

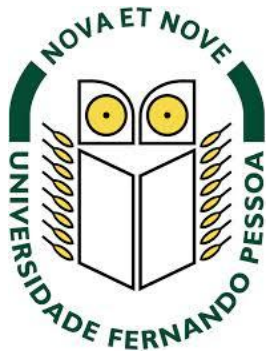
Bruna Daniela Gonçalves da Silva

Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos
biofarmacêuticos

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2015

Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos biofarmacêuticos



Bruna Daniela Gonçalves da Silva

Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos
biofarmacêuticos

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2015

Bruna Daniela Gonçalves da Silva

Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos biofarmacêuticos

*Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas*

Resumo

Os produtos biofarmacêuticos englobam os produtos à base de proteínas terapêuticas, de ácidos nucleicos e os que são usados em terapia celular. Com o crescimento exponencial que se tem verificado nos últimos anos para a biotecnologia farmacêutica, o uso clínico destes produtos tem vindo a aumentar. Contudo, tendo em conta as características físico-químicas das moléculas, têm surgido algumas limitações relativas à administração de produtos biofarmacêuticos. Com efeito, a investigação tem-se focado nos estudos relativos ao desenvolvimento de novos sistemas para veicular estes produtos. Neste contexto, e tendo em conta as vantagens que apresentam, as nanopartículas lipídicas têm sido apresentadas como promissoras.

Na primeira parte deste trabalho é efectuada uma revisão bibliográfica relativa aos diferentes produtos biofarmacêuticos, às suas características e limitações de administração. Na segunda parte, é apresentada uma revisão relativa ao estado da arte do uso de nanopartículas lipídicas para promover a administração de produtos biofarmacêuticos.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos; Nanopartículas lipídicas; Nanopartículas lipídicas sólidas; Péptidos; Produtos biofarmacêuticos; Proteínas; Vectores lipídicos nanoestructurados.

Abstract

Biopharmaceutical products include therapeutic proteins, nucleic acids and cell-based products. Within the exponential growth of pharmaceutical biotechnology the clinical use of these products has been increasing. Nevertheless, according to the physical and chemical nature of the molecules, some limitations have appeared, limiting the use of biopharmaceutical products. In this way, the number of studies related with the development of new solutions for using biopharmaceutical products has been growing. Accordingly, due to its advantages, lipid nanoparticles have been presented as promising candidates.

The first part of this work provides a bibliographic overview of the different biopharmaceutical products, and their characteristics and limitations for therapeutic use. In the second part, is presented a review of the state-of-the-art of using lipid nanoparticles systems to improve the therapeutic efficacy of biopharmaceutical products.

Key-words: Biopharmaceuticals; Nanostructured lipid carries; Lipid nanoparticles; Nucleic acids; Peptides; Proteins; Solid lipid nanoparticles.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Catarina Silva, por todo o seu auxílio, dedicação e inteira disponibilidade durante a realização da monografia. Não posso deixar de agradecer aos meus pais, irmão e namorado por toda a paciência e carinho, foram sem dúvida um grande porto de abrigo.

Um bem-haja a todos e mais uma vez obrigada por tornarem o caminho menos árduo.

Índice

I. Introdução.....	1
II. Produtos biofarmacêuticos.....	2
2.1. Definição e características	2
2.2 Produção	10
2.3. Administração de produtos biofarmacêuticos.....	13
2.4. Novas formas farmacêuticas para a libertação de produtos biofarmacêuticos	16
III. Nanopartículas Lipídicas	17
3.1. Vantagens da utilização de nanopartículas lipídicas comparativamente aos sistemas farmacêuticos tradicionais	22
IV. Produtos biofarmacêuticos incorporados em sistemas lipídicos. Exemplos de utilização terapêutica	25
V. Conclusões e perspectivas	32
VI. Bibliografia.....	33

I. Introdução

Entre os diferentes tipos de nanossistemas lipídicos para a administração de produtos biofarmacêuticos estão as nanopartículas lipídicas. Estes sistemas têm-se demonstrado capazes de veicular os produtos biofarmacêuticos de forma eficaz, melhorando a sua biodisponibilidade e ultrapassando as limitações das formas farmacêuticas convencionais, ao mesmo tempo que promovem o sucesso da terapia (Souto et al., 2004; Müller et al., 2000).

No presente trabalho serão inicialmente descritos os diferentes produtos biofarmacêuticos, tendo em conta a sua definição, características, limitações e vias de administração. Na segunda parte do trabalho, serão apresentadas as principais características dos sistemas de nanopartículas lipídicas usados para veicular estes produtos. Por fim, é efectuada uma revisão bibliográfica, relativa aos resultados publicados recentemente na literatura científica, relativos à aplicação destes sistemas.

II. Produtos biofarmacêuticos

O conceito de produto biofarmacêutico tem vindo a evoluir ao longo dos tempos. Inicialmente eram considerados como produtos biofarmacêuticos as proteínas e péptidos terapêuticos, que eram obtidos através de técnicas biotecnológicas, usando técnicas de recombinação genética, ou a técnica do hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais. Actualmente este conceito é mais completo, pois engloba também os produtos à base de células e de ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico, DNA, e ácido ribonucleico, RNA) (Walsh, 2007). Neste sentido, a biotecnologia farmacêutica, que visa a obtenção dos produtos biofarmacêuticos, tornou-se um sector importante da indústria farmacêutica, tendo vindo a aumentar exponencialmente nos últimos anos (Knäblein, 2013). O uso clínico deste tipo de produtos está a aumentar, porque já se demonstrou eficaz no tratamento de doenças crónicas e graves, como a diabetes e o cancro, respectivamente (Silva *et al.*, 2015a).

2.1. Definição e características

A principal classe de produtos biofarmacêuticos é as proteínas terapêuticas. Os ácidos nucleicos e as células constituem classes mais recentes, que embora também sejam produtos biofarmacêuticos, não estão tão desenvolvidas (Walsh, 2007; Walsh, 2004).

