

**Nuno Araújo Franco**

**Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas**

**O Estado da Arte**



**Universidade Fernando Pessoa**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2013**



**Nuno Araújo Franco**

**Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas**

**O Estado da Arte**



**Universidade Fernando Pessoa**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2013**

**Nuno Araújo Franco**

**Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas**

**O Estado da Arte**

**De:** \_\_\_\_\_

Projeto de pós graduação/dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do Professor Doutor José Catita.



## **Resumo**

As nanopartículas são uma inovação tecnológica que não passou despercebida na área das ciências farmacêuticas. Desde o primeiro conceito de “bala mágica”, de Paul Ehrlich, mais de 100 anos passaram. E os desenvolvimentos e descobertas feitas na área de tecnologia farmacêutica com as nanopartículas, fazem com que esse conceito ganhe forma. Uma forma que não é visível a olho nu, mas sim numa escala nanométrica.

As nanopartículas, em ciências farmacêuticas podem ser ferramentas inovadoras de análise, diagnóstico e terapêutica. Podem aumentar os limites de sensibilidade e a especificidade de testes bioquímicos e métodos analíticos, permitir a visualização de tecidos e células marcadas com as nanopartículas em técnicas de imagiologia, e permitem o aumento da eficácia, conforto e segurança dos fármacos, como sistemas de veiculação de fármacos.

Este trabalho começa pela definição de nanopartículas e por um breve resumo dos tipos de partículas com interesse farmacêutico, enquadradas nessa definição: complexos de inclusão, lipossomas, nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas e vetores lipídicos nanoestruturados, conjugados fármaco-lípido, nanopartículas magnéticas e quantum dots.

Após a discussão de aspectos técnicos acerca das formulações das nanopartículas, são abordados os vários tipos de aplicações potenciais e atuais, assim como exemplos de formulações no mercado. Mencionam-se as suas vantagens e desvantagens, métodos de produção e caracterização, farmacocinética e toxicidade dos sistemas nanométricos de veiculação de fármacos, e perspectivas futuras para o campo da nanotecnologia aplicada em ciências farmacêuticas.

## **Palavras-Chave:**

Nanopartículas; Nanotecnologia; Ciências Farmacêuticas; Aplicações; Caracterização; Produção; Farmacocinética e Toxicidade

## **Abstract**

Nanoparticles are a technological breakthrough that didn't pass unnoticed in pharmaceutical sciences. Over 100 years have passed since Paul Ehrlich's "magic bullet" first concept. The developments and discoveries, made with nanoparticles in pharmaceutical technology, have given shape to that concept. A shape that can't be seen by naked eye, but on a nanometric scale.

In pharmaceutical science, nanoparticles can be groundbreaking tools for analysis, diagnosis, and therapeutic procedures. They can increase the sensibility and specificity of biochemical tests and analytical methods, allow the visualization of nanoparticle-marked tissues and cells in imaging methods, and increase a drug's efficiency, comfort and safety, as drug delivery systems.

This work starts with the definition of nanoparticles and with a brief description of the kinds of nanoparticles with pharmaceutical interest, fitting within the given definition: inclusion complexes, liposomes, nanoemulsions, nanospheres and nanocapsules, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, lipid-drug conjugate, magnetic nanoparticles and quantum dots.

After discussing the technical aspects of nanoparticle formulations, the various potential and actual applications are shown, as well as some examples of commercialized nanoparticles. Further mentioning nanoparticles' advantages and drawbacks, their production and characterization, pharmacokinetics and toxicity of nanometric drug delivery systems, and future perspectives for the pharmaceutical sciences field applications of nanotechnology.

## **Key words:**

Nanoparticles; Nanotechnology; Pharmaceutical Sciences; Applications; Characterization; Production; Pharmacokinetics and Toxicity.

## Índice Geral

Resumo .....	i
Abstract .....	ii
I. Introdução .....	- 1 -
II. Nanopartículas .....	- 3 -
II.1. Definição .....	- 3 -
II.2. Tipos de nanopartículas com interesse farmacêutico.....	- 4 -
II.2.i. Ciclodextrinas e Complexos de Inclusão .....	- 4 -
II.2.ii. Lipossomas .....	- 5 -
II.2.iii. Nanoemulsões .....	- 7 -
II.2.iv. Nanoesferas e Nanocápsulas .....	- 9 -
II.2.v. Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Vetores Lipídicos Nanoestruturados.....	- 10 -
II.2.vi. Conjugados Fármaco-Lípido .....	- 11 -
II.2.vii. Nanopartículas Magnéticas e Quantum Dots .....	- 12 -
II.3. Tipos de formulações com nanopartículas - composição e aspetos técnicos .....	- 13 -
III. Métodos de produção .....	- 16 -
III.1. Métodos de produção de lipossomas .....	- 16 -
III.2. Métodos de produção de nanoesferas e nanocápsulas .....	- 17 -
III.3. Métodos de produção de nanoemulsões .....	- 19 -
III.4. Métodos de produção de SLNs, NLCs e LDCs .....	- 21 -
III.5. Esterilização .....	- 22 -
III.6. Liofilização .....	- 22 -
IV. Caracterização .....	- 23 -
IV.1. Tamanho e morfologia das partículas .....	- 23 -
IV.2. Potencial zeta .....	- 26 -
IV.3. Estabilidade física .....	- 28 -
IV.4. Estabilidade química .....	- 29 -
V. Aspetos farmacocinéticos e toxicológicos das nanopartículas .....	- 30 -

V.1. Farmacocinética de fármacos veiculados em nanopartículas .....	- 30 -
V.1.i. Via oral .....	- 31 -
V.1.ii. Via ocular .....	- 32 -
V.1.iii. Via nasal e inalatória .....	- 33 -
V.1.iv. Via cutânea e transdérmica .....	- 33 -
V.1.v. Via parentérica .....	- 34 -
V.2. Toxicidade e riscos na utilização de nanopartículas .....	- 34 -
VI. Utilização de nanopartículas em ciências farmacêuticas .....	- 36 -
VI.1. Recurso a nanopartículas como ferramentas de diagnóstico e terapêutica .	- 36 -
VI.1.i. Dermocosmética .....	- 36 -
VI.1.ii. Métodos de diagnóstico e análise .....	- 37 -
VI.1.iii. Veiculação de fármacos .....	- 38 -
VI.1.iv. Formulações já disponíveis no mercado .....	- 38 -
VI.2. Vantagens e Desvantagens .....	- 40 -
VI.2.i. Vantagens .....	- 41 -
VI.2.ii. Desvantagens/Limitações/Problemas .....	- 42 -
VII. Perspetivas Futuras .....	- 43 -
VIII. Conclusão .....	- 45 -
IX. Bibliografia .....	- 46 -

## Índice

### Figuras e Tabelas

Figura 1 – Interação fármaco-ciclodextrina. Retirado de Arrais et al, 2011. ....	- 4 -
Figura 2 – Modelo estrutural, material encapsulado e modificações superficiais de um lipossoma. Retirado de Boyd e Liu, 2013. ....	- 6 -
Figura 3 – Aspeto de uma nanoemulsão (à esquerda) e de uma emulsão convencional (à direita) com gotículas de 35 nm e de 1 µm, respetivamente. Retirado de Azemar <i>et al</i> , 2005. ....	- 8 -
Figura 4 – Estrutura de nanoesfera e sua matriz sólida, revestida com moléculas de PEG. Retirado de Burt e Letchford, 2007. ....	- 9 -
Figura 5 – Estrutura núcleo-invólucro de nanocápsula e polimerossoma. Retirado de Burt e Letchford, 2007. ....	- 10 -
Figura 6 – Estrutura cristalina das SLNs (canto superior esquerdo) e das NLCs. Retirado de Müller e Radtke, 2001. ....	- 10 -
Figura 7 – A) Nanopartícula metálica, B) Nanopartícula magnética e C) Quantum Dot. Retirado de Misra <i>et al</i> , 2012. ....	- 12 -
Figura 8 – Método da evaporação do solvente. Retirado de McClements e Rao, 2011. ....	- 18 -
Figura 9 – Métodos mecânicos de alta energia para produção de nanoemulsões. Retirado de McClements e Rao, 2011. ....	- 20 -
Figura 10 – Imagem obtida por TEM e por SEM. Retirado de Calzolari <i>et al</i> , 2012. ....	- 24 -
Figura 11 - Dupla camada elétrica de uma partícula e plano de fricção entre a mesma e o líquido. Retirado de Flores, 2013. ....	- 27 -
Figura 12 – Nanorobôs desenhados para redução das lesões ateroscleróticas no coração. Retirado de Durairaj e Sivasankar, 2012. ....	- 44 -
Tabela 1 - Tabela de características dos métodos de caracterização de tamanho. Adaptado de Calzolari <i>et al</i> , 2012. ....	- 26 -
Tabela 2 – Exemplos de produtos dermocosméticos comercializados com nanopartículas. Retirado de Hommoss <i>et al</i> , 2009. ....	- 39 -
Tabela 3 – Exemplos de sistemas de veiculação nanoparticulados disponíveis no mercado. Retirado de Reis, 2011. ....	- 40 -
Tabela 4 – Exemplos de complexos de inclusão comercializados. Retirado de Figueiras e Veiga, 2011. ....	- 40 -

## Índice de Símbolos e Abreviaturas

™	-	trademark
®	-	registered trademark
°C	-	graus celsius
MPa	-	megapascal
µm	-	micrómetro
nm	-	nanómetro
ADN	-	Ácido Desoxirribonucleico
AFM	-	Atomic Force Microscopy
ARN	-	Ácido Ribonucleico
BET	-	Brunauer-Emmett-Teller
BHE	-	Barreira Hemato-Encefálica
CDs	-	Ciclodextrinas
CLS	-	Centrifugal Liquid Sedimentation
DLS	-	Dynamic Light Scattering
DSC	-	Differential Scanning Calorimetry
EFSA	-	European Food Safety Authority
EHL	-	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EM	-	Electron Microscopy
ENM	-	Engineered Nanomaterial
EPR	-	Enhanced Permeation and Retention
FDA	-	Food and Drug Administration
FFF	-	Field Flow Fractioning
GRAS	-	Generally Regarded As Safe
HPH	-	High Pressure Homogenization
IUPAC	-	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDC	-	Lipid-Drug Conjugate
NCD	-	Nanorobot Control Design
NLC	-	Nanostructured Lipid Carrier

NSL	-	Nanosphere Lithography
PCA	-	Poli(cianoacrilatos)
PEG	-	Polietilenoglicol
PEO	-	Polifosfato de óxido de etileno
PIT	-	Phase Inversion Temperature
PLA	-	Poli(ácido láctico)
PLG	-	Poli(D,L-glicólico)
PLGA	-	Poli(D,L-ácido láctico-co-glicólico)
PPO	-	Polifosfato de óxido de propileno
PTA	-	Particle Tracking Analysis
QDs	-	Quantum Dots
SAXS	-	Small-Angle X-ray Scattering
SEM	-	Scanning Electron Microscopy
SLN	-	Solid Lipid Nanoparticle
SRE	-	Sistema Retículo Endotelial
TEM	-	Transmission Electron Microscopy
TEWL	-	Transepidermal Water Loss
UV	-	Ultravioleta
XRD	-	X-ray Diffraction



## I. Introdução

A Tecnologia Farmacêutica é uma área de constante desenvolvimento. A busca de novas ferramentas de diagnóstico e de novos sistemas terapêuticos, mais eficazes e com menos problemas associados, levou ao desenvolvimento de métodos nanotecnológicos e ao aparecimento das denominadas Nanopartículas.

As primeiras nanopartículas, materiais de dimensões nanométricas, produzidas em ciências farmacêuticas, foram desenvolvidas para serem utilizadas em vacinas como sistemas de liberação prolongada de antígenos, pela equipa de Peter Paul Speiser em 1969 (Kreuter, 2007).

Estas demonstraram, desde logo, um elevado potencial para: sistemas de veiculação de fármacos, de liberação modificada, sondas que permitam análises mais rápidas e específicas, terapias localizadas para alguns cancros, como a hipertermia magnética, entre outras aplicações (Marszatt, 2011).

Atualmente, encontram-se inúmeras definições diferentes para nanopartículas, sendo que a comunidade científica ainda não apresenta consenso quanto a uma definição concreta. Neste trabalho, o conceito de Nanopartículas aborda os sistemas desenvolvidos com intuito de serem utilizados em ferramentas de diagnóstico e terapêutica, de escala nanométrica (10 - 1000 nm) (Kreuter, 2007). Tendo este conceito em conta, serão tratadas, ao longo do trabalho, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), conjugados fármaco-lípido (LDC), nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, lipossomas, complexos de inclusão, quantum dots (QD) e nanopartículas magnéticas. Cada uma destas nanopartículas, apresenta características físico-químicas que a permite ser aplicada em diversas áreas (indústria alimentar, engenharia química, eletrónica, indústria automóvel, indústrias de tintas, etc.) (Labhasetwar e Panyam, 2003).

A escolha de um sistema com nanopartículas depende da ação pretendida, do tipo de fármaco que se pretende veicular(se for o caso), e da via de administração pretendida (Labhasetwar e Panyam, 2003). Estes fatores podem influenciar a escolha de excipientes adequados para veicular um fármaco, e por sua vez o fármaco vai afetar as características físicas do sistema e a sua estabilidade. Assim, o desenvolvimento de sistemas deste tipo, para veiculação de fármacos, envolve um planeamento extensivo e

muitos estudos de estabilidade e compatibilidade, assim como estudos do perfil farmacocinético (Bae e Lee, 2012).

Alguns métodos de produção surgiram nos anos 1960s, tendo sido aperfeiçoados e estando ainda em uso, outros têm surgido e tomam um papel importante para a possível comercialização deste tipo de sistemas. A caracterização é feita para parâmetros considerados fundamentais, embora alguns investigadores apresentem a necessidade de controlo de mais parâmetros para uma correta caracterização dos sistemas e suas qualidades, assim como para estabelecer critérios de controlo de qualidade dos produtos finais (Mäder e Mehnert, 2001).

O estabelecimento de perfis farmacocinéticos já tem sido efetuado para alguns animais, para vários sistemas e vias de administração, mas esta atividade ainda é uma incógnita para muitos sistemas no ser humano. A questão da toxicidade dos materiais utilizados nestes sistemas já foi estudada para formas farmacêuticas convencionais (M.V. Gadhave *et al.*, 2012). Esses materiais são considerados seguros, mas a interação das partículas com ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas plasmáticas, enzimas, órgãos, tecidos e células, ainda está pouco estudada (European Food Safety Authority, 2009). Alguns sistemas apresentam riscos graves, em certas vias de administração, como por exemplo a parentérica (Kayser *et al.*, 2004).

As nanopartículas são uma inovação em ciências farmacêuticas. Permitem ultrapassar as limitações de sistemas de veiculação clássicos, desenvolver novas estratégias de diagnóstico e tratamento, assim como abrir caminho para uma melhor compreensão de mecanismos biológicos.

## II. Nanopartículas

### II.1. Definição

O termo “Nanopartícula”, aplicado literalmente, compreende uma partícula que, independentemente da sua constituição, forma, tipos de interações e aplicações, apresenta um tamanho nanométrico. Segundo a EFSA (European Food Safety Authority), qualquer nanomaterial, em inglês ENM (engineered nanomaterial), é definido como um material produzido que seja composto por partes estruturais e funcionais discretas, que possuam mais de uma dimensão e cujo tamanho seja inferior a 100 nm (European Food Safety Authority, 2009). No entanto, a comunidade científica e, em específico, em ciências farmacêuticas, o termo é utilizado para descrever partículas que nem sempre se enquadram nesta definição mais estrita. Existe, ainda, uma necessidade de esclarecer a sua definição. Esta confusão não facilita a pesquisa deste tema, pois os termos microcápsulas e microesferas são, geralmente, associados ao tema, embora não se encontrem dentro da definição literal. Basicamente, certas partículas e sistemas coloidais são considerados nanopartículas, embora não o sejam (Kayser *et al.*, 2004), por apresentarem características físico-químicas associadas ao pequeno tamanho das partículas ou por serem desenvolvidos com técnicas que permitam a produção de nanopartículas com tamanhos na ordem dos 100 nm ou inferiores (Mäder e Mehnert, 2001). Este fato leva a que as nanopartículas sejam definidas dependendo do ramo em que estão a ser aplicadas, embora a União Europeia pretenda implementar no futuro próximo uma legislação europeia para os nanomateriais, em que serão definidos como “qualquer material natural, acidental ou produzido que contenha partículas, agregadas ou livres, e nas quais 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho em número, numa ou mais dimensões externas, se encontram no intervalo de tamanhos entre os 1 e os 100 nm. Em casos específicos e onde são exigidas, por preocupações pelo ambiente, saúde, segurança e competitividade, o limite de 50% na distribuição de tamanho pode ser substituído por um limite entre 1 e 50% (...)”. A revisão desta definição será feita em 2014 (European Commission, 2012).

