersa. Além disso, requerem a incorporação de um cosolvente e/ou cotensioativo para facilitar a sua formação (Narang et alii., 2007).

Os agentes tensioativos são moléculas com propriedades hidrófilas e lipófilas caracterizados pelo seu valor de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) o que determina as interações estabilizantes do final hidrófilo do agente tensioativo com a fase aquosa. São utilizados para a preparação quer de nano ou microemulsões, podendo ser iônicos ou não-iônicos. Enquanto um agente tensioativo não-iônico é estabilizado por ligações dipolo-dipolo e pontes de hidrogénio com a hidratação da camada de água na sua superfície hidrófila, um agente tensioativo iônico é estabilizado por dupla camada elétrica. Para fins farmacológicos, os agentes tensioativos iônicos são evitados devido à sua toxicidade (Narang et alii., 2007).

A natureza física destes sistemas, os mecanismos de aprisionamento do fármaco e as interações físico-químicas dos seus constituintes são aspetos físicos e biofarmacêuticos que determinam a sua capacidade de solubilização de fármacos e a estabilidade física durante o armazenamento e após diluição (Narang et alii., 2007).

A sua composição inclui frequentemente a adição de um agente cotensioativo, sendo este uma molécula anfifílica, uma amina ou um álcool de cadeia curta (Kaur et alii.,

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

2007), capaz de se acumular substancialmente com o tensioativo na camada interfacial. Agentes tensioativos não-iônicos ou álcoois podem funcionar como cotensioativos num determinado sistema, onde a quantidade utilizada é normalmente menor do que a quantidade de tensioativo e serve para modificar o valor de EHL do sistema (Narang et alii., 2007).

A adição de cosolventes aumenta a solubilidade do fármaco e estabiliza a fase dispersa. Estes têm a capacidade de diminuir a constante dielétrica da água tornando o ambiente mais hidrófobo e, por conseguinte, aumentam a quantidade de agente tensioativo disperso na fase aquosa, que fica assim disponível para auxiliar na solubilização do fármaco por criação de gotículas hidrófobas no interior da fase aquosa (Figura 3) (Narang et alii., 2007).

Nome comercial do excipiente	
Surfactantes/Co-surfactantes	Lípidos
Polissorbato 20 (Tween 20)	Mono, di e triglicerídeos de óleo de milho
Polissorbato 80 (Tween 80)	α -tocoferol
Monooleato de sorbitano (SPAN 80)	Triglicerídeos do óleo de coco
Cremophor EL	Triglicerídeos do óleo de sementes de palma
Cremophor RH 40	Mono e di-glicerídeos dos ácidos caprílico e cáprico
Labrafil M 2125Cs	Mono e di-glicerídeos de cadeia média
Labrafil M 1944 Cs	Óleo de milho
TPGS	Azeite
	Ácido oleico
Co-solventes	Óleo de sésamo
Étanol	Óleo de soja hidrogenado
Glicerina	Óleos vegetais hidrogenados
Propilenoglicol	Óleo de soja
Poliétilenoglicol	Óleo de amendoim
	Cera de abelhas

Figura 3 - Exemplos de surfactantes, cosurfactantes e cosolventes utilizados em formulações comerciais lipídicas. (adaptado de Narang et alii., 2007).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Além da sua estabilidade termodinâmica, existem outras vantagens associadas ao desenvolvimento de microemulsões, tais como a facilidade de produção, reduzida viscosidade, elevada capacidade de carga, transparência e reduzido tamanho das partículas, levando ao aumento da penetração transdérmica (Vicentini et alii., 2008; El Maghraby, 2010).

O considerável interesse deste tipo de sistema como potenciais veículos de libertação de fármacos prende-se com a simplicidade da sua preparação (Warisnoicharoen et alii., 2000). Como consequência da sua estabilidade termodinâmica, as microemulsões podem ser preparadas por um método menos dispendioso: autoemulsificação (Peira et alii., 2008). Este baseia-se na simples mistura de todos os componentes, não requerendo condições e métodos de elevada energia como acontece com as nanoemulsões (Kaur et alii., 2007). Depois de agitação em vortex, formam-se microemulsões espontaneamente (Vicentini et alii., 2008).

No entanto a limitação que se opõe à sua utilização farmacêutica associa-se à necessidade de componentes farmacologicamente aceitáveis, e com a utilização de um cotensioativo podendo conduzir à destabilização da microemulsão, provocada pelo efeito de diluição, ocasionando o deslocamento do cotensioativo para fora da região interfacial da fase contínua (Warisnoicharoen et alii., 2000).

Como já referido, as microemulsões são termodinamicamente estáveis, contudo tal só acontece com determinadas composições e condições (diluição, adição de um componente ou alteração da temperatura), e uma vez alteradas estas condições a microemulsão passa a ser instável (Rao e McClements, 2012).

Uma outra desvantagem associada aos sistemas microemulsionados reside no facto de que estes sistemas quando sujeitos à diluição com fase aquosa ou evaporação de qualquer componente volátil, sofrerem uma transição de fases (El Maghraby, 2010). Em sistemas de microemulsões sem álcool uma ligeira alteração no teor de água pode influenciar o comportamento das fases, podendo provocar uma alteração na viscosidade do mesmo. No caso da aplicação tópica na pele, a transição de fases pode ocorrer após aplicação como resultado da evaporação de água ou de constituintes voláteis, ou mediante a combinação com secreções da pele após aplicação oclusiva (El Maghraby, 2010). Uma outra desvantagem inerente a este tipo de sistemas reside no facto destes

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

necessitarem de uma elevada quantidade de agente tensioativo, podendo provocar irritação no caso de aplicação cutânea (Vicentini et alii., 2008).

3. Constituintes das Nanoemulsões

A nanotecnologia oferece o potencial para melhorar significativamente a solubilidade e biodisponibilidade de muitos compostos funcionais, incluindo carotenóides, ácidos gordos polinsaturados e fitoesteróis (Yuan et alii., 2008a).

A produção de nanoemulsões baseia-se na utilização de lípidos fisiológicos e/ou biodegradáveis, de modo que estes sistemas de transporte exibam uma excelente tolerabilidade e posteriormente um elevado grau de segurança (Pardeike et alii., 2009).

Para que uma formulação seja introduzida no mercado, é necessário que os seus excipientes revelem um estatuto legal aceite: o estatuto “*Generally Recognized As Safe*”, GRAS (Müller et alii., 2002). O estatuto GRAS é um sistema que se direciona para a revisão e aprovação de substâncias, avaliando a sua segurança e a conformidade regulamentar. Consiste num processo de julgamento por parte de especialistas qualificados pela sua formação científica e experiência. O futuro do estatuto GRAS é garantido pelo seu bom desempenho acreditando produtos seguros para o consumidor (Burdock e Carabin, 2004). Assim, as substâncias com este estatuto são consideradas seguras e podem ser utilizadas no desenvolvimento de novas formulações, numa concentração próxima à utilizada nos produtos já comercializados, não havendo necessidade de a ultrapassar evitando assim a necessidade de realização de novos ensaios de tolerabilidade (Müller et alii., 2002).

Uma vez otimizadas as condições de homogeneização, as nanoemulsões podem ser produzidas usando triacilgliceróis, ésteres, alcanos, silicones, óleos essenciais e óleos aromatizantes como fase oleosa (Sonneville-Aubrun et alii., 2004; McClements, 2012), e proteínas, polissacarídeos, fosfolípidos e tensioativos como agentes emulsivos (McClements, 2012).

A seleção do lípido para inclusão na fase oleosa é restringida ao seu peso molecular, uma vez que lípidos com menor peso molecular originam nanoemulsões instáveis

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

contrariamente aos lípidos de elevado peso molecular. Quanto menor o peso molecular e maior a polaridade do lípido, maior a sua suscetibilidade ao efeito de Ostwald (Figura 4) (Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

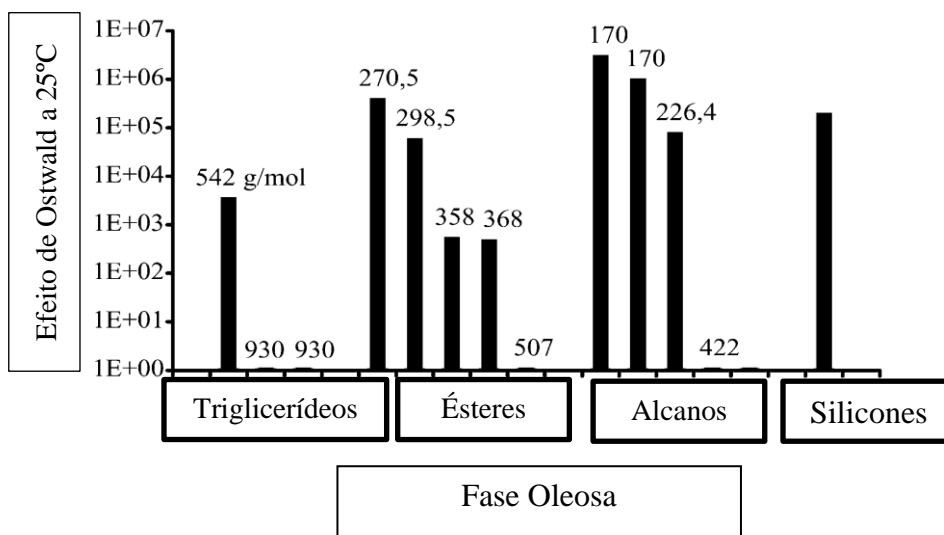


Figura 4 - Efeito de Ostwald a 25°C em função da natureza do lípido (adaptado de Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

Normalmente, a fase oleosa de produtos cosméticos é composta por uma mistura de lípidos de modo a obter um bom compromisso entre a estabilidade e as propriedades cosméticas do sistema, otimizando assim as suas propriedades para aplicação na pele. Os lípidos de baixo peso molecular são leves e pouco oleosos, enquanto os de elevado peso molecular são pesados e gordurosos (Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

Podem ser utilizadas diferentes tipos de nanogotículas em sistemas de liberação de fármacos, formulados a partir de diversos materiais com arquiteturas únicas, de modo a servir de veículo de liberação, com o objetivo de tratar uma patologia em particular. Para garantir a estabilidade das nanogotículas são adicionados normalmente agentes tensoativos, que formam uma membrana interfacial, gerando uma força repulsiva eficaz entre as nanogotículas, prevenindo assim o fenómeno de floculação (Parveen et alii., 2012). Uma vez utilizado o método de Homogeneização de Alta Pressão (“*High Pressure Homogenization*”, HPH) pode ser usada uma enorme variedade de agentes tensoativos, contrariamente ao que acontece com o método de Emulsificação por Inversão de Fases através da Temperatura ou Inversão de Fases por alteração da

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

composição. Alguns exemplos de agentes tensioativos aptos para produção de nanoemulsões estáveis são: alquil-ésteres de sacarose, alquil-ésteres de sorbitano (etoxilados ou não etoxilados), alquil-ésteres do ácido cítrico, alquil-ésteres do ácido fosfórico, copolímeros (Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

Os agentes tensioativos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de nanoemulsões. Estes diminuem a tensão interfacial entre a fase oleosa e aquosa, reduzindo a quantidade de energia necessária para quebrar as partículas levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de partículas de menor dimensão. Além disso, formam uma camada protetora à volta das mesmas prevenindo o fenómeno de coalescência. O Tween 20 é um agente tensioativo não iónico que adsorve rapidamente à interface óleo/água e tem demonstrado bons resultados no que remete para a formação de partículas de pequenas dimensões para várias aplicações, incluindo para nanoemulsões (Silva et alii., 2011).

Os agentes tensioativos mais utilizados nas formulações de nanoemulsões são os fosfolípidos. São constituintes maioritários das membranas biológicas humanas, animais e de plantas, são uma fonte de ácidos gordos essenciais e funcionam como promotores de penetração membranar em sistemas de transporte dérmicos e transdérmicos, devido à elevada similaridade estrutural com os lípidos da pele. A sua utilização como agentes tensioativos é bastante comum em sistemas de dispersão para fins alimentares, cosméticos e farmacêuticos, devido à sua baixa toxicidade, elevada eficácia e biodegradabilidade, e elevada afinidade para os tecidos (Liu e Hu, 2007; Amsalem et alii., 2009). Muitas vezes, a sua incorporação em sistemas de libertação de fármacos tende mesmo a reduzir efeitos laterais. Além disso, funcionam como hidratante para a pele uma vez que têm uma elevada capacidade de ligação a moléculas de água, e possuem propriedades antioxidantes (Amsalem et alii., 2009). Não são imunogénicos nem irritantes, sendo inofensivos para a pele (Liu e Hu, 2007).

Os fosfolípidos são substâncias que não possuem toxicidade mesmo em elevadas concentrações, e sendo constituintes das membranas celulares biológicas têm uma elevada afinidade para as mesmas, possibilitando o aumento da absorção do fármaco (Paolino et alii., 2002). O facto de serem moléculas anfifílicas, permite-lhes atuar como transportadores para fármacos hidrófilos e lipófilos ou até fármacos com dificuldade de

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

dissolução (Liu e Hu, 2007). Quando submetidos a fatores ambientes como a temperatura, estes sofrem alterações dinâmicas na sua composição e metabolismo (Tocher et alii., 2008). A lecitina é um agente tensioativo de origem natural constituída por ésteres glicerofosfóricos da colina e ácidos gordos diversos (oleico, palmítico, esteárico) (Prista et alii., 2008), funcionando como agente tensioativo em nanoemulsões e outros tipos de sistemas coloidais devido às suas propriedades físico-químicas, destacando a sua elevada lipofilia e tendência para formar estruturas cristalinas líquidas (Dreher et alii., 1997; Paolino et alii., 2002). Como agente tensioativo, diminui a tensão superficial levando à formação de pequenas gotículas durante a homogeneização e aumenta a viscosidade da fase aquosa, melhorando a estabilidade de uma emulsão, o que também poderá estar relacionado com o facto de não afetar o valor de potencial zeta e conferir alguma resistência ao calor (MsSweeney et alii., 2008). Emulsões com lecitina são de particular interesse devido à sua habilidade para solubilizar fármacos com diferentes propriedades físico-químicas, baixo potencial para provocar irritação aguda e cumulativa na pele (no caso de aplicação cutânea) e devido à sua composição química, a lecitina funciona como um promotor da permeação na pele (Dreher et alii., 1997). No entanto, a sua utilização não é generalizada uma vez que sofre alterações com muita facilidade e apresentam, por vezes, gosto e cheiro desagradáveis. As lecitinas são agentes tensioativos do tipo O/A, mas o seu poder emulsivo depende dos ácidos gordos que figuram a sua constituição e da posição da colina (Prista et alii., 2008).

A adição de polímeros induz a variação na textura de uma nanoemulsão. Os carbómeros são polímeros de ácido poliacrílico, e são os agentes gelificantes mais utilizados em produtos para aplicação na pele. Após a sua introdução, a nanoemulsão torna-se de imediato mais clara, independentemente da concentração de polímero utilizado e do tamanho da partícula. No entanto, são obtidos melhores resultados através da associação de polímeros, originando nanoemulsões transparentes e espessas que proporcionam uma sensação agradável no momento de contacto com a pele, e que apresentam melhores características de fluxo comparativamente às nanoemulsões ricas em lípido (Figura 5) (Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

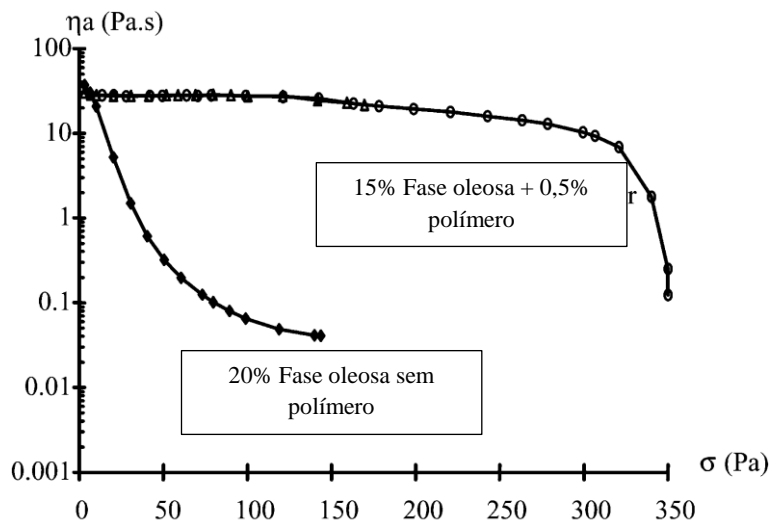


Figura 5 - Comparação das curvas de fluxo de uma nanoemulsão rica em lípido e associação de uma nanoemulsão com polímero (adaptado de Sonnevile-Aubrun et alii., 2004).