Ao nível estrutural, as proteínas apresentam três conformações (Figura 1): a estrutura primária, a secundária e a terciária. Estas têm como constituinte fundamental os aminoácidos (a.a.), que são constituídos por um carbono central α , ao qual estão ligados um átomo de hidrogénio (H), um grupo amina (NH_2), um grupo carboxilo (COOH) e um grupo adicional na cadeia lateral (R). A cadeia R difere de a.a. para a.a., determinando a reactividade química dos mesmos e influenciando a conformação final.

A prolina é um a.a. especial, porque apresenta uma estrutura anelar e o seu grupo R está ligado a um átomo de azoto e a um átomo de carbono. A ligação entre os a.a. é feita por ligações peptídicas entre o resíduo do a.a. adjacente, o que implica o estabelecimento de ligações covalentes entre os grupos amina e carboxilo, fazendo com que os grupos quimicamente reactivos estejam no grupo R (Eisenhaber *et al.*, 1995; Walsh, 2007).

O grupo R dos a.a. alifáticos não polares (glicina, alanina, valina, leucina, prolina e isoleucina) são desprovidos de grupos quimicamente reactivos. A glicina tem no grupo R um átomo de hidrogénio, fazendo com que o carbono central não seja um carbono quiral (i.e. um carbono com quatro grupos químicos diferentes ligados a ele). O grupo R dos a.a. aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) não é muito reactivo quimicamente. Os a.a. polares não carregados (cisteína, metionina, serina, treonina, aspargina e glutamina) têm diferentes grupos R com pouca reactividade química. A cisteína e a metionina têm um átomo de enxofre no grupo R (sendo a cisteína mais reactiva), a serina e treonina têm no grupo R grupos hidroxilos (OH), e a aspargina e a glutamina têm no grupo R amidas (RCONH). O grupo R da arginina é uma cadeia hidrófoba com três grupos metileno (CH₂), um grupo amina e um grupo guanida ionizado. O imidazol da cadeia de histidina é uma amina terciária com capacidade de agir como catalisador nucleófilo, acelera a velocidade das reacções orgânicas de adição e substituição nucleofílica. Como se pode verificar pela análise da Figura 1a, a estrutura primária das proteínas é constituída por cadeias não ramificadas de a.a. ligados entre si, através de ligações de dissulfureto, com sequências pré-definidas e com posicionamento exacto, sendo designados por polipéptidos (Walsh, 2007; Tropp, 2012).

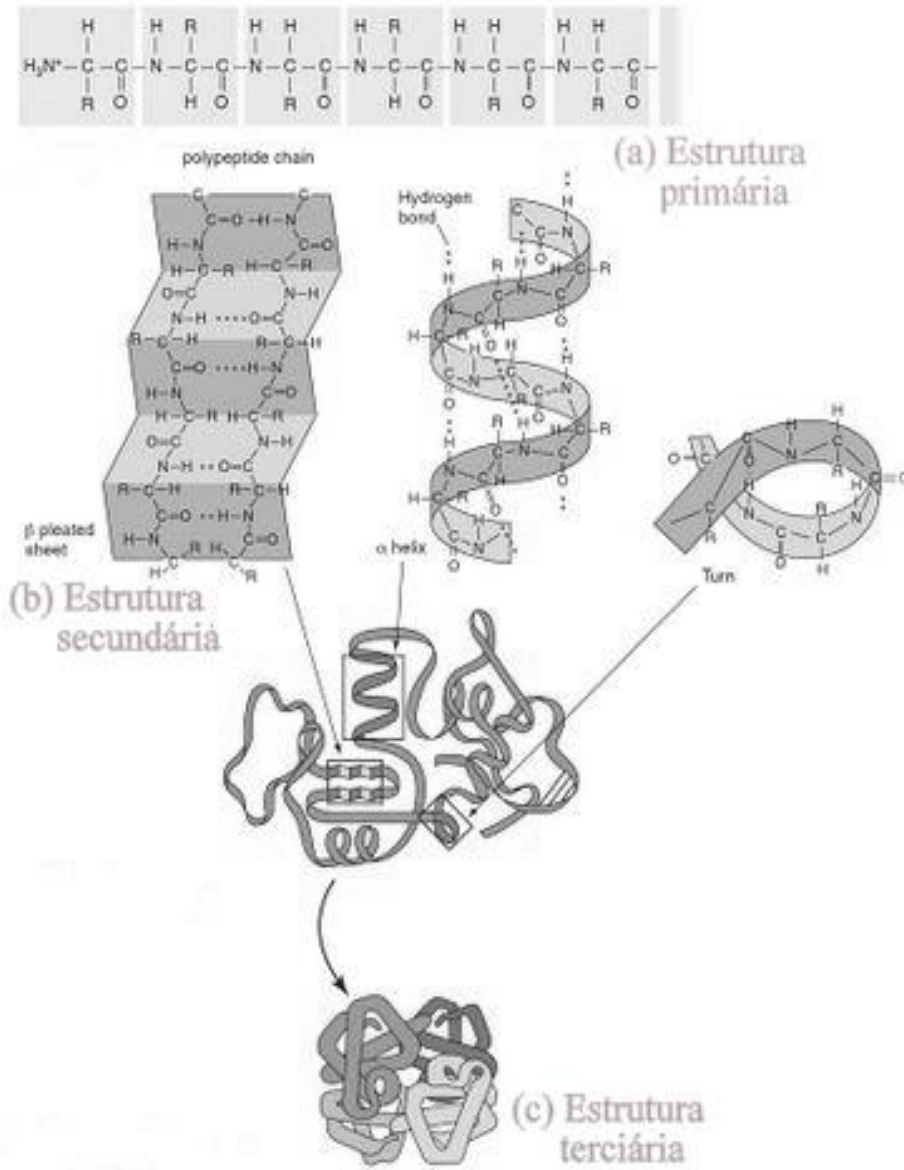


Figura 1: Representação das três estruturas das proteínas: a) primária; b) secundária; c) terciária. (Adaptado de (Tropp, 2012)).