Enquanto que para aplicações não-farmacêuticas, sejam partículas de tamanho nanométrico, para as ciências farmacêuticas são partículas ou materiais de tamanho coloidal (de 10 a 1000 nm) que sejam, por si só, biologicamente ativas, ou que tenham a capacidade de veicular fármacos (Kreuter, 2007).

## II.2. Tipos de Nanopartículas com interesse farmacêutico

Existe um vasto número de nanopartículas, com as mais diversas aplicações, em várias áreas. No setor farmacêutico, como mencionado anteriormente, as nanopartículas não se encontram categorizadas nem apresentam uma definição concreta. No entanto, trataremos as nanopartículas como qualquer material ou partícula coloidal, farmacologicamente ativo ou inerte com a capacidade de veicular agentes terapêuticos, que se encontre no intervalo nanométrico de 10 a 1000 nm (1  $\mu$ m). Nesta definição estão enquadrados os complexos de inclusão, os lipossomas, as nanoemulsões, as nanocápsulas e nanoesferas, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), os conjugados fármaco-lípido (LDC), as nanopartículas magnéticas, e os quantum dots (QD).

### II.2.i. Ciclodextrinas e Complexos de Inclusão

As ciclodextrinas (CDs), cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger, são oligossacarídeos macrocíclicos, constituídos por unidades de  $\alpha$ -D-glucose ligadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e obtidas a partir da degradação enzimática do amido (Arrais *et al*, 2011). A sua estrutura em forma de barril, com grupos funcionais hidroxilo (primários) na abertura estreita, e grupos hidroxilo (secundários) na abertura mais larga, faz com que a ciclodextrina apresente caráter anfifílico. Uma elevada afinidade para a água e uma cavidade interna hidrófoba. Esta organização estrutural da macromolécula permite que a sua cavidade faça um envolvimento total ou parcial de outras moléculas, ou partes de moléculas, que apresentem características hidrófobas também. Este envolvimento, que resulta de interações hidrófobas e de van der Waals, de moléculas denominadas “hóspedes”, origina os chamados complexos de inclusão (Hennink *et al*, 2009).

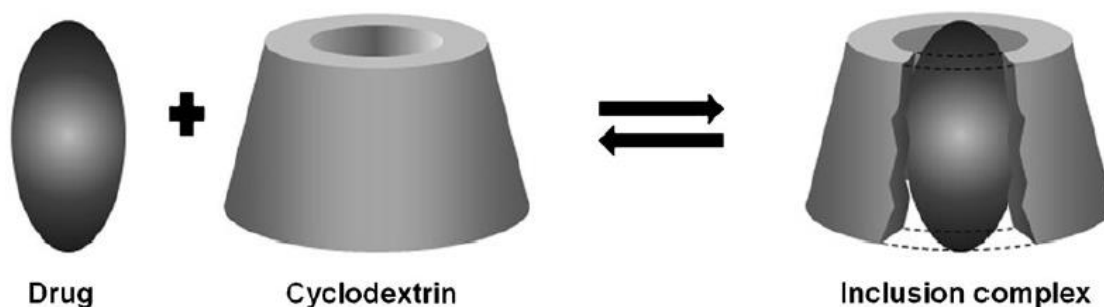


Figura 1 – Interação fármaco-ciclodextrina. Retirado de Arrais *et al*, 2011.

Existem 3 tipos de ciclodextrinas naturais: as  $\alpha$ -CDs, com 6 unidades de  $\alpha$ -D-Glucose, as  $\beta$ -CDs com 7, e as  $\gamma$ -CDs com 8. Não é possível a obtenção de CDs com menos de 6 unidades de açúcar, pois existe um elevado impedimento estérico, e as homólogas com mais de 8 unidades de açúcar, são difíceis de purificar (Arrais *et al*, 2011). Existe alguma toxicidade associada ao uso de CDs que se evidencia dependendo da via de administração e subtipo de ciclodextrina. Daí que se tenham desenvolvido derivados das CDs convencionais, mais hidrófilos ou mais lipófilos, de maneira a podermos evitar essa toxicidade e melhorar as características de solubilidade e cedência de fármaco (Couvreur *et al*, 2010).

A capacidade de inclusão das ciclodextrinas permite, com recurso às mesmas, a modulação da solubilidade e biodisponibilidade de fármacos, reduzir a sua volatilidade e reatividade química, mascarar sabores e odores desagradáveis, estabilizar compostos sensíveis à degradação pela temperatura, hidrólise, oxidação, e prevenir a interação entre fármacos ou entre o fármaco e outras substâncias (Jansook *et al*, 2010). Estas capacidades das ciclodextrinas, associadas ao seu baixo custo e disponibilidade, fazem com que sejam frequentemente aplicadas em ciências farmacêuticas, ciências analíticas, processos de separação, indústrias têxteis, indústrias alimentares e cosméticas (Hennink *et al*, 2009).

Para além de ser capaz de formar complexos de inclusão que podem ser veiculados em sistemas hidrófilos ou sistemas com água, esta capacidade de inclusão das ciclodextrinas pode ser aproveitada para produzir nanoesponjas para limpeza de solventes ou impurezas em meios aquosos (Hennink *et al*, 2009), desenvolver redes poliméricas para nanogéis (Alvarez-Lorenzo *et al*, 2012), assim como nanoestruturas que condensem ácidos nucleicos e que permitam veicular genes (Benito *et al*, 2011).

## **II.2.ii. Lipossomas**

Lipossomas são vesículas coloidais esféricas cujo volume aquoso é envolvido por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos naturais ou polímeros sintéticos, com estatuto GRAS (generally regarded as safe) (Jose *et al*, 2012). Na sua produção, os fosfolípidos passam por uma auto-montagem, em meio aquoso, formando a bicamada da vesícula (Franzen e Østergaard, 2012).

O seu interior de natureza hidrófila e a membrana lipófila, permitem a encapsulação de vários materiais como fármacos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros (deMello e van Swaay, 2013). As bicamadas assemelham-se às membranas biológicas e, por isso, os lipossomas têm sido utilizados como modelos para o estudo de interações com membranas celulares (Car *et al*, 2012). Torna-se cada vez mais evidente a utilidade da sua aplicação em desenvolvimento de biosensores e técnicas de diagnóstico, formação de células artificiais para estudo de sistemas celulares, e para a veiculação de fármacos (deMello e van Swaay, 2013). Esta última aplicação é muito investigada pois os lipossomas são biodegradáveis, biologicamente inertes, apresentando fraca imunogenicidade e limitada toxicidade (Goodger *et al*, 2012).

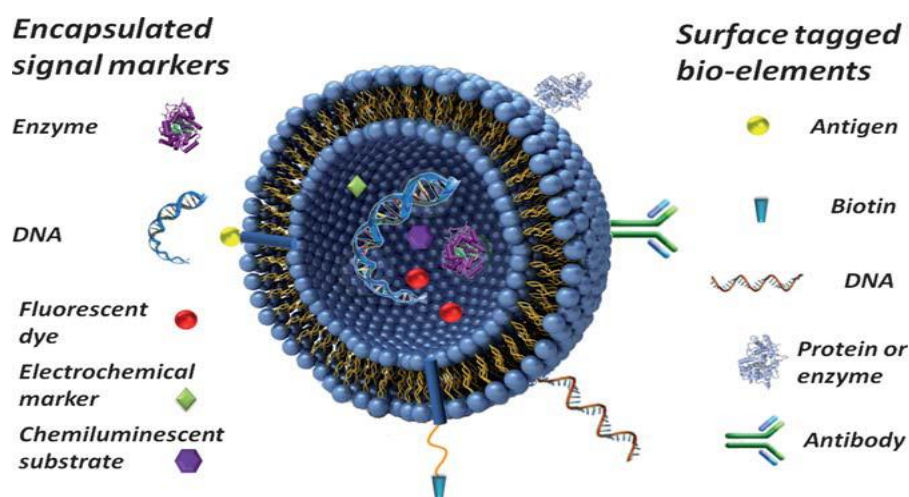


Figura 2 – Modelo estrutural, material encapsulado e modificações superficiais de um lipossoma. Retirado de Boyd e Liu, 2013.

A sua classificação é deveras complexa, pois pode ser baseada no tamanho, em vesículas pequenas, médias, grandes ou gigantes, e lamellaridade, ou número de bicamadas, em vesículas unilamelares ou multilamelares (Alves *et al*, 1996). Podem ser classificados quanto à sua constituição, em Lipossomas convencionais (constituídos somente por fosfolípidos), Niossomas (vesículas pequenas e unilamelares feitas de surfactantes não-iônicos), Archaeossomas (com lípidos de membranas celulares de archaeobactérias), Etossomas (com etanol na sua constituição), Polimerossomas (de blocos copolímeros anfifílicos) e os ultradeformáveis Transferossomas (de fosfatidilcolina e colato). Podem ser ainda classificados pela sua função em Virossomas (com hemaglutinina do vírus *influenza* que vetoriza o lipossoma para os macrófagos), Imunolipossomas (com anticorpos monoclonais para vetorização), e os Lipossomas

Stealth (revestidos com cadeias de polietilenoglicol, PEG, para um maior tempo de circulação) (Crommelin e Kersten, 2003).

Os lipossomas servem para melhorar as propriedades farmacocinéticas de um fármaco, servindo como sistema de liberação modificada ou de vetorização, ao mesmo tempo que reduzem a possibilidade de o fármaco se degradar ou desenvolver algum efeito indesejado (Jose *et al*, 2012). Permitem a encapsulação de fármacos hidrófilos, no seu interior, e fármacos lipófilos na membrana lipossomal, e os grupos funcionais à superfície podem ser alterados para personalizar as propriedades da membrana (Byrne *et al*, 2012). A sua diversidade de aplicações desencadeou o desenvolvimento de métodos robustos de produção. Os métodos de produção mais utilizados são a extrusão através de membranas porosas, eletroformação, liofilização, hidratação de filme lipídico, emulsões triplas (A/O/A) ou “budding”. Estes métodos podem utilizar volumes de fluídos na ordem dos mililitros aos microlitros (deMello e van Swaay, 2013).

### **II.2.iii. Nanoemulsões**

As nanoemulsões, miniemulsões, ou emulsões dispersamente finas, são emulsões submicrométricas, resultantes da mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis entre si, com uma ou mais fases dispersas ou internas, que se apresentam em gotículas, e uma fase contínua ou externa. As nanoemulsões diferem das emulsões convencionais pelo seu raio médio de gotícula ser muito inferior, compreendido entre os 10 e os 500 nm, que por sua vez irá dotar as nanoemulsões de propriedades, comportamentos e estabilidade diferentes (McClements e Rao, 2011). A maior particularidade das nanoemulsões é a elevada estabilidade das gotículas pequenas, contra fenómenos de coalescência, “creaming” e separação de fases, face a alguma diluição e mudanças de temperatura (Anton *et al*, 2008). Apresentam-se, geralmente, como líquidos homogêneos translúcidos ou pouco turvos, visto que as gotículas apresentam um tamanho inferior ao comprimento de onda da luz visível (McClements e Rao, 2011).

Existe, ainda, alguma confusão acerca das diferenças entre micro e nanoemulsões, embora sejam muito diferentes, em termos de estabilidade e comportamento. As microemulsões, com gotículas de tamanho superior, resultam de uma dispersão consequente de uma falta de equilíbrio energético e não das diferentes solubilidades dos líquidos, ou seja, apresentam a tendência para serem microemulsões, um sistema termodinamicamente estável. No caso das nanoemulsões, tal não acontece. As

nanoemulsões, tal como as emulsões convencionais, são formadas pelas diferenças de solubilidade entre as fases que as constituem, apresentando uma tendência espontânea para coalescência e separação de fases. Não se encontram em equilíbrio termodinâmico, mas compensam esse fato com as gotículas muito pequenas e elevadas quantidades de surfactantes, que conferem às nanoemulsões uma elevada estabilidade cinética face aos fenómenos que afetam as emulsões convencionais (González *et al*, 2008).

As nanoemulsões são utilizadas em várias indústrias, sendo que na farmacêutica servem de sistemas de veiculação de fármacos que apresentam incompatibilidades com a fase externa, como, por exemplo, problemas de solubilidade ou de estabilidade química (Almeida *et al*, 2011). São também utilizados como sistemas que servem de ponto de partida para a preparação de nanopartículas. Daí que o conhecimento da sua formação, comportamento, propriedades e estabilidade, são uma ferramenta essencial para o desenho dessas mesmas partículas, e a ligação entre os processos de formulação de nanoemulsões e a morfologia das nanopartículas resultantes não é óbvia nem sistemática. As nanopartículas que podem ser obtidas a partir de nanoemulsões são as nanoesferas e nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas e vetores lipídicos nanoestruturados (Anton *et al*, 2008).



Figura 3 – Aspeto de uma nanoemulsão (à esquerda) e de uma emulsão convencional (à direita) com gotículas de 35 nm e de 1  $\mu$ m, respetivamente. Retirado de Azemar *et al*, 2005.

#### II.2.iv. Nanoesferas e Nanocápsulas

As nanoesferas e nanocápsulas são sistemas coloidais poliméricos, preparados com ou sem surfactantes. As nanoesferas apresentam uma matriz sólida, de tamanho compreendido entre os 100 e 200 nm, resultante da agregação de monómeros poliméricos, e onde o fármaco, no caso da indústria farmacêutica, se encontra dissolvido, aprisionado, ligado quimicamente ou adsorvido aos seus constituintes. As nanocápsulas, por sua vez, apresentam tamanhos entre os 100 e os 300 nm, e os monómeros poliméricos encontram-se sob a forma de uma membrana ou invólucro, que envolve um núcleo de matriz líquida. As nanocápsulas são, portanto, sistemas de veiculação do tipo núcleo-invólucro, nos quais o fármaco se encontra no núcleo ou cavidade, ou na membrana ou no revestimento polimérico, dependendo dos constituintes da nanocápsula e afinidade do fármaco (Burt e Letchford, 2007). A sua produção pode envolver a utilização de solventes ou nanoemulsões, métodos de polimerização ou gelificação, nanoprecipitação, e tecnologias de fluídos supercríticos, que serão abordados posteriormente (Chen e Mohanraj, 2006).

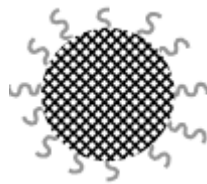


Figura 4 – Estrutura de nanoesfera e sua matriz sólida, revestida com moléculas de PEG. Retirado de Burt e Letchford, 2007.

As nanoesferas modificadas com grupos funcionais negativos, carboxilatos ou sulfatos, à sua superfície são repelidas por substratos como o vidro e a mica. Assim, podem ser utilizadas para a realização de litografia de nanoesferas, NSL, do inglês Nanosphere Lithography. Este procedimento permite a nanofabricação relativamente barata de nanopartículas metálicas de tamanho e forma controlada (Duyne e Haynes, 2001).

As nanocápsulas de núcleo oleoso podem ser denominadas de nanocápsulas lipídicas, geralmente preparadas com recurso a surfactantes não-iônicos (Benoit *et al*, 2009). Os polimerossomas podem ser classificados como nanocápsulas de núcleo aquoso, pois são vesículas coloidais semelhantes aos lipossomas, cuja membrana é constituída por polímeros anfifílicos de origem natural ou sintética (Crommelin e Kersten, 2003).

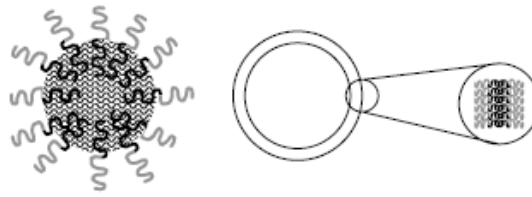


Figura 5 – Estrutura núcleo-invólucro de nanocápsula e polimerossoma. Retirado de Burt e Letchford, 2007.