A adição de agentes tensioativos não iônicos e/ou um ou mais polímeros às nanoemulsões confere uma estabilização estérica (Hoeller et alii., 2009).

É sabido que mais de 50% das formulações produzidas pela Indústria Farmacêutica revelam baixa solubilidade em meio aquoso, estando muitas vezes associada uma baixa e variável biodisponibilidade. Deste modo, tem-se tentado ultrapassar estas barreiras através de diferentes abordagens farmacológicas (Mauludin et alii., 2009).

Os agentes tensioativos desempenham um papel de maior importância na emulsificação, uma vez que não só facilitam a obtenção da fase dispersa, como também concorrem para a sua estabilização. Misturas de tensioativos são muitas vezes empregadas de modo a obter uma emulsão de maior estabilidade, originando um equilíbrio hidrófilo-lipófilo mais perfeito; estabelecer uma película interfacial mais estável e dar à emulsão uma consistência mais conveniente (Prista et alii., 2008).

O Tween 80, ou Monoleato de polioxietileno sorbitano, representa um agente tensioativo sintético não iônico derivado do sorbitano que pode ser utilizado para uso interno. São compostos solúveis em água e dispersáveis nos óleos, originando emulsões do tipo O/A (Prista et alii., 2008).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Uma grande variedade de lípidos, sólidos ou líquidos, naturais, semissintéticos ou sintéticos, com estruturas diversas (triglicerídeos, glicerídeos, ácidos gordos, esteróides) estão disponíveis para produção de nanoemulsões. Contudo, este deve ser cuidadosamente selecionado, uma vez que irá influenciar o desempenho do sistema de transporte (Pardeike et alii., 2011). A fase oleosa de uma emulsão pode ser constituída por óleos, essências, resinas, gomo-resinas, ceras e gorduras e outras substâncias lipossolúveis (vitaminas, antioxidantes, antissépticos) (Prista et alii., 2008).

A seleção adequada do lípido influencia diretamente propriedades como a toxicidade e biocompatibilidade através da escolha de lípidos biodegradáveis e fisiologicamente toleráveis; a quantidade e eficácia de aprisionamento do fármaco escolhendo lípidos que possuam baixa cristalinidade e onde o fármaco demonstre elevada solubilidade; aumento da estabilidade do fármaco no caso de substâncias fotossensíveis, sensíveis a hidrólise e oxidação (Pardeike et alii., 2011).

O Mygliol 812 é um lípido líquido de cadeia média, constituído por triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Paolino et alii., 2002; Castelli et alii., 2005). De origem vegetal e constituído por uma mistura de triglicerídeos saturados, apresenta-se como um óleo quase incolor, de fraca viscosidade e com baixa acidez. A ausência de ácidos insaturados impede a sua oxidação (Prista et alii., 2008).

4. Métodos de produção de Microemulsões e Nanoemulsões

As nanoemulsões podem ser fabricadas através de vários métodos de produção, convenientemente classificados em métodos de elevada ou baixa energia (Anton e Vandamme, 2009; Lee e McClements, 2010). Os métodos de elevada energia utilizam dispositivos mecânicos capazes de gerar forças disruptivas de elevada intensidade que provocam a rutura das fases aquosa e oleosa, levando à formação de pequenas gotículas oleosas dispersas no interior da fase aquosa. Os homogeneizadores vulgarmente utilizados na Indústria incluem Misturadores de Tensão de Corte, Homogeneizadores de Alta Pressão, Moinhos Coloidais, Microfluidizadores e Ultrassons (Figura 6) (Lee e McClements, 2010; McClements, 2012). A utilização de um dispositivo de corte elevado permite um melhor controlo do tamanho das gotículas e uma grande variedade de composições (Sonneville-Aubrun et alii., 2004)

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

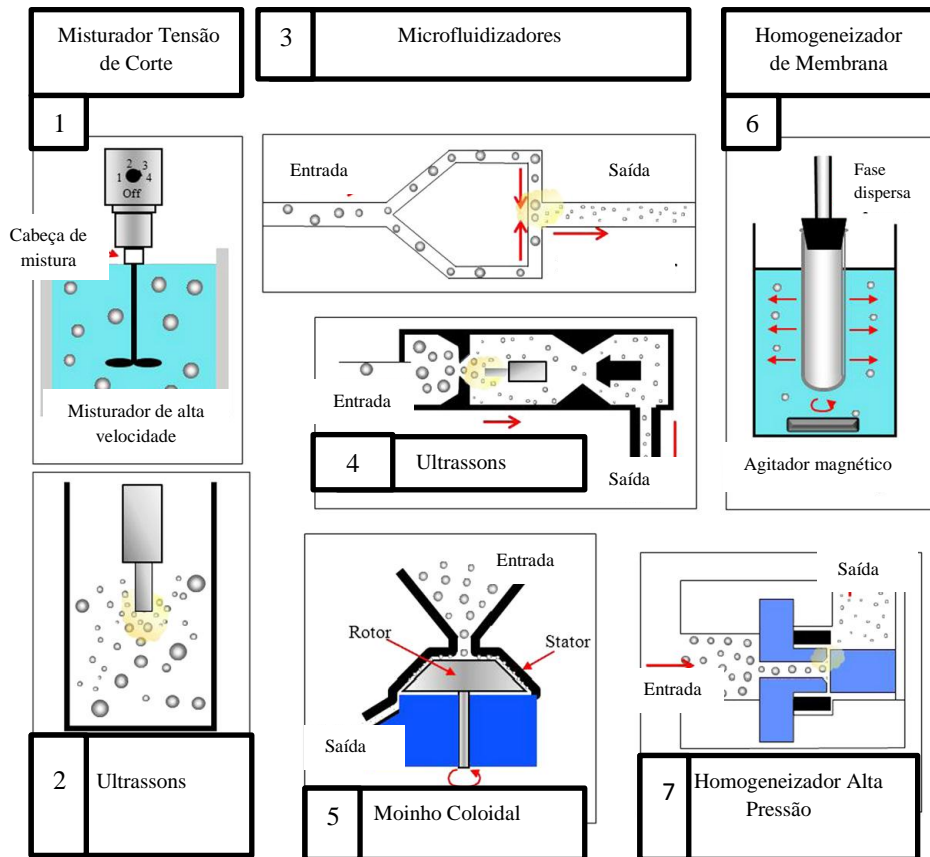


Figura 6 - Dispositivos mecânicos de alta energia para produção de nanoemulsões: 1) Misturador de alta velocidade; 2) Ultrassons; 3) Microfluidizadores; 4) Ultrassons; 5) Moinho Coloidal; 6) Homogeneizador de Membrana; 7) Homogeneizador de Alta Pressão (adaptado de McClements, 2012)

A escolha de um tipo particular de homogeneizador e das respectivas condições operacionais depende das características das matérias-primas submetidas a homogeneização, como a viscosidade, tensão interfacial, sensibilidade à tensão de corte, mas também das propriedades pretendidas para a emulsão final, como o tamanho da partícula, concentração, viscosidade. Por exemplo, se o lípido utilizado for suscetível a degradação química, torna-se necessário um controlo cuidadoso das condições de homogeneização de modo a evitar a exposição a fatores que aumentem a taxa de degradação, como temperaturas elevadas, oxigénio, luz ou metais de transição, podem ainda ser adicionados compostos químicos protetores como antioxidantes, agentes quelantes ou soluções tampão (McClements, 2012).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Os métodos de elevada energia constituem um dos meios mais versáteis de produção industrial de emulsões, uma vez que podem ser utilizados com uma larga variedade de lípidos e agentes tensioativos, e são suscetíveis de produção em grande escala. Ainda assim, o tamanho das gotículas produzidas depende fortemente das características do lípido e do agente tensioativo utilizado. Torna-se mais fácil produzir partículas de menor tamanho quando a fase oleosa tem menor viscosidade e/ou tensão interfacial, como no caso da utilização de óleos aromatizantes, óleos essenciais ou alcanos (McClements, 2012).

A desvantagem inerente à utilização exclusiva dos ultrassons ou agitação mecânica é a obtenção de dispersões heterogéneas com elevados índices de polidispersão (PI), uma vez que a emulsão não é sujeita à mesma intensidade de energia nas diferentes zonas. Além disso, existe o risco de contaminação por titânio e degradação do fármaco pela elevada força de cavitação aplicada. O método de HPH não apresenta qualquer tipo de dificuldade de transposição em escala, permitindo ainda trabalhar em condições assépticas. Através deste método, é aplicada igual tensão de corte a toda a amostra, obtendo uma dispersão homogénea de tamanhos ($\leq 25\text{-}30\ \mu\text{m}$), devido às dimensões reduzidas do orifício de saída do homogeneizador. A HPH pode ser realizada a uma temperatura superior ou inferior ao ponto de fusão do lípido, denominando-se HPH a quente ou HPH a frio, respetivamente. O método a quente realiza-se a uma temperatura compreendida entre 70 a 90°C, enquanto no método a frio se promove o arrefecimento rápido, com gelo seco ou azoto líquido, do lípido fundido com o fármaco. Na maior parte dos casos, são suficientes 2 a 5 ciclos de homogeneização a uma pressão compreendida entre 500 e 1500 bar (Souto et alii., 2011).

A formação de nanoemulsões utilizando métodos de produção de baixa energia baseia-se na formação espontânea de pequenas gotículas oleosas no interior de emulsões óleo/água, resultante da alteração da composição ou do ambiente envolvente (Lee e McClements, 2010; McClements, 2012). Conduzem à formação gotículas de menor dimensão, de escala nanométrica, através da alteração das propriedades intrínsecas dos tensioativos, cotensioativos e outros excipientes presentes na formulação (Anton e Vandamme, 2009). Deste tipo de métodos de produção destacam-se como principais o método de microemulsão, de emulsificação espontânea, método de inversão de fase através de alteração da temperatura e método do ponto de inversão da emulsão (Figura

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

7) (Sonneville-Aubrun et alii., 2004; Lee e McClements, 2010). Por vezes, torna-se mais efetiva a utilização destes métodos em detrimento dos de elevada energia no que diz respeito à produção de gotículas de menor dimensão, no entanto existe maior limitação na escolha do lípido e do agente tensioativo que podem ser utilizados (McClements, 2012). O particular interesse destes métodos está relacionado com o potencial para prevenir a degradação de moléculas frágeis encapsuladas, uma vez que não é aplicada agitação mecânica, e devido à possibilidade de produção industrial em grande escala (Anton e Vandamme, 2009).

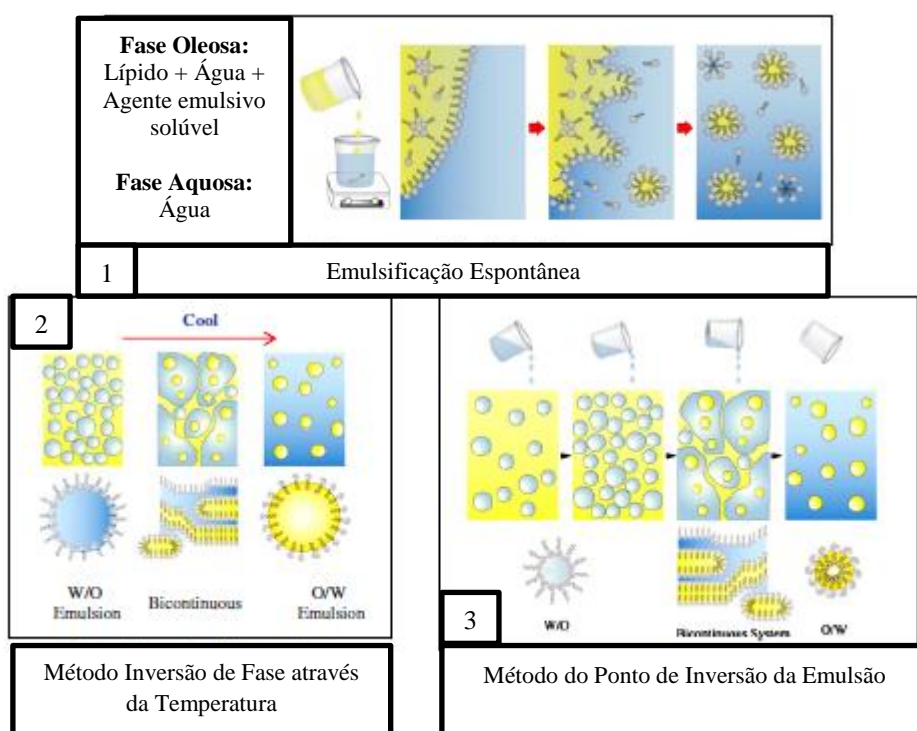


Figura 7 - Exemplos de métodos de produção de baixa energia utilizados para produzir nanoemulsões: 1) Emulsificação Espontânea; 2) Método de inversão de fase; 3) Método de inversão do ponto da emulsão (adaptado de McClements, 2012).

Comparativamente, as Microemulsões também podem ser produzidas através de métodos de baixa energia, como pelo método de inversão de fases através da alteração da temperatura, onde a fase aquosa, fase oleosa e agentes tensioativos não iónicos são adicionados à temperatura ambiente com ligeira agitação e seguidamente se procede ao seu aquecimento. Como resultado, a solubilidade do agente tensioativo é progressivamente alterada da fase aquosa para a fase oleosa, em que acima da

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

temperatura de inversão de fase, o tensoativo está totalmente solubilizado na fase oleosa, passando a mistura de uma emulsão O/A para uma emulsão A/O. Por outro lado, e como a afinidade de moléculas anfifílicas para cada fase é semelhante e a curvatura interfacial é muito reduzida, formam-se as designadas Microemulsões (Anton e Vandamme, 2009). Como consequência da sua estabilidade termodinâmica, as Microemulsões podem ser preparadas por um processo pouco dispendioso através de autoemulsificação (Peira et alii., 2008).

Os métodos de emulsificação espontânea são mais restritivos do que os métodos de elevada energia, sendo que estes últimos permitem um melhor controlo do tamanho da gotícula e uma maior escolha da composição da emulsão (Sonneville-Aubrun et alii., 2004).

5. Caraterização de uma nanoemulsão

i. Tamanho da partícula e Potencial Zeta

A estabilidade de um sistema depende de vários fatores como o tamanho da partícula, o potencial zeta, pH e componentes adicionados (Hyam et alii., 2008).

O tamanho mínimo da gotícula que pode ser produzido depende do tipo de homogeneizador (perfis de fluxo e força), das condições operacionais de homogeneização (intensidade da energia utilizada, duração e temperatura), das condições ambientais (temperatura e pressão), da composição da amostra (tipo de lípido, tipo de agente emulsivo e respetivas concentrações utilizadas) e das características físico-químicas dos componentes das fases (tensão interfacial e viscosidade) (Lee e McClements, 2010; McClements, 2012).

Na preparação de uma nanoemulsão por HPH a quente, as elevadas temperaturas conduzem a uma diminuição do tamanho das partículas, uma vez que promovem a diminuição da viscosidade da fase interna, originando também uma redistribuição homogénea de tamanhos. Por outro lado, e para garantir a redução do tamanho da partícula, pode também aumentar-se a tensão aplicada ou o número de ciclos de homogeneização, no entanto um excesso neste aumento pode originar partículas de

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

maiores dimensões devido ao fenómeno de coalescência das gotículas lipídicas, decorrente do aumento da energia cinética (Souto et alii., 2011).

Por outro lado, o aumento da concentração de lípido aumenta a viscosidade da pré-emulsão, tornando mais difícil a sua emulsificação na fase aquosa, e por conseguinte aumentando as dimensões das partículas. Como as emulsões contêm cerca de 5 a 10% (m/m) de lípido, a sua viscosidade é suficientemente reduzida para serem homogeneizadas por HPH, obtendo gotículas de tamanhos mais reduzidos e uma distribuição homogénea de tamanhos (Souto et alii., 2011).

O tamanho da partícula pode ser ainda reduzido através da utilização de métodos de evaporação ou substituição de solvente. No método de substituição de solvente, a emulsão O/A convencional é formada inicialmente por homogeneização da fase orgânica, constituída pelo lípido e o solvente orgânico, com a fase aquosa, constituída por água e agente emulsivo hidrófilo. A seleção do solvente orgânico é baseada na sua miscibilidade em água, ponto de fusão, segurança e estatuto GRAS. Utilizam-se solventes orgânicos polares próticos (metanol, étanol) e apróticos (acetona) (Lee e McClements, 2010).