A α -hélice e a folha β fazem parte da conformação da estrutura secundária (Figura 1b). A α -hélice tem um comprimento de 0,56 nm, estando as cadeias laterais da alanina, leucina, metionina e glutamato direccionadas para o meio exterior. Os a.a. com grupos volumosos ou com grupos laterais com a mesma carga e o a.a. prolina tendem a destabilizar a α -hélice. Esta estrutura é estabilizada por pontes de hidrogénio, com o seu interior constituído por grupos carbonilos (C=O), que estabelecem ligações de hidrogénio com o grupo amina. As folhas β são constituídas por 5-10 resíduos de a.a. em cadeias com conformação em zig-zag, sendo estabilizadas por ligações de hidrogénio. As cadeias podem estar em paralelo (i.e. na mesma direcção), antiparalelo (i.e. com direcções opostas) ou ambas (i.e. mistura de cadeias paralelas com antiparalelas) (Tropp, 2012).

A estrutura secundária é constituída por várias regiões, que variam em comprimento e permitem a deformação do polipéptido na estrutura compacta da conformação terciária. Estas regiões influenciam a função biológica da proteína (Walsh, 2007; Eisenhaber *et al.*, 1995).

A estrutura terciária (Figura 1c) adopta uma conformação tridimensional compacta, que quando apresenta grandes tamanhos possui duas ou mais subunidades designadas por domínios (Eisenhaber *et al.*, 1995; Walsh, 2007). Para terem actividade biológica, as proteínas têm de estar na sua forma tridimensional. Se houver alteração da estrutura proteica ocorre desnaturação da proteína e a consequente perda da sua função. Esta desnaturação proteica pode dever-se a alterações de pH e temperatura (Walsh, 2007).

As proteínas podem ser simples ou complexas. As complexas requerem reacções pós-tradução para poderem exercer a actividade biológica, que consistem na modificação química da cadeia proteica, que ocorre após a tradução, através de reacções de fosforilação, glicosilação e metilação (Alberts *et al.*, 2006).

Os ácidos nucleicos estão presentes em todas as células vivas e contêm a informação genética das mesmas, sob a forma de DNA ou RNA. Ao nível estrutural, estes são macromoléculas compostas por nucleótidos específicos, ligados por ligações fosfodiéster (Figuras 2 e 3). Os nucleótidos têm na sua constituição uma base azotada, um grupo fosfato e uma pentose. Existem dois tipos de bases: as purinas, compostas por adenina e guanina, e as pirimidinas, compostas por citosina, timina (presente apenas no DNA) e uracilo (presente apenas no RNA). Ambas têm como função mediar a informação genética através de processos de replicação, transcrição e tradução (Alberts *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2015b).

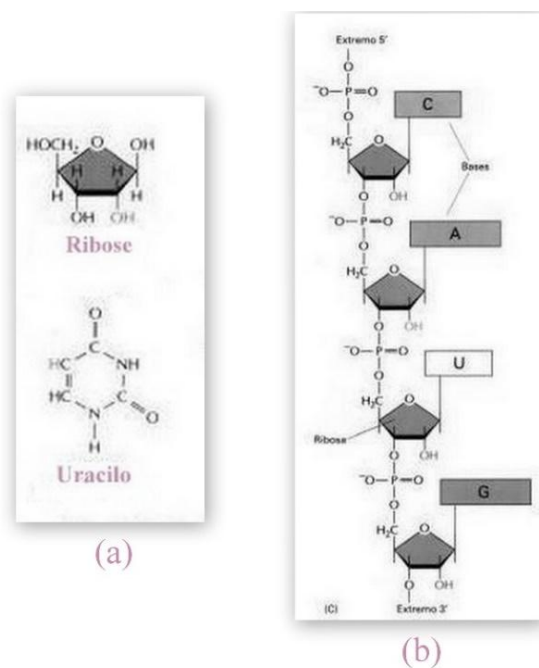


Figura 2: Estrutura do RNA: (a) Ribose e Uracilo; (b) cadeia linear. (Adaptado de (Alberts *et al.*, 2006)).

Tal como ilustra a Figura 2, o RNA tem como pentose a ribose e é constituído por uma cadeia simples de nucleótidos. Este ácido nucleico é importante na síntese das proteínas, apresentando três formas: o RNA mensageiro, que leva a informação genética até aos ribossomas; o RNA ribossomal, que se liga a proteínas específicas formando o ribossoma; e o RNA de transferência, que transporta e adiciona os a.a. específicos à cadeia de polipéptidos a ser sintetizada (Alberts *et al.*, 2006).

O DNA tem como pentose a desoxirribose e é constituído por cadeia dupla de nucleótidos, com conformação em hélice (Figura 3). As cadeias de DNA são antiparalelas, apresentando complementaridade nas sequencias de bases. Se em uma cadeia estiver uma timina, na outra cadeia, na mesma posição, terá de estar uma adenina. O mesmo acontece com a guanina e citosina. Os açúcares e os grupos fosfatos estão direccionados para o exterior (meio aquoso) e as bases estão direccionadas para o interior (meio hidrófobo). As cadeias de DNA são estabilizadas por pontes de hidrogénio (duas entre a adenina e guanina e três entre a guanina e citosina) (Walsh, 2007; Berman *et al.*, 1992).

Os ácidos nucleicos são usados em terapia genética como medicamentos. Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9, entende-se por medicamentos de terapia genética para uso humano “qualquer produto obtido por um conjunto de métodos de fabrico que visam a transferência, *in vivo* ou *ex vivo* de um gene profiláctico, de diagnóstico ou terapêutico (a saber, uma fracção de ácido nucleico), através de células humanas/animais e sua consequente expressão *in vivo*. A transferência genética implica um sistema de expressão chamado vector, que pode ser de origem vírica ou não vírica. Este vector pode também ser incluído numa célula humana ou animal.”

Com o uso clínico da terapia genética é possível prevenir, controlar ou curar doenças, através da substituição de um gene defeituoso ou da inserção de um gene normal.

Neste âmbito também se insere a tecnologia antisense e a terapia de aptâmeros. A tecnologia antisense consiste na utilização de pequenos oligonucleótidos de DNA ou RNA, capazes de inibir ou diminuir os efeitos causados pela expressão ou super-expressão de genes. Os aptâmeros são oligonucleótidos de cadeia simples ou péptidos, que se ligam a alvos moleculares com elevada especificidade e afinidade (Silva *et al.*, 2015b).