## II.2.v. Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Vetores Lipídicos Nanoestruturados

Tanto as Nanopartículas Lipídicas Sólidas, ou SLN (do inglês, Solid Lipid Nanoparticle), como os Vetores Lipídicos Nanoestruturados, ou NLC (Nanostructured Lipid Carriers), são sistemas de veiculação baseados em matrizes lipídicas e sólidas à temperatura corporal, de tamanhos inferiores a 500 nm (Mäder e Mehnert, 2001). As SLNs são partículas compostas de lípidos sólidos, triglicerídeos altamente purificados, misturas complexas de glicerídeos ou ceras, estabilizadas por diversos surfactantes (Kayser *et al.*, 2004). Apresentam boa estabilidade física, são bem toleradas, apresentando uma proteção elevada do fármaco e uma liberação controlada do mesmo (Mäder e Mehnert, 2001). No entanto, apresentam uma baixa eficácia de encapsulação, e alguma perda de fármaco após a sua produção. As NLCs foram produzidas com o intuito de ultrapassar essas limitações, sendo a sua matriz sólida uma mistura de lípidos sólidos com lípidos líquidos, que apresenta uma nanoestrutura com capacidade de carga superior e que previne a perda de fármaco (Car *et al.*, 2012). Existem, no entanto, limitações naturais a estes sistemas. Estes só são capazes de apresentar uma boa eficácia de encapsulação para compostos ou fármacos lipófilos, solúveis na matriz lipídica das nanopartículas (Maincent *et al.*, 2008).

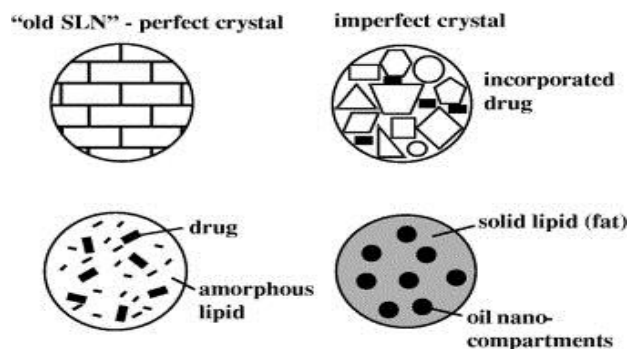


Figura 6 – Estrutura cristalina das SLNs (canto superior esquerdo) e das NLCs. Retirado de Müller e Radtke, 2001.

Estas partículas apresentam métodos de produção semelhantes, a partir de emulsões, recorrendo ou não a solventes orgânicos e a surfactantes, dependendo do fármaco a encapsular, ponto de fusão e solubilidade dos constituintes lipídicos (Mäder e Mehnert, 2001). Sendo os métodos mais divulgados a homogeneização a alta pressão, a quente ou a frio, a emulsificação-evaporação do solvente, a substituição do solvente, a emulsificação-difusão, a inversão de fases, o recurso a fluídos supercríticos, e a filtração em membrana (Ferreira D.C. et al, 2011).

As SLN e NLC podem ser incorporadas em formulações dermocosméticas, com a função de hidratantes por oclusão e de filtros solares físicos (Mäder e Mehnert, 2001). O aumento da hidratação, relativamente a formulações sem estas nanopartículas lipídicas, é mais evidente com o aumento do tempo do tratamento e é devido à oclusão causada pela formação de um filme de nanopartículas na superfície cutânea. As nanopartículas agem como filtros solares físicos por si sós, embora possam encapsular filtros solares químicos para que haja um efeito sinérgico, pois refletem e difratam a radiação solar. A incorporação destas partículas pode diminuir as quantidades necessárias de filtros solares físicos nas preparações até 50%, para uma proteção semelhante (Müller e Wissing, 2003).

#### **II.2.vi. Conjugados Fármaco-Lípido**

Os conjugados fármaco-lípido (LDCs do inglês lipid-drug conjugate), surgiram numa tentativa de melhorar a biodisponibilidade oral de moléculas hidrófilas. São partículas lipídicas sólidas resultantes da ligação entre o fármaco e um lípido (Maincent, Muchow e Müller, 2008). Essa ligação é feita, geralmente, de maneira covalente ou por formação de sal de ácido gordo (ligação éster), no caso de fármacos com grupos funcionais protonáveis (Goodger, Rajendran e Udayar, 2012). Os LDCs são pouco hidrossolúveis, com um intervalo de fusão entre os 50 e os 100°C, de peso molecular baixo, relativamente às outras nanopartículas lipídicas, e podem ser constituídos por nanopartículas do conjugado, por si só, ou do conjugado misturado com outra matriz lipídica sólida (Maincent *et al*, 2008).

São produzidos através do mesmo método de produção das SLN e NLC, com ligeiras alterações. As nanopartículas lipídicas apresentam uma encapsulação verdadeiramente eficaz para moléculas lipófilas, e, mesmo solubilizando algum composto hidrófilo, a passagem deste pela parede do trato gastrointestinal permanece um problema. Advém,

destes fatos, o recurso a um diferente tipo de partícula, como os LDCs, para encapsular e proteger o fármaco hidrófilo, modulando as características de solubilidade, aumentando a lipofilia, e potenciando a sua biodisponibilidade por via oral, através dos lípidos presentes na sua matriz que aumentam a permeação através da barreira intestinal (Maincent *et al*, 2008).

## II.2.vii. Nanopartículas Magnéticas e Quantum Dots

As nanopartículas magnéticas podem ser de três tipos: metais puros (ouro, platina, paládio, cobalto, níquel, manganésio e ferro), ligas metálicas (associações de metais) ou óxidos de metais, dependendo da sua constituição e das propriedades magnéticas desses metais. No entanto, só as nanopartículas de óxido de ferro (magnetite) é que estão aprovadas para uso clínico pela FDA (Food and Drug Administration), pela sua fácil síntese química e modificação, biocompatibilidade dentro de concentrações fisiológicas, e estabilidade química em condições fisiológicas (Car *et al*, 2012). Podem ser utilizadas para aumentar a sensibilidade e limites de detecção de métodos de análise biospecíficos, para marcação de tecidos, vetorização de fármacos e tratamentos de hipertermia localizada (Kataoka *et al*, 2003).

Os Quantum Dots, nanoinvólucros metálicos ou QDs, são compostos por agregados de centenas a alguns milhares de átomos, com diâmetros de partícula entre os 2 e os 10 nm (Bagalkot *et al*, 2012). Os seus núcleos cristalinos consistem em metais nobres, semicondutores e metais de transição magnéticos, cujos revestimentos biocompatíveis tendem a ser efetuados com moléculas hidrófilas e grupos funcionais, de maneira a que apresentem a bioatividade desejada. Apresentam grande potencial para vetorização de fármacos, pois podem ser conjugados com substâncias ativas, ligandos e marcadores biológicos, e no campo da imagiologia clínica, por apresentarem espectros de fluorescência únicos (Hardman, 2006).

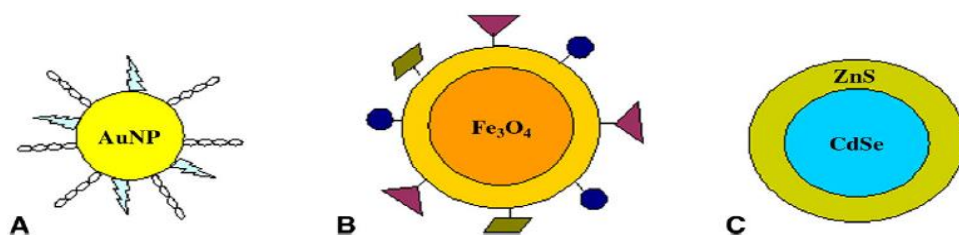


Figura 7 - A) Nanopartícula metálica, B) Nanopartícula magnética e C) Quantum Dot. Retirado de Misra *et al*, 2012.

### **II.3. Tipos de formulações com nanopartículas – composição e aspetos técnicos**

A exploração do potencial terapêutico de fármacos depende da sua solubilidade, tipo de ligações ou estabilidade, quando incorporados, associados ou adsorvidos em formulações biocompatíveis e biodegradáveis, com ou sem vetorização associada. Os sistemas de veiculação, e os excipientes apropriados para uma dada molécula, nem sempre são evidentes. Para cada forma farmacêutica, as nanopartículas devem ser otimizadas consoante os objetivos finais da forma farmacêutica e propriedades desejadas para esse fim. Embora os sistemas e seus excipientes, permitam alterar propriedades físico-químicas inerentes a uma substância, há que ter em conta que essa substância também afeta o comportamento do sistema que a veicula. Podemos aplicar modelos teóricos e analíticos, para estimar e prever os diversos parâmetros que afetam a nossa formulação e o seu comportamento *in vivo*, permitindo alguma otimização do sistema antes da sua produção (Allen *et al*, 2012).

A formulação de uma nanopartícula para veiculação de fármacos depende da via escolhida para a administração, de características químicas e físicas do fármaco e excipientes, assim como dos efeitos pretendidos. Se a nanopartícula for formulada para administração parenteral, por exemplo, deverá: apresentar estabilidade no meio fisiológico, protegendo o fármaco de enzimas e degradação; ser muito mais biocompatível, reduzindo quantidades de surfactantes; apresentar um tamanho de partícula/gotícula que lhe permita passar pelos vasos sanguíneos sem causar bloqueios da corrente (embolia); assim como apresentar os demais requisitos para esta via de administração. Cada via de administração apresenta os seus requisitos diferentes, que limitam os sistemas e excipientes a utilizar (Kayser *et al*, 2004). Isto será discutido posteriormente.

Os excipientes utilizados para a formulação de nanopartículas são, na sua maioria, utilizados em formulações farmacêuticas ditas clássicas ou convencionais. Podem ser agrupados em grupos de polímeros, naturais, semi-sintéticos ou sintéticos, lípidos naturais ou modificados, fosfolípidos naturais ou modificados, agentes tensioativos ou surfactantes (Jose *et al*, 2012), e oligossacarídeos (Arrais *et al*, 2011). Um requisito obrigatório a todos os excipientes é o de apresentarem estatuto GRAS, dado pela FDA (Jose *et al*, 2012). Os excipientes devem ser biodegradáveis e biocompatíveis, pelo que a escolha de excipientes de origem natural ou biológica são preferidos, e devem permitir

a possibilidade de vetorização, ter um metabolismo *in vivo* conhecido, apresentarem elevada capacidade de carga para o fármaco, boa estabilidade, custos razoáveis, e facilitarem a produção em escala industrial (Mäder e Mehnert, 2001).

Ciclodextrinas são exemplos de oligossacarídeos que servem para encapsular fármacos, mascarando e modificando propriedades organolépticas e físico-químicas dos mesmos. Este tipo de excipientes permite a incorporação das nanopartículas, que neste caso são os complexos de inclusão, noutras formas farmacêuticas convencionais (Hennink *et al*, 2009).

Polímeros hidrófilos podem ser utilizados para gelificação iônica de gotículas em nanoemulsões, formando nanoesferas, ou como compostos que polimerizam nas interfaces das gotículas, formando nanocápsulas. Exemplos desses compostos são: o quitosano, gelatina, alginato de sódio, e os polifosfatos de óxido de etileno e óxido de propileno (PEO-PPO), como polímeros gelificantes iônicos; e como polímeros que polimerizam em meio aquoso temos os poli(alquilcianoacrilatos). Os polímeros préformados biodegradáveis como o PLA [poli(ácido láctico)], PLG [poli(D,L-glicólico)], PLGA [poli(D,L-lactida-co-glicólico)] e PCA [poli(cianoacrilatos)] podem ser dispersos de maneira a formar nanopartículas (Chen e Mohanraj, 2006). O PEG e seus derivados, podem ser utilizados nas formulações como componentes da matriz ou como revestimento. Prolongam o tempo de semi-vida na corrente sanguínea por diminuição da opsonização das partículas, resultado do impedimento estérico causado pelas cadeias hidrófilas, e redução da eliminação por ação do sistema mononuclear fagocítico, também conhecido por sistema retículo endotelial (SRE) (Kataoka *et al*, 2003).

No caso dos fosfolípidos, como a fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina, e demais derivados, pela sua ação como surfactantes anfifílicos, podem permitir a produção de lipossomas, serem utilizados na produção de SLNs e NLCs, ou em nanoemulsões, como agentes estabilizantes. Encontram-se nestas formulações para reduzir a tensão superficial e interfacial das partículas ou gotículas, respectivamente, estabilizando os produtos finais. Outros surfactantes como a Lecitina de soja (Lipoid® S), ou lecitina de ovo (Lipoid® E), Poloxamer, Polisorbatos, e o Colato de sódio, são utilizados para esses fins (Mäder e Mehnert, 2001).

Os lípidos utilizados nas formulações de nanoemulsões, SLNs, NLCs, e LDCs, podem ser sólidos ou líquidos, à temperatura ambiente, e são divididos em vários tipos. Temos o colesterol e seus derivados, que permitem diminuir a fluidez e dar rigidez a certas partículas, assim como aumentar a ligação a proteínas plasmáticas. Os triglicerídeos (Dynasan®) e suas misturas (Witepsol®), coco-glicerídeos (Softisan®), ácidos gordos como o ácido palmítico, palmítoleico, esteárico, oleico, linoleico e araquidônico, e seus derivados como o monoestearato de glicerilo (Imwitor®), behenato de glicerilo (Compritol®), Palmitoestearato de glicerilo (Precirol®), palmitato de cetilo (Rhodes e Vemuri, 1995). A escolha do lípido ou mistura de lípidos, depende de vários fatores. Mas a formulação escolhida, o custo, a facilidade de manipulação e a qualidade do produto final, são fatores decisivos para essa escolha (Allen *et al*, 2012). A incorporação de colesterol nas membranas dos lipossomas, por exemplo, torna-os menos flexíveis e permeáveis, logo menos sujeitos à quebra da membrana por processos físicos de produção ou processamento mecânico. Este é um exemplo de como temos de adaptar os nossos métodos de produção e processamento, consoante os constituintes da nossa formulação, objetivos e propriedades da mesma (Crommelin e Kersten, 2003).

### **III. Métodos de produção**

Existem vários métodos de produção para cada uma das nanopartículas mencionadas. Tendo em conta que as CDs, QDs e nanopartículas magnéticas são geralmente obtidas por síntese química, por adição de quantidades apropriadas de reagentes e matérias-primas, não serão abordados os seus métodos de produção.

#### **III.1. Métodos de produção de lipossomas**

A maior parte das preparações de lipossomas, unilamelares ou multilamelares, pode ser efetuada pelo método de hidratação de filme lipídico. Os lípidos anfifílicos são dissolvidos num solvente, ou mistura de solventes orgânicos, que é evaporado com auxílio de pressão reduzida, corrente de azoto, ou por secagem em aerossol, formando um filme lipídico. A adição de água ou de uma solução tampão, com agitação magnética, permite uma dispersão e organização espontânea dos lípidos, em vesículas multilamelares, lipossomas. O processamento mecânico, eletrostático ou químico, destas vesículas multilamelares, permite a obtenção de lipossomas unilamelares de dimensões mais reduzidas (Matos e Moutinho, 2011). Exemplos desses processamentos são a extrusão por membranas de malha pequena, passagem por homogenizador a alta pressão, a sonicação e o recurso a ciclos de congelamento e arrefecimento, que quebram e reformam as bicamadas fosfolipídicas (Burgess et al, 2012).

O método de eletroformação e hidratação, é um método semelhante ao da hidratação de filme lipídico, mas recorre a um elétrodo planar onde é formado o filme lipídico. Após a evaporação de solvente e adição de solução aquosa, é aplicado um campo elétrico através do filme e solução aquosa que o envolve. Os lípidos sofrem “peeling off” da superfície do elétrodo, por camadas que vão formar as vesículas multilamelares gigantes e polidispersas. O aperfeiçoamento do método pode permitir a obtenção de vesículas unilamelares, mas a técnica pode afetar a função de proteínas com carga a serem encapsuladas (deMello e van Swaay, 2013).