De um modo geral, o tamanho da gotícula em emulsões produzidas através de métodos de alta energia é traduzido pelo balanço entre dois processos opostos que ocorrem no interior do homogeneizador: disrupção e coalescência das partículas. Sabe-se que este tende a diminuir quando a intensidade energética ou duração da homogeneização aumentam; a tensão interfacial diminui; a taxa de adsorção do agente tensioativo aumenta e a razão dispersão de fase contínua/viscosidade cai dentro de um determinado intervalo (McClements, 2012).

O potencial zeta, originado pela diferença de energia entre a partícula e o eletrólito, é definido como o potencial na superfície de corte, isto é, entre a interface gotículas e meio de dispersão líquido (Hyam et alii., 2008), e constitui uma propriedade de extrema importância pois remete para uma diversidade de fenómenos associados às nanogotículas, mais concretamente à estabilidade destes sistemas (Kaasalainen et alii., 2012). Caracteriza a carga de superfície das partículas e assim dá informações sobre forças repulsivas entre as partículas e as gotículas, forças estas que são a propriedade chave de uma emulsão resistente ao fenómeno de aglomeração. Valores superiores a

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

30mV, em valor absoluto, geralmente indicam a boa estabilidade do sistema (Hoeller et alii., 2009; Kaasalainen et alii., 2012). Existe uma relação diretamente proporcional entre o tamanho da partícula e o valor de potencial zeta, sendo que partículas com dimensões superiores revelam valores de potencial zeta igualmente superiores. Isto é vantajoso, no sentido que emulsões com valores de potencial zeta elevados têm demonstrado maior estabilidade (Hyam et alii., 2008).

A distribuição de tamanho das partículas é representada através de valores de índice de polidispersão (Hoeller et alii., 2009). O índice de polidispersão (PI) é a medida que indica o comportamento das partículas relativamente à forma como estas se dispersam no sistema, variando entre 0 e 1. Um índice de polidispersão igual ou próximo de 0 indica que as gotículas de um sistema revelam tamanho homogêneo, ou seja, uma emulsão monodispersa, por outro lado um índice de polidispersão de valor igual ou próximo de 1 indica que as gotículas do sistema revelam tamanhos heterogêneos (Müller et alii., 2004). Valores de PI inferiores a 0,25 indicam uma estreita distribuição de tamanhos proporcionando uma boa estabilidade às nanoemulsões devido à reduzida maturação de Ostwald (Hoeller et alii., 2009).

Ao longo do tempo, os valores de pH e potencial zeta vão sofrendo alterações, nomeadamente reduções (Figura 8). O valor de pH tem tendência a diminuir e o valor absoluto de potencial zeta também. Pensa-se que estas alterações são devidas à hidrólise dos triglicérides em ácidos gordos livres de carga negativa (Cui et alii., 2006).

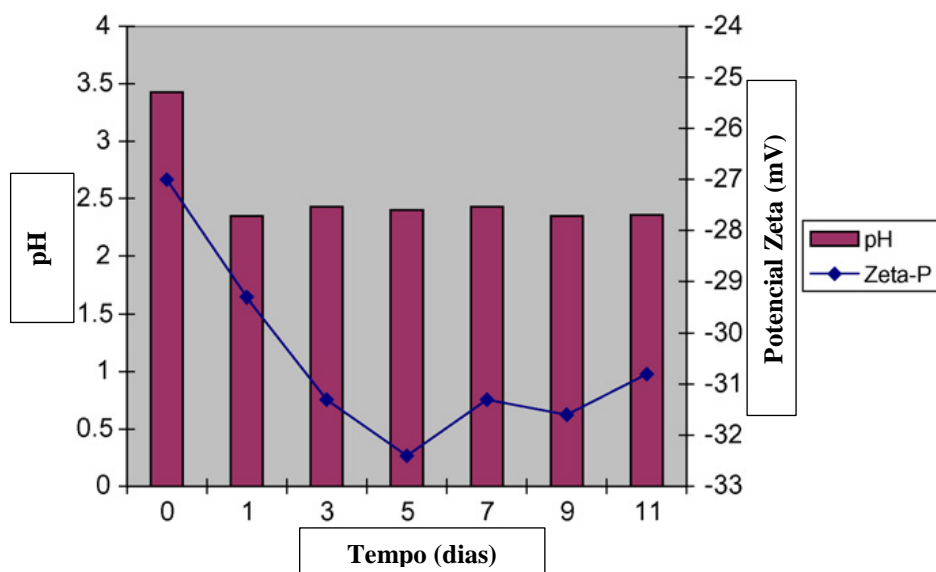


Figura 8 - Avaliação da diminuição do valor de pH e potencial zeta ao longo do tempo. (adaptado de Cui et alii., 2006).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

ii. Encapsulação

A encapsulação constitui uma boa abordagem para preservar as propriedades das substâncias ativas ao longo do tempo, representando igualmente uma forma de promover a eficácia terapêutica de compostos (durante o armazenamento do produto, controlo da libertação dos fármacos e prevenção de efeitos secundários). O processo de encapsulação deve garantir partículas de pequeno tamanho, com elevada taxa de encapsulação, bom índice de polidispersão (PI) e atividade durante o armazenamento (Gonnet et alii., 2010). Confere a proteção dos mesmos face a processos de degradação, promovendo a sua ação sem reduzir a sua biodisponibilidade ou funcionalidade (Laos et alii., 2007). Demonstra ser uma tecnologia útil no sentido em que permite a proteção de fármacos contra processos de oxidação (minimizando o contacto com oxigénio e luz), pH e sensibilidade à luz (Aghbashlo et alii., 2012).

Têm sido estudados, uma grande variedade de fármacos, essencialmente lipófilos, para encapsulação em sistemas nanotecnológicos, como as nanoemulsões. A encapsulação de um fármaco pode resultar em grandes alterações nas características do sistema (distribuição do tamanho da partícula, potencial zeta, modificação da estrutura do lípido). Deste modo, a determinação do tamanho da partícula da formulação placebo não é suficiente para caracterizar a formulação final com o fármaco encapsulado; as possíveis alterações estruturais do lípido e do fármaco devem ser caracterizadas por métodos apropriados (DSC, NMR, etc); a seleção de um controlo deve ter especial atenção de modo a provar que o resultado observado é derivado do sistema de transporte e não de outra estrutura coloidal presente na amostra (Mehnert e Mäder, 2001).

O principal método para encapsulação e posterior localização do fármaco na região interfacial de uma emulsão consiste na dissolução do agente tensioativo e do fármaco num solvente orgânico, removendo o solvente por evaporação e utilizando a restante pré-emulsão para desenvolvimento da nanoemulsão final. Este processo não confere uma produção estéril e portanto é simultaneamente dispendioso. No entanto, para alguns fármacos, os resultados obtidos após a sua encapsulação em nanoemulsões mostraram uma diminuição de efeitos secundários (Müller et alii., 2004).

Entende-se por Eficácia de Encapsulação (E.E) a quantidade de fármaco incorporada no sistema e capaz de exercer a sua ação terapêutica (Figura 9) (Nii e Ishii, 2005).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

$$E.E (\%) = \frac{\text{Quantidade de fármaco encapsulado (mg)}}{\text{Quantidade total teórica de fármaco adicionado à formulação (mg)}} \times 100$$

Figura 9 - Fórmula da Eficácia de Encapsulação (E.E) (adaptado de Laos et alii., 2007).

A capacidade de encapsulação de uma emulsão O/A não é ilimitada, e em determinado momento a camada interfacial fica saturada com fármaco, provocando a não dissolução de pequenos cristais de fármaco que ficam presentes na dispersão. A concentração de fármaco deve ser escolhida de modo a que esta permaneça inferior ao nível de saturação da camada interfacial (Müller et alii., 2004).

Alguns estudos demonstraram que, num elevado número de casos, existe uma elevada percentagem de fármaco lipófilo não aprisionado nas gotículas lipídicas mas sim em zonas polares, originando processos de distribuição do fármaco extremamente rápidos. Justifica-se assim a importância da caracterização do arranjo molecular do lípido e do próprio fármaco (Mehnert e Mäder, 2001).

iii. Ensaio de liberação

Idealmente, um sistema de liberação deve conter alguns atributos funcionais e características técnicas de modo que o tornem adequado a uma determinada finalidade. Deve ser desenhado com o objetivo de transportar um fármaco para um determinado local alvo e ser passível de o libertar. A liberação deve ser realizada a uma taxa controlada ou em resposta a um fator ambiental em particular (pH, força iónica, atividade enzimática ou temperatura) (McClements e Li, 2010).

Geralmente, observam-se dois tipos de mecanismos de liberação controlada durante a liberação da substância ativa: o mecanismo de liberação retardada e o mecanismo de liberação sustentada (Figura 10). No mecanismo de liberação retardada, a liberação da substância ativa é lenta por um período de tempo limitado até a um certo ponto onde a sua liberação é pretendida. Já o mecanismo de liberação sustentada, foi desenhado para manter concentrações constantes de fármaco no local alvo de ação (Fathi et alii., 2012).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

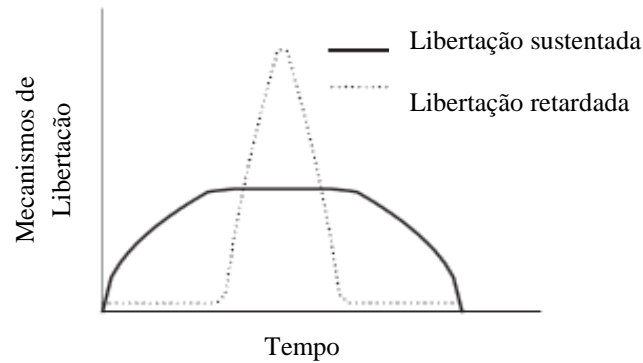


Figura 10 - Perfis de liberação de um fármaco a partir de nanoemulsões (adaptado de Fathi et alii., 2012).

A seleção apropriada do método e da temperatura de homogeneização permitem a modificação do perfil de liberação do fármaco aprisionado. A cinética de liberação de um fármaco depende de condições como, por exemplo, do meio de liberação selecionado. Devido ao tamanho coloidal destes sistemas, os estudos de liberação não constituem experiências triviais. A possibilidade de liberação controlada de fármacos encapsulados em nanoemulsões é limitada devido à pequena dimensão das partículas e ao estado líquido do transportador, ocorrendo normalmente uma liberação rápida derivada da elevada mobilidade do fármaco no líquido (Mehnert e Mäder, 2001).

A liberação de um fármaco depende da combinação entre as suas propriedades físico-químicas e a influência do veículo para alterar o seu perfil de liberação (Hoeller et alii., 2009). Segundo Baspinar e Borchert (2012), quanto menor é o tamanho da partícula, maior é a sua superfície e pressão exercida sobre ela e, conseqüentemente, maior é a sua taxa de liberação do sistema. A taxa de liberação de um fármaco depende essencialmente do cotensioativo podendo este causar um valor de potencial zeta (PZ) positivo ou negativo. Valores de PZ positivos dão origem a reduzidas taxas de liberação do fármaco, enquanto valores de PZ negativos originam elevadas taxas de liberação (Wang et alii., 2006). Sumarizando, pode concluir-se que a liberação de um fármaco do seu veículo de transporte é controlada pelo tamanho da partícula e pelo cotensioativo (Baspinar e Borchert, 2012).

Geralmente, a liberação é governada por um ou uma combinação de mecanismos existentes: difusão e erosão (Fathi et alii., 2012). As características de liberação convencionais das emulsões podem ser controladas variando as dimensões das

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

gotículas, aumentando a taxa de libertação através da diminuição do diâmetro da partícula. O reduzido tamanho das partículas das nanoemulsões significa que os componentes encapsulados normalmente difundem rapidamente do sistema. Revelam uma elevada área de superfície de modo que qualquer reação química que ocorra na interface óleo/água é acelerada. Por esta razão, a biodisponibilidade de substâncias lipófilas encapsuladas no interior de nanoemulsões é considerada superior à das emulsões convencionais (McClements e Li, 2010).

III. Vias de administração passíveis de serem utilizadas para administração de produtos de nanotecnologia

Os rápidos avanços no campo da nanotecnologia têm trazido várias e importantes oportunidades para o diagnóstico precoce, tratamento e monitorização de diversas patologias. O recente progresso tornou possível o desenvolvimento de sistemas para alcançar locais específicos para libertação de fármacos e potenciar o perfil farmacocinético de numerosos compostos com aplicações biomédicas (Reis et alii., 2006). O tipo de aplicação determina qual o veículo mais adequado para encapsulação do fármaco, de modo a que as características das partículas produzidas estejam adaptadas à via de administração para a qual vão ser utilizadas (oral, tópica, parenteral, etc) (Gonnet et alii., 2010).

1. Via de administração tópica

Entende-se por aplicação tópica a aplicação externa, sobre uma região limitada do corpo, e que não proporciona absorção sistémica dos constituintes de uma formulação. A sua aplicação pode ser feita sobre a pele e mucosas acessíveis do exterior, por exemplo mucosas faríngea, traqueopulmonar, genitourinária, conjuntiva, bucal, retal. Alguns medicamentos quando administrados por via GI não são absorvidos, desempenhando assim uma ação local, ou seja, uma ação em determinada zona do trato digestivo (Prista et alii., 2008). A administração tópica tem a vantagem de evitar de uma série de efeitos secundários GI associados à administração sistémica de fármacos (Paolino et alii., 2002). De facto, a via tópica é rapidamente acessível para administração de fármacos, e tem a potencial vantagem de evitar o efeito de primeira passagem resultante do metabolismo hepático dos fármacos. Por outro lado, o tempo de

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

residência do fármaco no local é longo possibilitando a sua libertação controlada, evitando ainda o pico plasmático associado à administração oral e injetável de fármacos (Himes et alii., 2010). O tratamento tópico de patologias está muitas vezes limitado pela fraca permeação percutânea através da pele. É por esta razão que a produção de veículos para formulações de fármacos para uso tópico pode ser particularmente importante no sentido do aumento da permeação na pele, garantindo o sucesso das várias abordagens terapêuticas (Paolino et alii., 2002).

Adicionalmente, administração de um fármaco para uma dada condição patológica, o tratamento para um determinado tecido que é mais pequeno deve requerer doses mais baixas, comparativamente às doses utilizadas para uma administração sistémica, minimizando assim os níveis sistémicos do fármaco e limitando a sua potencial toxicidade sistémica (Olsen, 2010).

São muitas as vias de administração existentes e, por isso, na preparação de sistemas terapêuticos deve ser considerada a via a que se destinam e a finalidade que deles se pretende. Preferencialmente, as superfícies cutânea, da faringe, da conjuntiva e genitourinária são utilizadas para aplicação tópica, o que não implica que não possa ocorrer uma absorção sistémica acidental ou propositada (Prista et alii., 2008). A via de administração tópica é idealmente adequada para as várias indicações em que a própria pele é o órgão alvo (Himes et alii., 2010).

i. Administração cutânea

A administração cutânea é essencialmente destinada à obtenção de um efeito tópico, mais ou menos profundo, não sendo esta utilizada quando se pretende a absorção de um medicamento e sua ação sistémica. Entretanto, a criação de novas formas farmacêuticas (Novos Sistemas Terapêuticos) de aplicação cutânea, veio a proporcionar uma excelente penetração de fármacos na pele, mesmo os absorvidos a nível sistémico (Prista et alii., 2008). Os dois principais entraves associados à aplicação tópica cutânea de produtos de natureza cosmética e farmacológica prendem-se com a absorção destes mesmos produtos através da pele e com a comprovação da sua eficácia clínica. De facto, a

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

interferência causada pela aplicação tópica destes produtos na pele, principalmente nos lípidos intercelulares do estrato córneo mas também na membrana celular de todas as camadas viáveis da pele, determina uma menor ou maior eficácia destas substâncias, e os eventuais e efeitos secundários (Morganti et alii., 2001). Pode mesmo dizer-se que a solubilidade de uma substância nos lípidos é mais importante, do ponto de vista da penetração cutânea, do que a qualidade do veículo utilizado (Prista et alii., 2008).

À superfície da pele encontra-se uma película gordurosa, contendo cerca de 20% de colesterol e ácidos gordos livres, como o oleico, e glicerídeos diversos. O pH oscila entre 5 e 5,5 (Prista et alii., 2008). O estrato córneo (*stratum corneum*) opõe-se à penetração de substâncias estranhas na pele, além de que regula continuamente a passagem de água do interior para o exterior, mantendo a homeostasia da pele e de todo o organismo humano. A fluidez da membrana varia consoante os tipos de lípidos que a constituem, podendo ser mais elástica (mais permeável e fluída, devido à presença de maior número de ácidos gordos insaturados) ou mais rígida (menos permeável, quando prevalecem ácidos gordos saturados e colesterol) (Morganti et alii., 2001).