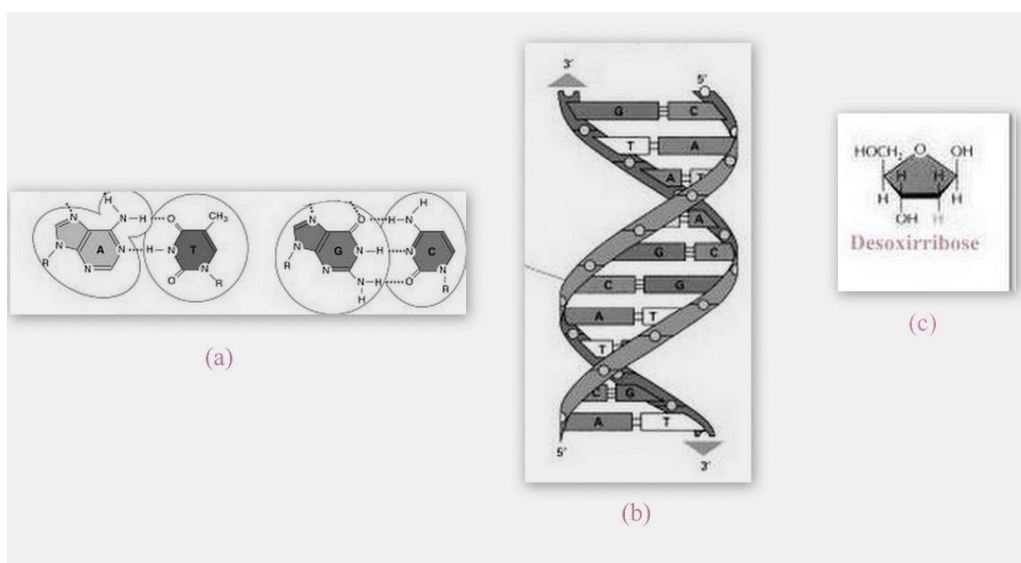


Figura 3: Estrutura do DNA: (a) ligação entre as bases; (b) dupla cadeia; (c) pentose (Adaptado de (Tropp, 2012; Alberts *et al.*, 2006)).

Recentemente descobriu-se o pequeno RNA de interferência (*small interfering RNA*, siRNA), que constitui uma alternativa promissora para a regulação da expressão dos genes. Devido à sua pequena dimensão e especificidade, o siRNA reprime a expressão de genes *in vivo* (Denli e Hannon, 2003; Boukany *et al.*, 2013).

Esta técnica é semelhante à tecnologia antisense, mas ocorre naturalmente, o que constitui uma vantagem, uma vez que a tecnologia antisense apresenta a limitação de poder afectar alvos que têm complementaridade semelhante ao alvo seleccionado (Walsh, 2005).

Para realizar terapia à base de genes é necessário garantir que os ácidos nucleicos cheguem ao núcleo da célula, para isso podem ser usados sistemas de transporte, pois os ácidos nucleicos sozinhos são pouco eficientes. Contudo, é possível melhorar o transporte isolado dos ácidos nucleicos, com o auxílio de métodos físicos (Silva *et al.*, 2015b; Al-Dosari e Gao, 2009).

Os genes podem ser veiculados através de vectores virais (por exemplo, adenovírus retrovírus recombinantes, aos quais foi retirada a capacidade de se replicar) e não virais (por exemplo, nanossistemas lipídicos). Os vectores virais têm grande eficiência no transporte, mas induzem respostas inflamatórias, podem afectar outras células para além das células alvo, o vírus pode ser transmitido para outros indivíduos e para o ambiente, o gene pode ser inserido num local errado da cadeia de DNA e pode haver sobre-expressão do gene. O principal desafio dos sistemas de transporte é aumentar a eficiência da transfecção (i.e. transferência do material genético para o núcleo da célula alvo da acção), sem que desenvolvam efeitos secundários e citotoxicidade. Neste sentido, os vectores não virais parecem ser a melhor opção, uma vez que permitem ultrapassar as desvantagens dos vectores virais (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015a).

O uso de ácidos nucleicos tem muitas limitações, pois o DNA e RNA têm características moleculares (hidrofilia, tamanho elevado e carga negativa) que dificultam a entrada dos mesmos no núcleo das células. Além disso, têm pouco tempo de circulação no sangue, pois têm de passar as várias barreiras fisiológicas antes que as enzimas os degradem ou que sejam eliminados pelas células do sistema imunológico (Silva *et al.*, 2015b).

Com os avanços da biotecnologia, foi possível desenvolver uma inovação terapêutica, recorrendo a células estaminais humanas para o tratamento ou alívio de doenças ou lesões no ser humano, através da administração de células autólogas (i.e. células do próprio indivíduo), alogénicas (i.e. células de outro indivíduo) e xenogénicas (i.e. células de outra espécie). Esta aplicação deve-se ao facto das células responderem a diferentes sinais e poderem ser direccionadas para locais específicos do organismo. No entanto, o uso da terapia celular é difícil, uma vez que as células são bastante complexas, pode ocorrer proliferação descontrolada, as suas dimensões não permitem a nanoencapsulação, sendo estas integradas em micropartículas, e ainda não existe uma total compreensão do processo de diferenciação das células estaminais (Walsh, 2007; Fischbach *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2010). Para o sucesso da sua aplicação clínica, as células devem manter a viabilidade, não devem activar o sistema imunológico e deve ser possível a sua microencapsulação, para as proteger da susceptibilidade a ambientes adversos aquando da administração (Walsh, 2007; Silva *et al.*, 2015a; Fischbach *et al.*, 2013).

2.2 Produção

Para a produção de proteínas terapêuticas recorre-se geralmente à técnica do DNA recombinante, que as produz de forma específica. Contudo, essa especificidade não é totalmente eficaz, porque podem ocorrer erros na tradução das proteínas (Harris e Kilby, 2014).

A tecnologia do DNA recombinante insere-se na área da engenharia genética. Esta técnica é constituída por duas fases principais. A primeira consiste na manipulação do DNA e engloba as etapas de isolamento, amplificação, quebra, caracterização, sequenciação e síntese química. A segunda consiste na clonagem e expressão do DNA e requer a utilização de organismos hospedeiros, onde o DNA recombinante é introduzido para a expressão das proteínas pretendidas.