A produção em escala industrial é possível, com adaptações dos métodos de produção descritos, e em especial a extrusão e homogenização a alta pressão (Matos e Moutinho, 2011). Os longos períodos de evaporação do solvente limitam a produção contínua e a formação das vesículas não impede a perda de fármaco para o meio de dispersão (de Mello e van Swaay, 2013). Mas pelo seu baixo custo e facilidade de

produção, pode ser comercializado pela indústria farmacêutica, mas obrigatoriamente sob a forma de medicamento de preparação extemporânea, ou seja, liofilizados para garantir a estabilidade dos lipossomas e fármacos (Boyd e Liu, 2013).

### **III.2. Métodos de produção de nanoesferas e nanocápsulas**

As nanoesferas podem ser produzidas por vários métodos, dependendo dos polímeros a utilizar. Se requerem a polimerização ou gelificação, ou se só requerem condensação. A polimerização de emulsões, ou métodos de condensação de polímeros pré-formados: o método de emulsificação-evaporação do solvente, emulsificação-difusão do solvente, e técnicas de “salting-out”. O método mais comum, no entanto, é o de deslocamento do solvente, também denominado de deposição interfacial ou nanoprecipitação. O polímero é dissolvido num solvente orgânico e miscível em água, que é adicionado a uma fase aquosa, com ou sem surfactante. O solvente orgânico difunde, imediatamente, e origina as nanoesferas por precipitação do polímero (Burt e Letchford, 2007).

Na polimerização, o fármaco é incorporado por dissolução no meio ou por adsorção às nanopartículas, após a sua formação (Chen e Mohanraj, 2006).

A gelificação envolve polímeros hidrófilos biodegradáveis como o quitosano, gelatina ou alginato de sódio. Envolve a mistura de duas fases aquosas. Uma com o polímero ou blocos de copolímeros, como o óxido de etileno ou óxido de propileno (PEO-PPO), e fármaco, e a outra com um gelificante, como o polianião de tripolifosfato de sódio para o quitosano. A gelificação pode ser devida a fenômenos de coacervação ou devido a interações iônicas. Pode ser realizada em emulsões O/A com fase orgânica (solvente para o fármaco e óleo) para obtenção de nanocápsulas (Elaissari *et al*, 2010).

O método de emulsificação-evaporação do solvente envolve a dissolução do polímero num solvente orgânico (diclorometano, clorofórmio ou acetato de etilo), que já contém o fármaco hidrófobo. A mistura é então emulsionada com uma solução aquosa com surfactantes, formando uma emulsão O/A. A evaporação do solvente, após emulsificação, origina as nanopartículas, de tamanho dependente de fatores como: o tipo e concentração de surfactante, velocidade de agitação e concentração de polímero (Chen e Mohanraj, 2006). O método de difusão do solvente é uma versão modificada do método de evaporação de solvente. Um solvente, miscível com a água, é utilizado como fase oleosa. A difusão espontânea do solvente, aquando da adição da solução aquosa,

leva a uma turbulência interfacial que leva à formação de pequenas partículas (Ferreira *et al.*, 2011). Com o aumento da quantidade de solvente miscível com a água, há uma diminuição do tamanho de partícula. Estes dois métodos podem ser aplicados com fármacos lipófilos e hidrófilos, sendo que, no caso dos últimos, é necessária a dissolução do fármaco numa fase interna aquosa de uma emulsão múltipla A/O/A.

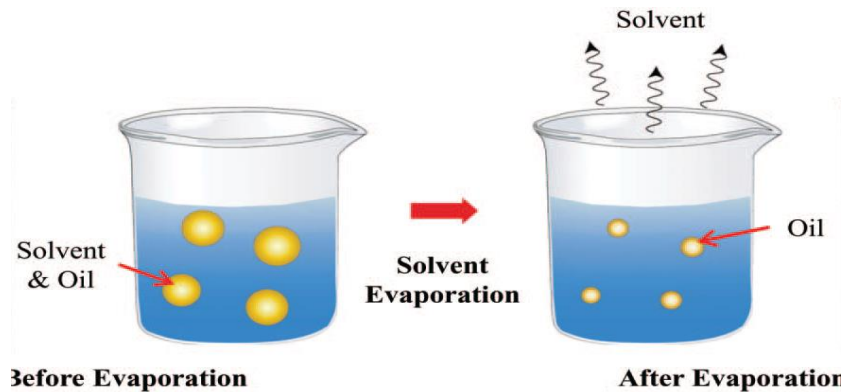


Figura 8 - Método da evaporação do solvente. Retirado de McClements e Rao, 2011.

As nanocápsulas são formadas por dispersão ou deposição interfacial de polímeros pré-formados. A dispersão de polímeros pré-formados envolve a utilização de polímeros de PLA, PLG, PLGA ou PCA (Chen e Mohanraj, 2006). Na deposição interfacial um fármaco solubilizado num solvente orgânico miscível em água, com ou sem surfactante, forma uma mistura à qual é adicionado um óleo imiscível na mesma, mas miscível com o solvente. Esta solução é dispersa numa fase aquosa com surfactante hidrófilo (poloxamer, por exemplo). Após agitação, o solvente difunde para a fase aquosa e o polímero agrega na interface das gotículas de óleo (Burt e Letchford, 2007).

As nanocápsulas podem ser formadas por modificação do método de deslocamento do solvente, no qual um óleo é adicionado à fase orgânica ou mistura de solventes orgânicos (Burt e Letchford, 2007).

Os polimerossomas são formados como os lipossomas, através de uma técnica de rehidratação de filme polimérico. O copolímero é dissolvido num solvente orgânico volátil, que é evaporado formando o filme polimérico. Esse filme é hidratado com a fase aquosa e com agitação vigorosa, formando os polimerossomas. A obtenção de polimerossomas monodispersos é feita por extrusão ou sonicação (Burt e Letchford, 2007).

### III.3. Métodos de produção de nanoemulsões

As nanoemulsões são obtidas por métodos de produção que podem ser de alta energia ou de baixa energia. Esta energia, sob a forma de trabalho ( $W$ ), tende a contrariar a tensão superficial ( $\gamma$ ) dos líquidos, e reduzir a sua área de superfície ( $\Delta A$ ), segundo a fórmula  $W = \gamma \Delta A$ . Visto que as nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, a energia cedida não é suficiente para manter a separação de fases e a estabilidade das mesmas. A energia livre de superfície ( $\Delta G_f$ ) das gotículas, cuja fórmula é  $\Delta G_f = W - T(\Delta S_f)$ , tem de ser inferior ao trabalho ( $W$ ) dispendido para as formar, para que as nanoemulsões formadas sejam estáveis. Para isto, recorremos a agentes tensioativos, também denominados como detergentes ou surfactantes. São moléculas anfifílicas que reduzem a tensão superficial ( $\gamma$ ) das gotículas, de maneira a diminuir a energia livre de superfície ( $\Delta G$ ). Os surfactantes formam barreiras na interface das gotículas e impedem a sua interação com outras gotículas, o fenómeno de coalescência, assim como a rutura das gotículas (Almeida et al, 2011).

Nas nanoemulsões, a floculação não ocorre naturalmente, pois existe uma estabilização estérica devida ao tamanho submicrométrico das gotículas, uma repulsão devida aos estabilizadores das gotículas e à redução de entropia conformacional, causada pelo stress de ligação das cadeias de estabilizadores que aumenta quando a distância entre as gotículas se aproxima do zero. Por isto se diz que as nanoemulsões são cineticamente estáveis (Benoit *et al*, 2008).

Uma fonte de instabilidade provém da solubilidade da fase dispersa na fase contínua ou da quantidade insuficiente de surfactante para revestir as gotículas formadas. Se tal acontecer, ocorre o envelhecimento de Ostwald, uma migração difusa de moléculas de fase dispersa que, por serem solúveis na fase contínua, tendem a se movimentar das gotículas pequenas para as de tamanho superior, segundo as pressões de Laplace, aumentando ainda mais o seu tamanho, a sua tensão superficial das gotículas, causando instabilidade cinética e regressão da nanoemulsão (Chang et al, 2006).

Os métodos de produção de alta energia, ou de dispersão, são normalmente conseguidos através de agitação a altas velocidades, homogenização a alta pressão e sonicação (Almeida *et al*, 2011). Na homogenização a alta pressão, com recurso a homogenizadores, e a pressões entre os 50 e os 100 MPa, forçamos uma pré-emulsão,

mistura de fases com surfactante e fármaco, aquecida ou não, a passar por um orifício a alta velocidade. As tensões causadas pela passagem e forças de cavitação, quebram as gotículas em gotículas mais pequenas, e com o aumento de passagens, mais homogêneas (Ferreira et al, 2011).

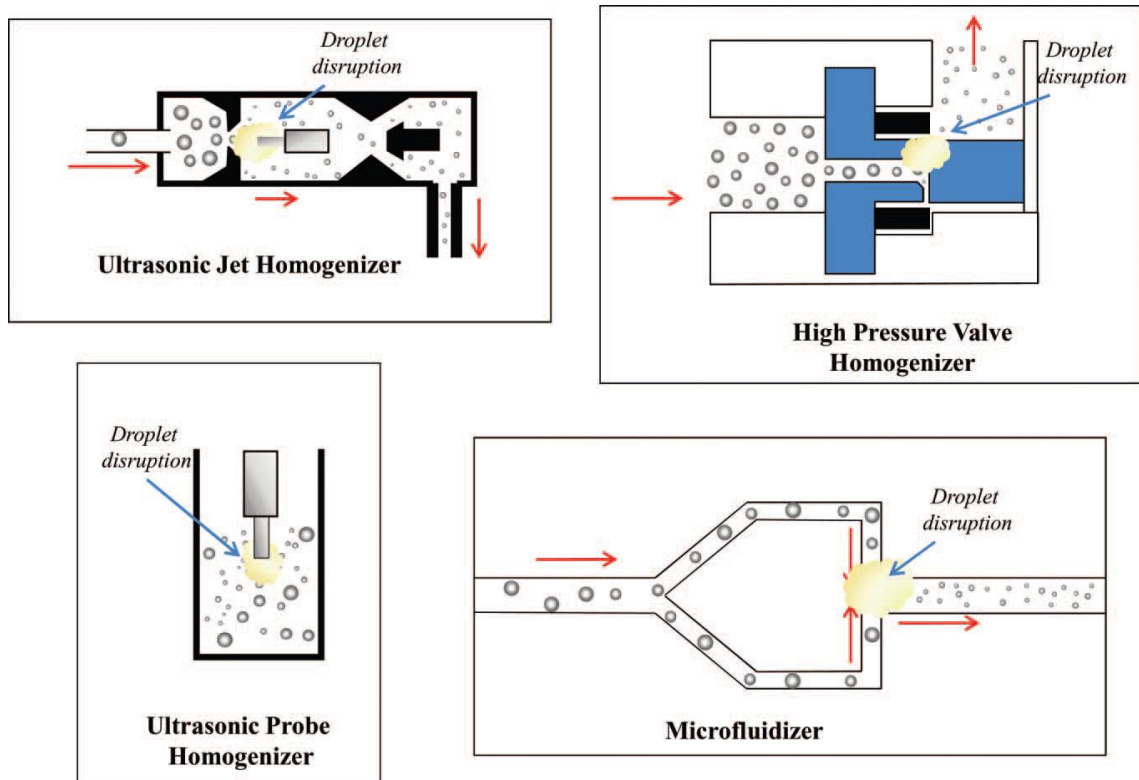


Figura 9 – Métodos mecânicos de alta energia para produção de nanoemulsões. Retirado de McClements e Rao, 2011.

A emulsificação com recurso a ultrasons é eficiente na redução do tamanho das gotículas, mas encontra-se limitada a pequenos lotes, de escala laboratorial (Azemar *et al*, 2005).

A utilização de dióxido de carbono supercrítico, ou líquidos comprimidos, pode ser útil na preparação de nanoemulsões. Estes tipo de líquidos a alta pressão e temperatura, apresentam propriedades e comportamentos de gases e líquidos, simultaneamente. Eles permitem a separação de compostos, como solventes, da formulação, a esterilização da mesma, e a produção de partículas secas. A sua adaptação à escala industrial é facilmente efetuada (Ferreira *et al*, 2011).

Os métodos de baixa energia, condensação ou de emulsificação espontânea, adquirem a energia necessária à formação e estabilidade das nanoemulsões a partir dos

seus componentes. A emulsificação pode ocorrer espontaneamente através da mistura dos componentes, de maneira quantitativamente adequada, mas tal efeito é raramente observado e necessita de condições de produção adaptadas para esse fim. O chamado método de PIT (Phase Inversion Temperature), é o mais comum, e tem como base as diferenças de solubilidade e equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos surfactantes não-iônicos com a temperatura. As emulsões preparadas na temperatura crítica de inversão de fase, quando aquecidas ou arrefecidas, para além desse ponto, formam emulsões cineticamente estáveis O/A ou A/O, respetivamente, devido à inversão de solubilidade e EHL do surfactante não-iónico (Almeida *et al*, 2011).

#### **III.4. Métodos de produção de SLNs, NLCs e LDCs**

O método de eleição para os 3 tipos de nanopartículas é o de homogeneização a alta pressão (HPH, do inglês High Pressure Homogenization). Estas partículas derivam de pré-emulsões, uma mistura de fase aquosa contendo surfactante, com uma fase oleosa contendo um fármaco, à mesma temperatura e preparadas em Ultra-Turrax. As SLNs apresentam o fármaco dissolvido ou disperso no lípido sólido fundido, a uma temperatura 5 a 10 °C acima do seu ponto de fusão. Nas NLCs, o fármaco é dissolvido numa mistura de lípido líquido com lípido sólido, a temperatura acima do ponto de fusão da mistura. As LDCs, por sua vez, são preparadas à temperatura ambiente (Maincent *et al*, 2008).

A HPH a quente é assim denominada por permitir a preparação de SLNs e NLCs a partir de pré-emulsão com o lípido sólido fundido. A HPH a frio foi desenvolvida para contornar problemas que surgiram na HPH a quente como a degradação térmica do fármaco, a perda de fármaco para a fase aquosa durante a homogeneização, e complicações de cristalização no produto final. Na HPH a frio só conseguimos formar SLNs. O fármaco é dissolvido no lípido fundido, a mistura é sujeita a uma rápida solidificação em nitrogénio líquido, e é micronizada. O pó é disperso em fase aquosa fria com surfactante, originando uma suspensão que passa pelo homogenizador a alta pressão, originando SLNs. Isto permite proteger o fármaco, mas origina produtos finais menos homogéneos na distribuição de tamanhos de partícula e de tamanho de partícula superior (Mäder e Mehnert, 2001).

As SLNs e NLCs podem ser obtidas por utilização dos métodos de produção das nanoemulsões e a partir desses sistemas, visto que a diferença será o estado físico da

fase oleosa utilizada, aquando do produto final. Como exemplo, temos métodos de inversão de fases e homogeneização. Mas também podem ser produzidas com recurso a adaptações de métodos de produção de nanoesferas e nanocápsulas, substituindo os polímeros por lípidos solúveis em solventes orgânicos. Exemplos disso são os métodos de evaporação do solvente e difusão do solvente (Ferreira et al, 2011).

### **III.5. Esterilização**

A esterilização está limitada à filtração por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para algumas nanopartículas (nunca com tamanhos superiores a 0,2  $\mu\text{m}$ ), e desde que não mude a estabilidade física e química dos sistemas. Verificou-se que a esterilização com vapor de água a 121 °C pode resultar na fusão de SLNs e NLCs, degradação de alguns fármacos, rutura de membranas de lipossomas, e instabilidade das nanoemulsões. A radiação  $\gamma$  esterilizante, por ser altamente energética, pode originar radicais livres que podem afetar sistemas como os lipossomas e algumas partículas poliméricas (Mäder e Mehnert, 2001).

### **III.6. Liofilização**

A liofilização é um processo que aumenta a estabilidade física e química de sistemas nanoparticulados. A transformação numa forma sólida permite que não se verifiquem problemas de degradação por hidrólise, e de envelhecimento de Ostwald, e que as nanopartículas como as SLNs, NLCs e lipossomas, possam ser incorporadas em comprimidos, pastilhas e cápsulas. O processo envolve a congelação da amostra e evaporação da água sob pressão reduzida. Forma-se um resíduo seco que, após hidratação com água ou soluções tampão, pode ser redisperso e restabelecer os sistemas.