A pele funciona como barreira impedindo a perda de água, de eletrólitos e outros constituintes, obstruindo igualmente a absorção percutânea de outros compostos possivelmente prejudiciais e provenientes do ambiente externo (Figura 11). Os mecanismos de transporte ocorrem por difusão, logo o desempenho do estrato córneo como barreira está intimamente limitado pelo seu grau de hidratação. Assim, um aumento da permeabilidade à água corresponde a um aumento da permeabilidade tópica aos compostos aplicados. Na realidade, o grau de hidratação do estrato córneo é o fator mais importante na determinação da taxa de absorção percutânea, e aumenta em função do gradiente de concentração da água entre a derme (camada mais profunda da pele) e a superfície da pele e em função da capacidade de ligação das moléculas de água ao estrato córneo (Morganti et alii., 2001). Compreende-se que a hidratação da pele promova a penetração dos fármacos, por facilitação da difusão das substâncias aplicadas na superfície da pele (Prista et alii., 2008). Por conseguinte, os sistemas de libertação de fármacos administrados através da pele estão associados a dificuldades, tais como a variabilidade de absorção dependendo do local de administração, de patologia (se existente), da idade e de diferentes espécies; a capacidade reservatório da pele; potencial irritação e toxicidade causada pela aplicação tópica de fármacos; a heterogeneidade do

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

metabolismo, e do incompleto conhecimento sobre a tecnologia que possam ser utilizadas para facilitar ou retardar a absorção do fármaco (Morganti et alii., 2001).

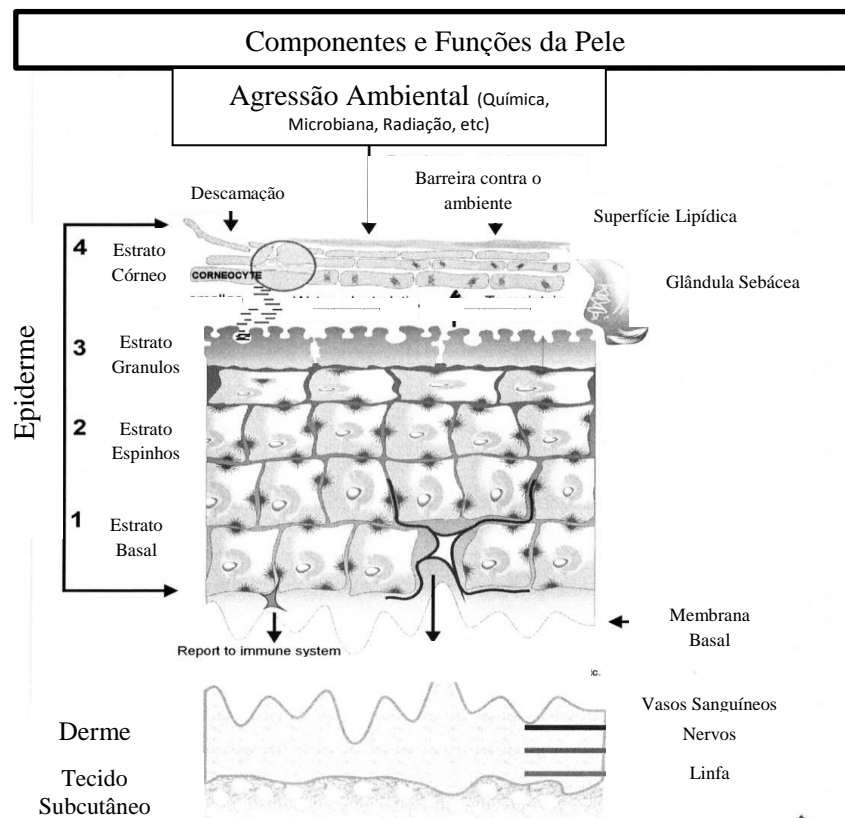


Figura 11 - Componentes e funções da pele. (adaptado de Morganti et alii., 2001).

A eficácia de produtos aplicados na pele pode ser determinada pela relação estabelecida entre o coeficiente de permeabilidade do estrato córneo e a estrutura dos agentes penetrantes, como o veículo e fármaco. Variando as características, quer do veículo quer do fármaco, o grau de absorção cutânea varia de igual modo. De facto, o coeficiente de permeabilidade é influenciado pela hidrofobia e tamanho dos agentes penetrantes, e pela presença ou ausência de carga elétrica. Torna-se fundamentalmente importante a seleção adequada do tipo de veículo a utilizar, onde a principal preocupação está relacionada com a libertação do fármaco a partir do veículo que o transporta, após aplicação na superfície da pele. Além disso, a evaporação de compostos voláteis, como a água, das formulações tópicas na superfície da pele influenciam, significativamente, a

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

difusão dos fármacos através do estrato córneo. Tal acontece com a utilização de nanoemulsões O/A, que sofrem modificações durante e após a sua aplicação na pele, havendo perdas de água devido ao fenómeno de evaporação (Morganti et alii., 2001).

Para que ocorra absorção transepidérmica, o fármaco tem de ser dissolvido nos lípidos do estrato córneo, difundir-se através dos domínios lamelares do mesmo, migrar para epiderme mais hidrófila, difundir através da epiderme e derme, e finalmente, entrar na circulação sistémica através da microvasculatura cutânea. Os factos confirmam que os veículos não podem ser considerados transportadores simples e inertes. Assim se justifica a importância da seleção do veículo, que deve ser compatível com o fármaco e com os lípidos utilizados, o tipo de efeito desejado da formulação, e a tipologia e condições da área de pele a tratar (Morganti et alii., 2001).

Para aumentar a penetração de fármacos na pele são utilizados promotores de absorção/permeação, designados como constituintes que modificam de forma reversível a estrutura lipídica e alteram a função “barreira” da pele, aumentando o fluxo transdérmicos de alguns fármacos. Exemplos de promotores de absorção são os solventes orgânicos, como o etanol, e ácidos gordos, como o ácido oleico (Morganti et alii., 2001; Paolino et alii., 2002). Contudo, alguns destes promotores originam, várias vezes, irritação na pele, pelo que os sistemas de aplicação tópica não sejam somente avaliados em termos de capacidade de carga e absorção cutânea, mas também tolerabilidade e toxicidade. Assim, é de realçar que a escolha adequada dos componentes de uma formulação é essencial para minimizar o efeito irritante e para determinar o aumento da permeação do fármaco na pele. A utilização de componentes biocompatíveis potencia o aumento da sua utilização em sistemas de libertação tópica nos campos farmacêutico e cosmético. A utilização de fosfolípidos, por exemplo a lecitina, em formulações para aplicação na pele, promove o aumento do fluxo do fármaco, diminui o seu tempo de residência e promove a hidratação da pele, em comparação com outro tipo de sistemas (Paolino et alii., 2002).

A penetração depende ainda, acessoriamente, do tipo de excipientes utilizados para o fármaco. De um modo geral, excipientes de natureza animal (banha, lanolina) são dotados de maior poder de penetração cutânea do que os de natureza vegetal (azeite,

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

óleos) e, por sua vez, estes mais do que os minerais (vaselina, parafina) (Prista et alii., 2008).

O papel dos sistemas de liberação de fármacos prende-se em assegurar que a concentração correta de fármaco chega ao local alvo num período de tempo suficiente. A otimização dos benefícios das substâncias administradas é conseguida através do controlo da concentração e distribuição dos fármacos no estrato córneo ou nos outros tecidos cutâneos. Mesmo que o local de ação para a maior parte dos produtos cosméticos seja a superfície da pele, deve ser feita uma escolha assegurada na seleção do veículo que irá ser utilizado para determinado fármaco de modo a obter o resultado esperado. Alguns compostos têm como local alvo a superfície da pele, como é o caso dos filtros UV, e caso exista penetração na mesma ficarão além do seu local de ação e portanto perderão o seu interesse terapêutico, enquanto compostos antissépticos e desodorizantes devem atingir as superfícies bacterianas e fúngicas existentes nas fissuras da pele, devendo penetrar. Compostos antioxidantes e agentes antienvhecimento têm de exercer a sua atividade na epiderme ou derme (Morganti et alii., 2001).

A seleção do veículo a utilizar num sistema afeta a cedência de fármacos em vários sentidos, quer por interação com o próprio, por controlo da taxa de liberação do veículo, alteração da resistência oferecida pelo estrato córneo, ou potenciação da hidratação da pele (Morganti et alii., 2001). Igualmente se verifica que as emulsões O/A ou A/O são dotadas de melhor poder de penetração do que os medicamentos não emulsionados. É de salientar a excelente penetrabilidade obtida com emulsões O/A, conseguida graças à molhabilidade dos seus excipientes e ao grau de dispersão apresentado pelas respetivas partículas, favorecendo a absorção transfolicular uma vez que as membranas são semipermeáveis através das quais só passam partículas de muito reduzidas dimensões (Prista et alii., 2008).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

2. Via de administração oral

A administração oral de compostos farmacêuticos com fraca solubilidade permanece um desafio em tecnologia farmacêutica (Souto e Müller, 2010). Pensa-se que a biodisponibilidade oral de pequenas moléculas com atividade farmacológica seja determinada pela sua solubilidade em meio aquoso, permeabilidade membranar e estabilidade metabólica. O desenvolvimento de novas formulações tem como objetivo principal garantir a estabilidade e proteção de substâncias farmacologicamente ativas contra a degradação, aumentar a sua solubilidade em água e conseqüentemente a sua biodisponibilidade, conseguir uma liberação controlada do fármaco, e mais recentemente, direcionar o fármaco para o local alvo da terapêutica através de sistemas transportadores coloidais e multiparticulados (Amri et alii., 2012).

Não obstante, a capacidade de formulações lipídicas em facilitar a absorção GI destes compostos é bem documentada, e a atividade farmacológica não é comprometida. Os lípidos são considerados materiais seguros para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos pouco solúveis, como é o caso das emulsões e microemulsões, que têm sido amplamente utilizadas no aumento da absorção e biodisponibilidade destes compostos (Souto e Müller, 2010).

Em comparação com as outras vias de administração possíveis, a administração oral de fármacos possui várias vantagens. Não só se trata de uma via não invasiva e relativamente ausente de complicações (contrariamente às formulações para administração parenteral onde existe a necessidade de técnicas estéreis), mas também é a via mais conveniente e de fácil dosagem com preparações de baixo custo, encorajando a adesão do paciente à terapêutica (Reis et alii., 2006).

Após a sua administração oral, o fármaco é absorvido no trato gastrointestinal, sendo passível de sofrer degradação ao longo do mesmo. A nanotecnologia oferece a possibilidade de proteger fármacos suscetíveis de serem degradados, conferindo de igual modo proteção ao trato gastrointestinal perante a toxicidade associada ao fármaco. Assim, os sistemas nanotecnológicos funcionam como sistemas de transporte possibilitando o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos que são fracamente absorvidos; o prolongamento do tempo de residência de fármacos no intestino; elevada

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

dispersão molecular e conseqüentemente um aumento na absorção; liberação controlada de fármacos; direcionamento do mesmo a um órgão alvo, reduzindo a toxicidade e efeitos secundários; redução da irritação da mucosa gastrointestinal (GI) causada pelos fármacos e, por fim, a estabilidade de fármacos ao longo do trato GI (Reis et alii., 2006; Souto e Müller, 2010).

Apesar da existência de outras abordagens, a diminuição do tamanho de partículas a uma escala nanométrica constitui uma importante estratégia para atingir taxas de dissolução mais elevadas e o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis (Tan e Nakajima, 2005; Mauludin et alii., 2009). A produção destes sistemas para administração oral permite atingir concentrações terapêuticas plasmáticas, devido à reduzida solubilidade e absorção no trato GI serem ultrapassados através da redução extensa do tamanho das partículas (Mauludin et alii., 2009). Todos estes sistemas partilham da mesma função: encapsulação, proteção e liberação de compostos farmacologicamente ativos hidrófobos (McClements, 2012).

3. Via de administração parenteral

Por último, a administração de fármacos também pode ser realizada por via parenteral, onde se destacam as subdivisões intravenosa, intradérmica, subcutânea, intramuscular, intrarraquídea, intraperitoneal, intrapleural, entre outras (Prista et alii., 2008).

A investigação tem focado um maior interesse em formas orais uma vez que estas são preferenciais para tratamento crónico, devido à facilidade de administração (Amri et alii., 2012). Cerca de 40% dos compostos descritos pela indústria farmacêutica revelam fraca solubilidade e dos novos compostos sintetizados cerca de 60% revelam valores de solubilidade inferiores a 0,1 mg/l (Müller et alii., 2004).

As formas parenterais escapam ao metabolismo intestinal, sendo mais projetadas para o tratamento agudo de patologias (Amri et alii., 2012). O uso de formulações parenterais está justificado em situações de emergência ou pacientes com necessidade de tratamento intensivo, nomeadamente por injeção intravenosa ou infusão (Müller et alii., 2004). A administração intravenosa revela uma elevada aplicabilidade no sentido em que torna

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

possível a concentração do fármaco em locais acessíveis, o reencaminhamento de fármacos impedindo a sua toxicidade, e o aumento do tempo de semi-vida de fármacos lábeis ou rapidamente eliminados (como péptidos e proteínas) (Reis et alii., 2006). É a via de ação mais rápida e de efeito mais intenso, uma vez que não comporta a fase de absorção (Prista et alii., 2008).

As nanoemulsões são preferencialmente utilizadas como sistemas para nutrição parenteral, devido à possibilidade de transporte de fármacos lipófilos e garantia da sua estabilidade em formulação e posteriormente redução dos efeitos secundários locais e sistémicos (por exemplo, dor no local de injeção) (Mehnert e Mäder, 2001). Têm sido utilizados desde os últimos cinquenta anos, são de baixo custo e estão prontos a utilizar. No entanto, o número de emulsões no mercado é limitado, sendo os principais fármacos veiculados nestes sistemas o diazepam, etomidato e propofol (Müller et alii., 2004).

IV. Flavonoides

1. Importância dos Flavonoides

Os flavonoides pertencem à classe das substâncias fenólicas, são de baixo peso molecular e são caracterizados pelo seu núcleo flavónico (Formica e Regelson, 1995; Ramadan, 2012), onde o número, posição e tipo de substituintes influenciam a captação de radicais livres e a atividade quelante. São derivados benzo- γ -pirano constituídos por anéis fenólicos e de pirano, sendo classificados consoante os seus substituintes (Figura 12) (Heim et alii., 2002). Estão distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores de plantas, sendo que mais de 4000 flavonóides foram identificados até à data (Heim et alii., 2002; Ramadan, 2012).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

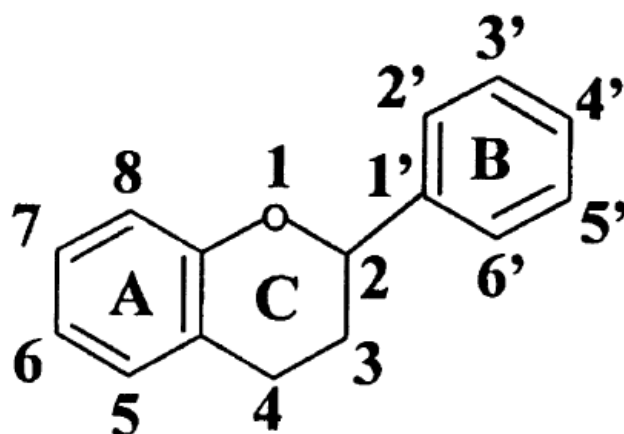


Figura 12 - Estrutura química nuclear dos flavonoides. (adaptado de Heim et alii., 2002).

O consumo de frutas e vegetais está associado à redução do risco de cancro e doenças cardiovasculares. Embora estes efeitos protetores tenham sido primeiramente atribuídos ao beta-caroteno e ao ascorbato, os constituintes fenólicos também desempenham um papel importante (Heim et alii., 2002). Pode então dizer-se que os flavonóides são benéficos para a longevidade e proteção do sistema cardiovascular (Formica e Regelson, 1995).

São diversos os fatores exógenos e processos metabólicos endógenos que podem desencadear a formação de espécies de oxigénio reativas. Quando a formação destas moléculas excede o potencial antioxidante do organismo origina o aparecimento de condições patológicas, consequência da interação destas substâncias com compostos biológicos no interior e exterior das células. É neste sentido que, nos últimos anos, se têm estudado e desenvolvido compostos antioxidantes de modo a proteger os tecidos biológicos do ataque destas moléculas reativas e suprimir os danos resultantes desta interação (Yang et alii., 2008a).