De um modo geral, pode resumir-se estas fases nos seguintes passos: o DNA de interesse é isolado e, através da acção das enzimas de restrição específicas (endonucleases), é cortado, obtendo-se apenas a sequência pretendida. Este fragmento é então conjugado com o DNA de um veículo ou vector de clonagem (geralmente um plasmídeo), pela acção das enzimas ligases, obtendo-se o DNA recombinante, que vai ser introduzido no hospedeiro onde é replicado, produzindo-se as proteínas terapêuticas pretendidas (i.e. os produtos biofarmacêuticos). No final, é necessário isolar e purificar estas proteínas através de técnicas altamente sensíveis (Emery, 1984; Knäblein, 2013).

Como anteriormente referido, a maior parte dos produtos biofarmacêuticos são proteínas terapêuticas, onde estão incluídas as citoquinas, as hormonas, os factores de crescimento humano hematopoético, os factores sanguíneos, as enzimas, as vacinas e os anticorpos monoclonais. Dependendo da necessidade de efectuar reacções pós-tradução para exercer actividade biológica, as proteínas terapêuticas podem ser produzidas em hospedeiros mais ou menos complexos. As citoquinas são glicoproteínas produzidas em hospedeiros unicelulares, designadamente, os interferões são produzidos pela *E.coli* e pela *S.cerevisiae* e as interleucinas são produzidas pela *E.coli*.

As hormonas terapêuticas são sintetizadas pelas glândulas do organismo e incluem: a insulina, usada no tratamento da diabetes tipo 1, que pode ser produzida pela *E.coli* e pela *S.cerevisiae*; o glucagon, que aumenta os níveis de glicose através da activação da gluconeogénese e é produzido em *S.cerevisiae*; a hormona do crescimento (somatotropina), que é usada no tratamento de obesidade, problemas de crescimento, indução da lactação e ovulação e é sintetizada pela *E.coli*; as gonadotrofinas (hormona luteinizante - Lh, hormona folículo-estimulante humana – FSH e gonadotrofina coriónica humana – hCG), que regulam a função reprodutora e o desenvolvimento das características sexuais secundárias, são produzidas através de culturas de células de mamíferos (células do ovário de hamsters bebés – CHO, e células dos rins de hamsters adultos - BHK).

Como exemplos de enzimas temos: a dornase alfa, usada no tratamento da fibrose cística e obtida em células CHO; a alteplase, usada para dissolver coágulos sanguíneos e produzida em *E.coli*. Por outro lado, a epoetina é um factor de crescimento humano hematopoético, que tem a função equivalente da eritropoetina e é produzida em células CHO. As vacinas constituídas por fracções proteicas são desenvolvidas pela técnica de DNA recombinante. Como exemplos destas temos as vacinas contra os vírus influenza, papiloma vírus humano (HPV) e hepatite A e B (Walsh, 2007). Os anticorpos monoclonais são glicoproteínas em forma de Y, com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Ao nível funcional, estes compostos apresentam uma região constante e uma região variável, onde ocorre a ligação dos antigénios (Cardoso, 2012). Segundo a Farmcopia 9 “Os anticorpos monoclonais para uso humano são preparações de uma imunoglobulina ou de um fragmento de imunoglobulina, por exemplo, a F(ab')₂, de especificidade definida, produzida por um clone celular único. Podem ser conjugados com outras substâncias, nomeadamente com a finalidade de radiomarcção”.

Estes constituem cerca de 20% dos produtos biofarmacêuticos existentes, sendo obtidos através da engenharia genética, pela técnica do hibridoma ou do DNA recombinante (Roque *et al.*, 2004). A técnica consiste na injeção de um determinado antigénio num animal de laboratório (geralmente um ratinho) para que este produza anticorpos específicos contra esse antigénio.

De seguida, os linfócitos B do animal são isolados e incubados *in vitro*, juntamente com uma cultura de células tumorais (geralmente mieloma), ocorrendo a fusão entre as diferentes células e a formação dos hibridomas. Em cultura celular, os hibridomas dividem-se de forma intensa, expressando sempre os anticorpos específicos, que são isolados obtendo-se assim uma cultura pura de anticorpos monoclonais (Nakamura, 1982). Os anticorpos monoclonais podem ser: quiméricos e humanizados; humanizados e totalmente humanos.

Os anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados têm na região variável (tanto na cadeia leve como na cadeia pesada) sequências originárias do animal usado na imunização (ex. ratinho) com especificidade antigénica desejada e na região constante têm sequências originárias de humanos. Os humanizados possuem uma porção maior da sequência humana, a sequência não humana corresponde apenas às três sequências da zona de interacção com o antígeno, desta forma diminui o risco de desenvolver reacções imunológicas. Pode-se realizar outras alterações com o objectivo de melhorar a ligação ao antígeno. Os totalmente humanos são obtidos pela tecnologia do rDNA, sendo constituídos apenas por sequências humanas, ou seja, as regiões variáveis (tanto da cadeia leve e da cadeia pesada) são substituídas por sequências humanas e com isto apresentam menor imunogenicidade (Lima, 2007). Os anticorpos monoclonais podem ser usados para aplicações terapêuticas, clínicas e como diagnóstico (Ranade, 1989).

2.3. Administração de produtos biofarmacêuticos

Tendo em conta as suas características moleculares, os produtos biofarmacêuticos são muito susceptíveis a degradações. Por exemplo, as proteínas e os ácidos nucleicos não podem ser administrados por via oral, pois as enzimas e o baixo pH provocam alterações nas suas estruturas moleculares, fazendo com que estes percam a actividade. Por outro lado, a hidrofília, a baixa permeabilidade das macromoléculas ao longo do tracto gastrintestinal (TGI) e o efeito de primeira passagem originam uma baixa absorção destes produtos, o que pode inviabilizar a sua actividade terapêutica (Desai *et al.*, 2012; Ezan, 2013). Neste sentido, estes compostos são geralmente administrados pelas vias parentéricas, que permitem a passagem directa do fármaco do local de aplicação para a corrente sanguínea (Walsh, 2003). No entanto estas vias apresentam desvantagens, tais como dificuldade de administração, não adesão à terapêutica e elevados custos de produção. Neste contexto, os investigadores têm procurado estudar vias alternativas para a administração, como por exemplo, a nasal, transdérmica, bucal, vaginal, ocular e pulmonar (Owens *et al.*, 2003; Patton, 1996; Mitragotri *et al.*, 2014).