A adição de crioprotetores pode ser necessária para diminuir agregação das partículas secas e melhorar a sua redispersão aquando do momento de preparação. Os crioprotetores como a sacarose, glucose, maltose e trealose, a concentrações de 10 a 15%, favorecem o estado cristalino da amostra congelada e permitem a proteção de grupos funcionais polares, para uma posterior re-hidratação (Mäder e Mehnert, 2001).

## IV. Caracterização

Para estabelecermos critérios de qualidade para este tipo de sistemas e para a sua produção, armazenamento e comercialização, precisamos de saber quais as suas propriedades físico-químicas, comportamentos e estabilidade.

### IV.1. Tamanho e morfologia das Partículas

O tamanho de uma partícula é expresso em valores de comprimento e largura que, geralmente, só é válido para partículas de morfologia e geometria regular. Por exemplo, uma esfera é definida pelo raio ou diâmetro, enquanto que um cubo é pela altura, comprimento e largura. Os métodos existentes contornam esta situação, que ocorre na maioria das nanopartículas, por estimativa de uma média do tamanho das partículas com base na sua massa ou considerando as nanopartículas como esferas de propriedades equivalentes (Calzolari *et al*, 2012).

Cada sistema apresenta requisitos diferentes quanto ao tamanho de partícula, mas para serem considerados nanopartículas, devem apresentar tamanhos médios de partículas entre os 10 nm e os 1000 nm. A estabilidade física dos sistemas depende, em grande parte, do tamanho das partículas (Kreuter, 2007).

Quanto à distribuição de tamanhos de partícula ou dispersão das nanopartículas, dependendo do método de medição, esta pode ser baseada na soma dos volumes de todas as partículas por volumes fracionados da amostra. Os métodos de contagem envolvem a separação de cada partícula medida, permitindo a determinação de distribuição de tamanhos, e os métodos genéricos detetam um sinal conjunto de todas as partículas num volume específico de amostra, sendo a distribuição deduzida dos dados através de algoritmos de análise. Os métodos de fracionamento envolvem a análise de frações da amostra e recolha dos sinais de cada uma (Calzolari *et al*, 2012).

As dispersões ou suspensões de nanopartículas podem ser monodispersas, quando a distribuição de tamanhos de partícula é muito pequena, ou seja, apresentam índices de polidispersão muito baixos. E podem ser polidispersas se esse índice for elevado, o que indica que existe uma elevada variabilidade entre o tamanho das partículas na dispersão. Para garantir um comportamento consistente e reprodutível das nanopartículas, especialmente necessário em sistemas de veiculação de fármacos, é desejável que esses sistemas sejam o mais monodispersos possível (Mäder e Mehnert, 2001).

A microscopia eletrônica (EM) utiliza feixes de elétrons para visualizar estruturas que não são visíveis a olho nu, nem ao microscópio óptico. A microscopia eletrônica de varrimento (SEM) faz uma reconstrução de imagens através da reflexão dos elétrons nas superfícies das partículas, enquanto que a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) as constrói através da passagem de elétrons por seções finas da amostra. Mas tanto a SEM como a TEM, originam imagens a duas dimensões de partículas tridimensionadas, podendo apresentar valores de tamanho de partícula se assim o desejarmos, por diâmetro de círculo com a mesma área que a imagem a duas dimensões. A EM é um método de contagem, pelo que permite a obtenção de bons valores de distribuição de tamanhos, mas só a TEM consegue determinar, com boa resolução, as nanopartículas. No entanto, não pode ser utilizada em partículas orgânicas ou com revestimento orgânico, a não ser que a amostra seja liofilizada ou criocongelada (cryo-TEM). A EM permite a medição de partículas acima de 1 nm, num intervalo dinâmico que depende da técnica utilizada.

A microscopia de força atômica (AFM) envolve a utilização de um “cantilever”, montado numa alavanca, que passa pela superfície e permite o registo das alterações na posição da ponta afiada (topografia). Estas alterações são causadas pelas partículas na superfície. Podemos obter informações da altura das partículas, tomada como diâmetro, e análise da área das partículas como nos outros métodos, a partir das imagens de AFM. Isto é possível para partículas de diâmetro superior a 1 nm.

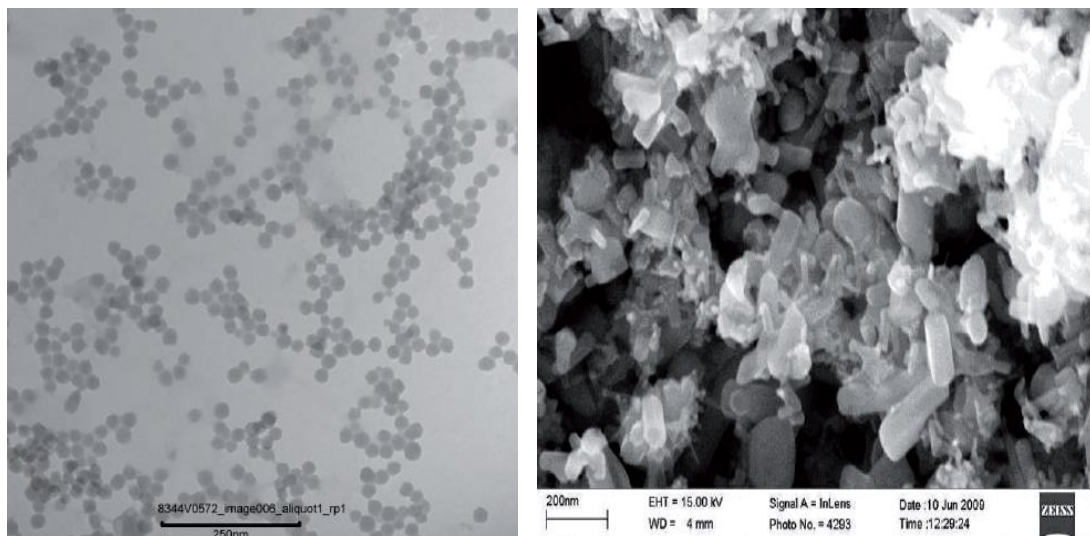


Figura 10 – Imagem obtida por TEM e por SEM. Retirado de Calzolari *et al*, 2012.

A dispersão dinâmica de luz (DLS), mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas, determinando a velocidade dos movimentos brownianos de uma partícula em suspensão. O DLS utiliza um feixe laser que, ao atingir as partículas em suspensão é disperso por elas, sofrendo difração. Os movimentos brownianos das partículas causam flutuações na intensidade da luz dispersa. Estas flutuações são então correlacionadas com uma função do coeficiente de difusão das partículas que pode ser utilizado para cálculo do tamanho das partículas. A dispersão causada por partículas de 50 nm é  $10^6$  vezes superior a uma partícula de 5 nm, pelo que este método é muito eficaz para determinar distribuições de tamanho. Só pode ser aplicado a partículas em suspensão, e permite medições na ordem dos 5 nm aos 500 nm (Calzolari *et al*, 2012).

A difração de raios-X (XRD) é bastante utilizada para análise de materiais de estrutura cristalina. A refração de raios-X de ângulo pequeno (SAXS), mede as partículas com base na refração de raios-X à superfície das partículas, e apresenta mais benefícios em sistemas dispersos. O ângulo de refração depende do comprimento de onda da luz e do tamanho da partícula do qual a luz é refratada. Este método é mais eficaz para partículas entre 1 nm e os 100 nm (Boyd e Dong, 2011).

A determinação da área de superfície específica por BET, mede a quantidade de gás (nitrogénio) que é adsorvido à superfície das partículas, a uma dada temperatura e pressão. Com isto, a área de uma partícula pode ser medida.

Outros métodos como o FFF (field flow fractioning), a CLS (centrifugal liquid sedimentation), PTA (particle tracking analysis), são também utilizados e tidos como passíveis de serem utilizados para estabelecer as especificações da definição de nanomaterial a implementar pela União Europeia. O FFF separa as partículas, de 1 nm a 200 nm, com base no tamanho hidrodinâmico através de contra-correntes, que podem ser líquidos, gases, corrente gravitacional ou elétrica. A CLS toma como princípio a capacidade superior de sedimentação das partículas de maiores dimensões, mas induz a sedimentação das nanopartículas por forças centrífugas, visto que as partículas de tamanho pequeno demoram a sedimentar. E a PTA é um método ultramicroscópico que se baseia na capacidade de difração de luz das partículas em suspensão e nos seus movimentos brownianos. A luz difratada é analisada, através de imagens, para estabelecer por triangulação o tamanho das partículas que se movimentam rapidamente. As partículas devem apresentar tamanho superior a 25 nm (Calzolari *et al*, 2012).

Method name (abbreviation)	Measurement range and medium (limiting factors)	Type of size distribution of raw data	poly-dispersity	Standards for use of method for size analysis available?
Electron microscopy (EM)	1 nm and higher; dry (dynamic range)	number-based	+	yes
Dynamic light scattering (DLS)	5 nm to 500 nm; suspension (sedimentation, scattering intensity)	(no distribution, or scattering-intensity-based)	--	yes
Centrifugal liquid sedimentation (CLS)	20 nm and higher; suspension (particle density)	extinction-intensity-based	+	yes
Small-angle X-ray scattering (SAXS)	5 nm and higher; suspension (dynamic range)	scattering-intensity-based	o	yes
Field flow fractionation (FFF)	1 nm to 200 nm; suspension (dynamic range)	(depends on detector)	+	no
Particle tracking analysis (PTA)	25 nm and higher; suspension (scattering intensity)	number-based	+	no
Atomic force microscopy (AFM)	1 nm and higher; dry (dynamic range)	number-based	+	yes
X-ray diffraction (XRD)	1 nm and higher; dry (only for crystalline materials)	(no distribution measured)	--	yes

Tabela 1 – Tabela de características dos métodos de caracterização de tamanho. Adaptado de Calzolari *et al*, 2012.

## IV.2. Potencial zeta

Segundo a IUPAC, potencial zeta ( $\zeta$ ) é o potencial eletrostático de uma partícula entre a sua dupla camada elétrica e o líquido, num plano de fricção entre a partícula e a solução aquosa (IUPAC, 1997). A dupla camada elétrica encontra-se à superfície de qualquer partícula num líquido e é composta por uma camada fixa, de carga contrária à carga superficial da partícula, e uma camada móvel ou difusa, de carga igual à da partícula. Os íões da camada difusa podem mover-se consoante a atividade elétrica do líquido. O potencial  $\zeta$ , medido no plano entre a camada difusa e o líquido, pode estar relacionado com a carga de superfície da partícula. Esse potencial, e não a carga de superfície, é que controla as interações entre as partículas e os compostos em solução (Kirby, 2010). Sendo assim, a carga e potencial  $\zeta$  no plano de fricção são sensíveis à concentração e tipo de íões em solução, pH e força iónica do meio (Baik e Lee, 2010).

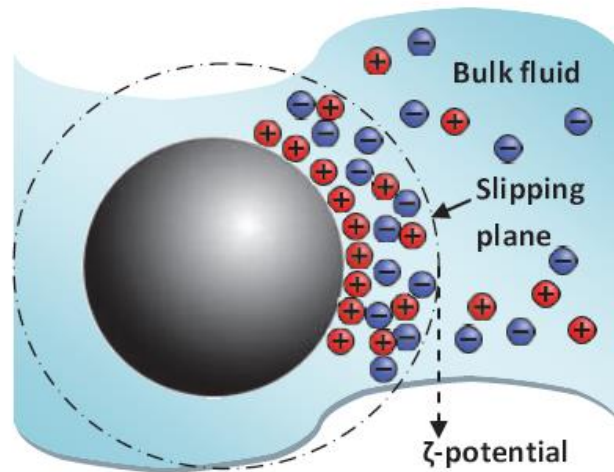


Figura 11 – Dupla camada elétrica de uma partícula e plano de fricção entre a mesma e o líquido. Retirado de Flores, 2013.

Os fenómenos de agregação são menos passíveis de ocorrer se as partículas apresentarem partículas carregadas (um elevado potencial  $\zeta$ ), devido a fenómenos de repulsão eletrónica. No entanto a presença de estabilizadores estéricos diminui o potencial  $\zeta$ , embora sejam uma fonte de estabilidade a considerar (Mäder e Mehnert, 2001).

A medição do potencial  $\zeta$  permite prever a estabilidade de dispersões coloidais, após a sua produção (Erickson et al, 2013). Permite, também, esclarecer o impacto que certas alterações nas condições de armazenamento possam ter na estabilidade destas formulações (Aresta *et al*, 2013).

O potencial  $\zeta$  não pode ser determinado diretamente, mas pode ser calculado através de modelos teóricos que o correlacionam com a mobilidade eletroforética, determinada experimentalmente por fenómenos electrocinéticos ou electroacústicos. Os fenómenos electrocinéticos consistem na aplicação de um campo elétrico que induz a migração de partículas carregadas em solução para um eléctrodo de carga contrária, com velocidade que é correlacionada com o valor de potencial  $\zeta$  (Delgado et al, 2007). A velocidade é medida através de um feixe laser, por velocimetria de Laser Doppler, na qual a luz laser refratada é combinada com um feixe de referência. As variações de intensidade no feixe laser são detetadas e são proporcionais à velocidade das partículas. A mobilidade eletroforética é, então, convertida em valor de potencial  $\zeta$  (Malvern Instruments, 2004). Os fenómenos electroacústicos medem a mobilidade eletroforética dinâmica, semelhante à anterior, mas a frequências mais elevadas (Dukhin e Goetz, 2004).

### IV.3. Estabilidade Física

Os fenômenos dinâmicos e características físicas dos nanocompartimentos podem ser estudados e relacionados, com o auxílio de métodos de ressonância magnética nuclear, para determinação do estado físico e homogeneidade das partículas e seus componentes (Mäder e Mehnert, 2001). Medidas da distribuição de tamanhos das partículas podem ser efetuadas por DLS, TEM ou AFM, a medição do potencial  $\zeta$ , e a análise calorimétrica por calorimetria de varrimento diferencial (DSC), permitem aferir acerca da estabilidade das nanopartículas. A estabilidade física de dispersões de SLNs é, geralmente, de mais de um ano, sendo que as partículas não variam o seu tamanho significativamente ao longo desse período de tempo (Kayser *et al*, 2004). No caso de sistemas que veiculam fármacos, a necessidade de estabilidade física é imperativa, pois irá ditar se o sistema perderá fármaco aquando do seu armazenamento, e se o seu perfil de libertação vai ser diferente do esperado. Os sistemas podem sofrer envelhecimento de Ostwald, perda de carga e de estabilidade eletrostática, rutura das membranas, desnaturação, agregação ou dissociação (Burgess *et al*, 2012).

A instabilidade física das preparações de nanopartículas pode estar relacionada com erros nas quantidades de componentes, antes da preparação. Por exemplo, pouca quantidade de surfactante pode ser motivo de instabilidade física das nanoemulsões, pois as gotículas formadas não estarão suficientemente estabilizadas e poderá haver coalescência (Almeida *et al*, 2011). Para evitar instabilidades por má formulação das partículas, estudos devem ser feitos com várias formulações, escolhendo a mais apropriada para o produto final.

A estabilidade física pode ser comprometida por variações bruscas de temperatura, no caso das nanopartículas lipídicas por alteração do estado físico das mesmas, por processos de produção inadequados (homogenização em demasia ou insuficiente, por exemplo), por interação da preparação com superfícies que despoletem processos de agregação das partículas, e por contaminação das preparações com outras estruturas coloidais, metais e eletrólitos (Mäder e Mehnert, 2001). A exposição à luz pode afetar a estabilidade física por adição de energia cinética ao sistema, pelo que, para maior estabilidade, os sistemas devem ser mantidos protegidos de fontes luminosas (Kayser *et al*, 2004).

#### **IV.4. Estabilidade Química**

A instabilidade termodinâmica e modificações químicas nos componentes e fármaco, podem ser determinadas por vários métodos, para avaliação da qualidade do produto final. A DSC e a XRD podem ser utilizadas para investigar o estado e conformação de lípidos, após transições químicas (Mäder e Mehnert, 2001).