A maioria dos efeitos benéficos para a saúde são atribuídos às capacidades antioxidantes, por inibição da peroxidação lipídica, e quelantes nos sistemas biológicos, incluindo o aprisionamento de radicais livre, sequestro de iões metálicos, ativação de enzimas antioxidantes e redução dos radicais α -tocoferol e inibição de oxidases. Contudo a sua eficácia depende da sua estrutura química (Heim et alii., 2002; Ramadan, 2012), ou seja, a propensão de um flavonoide para inibir os radicais livres é influenciada

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

pelo arranjo molecular dos seus grupos funcionais (Heim et alii., 2002). Um número considerável de estudos *in vitro* demonstrou chegar a uma hierarquia de classes, de acordo com a relação entre os substituintes e atividade antioxidante (Figura 13).

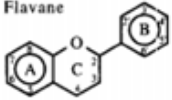
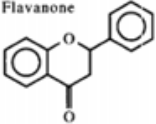
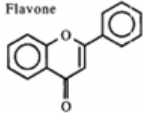
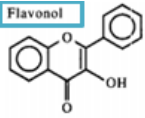
Estrutura Genérica	Flavonoide
<p>Flavane</p> 	<p>Catequinas Meciadonol</p>
<p>Flavanone</p> 	<p>Taxifolina Naringenina Naringina</p>
<p>Flavone</p> 	<p>Luteolina Apigenina</p>
<p>Flavonol</p> 	<p>Quercetina Cirsiliol Morina Galangina Rutina</p>

Figura 13 - Estrutura e grau de hidroxilação dos vários flavonoides (adaptado de Formica e Regelson, 1995).

Por virtude da capacidade de inibir a oxidação das lipoproteínas LDL (*Low Density Lipoproteins*), os flavonoides têm demonstrado efeitos cardioprotetores únicos (Heim et alii., 2002), além de que mantêm a integridade da parede capilar e a resistência capilar (Formica e Regelson, 1995).

Na dieta humana estão presentes em frutas, vegetais, vinhos, chás e coco, aparecendo sob a forma de O-glicosídeos (Figura 14). Uma dieta rica em flavonoides prevê uma diminuição na mortalidade por doença cardíaca coronária e uma menor incidência de enfarte do miocárdio em homens mais velhos, e também a redução do risco de doença cardíaca coronária em 38% em mulheres na pós-menopausa (Heim et alii., 2002).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

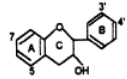
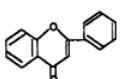
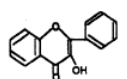
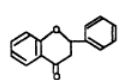
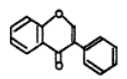
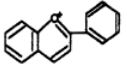
Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern	Dietary Sources	TEAC (mM)
Flavanol		(+)-catechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea (<i>Camellia sinensis</i>) ⁶	2.4
		(-)-epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea ⁶	2.5
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Tea	4.75
Flavone		chrysin	5,7-OH	Fruit skins	1.43
		apigenin	5,7,4'-OH	Parley, celery	1.45
		rutin	5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses	Red wine ⁵ , buckwheat ⁷	2.4
		luteolin	5,7,3',4'-OH	citrus, tomato skin ⁸	2.1
		luteolin glucosides	5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7'-glucose	Red pepper ¹¹	1.74 0.79
Flanonol		kaempferol	3,5,7,4'-OH	Leek, broccoli, endives grapefruit, black tea	1.34
		quercetin	3,5,7,3',4'-OH	Onion, lettuce, broccoli tomato, tea, red wine berries, olive oil, appleskin	4.7
		myricetin	3,5,7,3',4',5'-OH	Cranberry grapes, red wine	3.1
		tamarixetin	3,5,7,3'-OH,4'-OMe		
Flavanone (dihydroflavon)		naringin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose	Citrus, grapefruit	0.24
		naringenin	5,7,4'-OH	Citrus fruits	1.53
		taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Citrus fruits	1.9
		eriodictyol	5,7,3',4'-OH	Lemons ⁶⁴	1.8
		hesperidin	3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses	Oranges ⁹	1.08
Isoflavone		genistin	5,4'-OH, 7-glucose	Soybean ¹⁰	1.24
		genistein	5,7,4'-OH	Soybean ¹⁰	2.9
		daidzin	4'-OH, 7-glucose	Soybean ¹⁰	1.15
		daidzein	7,4'-OH	Soybean ¹⁰	1.25
Anthocyanidin		apigenidin	5,7,4'-OH	Colored fruits	2.35
		cyanidin	3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Cherry, raspberry, strawberry	4.42

Figura 14 - Classificação, estrutura e fontes alimentares de flavonoides na dieta. (Heim et al., 2002)

Outras funções clínicas relevantes associadas aos flavonoides incluem: atividade antihipertensora e antiarrítmica; propriedades antiinflamatória e antialérgica; atividade hipocolesterolaémica; estabilização plaquetária e dos mastócitos; atividade antihepatotóxica; e atividades antitumorais (Formica e Regelson, 1995).

2. Rutina

A rutina (3,3',4', 5'-7-pentahidroxiflavonol) representa um dos vários flavonoides naturais presentes na dieta sendo o mais abundante, potente e mais estudado (Heim et alii., 2002; Kumari et alii., 2010; Chen-yu et alii., 2012). É um constituinte importante do vinho tinto, e encontra-se igualmente presente na cebola, alface, brócolo, tomate, chá, azeite e maçã (Heim et alii., 2002). A atividade antioxidante desta molécula é superior à atividade antioxidante de moléculas como o ascorbilo, devido ao número e posição dos grupos hidroxilo (Figura 15) (Kumari et alii., 2010). O arranjo espacial dos substituintes é, talvez, mais determinante na atividade antioxidante do que o anel

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

flavónico por si só. Consistente com a maior parte dos antioxidantes polifenólicos, ambas a configuração e o número total de grupos hidroxilo, influenciam substancialmente muitos mecanismos de atividade antioxidante. A capacidade de captação de radicais livres é primariamente atribuída à elevada reatividade dos substituintes hidroxilo que participam nas reações (Heim et alii., 2002).

É sabido que a polaridade do ambiente governa extensamente a atividade antioxidante dos antioxidantes fenólicos: os antioxidantes hidrófilos são mais eficazes em lípidos sólidos, enquanto antioxidantes lipófilos são mais eficazes em sistemas com elevada razão superfície/volume, como no caso de emulsões (Ramadan, 2012).

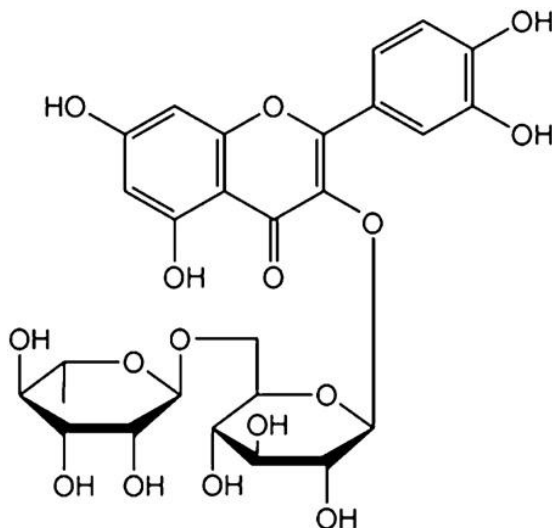


Figura 15 - Estrutura molecular da rutina. (adaptado de Mauludin et alii., 2009).

No entanto, é quimicamente instável, limitando a sua aplicabilidade no campo farmacêutico. Estas propriedades resultam numa baixa biodisponibilidade, baixa permeabilidade, instabilidade e elevada eliminação pelo efeito de primeira passagem (Kumari et alii., 2010).

3. Aplicações terapêuticas da rutina

A rutina é um flavonoide natural com uma variedade de atividades biológicas e ações farmacológicas, destacando a sua ação anticarcinogénica, promoção da dilatação das artérias coronárias, função antiagregante plaquetar, antianémica e efeitos

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

antianafiláticos. Estudos recentes demonstraram que os flavonoides naturais possuem ação antioxidante contra o stress oxidativo induzido por danos na pele. A rutina, sendo o flavonoide natural mais estudado, apresenta a maior atividade antirradicais livres. Assim, a sua aplicação tópica tem recebido elevada atenção devido à sua ação contra espécies reativas de oxigênio (“*Reactive Oxygen Species*”, ROS) que medeiam a danificação da pele. Como resultado da sua baixa solubilidade, a aplicação clínica da rutina é muito restrita pelo que é necessário o desenvolvimento de novos veículos de transporte adequados que garantam a sua passagem através da pele e a sua bioatividade (Chen-yu et alii., 2012).

Além dos efeitos anteriormente referidos, possui ainda outros efeitos benéficos para a saúde estando incluídas as funções antiinflamatória e antialérgica, assim como a proteção conferida contra eventos cardiovasculares e a redução do risco de cancro. Todas estas ações têm origem na sua forte atividade antioxidante explicada pela capacidade quelantes de iões metálicos, uma vez que estes desempenham um papel importante na formação de ROS (Ramadan, 2012). Além de funções antioxidante e antitumoral, a rutina também revela uma ação antiviral (Kumari et alii., 2010). Pode também exercer atividade farmacológica como vasoativo/venotrópico e citoprotector. Possui uma vantagem sobre os outros flavonoides que em certas ocasiões se comportam como pro-oxidantes e catalisam a produção de radicais de oxigênio. Assim, a rutina pode ser considerada uma potencial molécula não tóxica e não oxidável, contudo a sua desvantagem está associada à fraca solubilidade em água justificando a baixa biodisponibilidade da mesma, razão pela qual existem algumas restrições relativamente à sua utilização, nomeadamente para administração oral como suplementos nutricionais de tomas diárias (Mauludin et alii., 2009).

4. Produtos comercializados contendo rutina

Os venotrópicos são substâncias utilizadas no tratamento da insuficiência venosa. Na maioria são quimicamente flavonoides. O mecanismo pelo qual atuam não se encontra totalmente esclarecido, contudo as oxerrutinas apresentam maior eficácia (Caramona et alii., 2010).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

i. Venoruton® Pó para Solução Oral

A forma farmacêutica é um pó para solução oral, com sabor a laranja, de 1000 mg contendo O-(β -hidroxietil)-rutosídeos. Os outros componentes da formulação são o manitol, sacarina sódica e aroma de laranja. Apresenta-se em embalagens de 14 e 30 saquetas.

O Venoruton® pertence a um grupo de medicamentos que protege os vasos, designados por vasoprotetores. É indicado em situações de edema para o alívio do inchaço e sintomas associados com a Insuficiência Venosa Crónica (IVC) como dor, cansaço, sensação de pernas “inquieta”, aumento de volume, câibras, parestesias e sensação de pernas pesadas. Também pode ser utilizado para o alívio dos sintomas das hemorroidas.

No caso de Insuficiência Venosa Crónica (IVC) e suas complicações, a dose inicial é de uma saqueta por dia, devendo ser mantida até alívio completo dos sintomas e do edema. O alívio sintomático ocorre geralmente após duas semanas. A dose de manutenção é de 1000 mg por dia ou, no mínimo 500 a 600 mg. Após o alívio completo dos sintomas e edema, o tratamento pode ser interrompido. Em caso de recorrência dos sintomas, o tratamento deve ser reiniciado com a dose inicial ou a de manutenção.

O modo de administração do Venoruton® é a via oral, devendo diluir-se o conteúdo numa saqueta num copo de água, e administrar após as refeições.

Em casos raros, os efeitos secundários possíveis são distúrbios gastrointestinais, flatulência, diarreia, dor abdominal, desconforto gástrico, dispepsia, *rash*, prurido e urticária. Também em casos raros, o Venoruton® pode causar tonturas, dores de cabeça, cansaço, rubor, reações de hipersensibilidade, reações anafiláticas e choque anafilático (INFARMED, 2010).

ii. Venoruton® Gel

O Venoruton® Gel contém O-(β -hidroxietil)-rutosídeos com uma dosagem de 20 mg/g. Encontra-se na forma de uma bisnaga de 100g, sendo utilizado para o alívio e sintomas da IVC, no entanto para aplicação cutânea e transdérmica (INFARMED, 2010). Podem ocorrer reações de hipersensibilidade à aplicação local. Não se deve proceder à sua

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

aplicação em áreas não íntegras ou nas previamente expostas a radiações (Caramona et alii., 2010).

iii. Venoruton® F

O Venoruton® F pertence ao grupo das formas farmacêuticas orais sólidas, apresentado na forma de comprimidos-blister de 60 unidades, com uma dosagem de 500 mg em O-(β -hidroxietil)-rutosídeos. É um medicamento sujeito a receita médica (MSRM) (Caramona et alii., 2010).

V. Estados patológicos associados ao desenvolvimento de nanoemulsões com rutina

1. Doença venosa crónica

O Aparelho Circulatório é um sistema complexo e de funcionamento coordenado através de vasos sanguíneos que permite a troca de nutrientes e oxigénio mantendo os tecidos orgânicos vivos. O fluxo sanguíneo é redistribuído por artérias, veias, capilares e vasos linfáticos. As veias transportam o sangue desde os órgãos e tecidos do corpo humano novamente ao coração, sendo de realçar o trabalho árduo das veias de médio calibre dos membros inferiores, que transportam o sangue desde o ponto mais distante do corpo, contra à força da gravidade (Seeley et alii., 2003; Meissner et alii., 2007b). Assim, estas veias possuem válvulas que permitem a circulação do sangue até ao coração, mas não o sentido contrário, ocluindo o vaso (Figura 16) (Seeley et alii., 2003).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

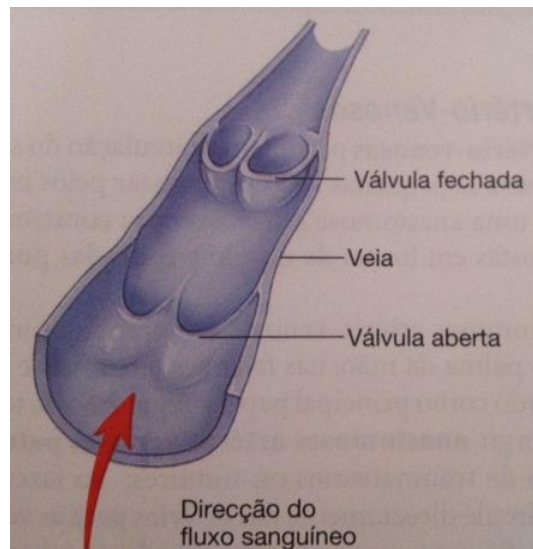


Figura 16 - Estrutura de uma veia e representação das válvulas. (adaptado de Seeley et alii., 2003).

A distensão das paredes das veias dos membros inferiores tem como consequência uma insuficiência valvular, resultando no aparecimento de veias varicosas (Figura 17). As veias ficam de tal forma dilatadas que as válvulas deixam de se sobrepor e tornam-se incapazes de impedir o refluxo do sangue. Consequentemente, a pressão venosa nos membros inferiores passa a ser superior ao normal, ocasionando o aparecimento de edema. O fluxo pode torna-se lento levando à coagulação do sangue, dando origem a uma flebite ou inflamação das veias. Caso a inflamação seja grave e ocasione a acumulação de sangue em determinada área, pode conduzir a gangrena causando a morte dos tecidos por redução ou perda de irrigação (Seeley et alii., 2003).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina



Figura 17 - Veias varicosas. (Hinchliffe et alii., 2006).

Os primeiros sintomas associados ao aparecimento de uma doença venosa são a sensação de pernas cansadas, pesadas e inchadas e dor na barriga da perna na posição sentada ou de pé por períodos de tempo prolongados (Meissner et alii., 2007a; Meissner et alii., 2007b). O espectro clínico da doença venosa crónica estende-se desde telangiectasias e varicoses passando pelo edema venoso até modificações crónicas ao nível da pele associadas a dor e ulceração (*Ulcus cruris venosum*) (Meissner et alii., 2007a; Tran e Meissner, 2002). Está estimado que a doença venosa crónica afeta mais de 1% da população em geral. Os recursos dedicados ao tratamento são enormes e as consequências físico-sociais significativas (Tran e Meissner, 2002).

Esta patologia pode surgir a partir de causas idiopáticas ou seguir um episódio de trombose venosa profunda aguda. Apesar das manifestações mais comuns de doença venosa crónica terem sido atribuídas historicamente a refluxo valvular, a obstrução venosa também influencia o desenvolvimento de síndrome pós-trombótico. Ambas contribuem para a hipertensão venosa ambulatória, característica pato-fisiológica responsável pelas manifestações severas da patologia (Tran e Meissner, 2002).