A via pulmonar é a alternativa mais promissora às vias parentéricas. A elevada biodisponibilidade conseguida através do epitélio pulmonar é devida ao facto deste apresentar grande área de superfície, camada de difusão fina, presença de inibidores proteolíticos, não ocorrer efeito de primeira passagem e ao baixo volume de fluidos existentes na superfície pulmonar (Walsh, 2003; Kwon *et al.*, 2013). Ao nível pulmonar as macromoléculas são bem absorvidas, sendo o seu peso molecular inversamente proporcional à taxa de absorção (i.e. quanto maior o peso, menor a taxa de absorção das moléculas) (Powell, 2004; Walsh, 2003). No entanto, para que as macromoléculas entrem na corrente sanguínea têm de atravessar as seguintes estruturas pulmonares: a monocamada de fosfolípidos que constitui o surfactante pulmonar, as células epiteliais, o interstício, a membrana basal e o endotélio vascular. Entre estas, a passagem pelo epitélio e endotélio são as maiores barreiras à absorção pulmonar de substâncias (Walsh, 2003).

A via nasal é atraente, porque apresenta uma área de superfície considerável (graças à presença das microvilosidades), altamente vascularizada, com rápida absorção, de fácil acesso e sem ocorrer o efeito de primeira passagem (Kwon *et al.*, 2013; Walsh, 2003). Apesar de somar várias vantagens, esta via de administração também apresenta desvantagens, tais como (Walsh, 2003): rápida eliminação do fármaco pela acção do movimento ciliar; presença de proteases celulares nasais; moléculas com grande tamanho têm uma taxa de absorção baixa; moléculas com tamanho superior a 10 kDa não atravessam facilmente a barreira epitelial, sendo necessário co-administrar promotores de absorção, que podem originar toxicidade ao ser utilizados por longos períodos de tempo.

A via transdérmica também constitui uma boa opção, pois evita o efeito de primeira passagem e é um processo indolor, aumentando-se a adesão à terapêutica (Prausnitz e Langer, 2008). A grande limitação desta via é a dificuldade de passagem das moléculas

pelo estrato córneo. Para contornar esta dificuldade, podem ser usados métodos físicos de promoção da absorção cutânea (Morris-Jones, 2014).

A administração na cavidade oral compreende a administração nas membranas bucal e sublingual, e tem como vantagens o acesso directo para o sistema circulatório, ausência do efeito de primeira passagem, baixo contacto com a actividade enzimática, ausência de dor durante a administração e facilidade de controlo das doses de fármaco no sangue.

O grande problema desta via de administração reside na presença da saliva, produzida pelos mecanismos fisiológicos normais, que leva à rápida eliminação das formas farmacêuticas aqui aplicadas (Khafagy *et al.*, 2007; Veuillez *et al.*, 2001).

Em suma, os principais factores responsáveis pelas limitações à administração de produtos biofarmacêuticos são o baixo tempo de semi-vida plasmática, a susceptibilidade a degradações, quando em contacto com as condições fisiológicas normais, e as elevadas dimensões moleculares das proteínas e dos ácidos nucleicos. Todos estes factores condicionam a chegada ao local alvo da acção e a passagem através das barreiras biológicas, condicionando desta forma a actividade terapêutica dos produtos (Ezan, 2013). Muitos produtos biofarmacêuticos estão à espera de aprovação para uso clínico, encontrando-se muitos já aprovados (Walsh, 2005). Com efeito, esta é uma área em desenvolvimento, sendo continuamente investigados novos produtos biofarmacêuticos, o que torna também necessário efectuar estudos relacionados com o desenvolvimento de novos os sistemas de libertação dos mesmos (Silva *et al.*, 2015a).

2.4. Novas formas farmacêuticas para a libertação de produtos biofarmacêuticos

Durante o desenvolvimento dos produtos biofarmacêuticos é crucial pensar na forma mais eficiente de os administrar aos, lembrando sempre que a biodisponibilidade e eficácia terapêutica do mesmo sejam as melhores possíveis. Tendo em conta que as formas farmacêuticas convencionais apresentam algumas limitações (como por exemplo, baixa absorção, rápida metabolização e eliminação), foram desenvolvidas formas farmacêuticas de libertação modificada (Mehnert e Mäder, 2001).

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9, uma forma farmacêutica de libertação modificada é definida como sendo uma “Preparação em que a libertação da(s) substância(s) activa(s) foi objecto, quanto à velocidade e/ou ao local onde ocorre, de uma modificação deliberada resultante de um processo específico de formulação e/ou de um método de fabrico especial, sendo portanto diferente da que se verifica com uma forma farmacêutica de libertação convencional administrada pela mesma via.”

Actualmente existem diversos tipos de formas farmacêuticas de libertação modificada, como por exemplo: micropartículas, lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanopartículas (lipídicas, proteicas, metálicas e poliméricas), nanocristais de fármaco, dendrimeros e fulerenos. Entre estes, as nanopartículas lipídicas têm sido apresentadas como sendo os sistemas mais promissores, tendo em conta as vantagens que apresentam, como a biocompatibilidade e a baixa toxicidade (Elia B. Souto e Lopes, 2011).

III. Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas lipídicas são sistemas coloidais de libertação de substâncias activas, criados nos anos 90. Estes sistemas consistem em dispersões aquosas de nanopartículas sólidas, à temperatura ambiente e corporal, que se encontram estabilizadas por um ou dois agentes tensoactivos. Existem duas gerações de nanopartículas lipídicas, a primeira geração são as nanopartículas de lípidos sólidos (*solid lipid nanoparticle, SLN*) e a segunda geração os vectores lípidos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers, NLC*). As SLN são constituídas apenas por lípidos sólidos à temperatura ambiente, enquanto que os NLC apresentam uma mistura de lípidos líquidos e sólidos (Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2002b).

As dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas apresentam uma fase lipídica, composta por lípidos sólidos (no caso das SLN) ou misturas de lípidos sólidos e lípidos líquidos (no caso dos NLC), podendo ir de 0,1% até 30% (m/m), que se encontra dispersa em um meio aquoso e estabilizada por tensoactivos, podendo ir de 0,5% até 5% (m/m) (Castro *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 1997; Pardeike *et al.*, 2009).

As matérias-primas usadas na preparação de sistemas de nanopartículas lipídicas são biocompatíveis, biodegradáveis e seguras para uso humano (i.e. substâncias *GRAS - Generally Recognized as Safe*) (Muller *et al.*, 2011). Entre os lípidos sólidos mais usados temos os triglicéridos puros, tripalmitina e triestearina, tricaprina e trilaurina; os ácidos gordos, como o ácido esteárico e o ácido palmítico; as ceras, como por exemplo, o palmitato de cetilo; misturas de triglicéridos, como Witepsol® e Softisan® e as gorduras como behenato de glicerilo, monoestearato de glicerilo e palmitoestearato de glicerilo. Como exemplos de lípidos líquidos, temos o (Miglyol®) e (Cetiol®). Os tensoactivos mais usados são o polissorbato 80 e o poloxamer 188 e 407, fosfolípidos e tiloxapol (Müller *et al.*, 1997; Schäfer-Korting *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

As nanopartículas lipídicas têm demonstrado vantagens em relação aos outros sistemas de libertação de substâncias activas (por exemplo, nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanoemulsões), tais como (Schäfer-Korting *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011a; Mehnert e Mäder, 2001; Müller, 2007; Schöler *et al.*, 2000): aumentam a biodisponibilidade das substâncias encapsuladas; apresentam elevada estabilidade ao longo do tempo; permitem obter uma libertação modificada das moléculas veiculadas; a matriz sólida confere protecção das moléculas contra degradações; baixa ou total ausência de toxicidade, devido à utilização de excipientes fisiológicos e biocompatíveis; elevada eficácia de encapsulação; facilidade de produção em larga escala; não é necessário recorrer ao uso de solventes orgânicos durante os processos de produção; baixo custo de produção; capacidade de direccionar as substâncias encapsuladas para locais alvo.



Figura 4: Estrutura das SLN e NLC (Adaptado de (Muller *et al.*, 2011)).

A morfologia das nanopartículas lipídicas é influenciada pela composição da formulação, no que diz respeito ao tipo de lípido(s), natureza química da substância activa, tipo de agente(s) tensioactivo(s), método de produção, capacidade de carga, rendimento de produção, eficiência de encapsulação e tamanho da partícula (Silva *et al.*, 2011a; Schäfer-Korting *et al.*, 2010).

A incorporação de substâncias activas nas nanopartículas lipídicas depende do coeficiente de partição, tipo de lípido(s) e tensioactivo(s), e técnica de produção (Silva *et al.*, 2015a). Com efeito, existem três modelos teóricos possíveis para descrever a incorporação de moléculas nas SLN. As SLN tipo I, que consistem no modelo de matriz homogénea, onde a substância activa está dispersa no núcleo do sistema lipídico, na sua forma molecular ou na forma de aglomerados amorfos. O modelo das SLN tipo II é definido como modelo de parede de substância activa, onde o núcleo lipídico é revestido por uma parede externa que contém uma grande quantidade de substância activa. Nas SLN tipo III, a substância activa está no núcleo da partícula, que se encontra revestido por uma parede lipídica externa, sendo o inverso do modelo SLN tipo II. Para além destes três modelos podem existir os modelos mistos, onde as SLN apresentam características dos vários modelos (Silva *et al.*, 2011a).

As SLN têm desvantagens que podem limitar o seu uso, tais como (Silva *et al.*, 2011a; Pardeike *et al.*, 2009): a elevada quantidade água presente nas formulações; a eficiência de carga diminui durante o armazenamento, uma vez que os cristais lipídicos tendem a passar da forma α (mais instável) para a forma β (mais estável), onde adquirem uma configuração sem imperfeições, levando à expulsão da substância activa do seu interior.

Os NLC surgiram para ultrapassar as limitações das SLN, designadamente, aumentar a capacidade de carga e evitar a expulsão de substância activa durante o armazenamento. A Figura 4 ilustra as diferenças estruturais entre as SLN e os NLC.

A fase lipídica dos NLC é constituída por uma mistura de um lípido sólido com um lípido líquido, numa razão que pode ir de 70:30 até 90:10 (lípido sólido:lípido líquido). Estes são estabilizados por um ou dois tensioactivos e têm estruturas menos organizadas que as SLN (Riangjanapatee e Okonogi, 2012; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2015a).

Tal como nas SLN, existem três modelos teóricos para explicar a incorporação da substância activa nos NLC (Silva *et al.*, 2011a): NLC tipo I, denominados como modelo do cristal imperfeito, pois possuem várias imperfeições na matriz. São obtidos por mistura de lípidos sólidos com pequenas quantidades de lípidos líquidos; NLC tipo II, que consistem no modelo amorfo, sendo constituídos por uma mistura de lípidos especiais, que re-cristalizam após a homogeneização; NLC tipo III são definidos por tipo múltiplo, que constituem um sistema semelhante ao de uma emulsão múltipla do tipo óleo em lípido sólido em água (O/LS/A).

O uso dos NLC para incorporação de substâncias activas é atractivo, porque apresenta muitas vantagens, tais como (Das *et al.*, 2014; Riangjanapatee e Okonogi, 2012; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011a): grande capacidade de carga de substância activa; aumento da estabilidade das substâncias incorporadas; controlo da libertação; não expulsão da substância activa durante o armazenamento.

Através de estudos *in vivo* e *in vitro* verificou-se que a degradação lipídica não contribui para a citotoxicidade dos sistemas lipídicos. Esta deve-se à degradação de produtos celulares, ao facto das nanopartículas aderirem à membrana das células ou serem interiorizadas por estas. Apesar dessa possibilidade, a citotoxicidade das nanopartículas lipídicas é baixa, o que as torna uma opção viável por via intravenosa, devendo, no entanto, controlar-se o tamanho das nanopartículas (Müller *et al.*, 1997).