A estabilidade química dos componentes pode ser comprometida por fatores ambientais como a exposição à luz, ao oxigênio, e a altas temperaturas. A presença de água, metais ou enzimas possibilita a ocorrência de degradações por hidrólise, pelo que a liofilização, quando possível, deverá ser efetuada, garantindo uma maior estabilidade química (Kayser *et al*, 2004). A presença de lípidos nas formulações pode implicar a utilização de antioxidantes, de maneira a evitar a sua oxidação ou peroxidação (Burgess *et al*, 2012).

## **V. Aspectos farmacocinéticos e toxicológicos das nanopartículas**

Este capítulo aborda aspectos de relevância acerca da farmacocinética das nanopartículas e seu destino *in vivo*, aquando da sua administração como agentes terapêuticos. A otimização de uma formulação farmacêutica nanométrica pode ser morosa, mas é necessária para garantir a eficácia do tratamento farmacológico e a segurança dos indivíduos sujeitos a este tipo de tratamentos.

### **V.1. Farmacocinética de fármacos veiculados em nanopartículas**

A elevada capacidade de modificação das formulações e de funcionalização das nanopartículas, faz das mesmas, veículos de fármacos muito versáteis e flexíveis. Permitem um ajuste das propriedades de fármaco e sistema, de maneira a aperfeiçoar a farmacocinética para a via de administração a utilizar.

A distribuição do fármaco pela matriz ou invólucro da nanopartícula, vai afetar a libertação do mesmo, que pode: ser imediata, especialmente se o fármaco estiver adsorvido á superfície da partícula ou no seu invólucro; modificada, caso essa distribuição seja heterogéna; ou prolongada, se a distribuição do fármaco for homogéna (Kayser *et al*, 2004).

A modificação das superfícies de nanopartículas é utilizada para controlar as propriedades biológicas das mesmas. A absorção, aumento de estabilidade e tempo de semi-vida está, geralmente, dependente deste tipo de modificações. É amplamente conhecida a capacidade de polímeros hidrófilos, como o PEG, no impedimento estérico da opsonização e interação com outras moléculas sanguíneas, proteção da carga de superfície, e aumento da solubilidade. Estas moléculas podem aumentar o tempo de semi-vida do fármaco significativamente, e os polímeros são facilmente excretados por via renal. Outros polímeros anfifílicos podem apresentar a mesma capacidade (Torchilin, 2012).

A vetorização passiva é devida a processos fisiológicos que permitem a acumulação de partículas de tamanho pequeno em tecidos e órgãos. O SRE, após opsonização das nanopartículas, atua rapidamente na eliminação das mesmas, permitindo uma acumulação destas partículas em tecidos desse sistema, como o baço, fígado e medula óssea. Outro mecanismo de vetorização passiva é o efeito de potenciação da permeação e retenção (EPR, do inglês *enhanced permeation and retention*), verificado em tecidos

tumorais ou inflamados. Resulta de uma vascularização sanguínea muito fenestrada e insuficiente drenagem linfática, que permite um aumento de permeação dos tecidos e uma retenção das nanopartículas no local (Misra *et al*, 2012).

A vetorização ativa envolve a modificação superficial das partículas com ligandos que façam com que as nanopartículas apresentem uma maior capacidade de ligação a certas células, receptores, enzimas ou moléculas. Proteínas e anticorpos são muito utilizados para o efeito, assim como derivados de hormonas para vetorização a certos tumores hormono-dependentes, e análogos estruturais de neurotransmissores e moléculas endógenas.

A utilização de polímeros “inteligentes”, que respondem a fenómenos biológicos como mudanças de pH e de temperatura, também permite uma vetorização ativa. Os polímeros hidrófilos responsivos a pH ácido, como os ésteres vinílicos, ésteres duplos e hidrazonas, são muito utilizados para responderem a tecidos inflamados e neoplásicos, ou a ambientes lisossomais, sendo quebrados e degradando a partícula, libertando o seu conteúdo (Torchilin, 2012).

A capacidade de algumas partículas, como agentes de contrastes para técnicas de imagiologia como a tomografia computadorizada, ressonância magnética, cintigrafias e ultra-sonografia, tem sido muito explorada pela sua capacidade de potenciar o sinal de contrastes já existentes ou pela possibilidade de vetorização dos mesmos (Misra *et al*, 2012).

### **V.1.i. Via oral**

Dispersões aquosas de nanopartículas ou formas farmacêuticas convencionais com nanopartículas incorporadas podem ser administradas por via oral. É esperado que o consumo de alimentos afete a absorção das nanopartículas por interações imprevistas e indesejadas, em muitos casos (Mäder e Mehnert, 2001).

O pH baixo e elevada concentração iónica favorece a agregação de partículas, a nível do estômago. No entanto, uma grande parte das partículas consegue passar para o intestino, protegendo o fármaco encapsulado da sua degradação. As SLN e NLCs são muito promissoras, para veiculação de fármacos lipófilos, nesta via (Mäder e Mehnert, 2001). Para resumir, as nanopartículas para administração no trato gastrointestinal

devem: proteger o fármaco da degradação, resistir à sua degradação e devem permitir uma boa absorção através do epitélio, se necessário (Matos e Moutinho, 2011).

O movimento de moléculas, através do epitélio intestinal, é feito através de mecanismos de transporte passivos e ativos. As moléculas lipófilas são absorvidas, geralmente, por mecanismo passivo de difusão transcelular, enquanto que as moléculas hidrófilas pequenas passam pelas junções intercelulares apertadas. A passagem das moléculas depende das propriedades dos compostos, pKa, solubilidade, coeficiente de partição, carga, forma e tamanho. O transporte ativo efetua-se por intermédio de proteínas transportadoras e envolve gasto energético. O transporte mediado por receptores é denominado por transcitose. Existem várias abordagens para cada um dos transportes, de maneira a aumentar a absorção das nanopartículas, mas as moléculas mais utilizadas como potenciadores da absorção serão as misturas de ciclodextrinas, ácidos gordos, vitaminas lipossolúveis, e sais biliares, modificados ou não (Al-Hilal *et al*, 2012).

O aumento da absorção e biodisponibilidade das nanopartículas pode ser devido, também, à adesividade das nanopartículas ao epitélio (Maincent *et al*, 2008).

#### **V.1.ii. Via ocular**

Embora as preparações com nanopartículas para administração ocular possam causar uma limitada obstrução da visão, podem aumentar a permanência do fármaco no local, por bioadesividade, e melhorar significativamente o tempo de semi-vida no humor vítreo, por libertação prolongada de fármaco na córnea (Matos e Moutinho, 2011). A existência de carga superficial catiónica está relacionada com episódios inflamatórios e, se a formulação não for adequada, pode haver agregação das nanopartículas por falta de estabilidade coloidal. No entanto, a existência de efeitos adversos é muito reduzida devido a ser uma aplicação no local a tratar, e por não necessitar de muitas administrações (Bochot e Fattal, 2012).

As nanopartículas são eliminadas do olho por dois processos, o de lavagem com fluído lacrimal, ou por absorção para a corrente sanguínea ou linfática, através dos vasos próprios (Bochot e Fattal, 2012).

### **V.1.iii. Via nasal e inalatória**

É uma via de fácil acesso, não-invasiva, e que escapa ao metabolismo de primeira passagem no fígado. A barreira epitelial é fina, muito irrigada, e com pouca atividade metabólica, comparando com outras vias. As nanopartículas utilizadas nesta via devem apresentar um diâmetro pequeno que impeça a sua eliminação com a expiração e que permita a sua deposição por toda a área do trato respiratório. A mucoadesividade das partículas tem de ser apropriada, e é influenciada pela carga das partículas, a sua composição, tamanho e porosidade. O fato de serem pequenas facilita a sua internalização rápida, por endocitose. As nanopartículas catiónicas ligam mais facilmente à mucosa do epitélio respiratório (Betberder e Dombu, 2012).

Os cílios e muco, no trato respiratório, podem ser fatores que afetam a eficácia por esta via, assim como a fagocitose por macrófagos alveolares (Gadhavé *et al*, 2012). Mesmo assim, esta via apresenta-se como promissora para a administração de nanopartículas carregadas com proteínas terapêuticas (Betberder e Dombu, 2012).

### **V.1.iv. Via cutânea e transdérmica**

Na administração dérmica, as nanopartículas devem ser incorporadas em formas farmacêuticas convencionais. Isto obriga a uma redução do conteúdo lipídico para que a viscosidade da preparação seja aceitável (Mäder e Mehnert, 2001).

Como já foi mencionado, algumas nanopartículas apresentam a capacidade de refletir ou refratar os raios ultravioleta (UV), pelo que podem ser utilizadas em protetores solares. O fato de essas nanopartículas serem constituídas por componentes fisiológicos, é uma vantagem clara sobre os sistemas existentes, quanto à toxicidade e penetração da pele. Os filmes densos formados pelas nanopartículas, após secagem das preparações, reduzem a perda de água transepidérmica (TEWL), por oclusão, aumentando a hidratação no local de aplicação (Müller e Wissing, 2003).

As nanopartículas lipídicas e lipossomas podem melhorar a biodisponibilidade de certos fármacos à superfície da pele, e permitir uma passagem através das camadas da epiderme para os mesmos, por ação de surfactantes e outros emolientes na preparação (Mäder e Mehnert, 2001). As nanopartículas podem difundir os fármacos a partir do estrato córneo da barreira epidérmica, poros, folículos pilosos, e espaços intercelulares. E essa difusão pode ser potenciada pela ação de calor e por massagem no local de

aplicação. Os fármacos mais estudados para estas vias são os anti-inflamatórios, agentes despigmentantes, antioxidantes, antineoplásicos, antibióticos e antissépticos (Becker *et al*, 2011).

#### **V.1.v. Via parentérica**

A administração parentérica de nanopartículas requer que estas apresentem alguma proteção contra a opsonização e rápida eliminação pelo SRE. Isto é geralmente conseguido por integração de polímeros hidrófilos (PEGs) à superfície das partículas (Kayser *et al*, 2004). Os lipossomas são os mais promissores e mais seguros, do ponto de vista de perfil de libertação, capacidade de vetorização, estabilidade do sistema e fármaco, biocompatibilidade, e por apresentarem pouca ou nenhuma quantidade de surfactante (Byrne *et al*, 2013).

As nanoemulsões podem ser utilizadas para veicular nutrientes hidrófilos e lipófilos, para nutrição parentérica, veiculação de vacinas, libertação controlada de fármacos ou genes, necessitando de gotículas inferiores a 1  $\mu\text{m}$  (Azemar *et al*, 2005).

Após a administração, verifica-se uma maior concentração de partículas não vetorizadas para órgãos do SRE. A adsorção de proteínas plasmáticas, como a albumina, à superfície das nanopartículas, é supostamente responsável pelo transporte de partículas através da barreira hemato-encefálica, BHE (Mäder e Mehnert, 2001).

#### **V.2. Toxicidade e riscos na utilização de nanopartículas**

As nanopartículas são muito estáveis, permitem a encapsulação de materiais hidrófilos e lipófilos, são bastante compatíveis com diversas vias de administração, apresentam perfis de libertação variados e a capacidade de os alterar, e permitem evitar efeitos adversos de fármacos, por proteção do fármaco de interações indesejadas ou por vetorização do mesmo para o local de ação (Misra *et al*, 2012). No entanto, as nanopartículas podem apresentar mecanismos de toxicidade que deverão ser estabelecidos, antes da sua comercialização (Hengstler *et al*, 2012).

O tamanho das partículas pode estar relacionado com o aumento da toxicidade das mesmas. A sua elevada área de superfície permite imensas interações, e uma elevada reatividade. Os excipientes das nanopartículas, deverão apresentar estatuto GRAS, de maneira a garantir a eliminação dos mesmos do organismo (Gadhav *et al*, 2012).

Sistemas que apresentem surfactantes em grandes quantidades, como as nanoemulsões, podem apresentar citotoxicidade quando administrados, pois os agentes emulsivos afetam a integridade das membranas celulares compostas por fosfolípidos (Almeida *et al*, 2011).

A transformação de dispersões de nanopartículas lipídicas pouco viscosas em gel viscoso é um risco que pode ocorrer rapidamente e de maneira imprevisível e irreversível. Um contato intenso da dispersão com superfícies e forças de tensão de corte, como a ponta de uma seringa, pode despoletar a reação de gelificação. Este fenômeno ocorre por cristalização induzida por modificações estruturais nos lípidos ou por interações superficiais, especialmente na ausência de surfactante. O estado sólido dos lípidos e o perigo da gelificação são obstáculos à aplicação de SLNs e NLCs em injeções intravenosas, pois podem causar embolias gordas (Mäder e Mehnert, 2001). A interação das nanopartículas com as proteínas séricas pode originar coagulação ou despoletar reações de hipersensibilidade, se existirem antigénios adsorvidos à sua superfície (Kayser *et al*, 2004).

As nanopartículas metálicas de ferro, desde que em pequenas quantidades, não irão induzir toxicidade, pois são eficientemente removidas pelo SRE. O ferro metabolizado é utilizado para biossíntese de hemoglobina ou excretado pela via renal (Hengstler *et al*, 2012).

A toxicidade depende da biocompatibilidade, da quantidade, do método de produção e do metabolismo dos materiais. Sabe-se que a utilização de grandes quantidades de surfactantes nas nanopartículas pode levar a alguma citotoxicidade por interação desses agentes tensioativos com as membranas fosfolipídicas celulares (Hommos *et al*, 2009). A existência de solventes orgânicos nas nanopartículas, decorrentes de uma remoção ineficaz do solvente aquando da produção, pode resultar em toxicidade (Mäder e Mehnert, 2001). A potencial toxicidade, dos materiais nanométricos, é uma grande preocupação para a implementação de terapêuticas medicamentosas à base de nanopartículas, mas a informação ainda é muito limitada (Hommos *et al*, 2009).

## **VI. Utilização de nanopartículas em ciências farmacêuticas**

As nanopartículas são utilizadas maioritariamente, em ciências farmacêuticas, para estabelecerem, por si sós, algum efeito terapêutico, ou para veicular um agente que apresentará esse efeito. Como agentes terapêuticos passíveis de serem veiculados em nanopartículas temos: fármacos, peptídeos e proteínas, material genético, ou outras substâncias que atuem beneficemente em casos patológicos particulares.

### **VI.1. Recurso a nanopartículas como ferramentas de diagnóstico e terapêutica**

As nanopartículas já são vistas, em ciências da saúde, como capazes de revolucionar os métodos de diagnóstico e tratamentos atuais. A capacidade que apresentam de modificar as propriedades do fármaco que veiculam, de aumentar a estabilidade de fármacos, de permitirem diversos perfis de libertação do mesmo, e de poderem apresentar especificidade para certos tecidos, torna-as em ferramentas essenciais para o desenvolvimento de sistemas de veiculação mais eficazes, com menos frequência de tomas e com menos efeitos adversos, assim como para o desenvolvimento de técnicas de análise de amostras biológicas e técnicas de imagiologia mais eficientes (Car *et al*, 2012).

#### **VI.1.i. Dermocosmética**

Produtos dermocosméticos poderão, no futuro, incorporar nanopartículas como os lipossomas, SLNs e NLCs, para veiculação de fármacos e ingredientes cosméticos ativos, e protegendo os compostos lábeis. Este tipo de utilização pode permitir a libertação prolongada de fármacos para o tratamento de afeções dermatológicas, de maneira localizada e com elevada eficácia, assim como a libertação prolongada de outros ingredientes de produtos dermocosméticos como hidratantes e reafirmantes, despigmentantes, pigmentos e perfumes.

Está demonstrado que a incorporação de 4% de SLNs em formulações de cremes O/A, permitiu um aumento de hidratação de 8% , em 28 dias, quando comparada com a hidratação proveniente do mesmo creme O/A sem SLNs. O efeito oclusivo causado pelo filme de óleo e SLNs, após a aplicação do creme, permite uma melhor hidratação.

Hoje em dia, com o aumento da consciencialização dos efeitos nefastos da exposição prolongada à radiação ultra-violeta solar, existe uma maior procura, por parte do público

e por parte da indústria, a uma proteção mais eficaz. As SLNs podem ser incorporadas, também, como filtros solares físicos, assim como encapsular filtros solares químicos, para um efeito sinérgico de proteção. As gotículas líquidas de emulsões convencionais não refractam a luz tão eficazmente como as partículas sólidas, e é possível reduzir a quantidade de outros filtros solares físicos em 50%, garantindo o mesmo fator de proteção (Müller e Wissing, 2003).