A investigação clínica da epidemiologia, história natural e tratamento da doença venosa tem sido limitada pela falta de uniformidade dos resultados, que incluem pacientes com severidade da doença variável, etiologias diversas e diferentes combinações de

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

patologias venosas. Assim, foi sugerido um sistema de classificação (CEAP) para permitir um diagnóstico mais uniforme e a comparação entre populações de pacientes (Tabela 1). O sistema CEAP inclui a classe clínica da patologia baseada em sinais objetivos (C); a etiologia (E); a distribuição anatómica do refluxo e obstrução nas veias superficiais, profundas e perforantes (A); e a pato-fisiologia causada pelo refluxo ou obstrução (P). De um ponto de vista etiológico, a doença venosa crónica pode ser considerada congénita (presente desde o momento do nascimento), primária ou secundária. Na patologia primária não existe um mecanismo disfuncional venoso identificável, enquanto na secundária resulta de um evento antecedente, usualmente um episódio trombótico venoso profundo agudo (“*Deep Venous Thrombosis* “, DVT) devido a desvios ou obstruções das veias profundas, acabando por haver acumulação de sedimentos nas paredes dos vasos (Tran e Meissner, 2002; Meissner et alii., 2007a).

Tabela 1 - Classificação clínica da Doença Venosa Crónica (CEAP). (adaptado de Tran e Meissner, 2002).

Classe 0	Não existem sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa
Classe 1	Telangiectasias ou veias reticulares
Classe 2	Veias Varicosas
Classe 3	Edema
Classe 4	Alterações na pele associadas a doença venosa (pigmentação, eczema venoso, lipodermatoesclerose)
Classe 5	Alterações na pele como as descritas na Classe 4, mas com ulceração curada
Classe 6	Alterações na pele como descritas na Classe 4, mas com ulceração ativa

Os derrames varicosos são a manifestação clínica mais comum, sugerindo uma prevalência superior em mulheres, implicando uma pré-disposição genética ao seu desenvolvimento (Tran e Meissner, 2002; Seeley et alii., 2003). Em mulheres nesta situação, tudo o que provoque um aumento da pressão e estiramento venoso pode levar

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

ao aparecimento de veias varicosas por perda de elasticidade dos vasos sanguíneos. Um exemplo é a gravidez, onde existe um aumento da pressão venosa nas veias que drenam os membros inferiores por estas ficarem comprimidas pelo crescimento uterino (Seeley et alii., 2003).

Os fatores de risco associados ao aparecimento de patologias venosas são a idade, excesso de peso, a gravidez (influências hormonais), sexo feminino e história familiar (Insuficiência venosa adquirida ou anomalia venosa congênita) (Meissner et alii., 2007a).

O tratamento farmacológico para a doença venosa crônica é muitas vezes prescrito, uma vez que a cirurgia (*stripping*) e escleroterapia (injeção de uma substância que provoca uma reação anti-inflamatória mínima fechando a veia) nem sempre são indicadas e a conformidade com os tratamentos de compressão, como a utilização de meias elásticas, ser frequentemente fraca. A utilização de flavonoides e outros fármacos têm conseguido um alívio considerável dos sintomas associados à doença venosa. Em 2005, concluiu-se, com base em ensaios clínicos e experiência de especialistas, que as substâncias venoativas são eficazes no controlo dos sintomas venosos (Martínez-Zapata et alii., 2008).

VI. Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

1. Materiais

O lípido utilizado para o desenvolvimento da nanoemulsão foi o Mygliol 812 N/F fornecido pela Sasol (Joanesburgo, África do Sul). A substância ativa Rutina Tri-Hidrato foi disponibilizada pela Fluka (Sigma Aldrich Chemical Co, Alemanha). A Lecitina Phospholipon 80H foi fornecida pela Lipoid (Alemanha). O agente tensioativo utilizado foi o Polissorbato 80 ou Tween 80 disponibilizado pela Sigma Aldrich (Alemanha). A água ultrapura foi obtida pela Milli Q[®] (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

2. Métodos

i. Preparação da nanoemulsão de rutina

Procedeu-se à pesagem de todos os constituintes da formulação através de uma balança analítica, dispersou-se a fase aquosa constituída por Polissorbato 80 e por Água Ultrapura num gobelé, seguidamente aquecida em banho de água a 50°C, coberto com vidro de relógio para evitar a evaporação da água. Num outro gobelé foram pesadas a Lecitina, a Rutina e o Mygliol 812 sendo também aquecida em banho de água a 50°C, coberto com vidro de relógio. Quando ambas as fases se encontraram à mesma temperatura, adicionou-se a fase aquosa à fase lipídica, passando a emulsão no Ultraturrax da IKA® T25 (Alemanha) a 8000 rpm durante um minuto. Por fim, o sistema é submetido a 3 ciclos num Homogeneizador de Alta Pressão (HPH) a uma pressão de 1000 bar, utilizando um Emulsiflex C3® da Avestin (Alemanha).

A preparação da emulsão placebo foi procedida de igual modo e perante as mesmas condições (Tabela 2), e a visualização das partículas da nanoemulsão não encapsulada analisada por microscópio ótico (Figura 18).

Tabela 2 - Composição qualitativa e quantitativa da formulação placebo

	% (m/m)	30 ml
Miglyol 812[®]	10%	3g
Lecitina	1%	0,3g
Tween 80	3%	0,9g
Água Ultrapura	q.b.p 100%	q.b.p 30ml

ii. Caracterização da nanoemulsão de rutina

- ✓ Análise de distribuição das partículas: determinação do tamanho da partícula e potencial Zeta da formulação placebo

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

As determinações do tamanho da partícula, do potencial zeta e do peso molecular foram realizadas, no dia 1 (Figura 19) e no dia 15 (Figura 20), através do equipamento ZetaSizer Nano ZS[®] da Malvern Instruments, Lda. (Reino Unido) (Tabela 3). Para conseguir uma condutividade de 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, foi efetuada uma diluição de 10 μL de nanoemulsão em NaCl 0,9%, isto evita a flutuação nos valores de PZ devido a diferenças na concentração de eletrólitos (Müller et alii., 2004).

Foram preparadas emulsões de 10, 20 e 30 mg de rutina (Tabelas 4, 5 e 6).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Tabela 4 - Composição qualitativa e quantitativa da nanoemulsão com 10 mg de rutina

	% (m/m)	30 ml
Rutina Tri-hidrato	0,033%	0,01g
Miglyol 812[®]	10%	3g
Lecitina	1%	0,3g
Tween 80	3%	0,9g
Água Ultrapura	q.b.p 100%	q.b.p 30ml

Tabela 5 – Composição qualitativa e quantitativa da nanoemulsão com 20 mg de rutina

	% (m/m)	30 ml
Rutina Tri-hidrato	0,067%	0,02g
Miglyol 812[®]	10%	3g
Lecitina	1%	0,3g
Tween 80	3%	0,9g
Água Ultrapura	q.b.p 100%	q.b.p 30ml

Tabela 6 – Composição qualitativa e quantitativa da nanoemulsão com 30 mg de rutina

	% (m/m)	30 ml
Rutina Tri-hidrato	0,1%	0,03g
Miglyol 812[®]	10%	3g
Lecitina	1%	0,3g
Tween 80	3%	0,9g
Água Ultrapura	q.b.p 100%	q.b.p 30ml

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

✓ Avaliação microscópica das partículas

A visualização das partículas das nanoemulsões de 10 mg (Figura 21), 20 mg (Figura 22) e 30 mg (Figura 23) foi efetuada através de um microscópio ótico Eclipse® da Nikon (Japão).

✓ Ensaio de varrimento do comprimento de onda da rutina

O varrimento do comprimento de onda da rutina, realizado a partir de uma solução-mãe com concentração igual a 45 µg/mL e em que o solvente foi utilizado numa proporção de 50:50 étanol 100%/água, foi necessário para determinar qual o valor de comprimento de onda a utilizar para calibração do espectrofotómetro para posterior determinação da percentagem de rutina encapsulada. O valor para o qual se registou um pico de absorvência foi o de 359,0 nm (Figura 24).

✓ Determinação da Eficácia de Encapsulação (E.E) da rutina

A concentração de rutina encapsulada foi calculada através da determinação da curva de calibração (Müller et al., 2004). Para a determinação da curva de calibração foram utilizadas seis soluções-padrão de rutina com as seguintes concentrações: 45, 40, 30, 20, 10 e 5 µg/mL (Figura 25).

Para realizar o ensaio de determinação da eficácia de encapsulação da rutina foram centrifugados, numa microcentrífuga (miniSpin, eppendorf, U.S.A), 500 µL da formulação de nanoemulsão de 20 mg de rutina durante 15 minutos a 13000 rpm. Foram retirados 50 µL do sobrenadante obtido e diluídos com água ultrapura até obter um volume final de 1 mL. O fator de diluição (F.D) é de 20 vezes. Posteriormente, procedeu-se à sua análise por UV-Vis realizando a leitura das absorvências de 3 alíquotas retiradas da emulsão de 20 mg, de modo a determinar a concentração de rutina no sobrenadante (Tabela 7).

Todas as leituras foram efetuadas em triplicado através de um espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific (U.S.A). Os resultados encontram-se apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

✓ Ensaio de liberação da rutina

Com a finalidade de avaliar o perfil de liberação da rutina a partir da emulsão produzida, procedeu-se à realização do ensaio de liberação através do método do saco de diálise (Kelman et alii., 2007), utilizando uma mistura de água ultra-purificada e etanol (65:35) como meio de liberação. O saco de diálise (MWCO 12Da, Sigma-Aldrich Co, Alemanha) foi embebido em água ultra-purificada durante 12 horas antes da sua utilização. Foi colocada uma alíquota de 5 mL da emulsão de 20 mg de rutina no saco de diálise. O saco foi colocado num recipiente a uma temperatura igual a 37°C com agitação constante a 100 rpm. Uma alíquota de 1 mL foi retirada em determinados intervalos e substituída por meio fresco (Li et alii., 2009, Almeida et alii., 2010). A presença de rutina em solução foi determinada por Espectrofotometria UV-vis. Todas as operações foram realizadas em triplicado (Figura 26).

3. Resultados

i. Avaliação microscópica da formulação placebo

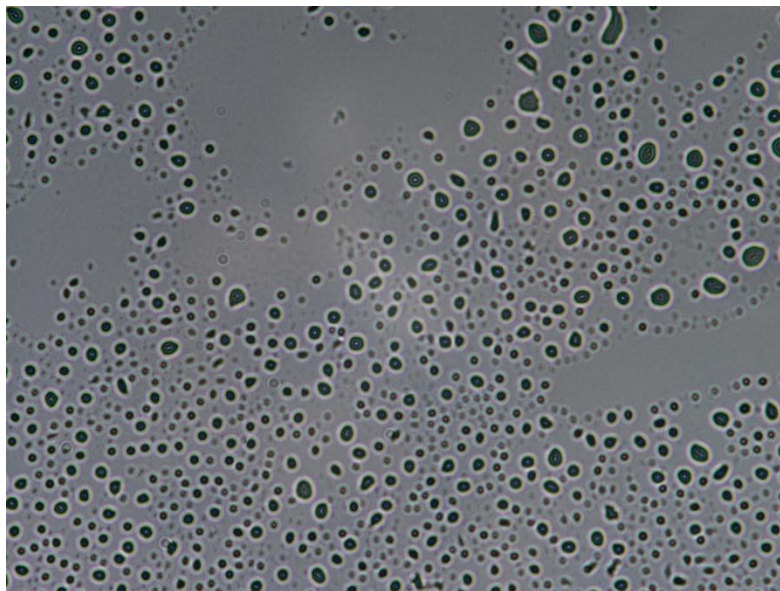


Figura 18 - Visualização das partículas da nanoemulsão placebo ao microscópio ótico

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

ii. Distribuição do tamanho das partículas da formulação placebo

Tabela 3 - Avaliação de parâmetros físico-químicos da formulação placebo

	Tamanho da partícula	Índice de Polidispersão (I.P)	Potencial Zeta (P.Z)
Dia 1	126,9 ± 1,097	0,168 ± 0,007	- 3,49
Dia 15	128,8 ± 1,537	0,178 ± 0,007	- 3,56

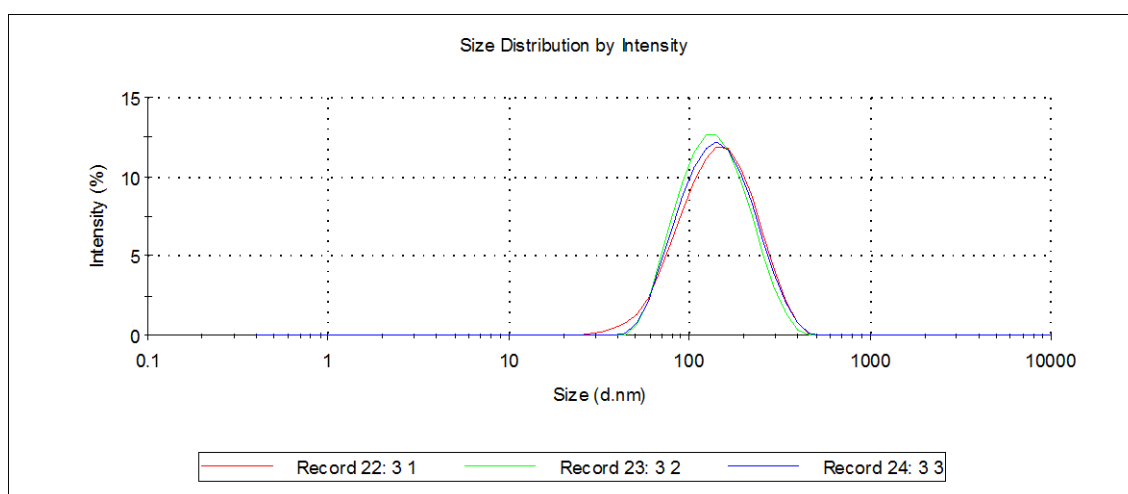


Figura 19 - Análise de distribuição das partículas da nanoemulsão placebo no dia 1

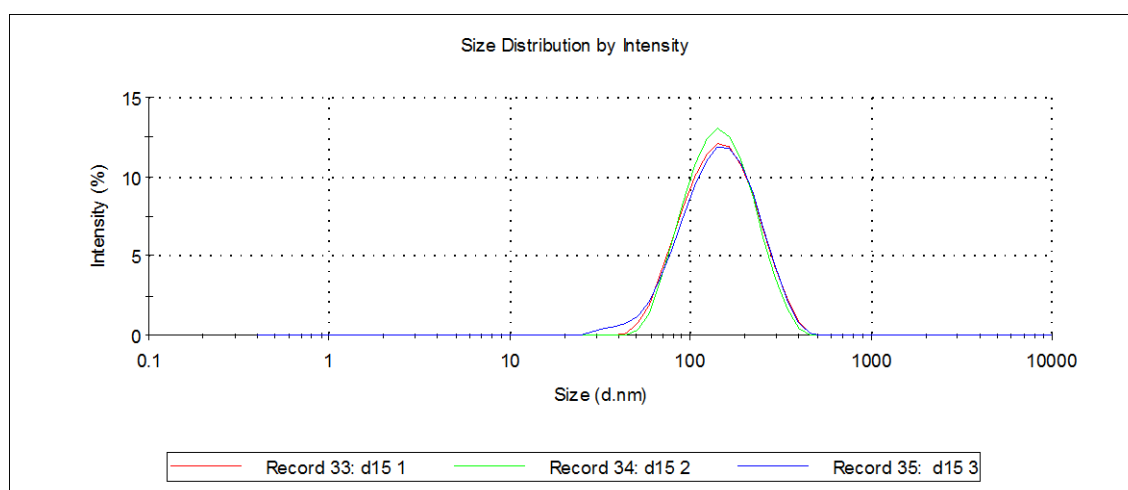


Figura 20 - Análise de distribuição das partículas da nanoemulsão placebo no dia 15.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

iii. Avaliação microscópica das formulações de 10, 20 e 30 mg de rutina

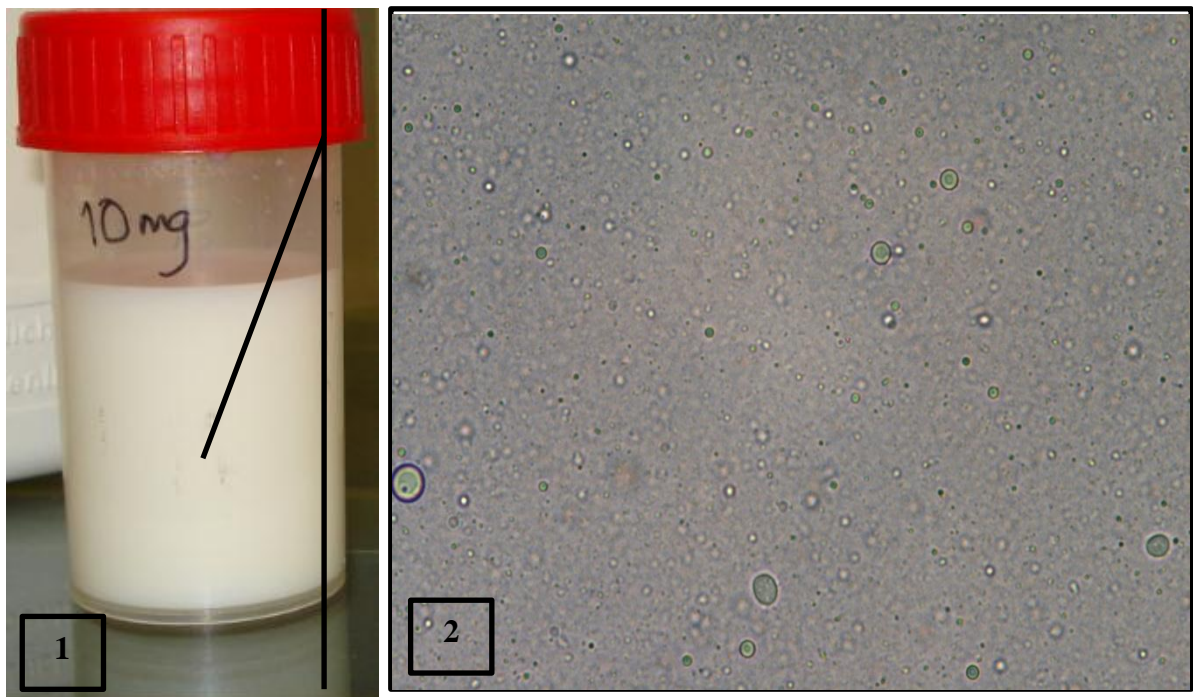


Figura 21 - 1) Aspeto físico da nanoemulsão 10 mg de rutina; 2) Observação a uma ampliação de 400 vezes.