#### **VI.1.ii. Métodos de diagnóstico e análise**

As nanopartículas marcadas com ligandos como proteínas (enzimas, anticorpos ou antigénios), ADN ou ARN (ácido ribonucleico), podem ser utilizadas para ligação das mesmas a certos tecidos específicos. Isto é muito útil na separação de moléculas, purificação de proteínas, vetorização de sistemas de veiculação de fármacos e de contrastes em imagiologia, realização de imunoenaios mais sensíveis, análises genéticas, e engenharia tecidual (Marszatt, 2011).

Existem já no mercado, nanopartículas bioconjugadas para utilização em análises bioquímicas, e anticorpos associados a nanopartículas metálicas de ouro, que permitem um aumento da sensibilidade de imunoenaios, por ampliação do sinal de deteção dos anticorpos ligados aos seus antigénios. Esperam-se que os QDs bioconjugados sejam capazes de serem utilizados para deteção rápida, específica e sensível de antigénios de bactérias causadoras de meningite, com mais pequenas quantidades de antigénios em amostras biológicas, permitindo um rápido e fundamentado diagnóstico clínico, e um tratamento eficaz e imediato.

A ressonância magnética é uma poderosa ferramenta de diagnóstico de distúrbios estruturais, que associada a contrastes contendo nanopartículas magnéticas, pode ser ainda mais útil para análise de seções específicas do organismo, por direcionamento das nanopartículas magnéticas através de campos magnéticos induzidos pelo aparelho (Pourmand *et al*, 2012). As nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas para tratamentos anti-tumorais de hipertermia a laser localizada. Recorrendo a campos magnéticos que concentrem as partículas no local a tratar, aplica-se um feixe laser que causa o aquecimento local, quer pela energia cedida pelo laser, quer pela ressonância plasmónica das nanopartículas metálicas revestidas com ouro, fazendo-as vibrar e aquecer, cedendo energia que destrói os tecidos patológicos (Franz et al, 2005).

### **VI.1.iii. Veiculação de fármacos**

Sem dúvida nenhuma que a maioria das nanopartículas mencionadas neste trabalho apresentam vantagens na veiculação de fármacos, relacionando com as formas farmacêuticas clássicas. Algumas terapias medicamentosas atuais falham por resultarem em concentrações insuficientes de fármaco, e um rápido metabolismo e eliminação do mesmo. E alguns fármacos estão limitados a serem utilizados por vias de administração específicas, devido a apresentarem características de solubilidade e estabilidade impróprias para a sua utilização por outras vias (Mäder e Mehnert, 2001). As nanopartículas foram desenvolvidas tendo como objetivo ultrapassar essas limitações.

O conceito de “bala mágica” de Paul Ehrlich, já não é tão improvável, com os avanços feitos na área de desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos, ao longo de 35 anos. O objetivo das primeiras nanopartículas, semelhantes a nanoesferas e nanocápsulas, para veiculação de princípios ativos era o de apresentar um perfil de liberação de fármaco prolongada (Kreuter, 2007). Com o avançar dos anos, conseguiram-se ultrapassar algumas das limitações inerentes às terapias farmacológicas com sistemas clássicos. Os sistemas nanoparticulados permitem que o fármaco encapsulado, hidrófilo ou lipófilo, seja protegido de possíveis alterações, apresentando um perfil de liberação completamente controlado, e especificidade, se desenharmos o sistema para esse fim, reduzindo a quantidade e frequência de tomas, mantendo o nível terapêutico da concentração de fármaco, e evitando possíveis efeitos adversos por liberação no local de ação. Com recurso a estes sistemas, é possível alterar as propriedades físico-químicas dos fármacos, a sua farmacocinética e estabilidade. É desejável, no entanto, que o sistema apresente uma elevada capacidade de carga e eficácia de encapsulação, que não seja tóxico, e que não apresente problemas a respeito de esterilização, produção em escala industrial e custos elevados (Mäder e Mehnert, 2001).

### **VI.1.iv. Formulações já disponíveis no mercado**

A primeira formulação farmacêutica, contendo nanopartículas, a ser comercializada foi o Abraxane™, nanopartículas de albumina sérica humana contendo paclitaxel, no início do ano de 2005, embora já se encontrassem no mercado há mais de 10 anos, nanopartículas em produtos para fins de diagnóstico (Kreuter, 2007).

Neste momento, a comercialização de lipossomas, micro e nanoemulsões, e de nanopartículas de fármacos, conjugados ou não com outras moléculas, é facilmente atingida desde que apresentem excipientes com estatuto GRAS, facilidade no aumento de escala de produção, boa capacidade de carga, capacidade de vetorização (excepto nas emulsões), boa relação custo-eficácia e poucos efeitos adversos (Date e Patravale, 2004).

Product name	Producer/distributor	Market introduction	Main active ingredients
Cutanova Cream Nano Repair Q10	Dr. Rimpler	10/2005	Q 10, polypeptide, hibiscus extract, ginger extract, ketosugar
Intensive Serum NanoRepair Q10		10/2005	Q 10, polypeptide, mafane extract
Cutanova Qream NanoVital Q10		06/2006	Q 10, TiO <sub>2</sub> , polypeptide, ursolic acid, oleanolic acid, sunflower seed extract
SURMER Crème Légère Nano-Protection	Isabelle Lancray	11/2006	Kukuinut oil, Monoi Tiare Tahiti®, pseudopeptide, milk extract from coconut, wild indigo, noni extract
SURMER Crème Riche Nano-Restructurante			Kukuinut oil, Monoi Tiare Tahiti®, pseudopeptide, milk extract from coconut, wild indigo, noni extract
SURMER Elixir du Beauté Nano-Vitalisant			Kukuinut oil, Monoi Tiare Tahiti®, pseudopeptide, milk extract from coconut, wild indigo, noni extract
SURMER Masque Crème Nano-Hydratant			Kukuinut oil, Monoi Tiare Tahiti®, pseudopeptide, milk extract from coconut, wild indigo, noni extract
NanoLipid Restore CLR	Chemisches Labororium	04/2006	Black currant seed oil containing $\omega$ -3 and $\omega$ -6 unsaturated fatty acids
Nanolipid Q10 CLR	Dr. Kurt Richter, (CLR)	07/2006	Coenzyme Q10 and black currant seed oil
Nanolipid Basic CLR		07/2006	Caprylic/capric triglycerides
NanoLipid Repair CLR		02/2007	Black currant seed oil and manuka oil
IOPE SuperVital Cream	Amore Pacific	09/2006	Coenzyme Q10, $\omega$ -3 und $\omega$ -6 unsaturated fatty acids
IOPE SuperVital Serum			
IOPE SuperVital Eye cream			
IOPE SuperVital Extra moist softener			
IOPE SuperVital Extra moist emulsion			
NLC Deep Effect Eye Serum	Beate Johnen	12/2006	Coenzyme Q10, highly active oligo saccharides
NLC Deep Effect Repair Cream			Q10, TiO <sub>2</sub> , highly active oligo saccharides
NLC Deep Effect Reconstruction Cream			Q10, acetyl hexapeptide-3, micronized plant collagen, high active oligosaccharides in polysaccharide matrix
NLC Deep Effect Reconstruction Serum			
Regenerationscreme Intensiv	Scholl	6/2007	Macadamia ternifolia seed oil, avocado oil, urea, black currant seed oil
Swiss Cellular White Illuminating Eye Essence	La prairie	1/2007	Glycoprotiens, panax ginseng root extract, equisetum arvense extract, Camellia sinensis leaf extract, viola tricolor extract
Swiss Cellular White Intensive Ampoules		1/2007	Glycoprotiens, panax ginseng root extract, equisetum arvense extract, Camellia sinensis leaf extract, viola tricolor extract
SURMER Creme Contour Des Yeux Nano-Remodelante	Isabelle Lancray	03/2008	Kukuinut oil, Monoi Tiare Tahiti®, pseudopeptide, hydrolyzed wheat protein

Tabela 2 – Exemplos de produtos dermocosméticos com nanopartículas. Retirado de Hommoss *et al*, 2009.

Nome comercial	Fármaco/Indicação terapêutica	Empresa responsável
<b>Nanotecnologias</b>		
Emend®	Aprepitant /Anti-emético	Merck & Co., Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Março 2003
Rapamune®	Sirolimus/Imunossupressor	Wyeth (EUA) Aprovado pela FDA em Agosto de 2000
Abraxane™	Paclitaxel/Citostático	American Pharmaceutical Partners, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Janeiro de 2005
Estrasorb™	Estradiol/Terapia hormonal	Novavax, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Outubro de 2003
Tricor®	Fenofibrato/Hipocolesterolémico	Abbott Laboratories (EUA) Disponível no mercado desde Dezembro de 2004
Megace®ES	Acetato de megestrol/Tratamento paliativo de neoplasias hormonossensíveis e agente anti-anorético	Pharmaceutical Companies, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Julho de 2005
Lifewave	Vários/Cosmético	Lifewave, LLC (EUA) Disponibilidade próxima no mercado
Basyc®	Celulose/Vasos sanguíneos artificiais	Sura Chemicals GmbH (Alemanha)

Tabela 3 – Exemplos de sistemas de veiculação nanoparticulados disponíveis no mercado. Retirado de Reis, 2011.

Complexo fármaco/CD	Nome comercial	Forma farmacêutica	Laboratório/País
PGE <sub>1</sub> /α-CD	Prostavastin®	Solução I.V.	Ono, Japão
PGE <sub>2</sub> /β-CD	Prostamon E®	Comprimido sublingual	Ono, Japão
OP-1206/γ-CD	Opalmon®	Comprimido	Schwartz, Alemanha
Piroxicam/β-CD	Brexin®, Flogene®, Cicladon®	Comprimido, solução, granulado, supositório	Chiesi, Itália
Benexate/β-CD	Ulgut®, Lonmiel®	Cápsula	Teikoky, Japão
Iodina/β-CD	Mena-Gargle®	Solução	Teikoky, Japão
Dexametasona/β-CD	Glymesason®	Pomada	Fulinaga, Japão
Nitroglicerina/β-CD	Nitropen®	Comprimido sublingual	Nihon Kayaku, Japão
Cefotrima-hexetil/β-CD	Pansporin T®	Comprimido	Takeda, Japão
Cefalosporina/β-CD	Meiact®	Comprimido	Meiji, Seika, Japão
Ácido tiaprofênico/β-CD	Surgamyl®	Comprimido	Roussel-Maestrelli, Itália
Difenidramina/β-CD	Stada-Travel®	Comprimido mastigável	Stada, Alemanha

Tabela 4 – Exemplos de complexos de inclusão comercializados. Retirado de Figueiras e Veiga, 2011.

## VI.2. Vantagens e Desvantagens

As nanopartículas podem ser, de fato, ferramentas úteis para contornar problemas existentes em sistemas de diagnóstico e terapêutica clássicos. E com a sua utilização podem surgir produtos farmacêuticos e dermocosméticos mais eficazes, assim como novos métodos de diagnóstico e terapêutica. Mas apresentam, cada uma delas, problemas face a possíveis vias de administração, utilização de grupos de fármacos, biodisponibilidade, biocompatibilidade e estabilidade.

### VI.2.i. Vantagens

Todas as nanopartículas, utilizadas como sistemas de veiculação de fármacos, apresentam a capacidade de mascarar ou modificar propriedades físico-químicas dos compostos, e protegê-los de processos de degradação e de interações indesejadas. Isto permite utilizar fármacos através de vias de administração que não poderiam ser escolhidas devido a problemas de solubilidade, estabilidade e características organolépticas dos fármacos (Jansook *et al*, 2010).

O tamanho das gotículas das nanoemulsões, das nanoesferas e nanocápsulas, SLNs, NLCs, e alguns lipossomas, permite a sua utilização em injetáveis, quer intra-venosos, intra-musculares ou subcutâneos (Kayser *et al*, 2004). As nanopartículas podem circular pelos vasos sanguíneos e tomarem partido do efeito de EPR, que ocorre naturalmente em tecidos inflamados e em tumores. Este tipo de vetorização passiva, permite só por si, um aumento da eficácia do fármaco no local, e uma diminuição de efeitos adversos (Bae e Lee, 2012).

Todos os sistemas, à excepção das nanoemulsões, são passíveis de serem conjugados ou revestidos com ligandos que permitam reconhecimento a nível molecular das nanopartículas. Isto é, podem ser capazes de vetorização ativa e de apresentar especificidade para tecidos, células, bactérias, vírus, ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas, se as marcarmos para esse efeito (Torchilin, 2012).

A elevada capacidade de modificação das nanopartículas permite, dentro de um dos tipos, milhares de formulações com diferentes perfis farmacocinéticos (Bae e Lee, 2012). Podemos incluir polímeros sensíveis a estímulos para modular a libertação do fármaco, anticorpos para vetorização ativa ou para pesquisa de antigénios, revestimentos de PEG que impeçam a opsonização das partículas e remoção por parte do SRE, e aumentem o tempo efetivo na circulação sanguínea das mesmas, entre outros componentes que afetam a sua atividade (Torchilin, 2012).

A utilização de nanopartículas magnéticas e de QDs, permite um aumento de sensibilidade dos métodos analíticos, e permite uma vetorização de contrastes associados às nanopartículas para locais a analisar (Franz *et al*, 2005).

## **VI.2.ii. Desvantagens/Limitações/Problemas**

Uma das vantagens, que também se traduz como desvantagem, é o seu tamanho que fornece às partículas uma elevada área de superfície, uma elevada possibilidade de interação com células e moléculas, e probabilidade de passarem por vias que não são acessíveis a mais nenhuma partícula (Hommos *et al*, 2009). Podem permanecer retidas em locais indesejados, e serem rapidamente eliminadas após reconhecimento como corpos estranhos por parte do SRE e seus órgãos, como o baço, medula óssea e fígado (Benoit *et al*, 2009).

Muitas das partículas apresentam baixa capacidade de carga, presença de formas coloidais diferentes, resultantes de modificações lipídicas, instabilidade no armazenamento e administração, não apresentam caracterização a nível molecular, para determinação da homogeneidade do fármaco na matriz, e a liofilização de nanopartículas poliméricas é, muitas vezes, necessária para evitar a degradação do polímero e destruição dos sistemas (Mäder e Mehnert, 2001).

Com o passar dos anos, aumentou o interesse acerca da potencial toxicidade de materiais nanométricos, mas a informação ainda é muito limitada. Esse potencial é determinado pela biocompatibilidade e metabolismo de qualquer nanomaterial. A utilização de grandes quantidades de excipientes como surfactantes, por exemplo, pode levar a alguma citotoxicidade por interação desses agentes tensioativos com as membranas celulares (Hommos *et al*, 2009). A utilização de solventes orgânicos na produção das nanopartículas pode ser causa de citotoxicidade se a remoção do solvente não for completamente realizada (Mäder e Mehnert, 2001).

## VII. Perspetivas Futuras

Um dos passos a seguir será o de conjugar diversas estratégias de vetorização e libertação de fármaco nos sistemas para veiculação de fármacos. Embora estejam bem conhecidas as capacidades de certos polímeros, quando incorporados nas nanopartículas, de fornecerem às mesmas a capacidade de responderem a estímulos como a temperatura, luz, e pH, ainda poucas nanopartículas apresentam estas tecnologias “Smart”. Por exemplo, o pH baixo encontrado em endossomas ou tecidos tumorais, pode ser utilizado para induzir a libertação de fármaco somente nesses locais e reduzir os efeitos adversos dos fármacos veiculados (Brewer *et al*, 2011).

O estabelecimento de especificações legais e critérios de qualidade dos produtos nanométricos é, também, essencial para a uniformização, a nível europeu e internacional, de normas que regulamentam estes produtos, permitindo uma maior segurança e consistência na atividade. A definição de um produto como “nanomaterial”, através de normas legislativas, requer que as suas aplicações, a sua produção e o seu controlo de qualidade sejam, de igual modo, legisladas de maneira a que as nanopartículas sejam utilizadas de maneira segura e reprodutível (Potocnik, 2011).