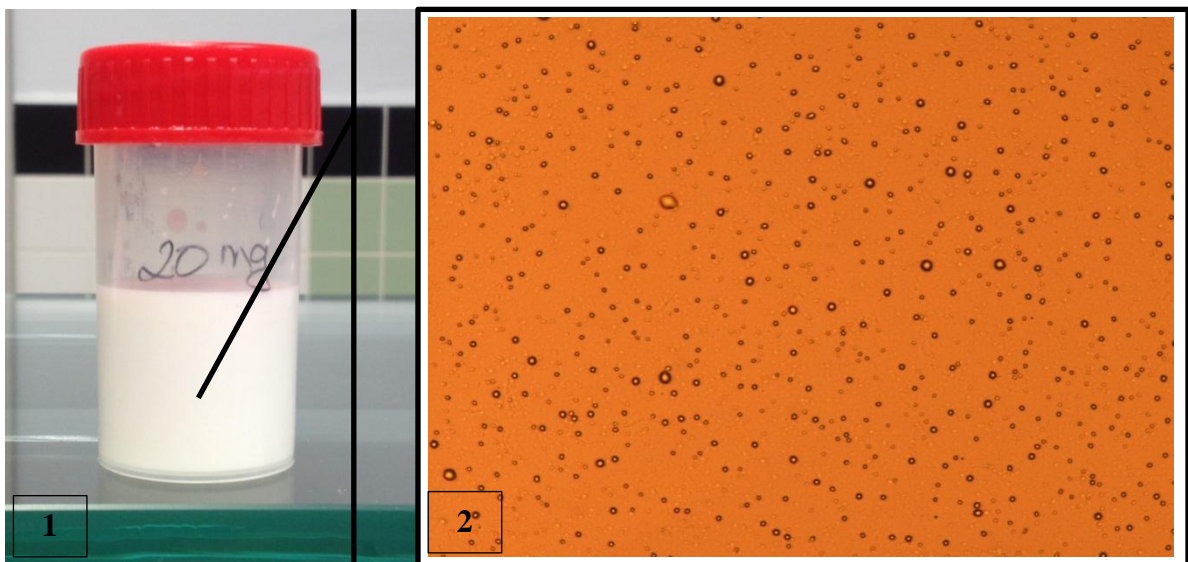


Figura 22 - 1) Aspeto físico da nanoemulsão 20 mg de rutina; 2) Observação a uma ampliação de 400 vezes.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

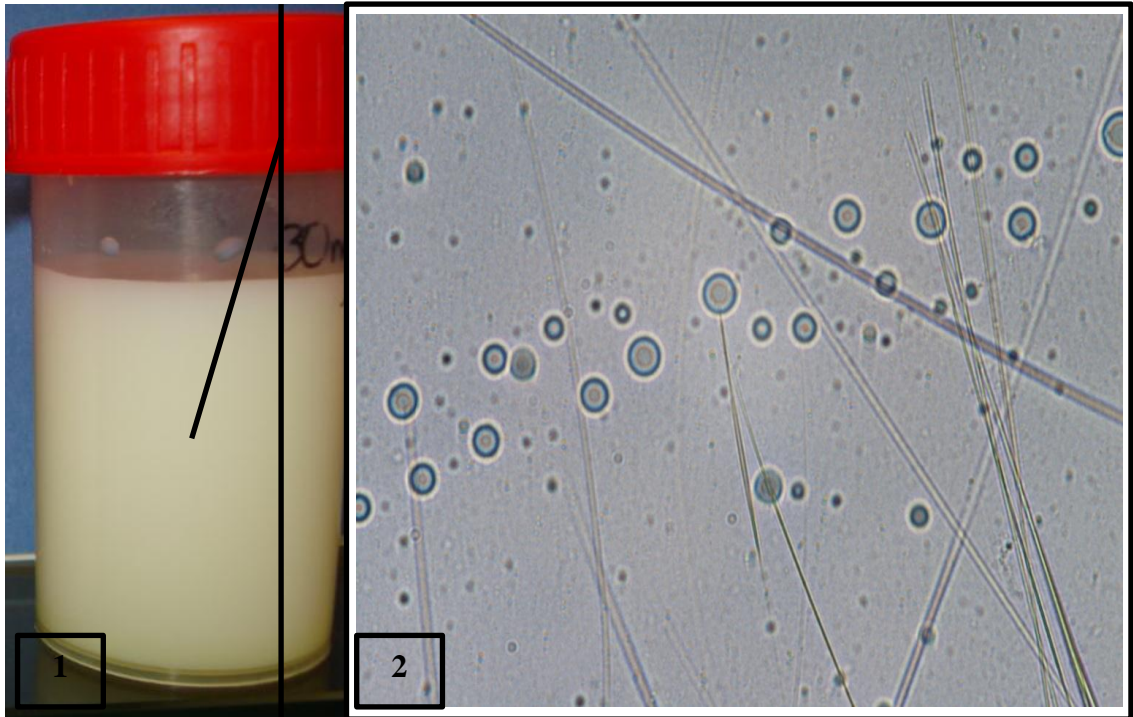


Figura 21 - 1) Aspetto físico da nanoemulsão 30 mg de rutina; 2) Observação a uma ampliação de 400 vezes.

iv. Varrimento do comprimento de onda da rutina

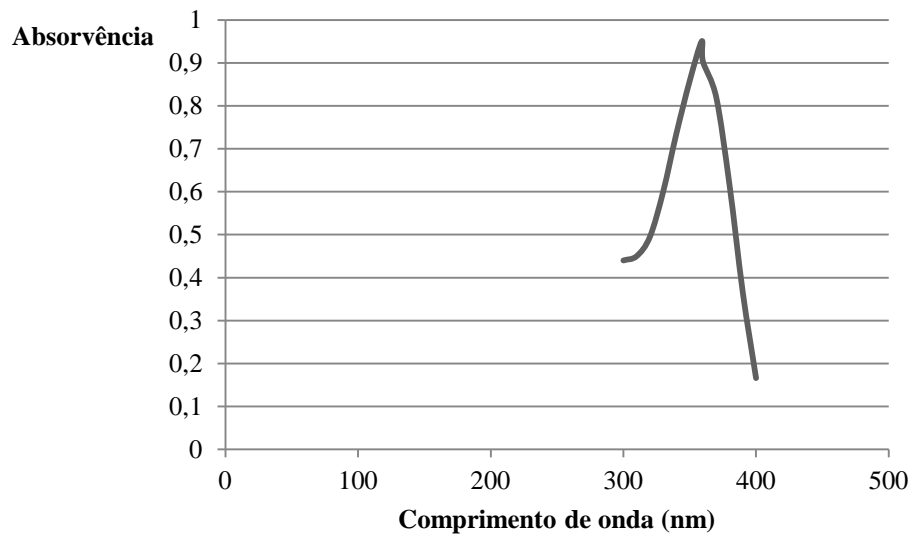


Figura 22 - Gráfico do varrimento do comprimento de onda da rutina.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

v. Determinação da curva de calibração

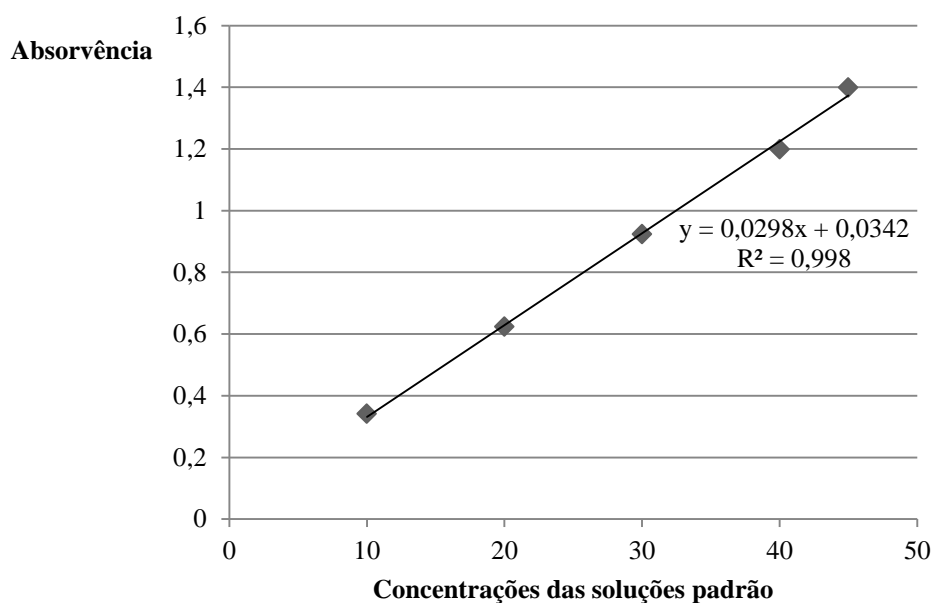


Figura 23 - Gráfico da curva de calibração.

vi. Cálculo da concentração de rutina encapsulada

Tabela 7 – Ensaio de determinação da eficácia de encapsulação (E.E). da rutina.

Amostra	Valores de Absorvência		
Nanoemulsão de 20 mg de rutina	0,176	0,200	0,168

Tabela 8 – Eficácia de encapsulação (E.E).

Equação da reta	Concentração rutina em 1 mL de amostra	Concentração rutina em 50 µL de emulsão	Concentração rutina em 30 mL de formulação	E.E (%)
$y = 0,0298x + 0,0342$ $R^2=0,998$	4,926 µg/mL	98,52 µg/mL	2955,6 µg 2,9556 mg	85,2 % ± 0,014

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

vii. Ensaio de liberação da rutina

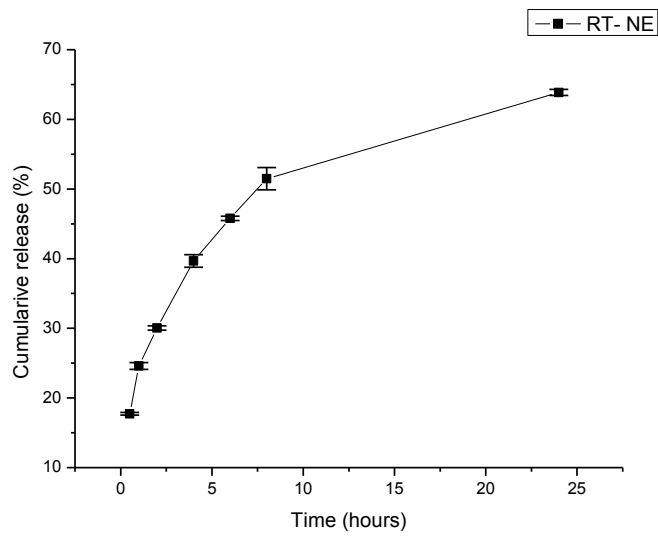


Figura 24 - Liberação in vitro da rutina a partir da nanoemulsão pelo método do saco de diálise (n=3).

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

4. Discussão

Como já foi referido ao longo deste trabalho, existem vários fatores que condicionam a estabilidade de um sistema, nomeadamente o tamanho da partícula, o potencial zeta e a polidispersão. Deste modo, salienta-se a importância da determinação destes parâmetros aquando do desenvolvimento de uma nova formulação.

A ação combinada entre a adição do agente tensioativo ao sistema e o método de produção permitem, através de uma ação conjunta, formar uma nanoemulsão de rutina estável.

Na Figura 18, está ilustrada a formulação placebo vista ao microscópio ótico numa ampliação de 400 vezes. Podem observar-se partículas de tamanho homogéneo, bem definidas remetendo para uma dispersão monodispersa. Através da análise da Tabela 3 e das Figuras 19 e 20, pode concluir-se que a distribuição do tamanho das partículas da formulação placebo tende a manter-se estável durante o armazenamento, sendo que no dia 1 remete para um valor de 126,9 nm e no dia 15 para 128,9 nm. Sabe-se também que o comportamento das partículas pode ser avaliado através do valor de PI. Os valores de PI da formulação placebo rondam 0,168 e 0,178, no dia 1 e no dia 15, respetivamente, apontando para a estabilidade da formulação podendo concluir que a formulação placebo não sofreu efeito de Ostwald significativo ou então sofreu a uma taxa aceitável. Outro fator que remete para a avaliação da estabilidade de uma formulação é o valor de potencial zeta, onde valores que rondam os 30 mV, em valor absoluto, indicam que se trata de uma nanoemulsão estável. Os valores obtidos foram de -3,49 e -3,56 mV no dia 1 e 15, respetivamente. Uma vez que foi adicionado à nanoemulsão um agente tensioativo não iónico, este não confere carga à formulação garantindo a estabilidade estérica e não estereoquímica. Deste modo, justifica-se a obtenção destes valores, acentuando ainda mais a estabilidade da formulação e o tamanho homogéneo das partículas, uma vez que se mantêm praticamente sem alterações ao longo do tempo.

Após a encapsulação da rutina na formulação placebo, procedeu-se à observação do comportamento das partículas com o intuito de selecionar a formulação que melhor satisfizesse os requisitos pretendidos. Isto porque, a encapsulação do fármaco pode

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

resultar em alterações nas características do sistema. As Figuras 21, 22 e 23 traduzem o comportamento das partículas nas formulações de 10, 20 e 30 mg de rutina, respetivamente. Através da análise das mesmas, podemos concluir que a formulação de 20 mg revela uma distribuição de tamanho das partículas uniforme e homogénea, não evidenciando aglomerados e onde as partículas se encontram bem definidas. A nanoemulsão de 10 mg também é estável, no entanto optou-se pela de 20 mg somente pelo facto de esta última possuir uma maior concentração de rutina. Contrariamente, na formulação de 30 mg observou-se a presença de um depósito de rutina em tom amarelado no fundo do recipiente (Figura 23), o que aponta para a instabilidade da mesma. Revela uma distribuição heterogénea com partículas de tamanho superior, podendo observar-se através da Figura 23 a presença de cristais de rutina.

A determinação e seleção do comprimento de onda (λ) da rutina através do seu varrimento e posterior determinação da curva de calibração, permitiram o cálculo da Eficácia de Encapsulação (E.E) da rutina no sistema. Os resultados do ensaio de determinação da E.E encontram-se ilustrados nas Tabelas 7 e 8. A rutina foi encapsulada no sistema numa percentagem de 85,2%, isto significa que, cerca de 85% do fármaco está aprisionado no sistema e disponível para exercer a sua ação terapêutica.

Por fim, e para avaliar o perfil de libertação da rutina da formulação, procedeu-se à realização do ensaio de libertação da rutina. Através da análise da Figura 26, verificou-se que ao fim de 8 horas cerca de 50% da rutina encapsulada foi libertada e que passadas 24 horas 65% teria sido libertada do sistema. Tais dados remetem para a eventualidade de ter sido conseguido um perfil de libertação prolongada da substância ativa.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

2.CONCLUSÃO

A nanotecnologia tem tido um desenvolvimento e crescimento estrondoso ao longo dos últimos anos (Mihrianyan et al., 2012). Os sistemas farmacêuticos, como as nanoemulsões, demonstram uma grande variedade de propriedades úteis e interessantes num contexto de aplicação clínica. A utilização da nanotecnologia na indústria farmacêutica tem como objetivo aumentar a eficácia *in vivo* de diversos fármacos através do controlo das suas propriedades biológicas e simultaneamente tornando o seu desempenho essencialmente terapêutico (Torchilin, 2006).

A abordagem realizada face à diminuição do tamanho das partículas a uma escala micrométrica ou até mesmo nanométrica, revela ser uma componente determinante na obtenção de um aumento significativo nas taxas de dissolução do fármaco, aumentando a sua solubilidade e, por sua vez, uma melhora na biodisponibilidade oral. Isto porque, através da redução do tamanho das partículas, há um aumento do grau de saturação e da área de superfície das partículas levando a um aumento da velocidade de dissolução (Mauludin et alii., 2009).

A encapsulação de fármacos permite a sua proteção contra fatores ambientais (como a oxidação). Por outro lado, existe um aumento da área de superfície o que conduz a um aumento da solubilidade, melhoria da biodisponibilidade, possibilidade de liberação controlada além do direcionamento da terapêutica a um local alvo (Fathi et alii., 2012).

Em estudo encontra-se a aplicação destes sistemas para as diferentes vias de administração, no entanto a utilização da nanotecnologia em sistemas de transporte demonstra ser particularmente vantajosa para administração tópica de fármacos, permitindo obter perfis de liberação prolongada de fármacos e melhorando a sua biodisponibilidade no local de ação (Cirri et alii., 2012).

As doenças venosas são hoje consideradas como doenças sociais derivada a sua grande incidência, nomeadamente em mulheres. O objetivo principal da terapia venosa consiste inicialmente na prevenção e posteriormente no alívio dos sintomas associados ao seu aparecimento. Não existe cura através de uma terapia medicamentosa, embora esta constitua um complemento apropriado, quando associado com outras medidas terapêuticas, como a utilização de meias de compressão. Atualmente, e mais por uma

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada

Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

questão meramente estética, existe a possibilidade de secagem das veias através de escleroterapia ou mesmo remoção cirúrgica (*Stripping*). Em qualquer dos casos, após algum tempo, é natural o reaparecimento de novas varizes.

Os flavonóides têm demonstrado resultados eficazes no alívio e controlo dos sintomas associados à doença venosa, embora a gama de produtos existentes no mercado destinados ao tratamento esta patologia seja limitada.

Com este trabalho experimental, verificou-se que a elaboração de um sistema constituído por partículas com dimensões nanométricas, permite ser vantajoso no sentido da encapsulação de um fármaco com fraca solubilidade e com elevado poder terapêutico, como é o caso da rutina. Sendo um composto natural com atividade maioritariamente antioxidante e venotrópica, tem associado a si um grande interesse no sentido em que a sua utilização no alívio dos sintomas associados a doença venosa, mais propriamente no alívio do sintoma de pernas cansadas, pode ser vantajosa.

Assim, a sua encapsulação num sistema de transporte parece ser determinante para proteger o fármaco e salvaguardar a sua atividade farmacológica no local pretendido. A escolha de uma nanoemulsão pareceu ser o mais viável, uma vez que, como o objetivo seria uma aplicação tópica, nomeadamente a nível dos membros inferiores, é pretendido um efeito local e uma ação minimamente rápida. Foi obtido o valor de Eficácia de Encapsulação de, aproximadamente, 85%, em que numa primeira hora, uma quantidade igual a 15% consegue ser libertada da nanoemulsão.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

3.BIBLIOGRAFIA

Aghbashlo, M., Mobli, H., Rafiee, S., Madadlou, A. (2012). Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and exergy efficiencies of fish oil microencapsulation, *Powder Technology*, 225, pp. 107-117.

Almeida, J., Lima, F., Da Ros, S., Bulhões, L., Carvalho, L. & Beck, R. (2010). Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. *Nanoscale Research Letters*, 5,1603-1610

Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?, *Journal of Controlled Release*, 158, pp. 182-193.

Amsalem, O., Yuli-Amar, I., Aserin, A., Garti, N. (2009). Phospolipids embedded fully dilutable liquid nanostructures. Part 1: Compositions and solubilization capacity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, pp. 15-22.

Anton, N., Vandamme, T. F. (2009). The universality of low-energy nano-emulsification, *International Journal of Pharmaceutics*, 377, pp. 142-147.

Atarés, L., Marshall, L. J., Akhtar, M., Murray, B. S. (2012). Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure, *Food Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.221>.

Baspinar, Y., Borchert, H. H. (2012). Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions – Is there e benefit of the positive charge?, *International Journal of Pharmaceutics*, 430, pp. 247-252.

Burdock, G. A., Carabin, I. G. (2004). Generally recognized as safe (GRAS): history and description, *Toxicology Letters*, 150, pp. 3-18.

Caramona, M., Esteves, A. P., Gonçalves, J., Mendonça, J., Osswald, W., Pinheiro, R. L., Rodrigues, A., Sampaio, C., Sepodes, B., Teixeira, A. A. (2010). *Prontuário Terapêutico*. Lisboa, INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP/Ministério da Saúde.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Castelli, F., Puglia, C., Sarpuetro, M. G., Rizza, L., Bonina, F. (2005). Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, *International Journal of Pharmaceutics*, 304, pp. 231-238.

Cevc, G., Vierl, U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal, *Journal of Controlled Release*, 141, pp. 277-299.

Chen-yu, G., Chun-fe, Y., Qi-lu, L., Qi, T., Yan-wei, X., Wei-na, L., Guang-xi, Z. (2012). Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.042>

Cirri, M., Bragagni, M., Mennini, N., Mura, P. (2012). Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, pp. 46-53.

Cui, G., Wang, L., Davis, P. J., Kara, M., Liu, H. (2006). Preparation and physical characterization of a novel marine oil emulsion as potential new formulation vehicle for lipid soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 325, pp. 180-185.

Dreher, F., Walde, P., Walther, P., Wehrli, E. (1997). Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport, *Journal of Controlled Release*, 45, pp. 131-140.

El Maghraby, G. M. (2010). Self-microemulsifying and microemulsion systems for transdermal delivery of indomethacin: Effect of phase transition, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, pp. 595-600.

Fasolo, D., Schwingel, L., Holzschuh, M., Bassani, V., Teixeira, H. (2007). Validation of an isocratic LC method for determination of quercetina and methylquercetin in topical nanoemulsions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, pp. 1174-1177.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Fathi, M., Mozafari, M. R., Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems, *Trends in Food Science & Technology*, 23, pp. 13-27.

Florence, A. T. (2004). Pharmaceutical Nanotechnology: a new section in *IJP*, *International Journal of Pharmaceutics*, 281, p. 1.

Formica, J. V., Regelson, W. (1995). Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, 33, pp. 1061-1080.

Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F. (2010). New trends encapsulation of liposoluble vitamins, *Journal of Controlled Release*, 146, pp. 276-290.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, pp. 572-584.

Himes, R., Lee, S., McMenigall, K., Russel-Jones, G. J. (2010). Reduction in inflammation in the footpad of carrageenan treated mice following the topical administration of anti-TNF molecules formulated in a micro-emulsion, *Journal of Controlled Release*, 3, pp. 210-213.

Hinchliffe, R. J., Ubhi, J., Beech, A., Ellison, J., Braithwaite, B. D. (2006). A Prospective Randomised Controlled Trial of VNUS Closure versus Surgery for the Treatment of Recurrent Long Saphenous Varicose Veins, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 31, pp. 212-218.

Hoeller, S., Sperger, A., Valenta, C. (2009). Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation, *International Journal of Pharmaceutics*, 370, pp. 181-186.

Horton, M. A., Khan, A. (2006). Medical nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for Nanotechnology, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2, pp. 42-48.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Huynh, L., Neale, C., Pomès, R., Allen, C. (2012). Computational approaches to the rational design of nanoemulsions, polymeric micelles, and dendrimers for drug delivery, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, pp. 20-36.

Hyam, R. S., Subhedar, K. M., Pawar, S. H. (2008). Effect of particle size distribution and zeta potential on the electrophoretic deposition of boron films, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 315, pp. 61-65.

INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9583&tipo_doc=fi> . [Consultado em 16/07/2012)].

Kaasalainen, M., Mäkilä, E., Riikonen, J., Kovalainen, M., Järvinen, K., Herzig, K. H., Lehto, V.P., Salonen, J. (2012). Effect of isotonic solutions and peptide adsorption on zeta potencial of porous silicon nanoparticle drug delivery formulations, *International Journal of Pharmaceutics*, 431, pp. 230-236.

Kaur, I. P., Kapila, M., Agrawal, R. (2007). Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing, *Ageing Research Reviews*, 6, pp. 271-288.

Kelmann, R. G., Kuminek, G., Teixeira, H. F. & Koester, L. S. (2007). Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics*, 342, 231-239.

Kogan, A., Garti, N. (2006). Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, pp. 369-385.

Kumari, A., Yadav, S. K., Pakade, Y. B., Singh, B., Yadav, S. C. (2010). Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetina, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80, pp. 184-192.

Laos, K., Lõugas, T., Mändmets, A., Vokk, R. (2007). Encapsulation of β -carotene from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) juice in furcellaran beads, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, pp. 395-398.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

- Lee, S. J., McClements, D. J. (2010). Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach, *Food Hydrocolloids*, 24, pp. 560-569.
- Li, H., Zhao, X., Ma, Y., Zhai, G., Li, L. & Lou, H. (2009). Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133, 238-244.
- Liu, J., Hu, G. (2007). Advances in studies of phospholipids as carriers in skin topical application, *Journal of Nanjing Medical University*, 6, pp. 349-353.
- Martínez-Zapata, M. J., Moreno, R. M., Gich, I., Urrútia, G., Bonfil, X. (2008). A Randomized, Double-Blind Multicentre Clinical Trial Comparing the Efficacy of Calcium Dobesilate with Placebo in the Treatment of Chronic Venous Disease, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 35, pp. 358-365.
- Mauludin, R., Müller, R. H., Keck, C. M. (2009). Development of an oral rutin nanocrystal formulation, *International Journal of Pharmaceutics*, 370, pp. 202-209.
- McClements, D. J. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems, *Advances in Colloid and Interface Science*, 174, pp. 1-30.
- McClements, D. J., Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components, *Advances in Colloid and Interface Science*, 159, pp. 213-228.
- McSweeney, S. L., Healy, R., Mulvihill, D. M. (2008). Effect of lecithin and monoglycerides on the heat stability of a model infant formula emulsion, *Food Hydrocolloids*, 22, pp. 888-898.
- Mehnert, W., Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, pp. 165-196.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Meissner, M. H., Gloviczki, P., Bergan, J., Kistner, R. L., Morrison, N., Pannier, F., Pappas, P. J., Rabe, E., Raju, S., Villavicencio, J. L. (2007a). Primary chronic venous disorders, *Journal of Vascular Surgery*, 46, pp. 54S-67S.

Meissner, M. H., Moneta, G., Burnand, K., Gloviczki, P., Lohr, J. M., Lurie, F., Mattos, M. A., McLafferty, R. B., Mozes, G., Rutherford, R. B., Padberg, F., Sumner, D. S. (2007b). The hemodynamics and diagnosis of venous disease, *Journal of Vascular Surgery*, 46, pp. 4S-24S.

Mihranyan, A., Ferraz, N., Strømme, M. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics, *Progress in Materials Science*, 57, pp. 875-910.

Morganti, P., Ruocco, E., Wolf, R., Ruocco, V. (2001). Percutaneous Absorption and Delivery Systems, *Clinics in Dermatology*, 19, pp. 489-501.

Müller, R. H., Mäder, K., Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, pp. 161-177.

Müller, R. H., Radtke, M., Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, pp. 131-155.

Müller, R. H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Brömer, S. (2004). SolEmuls® - novel technology for the formulation of i.v emulsions with poorly soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 269, pp. 293-302.

Narang, A. S., Delmarre, D., Gao, D. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 345, pp. 9-25.

Nii, T., Ishii, F. (2005). Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International Journal of Pharmaceutics*, 298, pp. 198–205.

Olsen, T. W. (2010). Routes for drug delivery: topical, transscleral, suprachoroidal, and intravitreal gas-phase nanoparticles, *Retinal Pharmacotherapy*, pp. 74-80.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Paolino, D., Ventura, C. A., Nisticó, S., Puglisi, G., Fresta, M. (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability, *International Journal of Pharmaceutics*, 244, pp. 21-31.

Pardeike, J., Hommos, A., Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *International Journal of Pharmaceutics*, 366, pp. 170-184.

Pardeike, J., Weber, S., Haber, T., Wagner, J., Zarfl, H. P., Plank, H., Zimmer, A. (2011). Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application, *International Journal of Pharmaceutics*, 419, pp. 329-338.

Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, pp. 147-166.

Peira, E., Carlotti, M. E., Trotta, C., Cavalli, R., Trotta, M. (2008). Positively charged microemulsions for topical application, *International Journal of Pharmaceutics*, 346, pp. 119-123.

Prista, L. N., Alves, A. C., Morgado, R., Lobo, J. S. (2008). *Tecnologia Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., McClements, D. J. (2011). Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type, *Food Chemistry*, 10.1016/j.foodchem.2011.11.091.

Ramadan, M. F. (2012). Antioxidant characteristics of phenolipids (quercetina-enriched lecithin) in lipid matrices, *Industrial Crops and Products*, 36, pp. 363-369.

Rao, J., McClements, D. J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability, *Food Hydrocolloids*, 29, pp. 326-334.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, pp. 53-65.

Sahoo, S. K., Parveen, S., Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, pp. 20-31.

Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia*, 6^{ed}. Loures, Lusociência.

Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., Coimbra, J. S. R., Carneiro-da-Cunha, M. G., Vicente, A. A. (2011). Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique, *Journal of Food Engineering*, 102, PP. 130-135.

Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J. T., L'Alloret, F. (2004). Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products, *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, pp. 145-149.

Souto, E. B., Müller, R. H. (2010). Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes. In: Schäfer-Korting, M. (ed.). *Drug Delivery*, Handbook of Experimental Pharmacology. 197. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 115-141.

Souto, E. B., Severino, P., Santana, M. H. A., Pinho, S. C. (2011). Nanopartículas de lípidios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial, *Química Nova*, XY, pp. 1-8.

Tan, C. P., Nakajima, M. (2005). B-Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation, *Food Chemistry*, 92, pp. 661-671.

Taylor, P. (1998). Ostwald ripening in emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 75, pp. 107-163.

Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J., Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish, *Aquaculture*, 1-4, pp. 21-34.

Nanomateriais biodegradáveis para formulações de libertação controlada
Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina

Torchilin, V. P. (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, pp. 1532-1555.

Tran, N. T., Meissner, M. H. (2002). The Epidemiology, Pathophysiology, and Natural History of Chronic Venous Disease, *Seminars in Vascular Surgery*, 15, pp. 5-12.

Vicentini, F. T. M. C., Simi, T. R. M., Del Ciampo, J. O., Wolga, N. O., Pitol, D. L., Iyomasa, M. M., Bentley, M. V. L. B., Fonseca, M. J. V. (2008). Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, pp. 948-957.

Wang, J. J., Sung, K. C., Hu, O. Y. P., Yeh, C. H., Fang, J. Y. (2006). Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs, *Journal of Controlled Release*, 115, pp. 140-149.

Wang, Y., Chen, L. (2011). Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7, pp. 385-402.

Warisnoicharoen, W., Lansley, A. B., Lawrence, M. J. (2000). Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour, *International Journal of Pharmaceutics*, 198, pp. 7-27.

Wissing, S. A., Müller, R. H. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN), *International Journal of Pharmaceutics*, 254, pp. 65-68.

Yilmaz, E., Borchert, H. H. (2006). Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study, *International Journal of Pharmaceutics*, 307, pp. 232-238.

Yuan, J. S., Ansari, M., Samaan, M., Acosta, E. J. (2008b). Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine, *International Journal of Pharmaceutics*, 349, pp. 130-143.

Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., Mao, L. (2008a). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Research International*, 41, pp. 61-68.