A terapia génica é muito estudada, utilizando nanopartículas como vetores génicos. As nanopartículas carregadas com ácidos nucleicos devem ultrapassar as barreiras citoplasmáticas e nucleares. Isto obriga a que consigam ser introduzidas nas células por endocitose mediada por receptores, escaparem dos compartimentos endo-lisossomais e serem transportadas até ao núcleo. A utilização de nanopartículas com propriedades catiónicas permite condensar ácidos nucleicos, de carga contrária, e libertá-los de maneira sustentada, aumentando a eficácia da transformação celular (Chen e Mohanraj, 2006).

As nanopartículas poderão permitir a síntese de novos nanomateriais para tratamentos de queimaduras e fraturas, como novos moldes biocompatíveis para o crescimento de novos tecidos, por exemplo (Pourmand *et al*, 2012).

Os nanorobôs, apresentarão nanomateriais como as nanopartículas descritas ao longo deste trabalho. Estes poderão providenciar tratamentos personalizados com reduzidos efeitos adversos, combinando a terapia farmacológica, agentes de contrastes, e marcadores, com diagnósticos rápidos e cirurgias á escala microscópica. Embora as

nanopartículas melhorem significativamente a eficácia, conforto e velocidade dos tratamentos, os nanorobôs serão ainda mais revolucionários. Os nanorobôs poderão induzir analgesia local, manipular tecidos e reparar lesões, em intervenções dentárias. Irregularidades em genomas celulares poderão ser detetados e corrigidos pelos nanorobôs, corrigindo patologias genéticas, combatendo e evitando a expressão de oncogenes. Embora em fase de “design”, os programas como o NCD, nanorobot control design, são simuladores que permitem estudar as interações dos nanorobôs com o nosso organismo, e dar ideias de como será o futuro (Durairaj e Sivasankar, 2012).

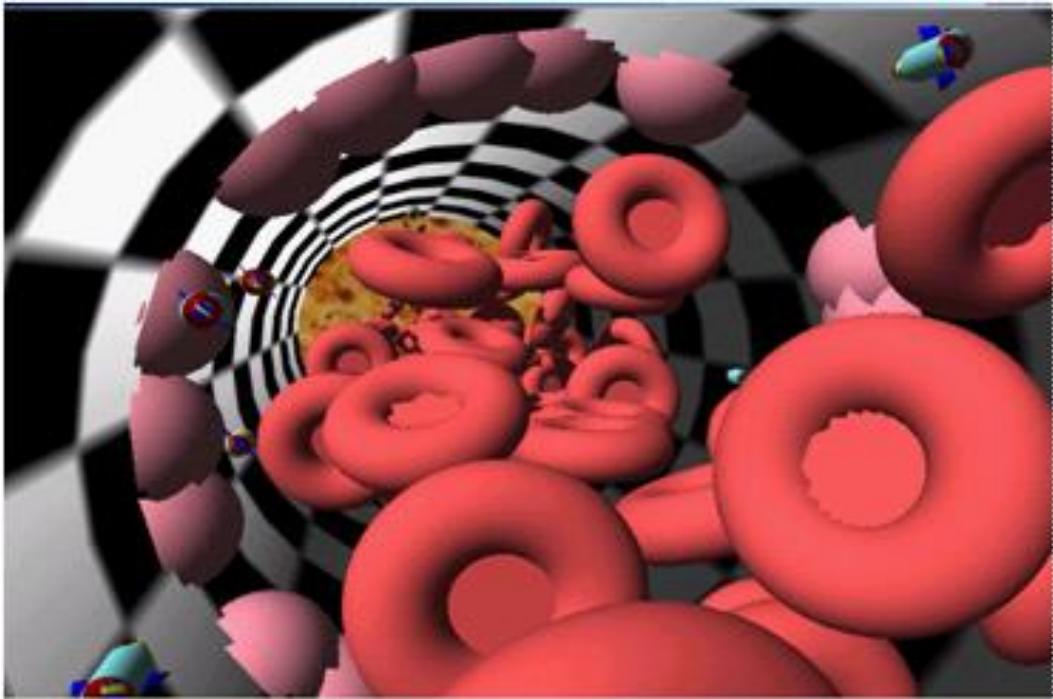


Figura 12 – Nanorobôs desenhados para redução das lesões ateroscleróticas no coração. Retirado de Durairaj e Sivasankar, 2012.

## VIII. Conclusão

As nanopartículas são potencialmente muito úteis como sistemas de veiculação de fármacos. Capazes de veicular uma panóplia de agentes terapêuticos, com vetorização ou libertação modificada. São sistemas completamente adaptáveis a uma variedade de aplicações e que permitem contornar problemas das formas farmacêuticas convencionais, aumentando a eficácia dos tratamentos medicamentosos que existem atualmente. Essa adaptação é efetuada por modificação da formulação, quantidades e tipos de excipientes utilizados, ou após a sua produção, com revestimentos protetores e grupos funcionais de vetorização que modifiquem o comportamento fisiológico das nanopartículas.

Pelos dados existentes, ainda muito estudo é necessário para garantir sistemas reprodutíveis em termos de farmacocinética, estabilidade de armazenamento melhorada, mecanismos e vias biológicas conhecidas, e com comportamento *in vivo* bem definido. Mas as informações que já possuímos permitem prever que as nanopartículas podem ser capazes de revolucionar técnicas de diagnóstico, monitorização e o tratamento de vários estados patológicos.

As suas propriedades físico-químicas e comportamentos podem ser utilizadas para inúmeras aplicações, sendo que a sua formulação perfeita para cada via de administração, para cada fármaco e para cada patologia, um verdadeiro e promissor desafio de tecnologia farmacêutica e de produção de novos sistemas terapêuticos.

## IX. Bibliografia

Al-Hilal T.A., Alam F., Byun Y. (2013). Oral drug delivery systems using chemical conjugates or physical complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.002>> [Consultado em 19/3/2013]

Allen C., Huynh L., Neale C., Pomès R. (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.

Almeida A.J., Ribeiro H.M., Simões S. (2011). Micro e nanoemulsões. In: Lopes C.M., Souto E.B. *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 271-291.

Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Loftsson T., Moya-Ortega M.D. (2012). Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 428, pp.152-163.

Alves A.C., Morgado R., Prista L.N. (1996). Tecnologia Farmacêutica, III volume, 4ª Edição, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 2025-2083.

Anton N., Benoit J., Saulnier P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release*, 128, pp. 185-199.

Aresta A., Calvano C.D., Cellamare S., De Gigilo E., Trapani A., Zamboni C.G. (2013). Development and analytical characterization of vitamin (s)-loaded chitosan nanoparticles for potential food packaging applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 15, pp. 1-12.

Arrais J., Cabral Marques H.M., Carvalho C., Conduto C., Pontes P., Salústio P.J., Sanches I. (2011). Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release. *Pharmaceutical Sciences Technology*, 12(4), pp. 1276-1289.

Azemar N., Garcia-Celma M.J., Izquierdo P., Nolla J., Solans C. (2005). Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, pp. 102-110.

Bae Y., Lee H.J. (2012). Pharmaceutical differences between Block Copolymer Self-Assembled and Cross-Linked Nanoassemblies as Carriers for Tunable Drug Release. [Em linha]. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-012-0893-3>> [Consultado em 2/12/2012].

Bagalkot V., Gao X., Probst C.E., Zrazhevskiy P. (2012). Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.036>> [Consultado em 3/4/2013].

Bagby T.R., Cai S., Forrest M.L., Yang Q. (2011). Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp. 901-908.

Baik M.H., Lee S.Y. (2010). Colloidal stability of bentonite clay considering surface charge properties as a function of pH and ionic strength. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16, pp. 837-841.

Balabathula P., Bhattacharjee H., Mandal B., Mital N., Sah H., Thoma L.A., Wood G.C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010>> [Consultado em 24/3/2013].

Becker W., Butler M., Faye R., Grice J.E., Lin L.L., Prow T.W., Robertson M.S., Robertson T.A., Soyer H.P., Wurm E.M.T., Yoong C. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp. 470-491.

Benito J.M., García Fernández J.M., Ortiz Mellet C. (2011). Cyclodextrin-based gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 40, pp. 1586-1608.

Benoit J.P., Huynh N.T., Passirani C., Saulnier P. (2009). Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 379, pp. 201-209.

Betberder D., Dombu C.Y. (2012). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.070>> [Consultado em 20/5/2013].

Bochot A., Fattal E. (2012). Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *Journal of Controlled Release*, 161, pp. 628-634.

Boyd B.J., Dong Y. (2011). Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *International Journal of Pharmaceutics*, 417, pp. 101-111.

Boyd B.J., Liu Q. (2013). Liposomes in biosensors. *Analyst*, 138, pp. 391-409.

Brewer E., Coleman J., Lowman A. (2011). Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*, [Em linha]. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/408675/>> [Consultado em 7/4/2013].

Burgess D.J., Costa A.P., Khan M.A., Xu Xiaoming (2012). Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 434, pp. 349-359.

Burt H., Letchford K. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, pp. 259-269.

Byrne M.E., Sundaram P., Webster D.M. (2013). Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.12.009>> [Consultado em 20/3/2013].

Calzolari L., Gibson N., Gilliland D., Klein C., Linsinger T., Roebben G., Rossi F. (2012). Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial”. *Joint Research Centre Reference Report*, JRC73260, pp. 9-49.

Car H., Markiewicz K.H., Niemirowicz K., Wilczewska A.Z. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64, pp. 1020-1037.

Chang C.B., Graves S.M., Mason T.G., Meleson K., Wilking J.N. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, pp. 636-664.

Chen Y., Mohanraj V.J. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), pp. 561-573.

Chiu W, Goodwin J.T., Li F., Li K.C., Li Z., Khant H.A., O'Neill B.E., Qin G., Xin R.(2011). Partially polymerized liposomes: stable against leakage yet capable of instantaneous release for remote controlled drug delivery. *Nanotechnology*, [Em linha]. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/0957-4484/22/15/155605>> [Consultado em 19/3/2013].

Couvreur P., Gref R., Laza-Knoerr A.L. (2010). Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 18(9), pp. 645-656.

Crommelin D.J.A., Kersten G.F.A. (2003). Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*, 21, pp. 915-920.

Date A.A., Patravale V.B. (2004). Current strategies for engineering drug nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, pp. 222-235.

Delgado A.V., Gonzalez-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., Liklema J. (2007). Measurement and Interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid Interface Science*, 309, pp. 194-224.

Dukhin A.S., Goetz P.J. (2004). Ultrasound for characterizing colloids. In: Markovic B., Somasundaran P., *Concentrated Dispersions, theory, experiments and applications*. Washington DC, American Chemical Society symposium series, pp. 91-120.

Durairaj R.B., Sivasankar M. (2012). Brief Review on Nano Robots in Bio Medical Applications. *Advances in Robotics & Automation-Open Access*, [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/ara.1000101>> [Consultado em 10/4/2013].

Elaissari A., Fessi H., Mora-Huertas C.E. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, pp. 113-142.

Erickson D., Li D., Ren L., Sze A. (2003). Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261, pp. 402-410.

European Commission (2012). Second Regulatory Review on Nanomaterials. *Communication from the commission to the european parliament, the council and the european economic and social committee*, pp. 2-15.

European Food Safety Authority (2009). The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. *The European Food Safety Authority Journal*. European Food Safety Authority, pp. 1-39.

Ferreira D.C., Martins S., Santos D., Silva A.C., Souto E.B. (2011). Nanopartículas Lipídicas. In: Lopes C.M., Souto E.B. *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 297-324.

Figueiras A.R., Veiga F. (2011). Libertação modificada por inclusão do fármaco em ciclodextrinas. In: Lopes C.M., Souto E.B. *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 347-369.

Flores C.E. (2013). Planctomycetes cell viability studies: perspectives of toxicity assessment using zeta potencial. In: Flores C.E. *Dissertação de Mestrado*. Porto, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pp. 35-37.

Franz E., Gallet S., Gangopadhyay P., Persoons A., Verbest T. (2005). Novel Superparamagnetic Core(Shell) Nanoparticles for Magnetic Targeted Drug Delivery and Hyperthermia Treatment. *IEEE Transactions on Magnetics*, 41(10), pp. 4194-4196.

Franzen U., Østergaard J. (2012). Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1267, pp. 32-44.

Fréchet J.M.J., Kieler-Ferguson H.M., Szoka Jr F.C. (2013). Clinical developments of chemotherapeutic nanomedicines: polymers and liposomes for delivery of camptothecins and platinum(II) drugs. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1209>> [Consultado em 26/2/2013].

Gadhve M.V., Gaikwad D.D., Grampurohit N.D., Jadhav S.L., Shelke P.K., Shinde S.K. (2012). Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, pp. 331-334.

González C., Gutiérrez J.M., Maestro A., Nolla J., Pey C.M., Solé I. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13, pp. 245-251.

Goodger Z.V., Rajendran L., Udayar V. (2012). Lipid-anchored drugs for delivery into subcellular compartments. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), pp. 215-221.

Hardman R. (2006). A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspectives*, 14(2), pp. 165-171.

Haynes C.L., Van Duyne R.P. (2001) Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, pp. 5599–5611.

Hengstler J.G., Marchan R., Reif R. (2012). Toxicology of magnetic nanoparticles: disturbed body iron homeostasis?. *Archives of Toxicology*, 86, pp. 683-684.

Hennink W.E., van de Manakker F., van Nostrum C.F., Vermonden T. (2009). Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 10(12), pp. 3157-3172.

Hirota S. (1998). Physicochemical specification of drug carrying liposomes for the quality control in the industrial production. *International Journal of Pharmaceutics*, 162, pp. 185-194.

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

Husseini G.A., Pitt W.G. (2008). Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Review*, 60, pp. 1137-1152.

IUPAC (1997). eletrokinetic potencial,  $\zeta$ . *IUPAC Gold Book*, [Em linha]. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/E01968.html>> [Consultado em 10/3/2013].

Jansook P., Kurkov S.V., Loftsson T., Messner M. (2009). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 387, pp. 199-208.

- Jose S., Raj S., Sabitha M., Sumod U.S. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 4(3), pp. 186-193.
- Kataoka K., Nagasaki Y., Otsuka H. (2003). PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, pp. 403-419.
- Kayser O., Müller R.H., Wissing S.A. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, pp. 1257-1272.
- Kirby B.J. (2010). Electroosmotic mobility and the electrokinetic potential. In: Kirby B.J. *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 225-244.
- Koudelka S., Turánek J. (2012). Liposomal paclitaxel formulations. *Journal of Controlled Release*, 163, pp. 322-334.
- Kreuter J. (2007). Nanoparticles-a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331, pp. 1-10.
- Labhasetwar V., Panyam J. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, pp. 329-347.
- Leung S.J., Romanowski M. (2012). Light-Activated Content Release from Liposomes. *Theranostics*, 2(10), pp. 1020-1035.
- Mäder K., Mehnert W. (2001). Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, pp. 165-196.
- Maincent P., Muchow M., Müller R.H. (2008). Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix(SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34, pp. 1394-1405.
- Malvern Instruments (2004). *Zetasizer Nano Series User Manual*, 2.1, pp. 231-242.
- Marszatt M.P. (2011). Application of Magnetic Nanoparticles in Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research*, 28, pp. 480-483.

- Matos C., Moutinho C. (2011). Lipossomas. In: Lopes C.M., Souto E.B. *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 237-264.
- McClements D.J., Rao J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), pp. 285-330.
- deMello A., van Swaay D. (2013). Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip*, 13, pp. 752-767.
- Misra R., Parveen S., Sahoo S.K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, pp. 147-166.
- Müller R.H., Radtke M. (2001). NLC™. Nanostructured lipid carriers: the new generation of lipid drug carriers. *New Drugs*, 2, pp. 48-52.
- Müller R.H., Wissing S.A. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 254, pp. 65-68.
- Potocnik J. (2011). Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union*, 275, pp. 38-40.
- Pourmand A., Pourmand M.R., Shesser R., Wang J. (2012). Application of nanomedicine in emergency medicine; A point-of-care testing and drug delivery in twenty first century. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(26), pp. 2-4.
- Reis C.P. (2011) Micro e nanopartículas biomacromoleculares. In: Lopes C.M., Souto E.B. *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 199-220.
- Rhodes C.T., Vemuri S. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70, pp. 95-111.
- Torchilin V.P. (2007). Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research*, 24(1), pp. 1-11.

Torchilin V.P. (2012). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 302-315.

Vehring R. (2008). Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharmaceutical Research*, 25(5), pp. 999-1013.