A estabilidade das nanopartículas lipídicas é afectada por parâmetros como tamanho, carga de superfície, grau de cristalinidade e modificação da estrutura lipídica e coexistência de estruturas coloidais adicionais (Müller *et al.*, 2000).

Tendo em conta a biocompatibilidade dos sistemas de SLN e NLC, estes podem ser usados em várias vias de administração, tais como: oral, ocular, tópica, transdérmica, pulmonar e parentérica (Silva *et al.*, 2011a; Raju *et al.*, 2014).

Apesar de ter sido demonstrado, por diversos grupos de investigação, que as nanopartículas lipídicas são eficazes na veiculação de fármacos, estes sistemas ainda não estão aprovados, porque têm demonstrado falhas de estabilidade, nos estudos *in vivo* (Müller *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2015a; Martins *et al.*, 2007). Neste sentido, o uso das SLN e dos NLC apenas está aprovado para a via tópica, na aplicação de cosméticos. Estas podem ser administradas por (Müller *et al.*, 2002b): incorporação das dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas em produtos já existentes (por exemplo, hidrogéis e cremes); produção directa de géis de SLN ou NLC, por adição de agentes gelificantes à fase aquosa; utilização de SLN ou NLC com fase lipídica com elevada concentração, obtendo-se consistência semi-sólida de creme.

De modo semelhante ao que acontece com outros sistemas à base de nanopartículas, é possível modificar a superfície das nanopartículas lipídicas através da conjugação com moléculas, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG), criando sistemas furtivos com capacidade de escapar à fagocitose, pois o complexo não é detectado pelas células do sistema reticuloendotelial, aumentando-se assim o seu tempo de circulação. Também é possível modificar a superfície dos complexos através da adsorção de ligandos (por exemplo, anticorpos monoclonais) que os direccionam para os locais alvo da acção terapêutica (Kuo e Shih-Huang, 2014).

O método de produção das nanopartículas lipídicas é relativamente simples (Silva *et al.*, 2011b; Patil e Pandit, 2007): o(s) lípido(s) e a substância activa são aquecidos a uma temperatura 5-10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido; em paralelo, a água e o(s) tensoactivo(s) são aquecidos à mesma temperatura. A fase aquosa é adicionada à oleosa, quando o lípido sólido estiver fundido e a substância activa solubilizada neste.

De seguida, emulsificam-se as duas fases a elevada velocidade, com o auxílio de um agitador automático (por exemplo, um Ultra-turrax[®]), formando-se uma pré-emulsão O/A. De seguida é aplicada a esta pré-emulsão um processo de elevada energia, para que as suas gotículas se quebrem e adquiram tamanhos nanométricos. Para o efeito é geralmente usada a energia dos ultrassons (sonicador) ou a homogeneização a alta pressão (homogeneizador), que geram uma energia de cavitação que provoca a colisão e consequente quebra das gotículas. Por fim, é necessário arrefecer a nanoemulsão produzida até à temperatura ambiente, para que o lípido solidifique e se formem as SLN ou os NLC.

3.1. Vantagens da utilização de nanopartículas lipídicas comparativamente aos sistemas farmacêuticos tradicionais

Apesar do uso comercial das SLN e NLC estar confinado à via tópica, estes sistemas têm grande potencial de aplicação para as vias oral e parentérica. A biodisponibilidade oral dos fármacos pode ser melhorada graças à presença dos lípidos, que melhoram a sua absorção no TGI. Por outro lado, as moléculas encapsuladas podem ser protegidas contra a degradação ao longo do TGI e a sua libertação pode ser controlada, o que reduz os efeitos secundários de alguns fármacos (Fricker *et al.*, 2010; Muchow *et al.*, 2008). Dado o seu tamanho reduzido, as SLN e NLC podem ser administradas pelas vias parentéricas, tais como a intravenosa, intramuscular e subcutânea.

Estas vias de administração tornam-se atractivas, uma vez que é possível controlar os níveis plasmáticos de fármaco, proteger as moléculas encapsuladas da hidrólise química e enzimática e aumentar a biodisponibilidade dos fármacos (Wissing *et al.*, 2004; Joshi e Müller, 2009).

Por outro lado, as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas podem ser veiculadas em associação com formas farmacêuticas convencionais, como por exemplo (Chakraborty *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2008; Pouton e Porter, 2008; Date *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2002a): incorporadas em cápsulas de gelatina mole; reduzidas a pó através de técnicas de granulação e associadas a lubrificantes e diluentes, para preparar comprimidos ou cápsulas de gelatina dura; incorporadas em bases de consistência semi-sólida (cremes ou geles) para aumentar a viscosidade e facilitar a aplicação tópica.

Para além disso, as nanopartículas têm (Silva *et al.*, 2015a; Celia *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2006): uma área de superfície considerável, que aumenta o contacto e, conseqüentemente, a absorção das moléculas encapsuladas; conseguem ultrapassar a barreira hemato-encefálica, sem que seja necessário a modificação das propriedades biofarmacêuticas da substância activa e/ou sem destruição da barreira; promovem a entrega de fármacos pouco solúveis; podem sofrer alterações na sua superfície, como por exemplo, a associação de moléculas que promovam o seu direccionamento para os órgãos-alvo da acção ou evitem a rápida eliminação da circulação, por parte das células do sistema imunológico.

Alguns tratamentos com anti-tumorais têm pouco sucesso, porque as células desenvolvem resistência aos fármacos. Neste sentido, foi demonstrado que a veiculação desses fármacos em SLN permite ultrapassar esta limitação (Anajwala *et al.*, 2010). Assim as SLN podem ter um papel activo na terapia, na detecção precoce e na triagem de tumores (Nie *et al.*, 2007).

Na administração oftálmica, a barreira ocular e a baixa solubilidade são duas grandes limitações dos sistemas tradicionais, o que diminui a biodisponibilidade dos fármacos, as SLN promovem tempo de residência na superfície ocular e a permeabilidade na córnea, aumentando assim a biodisponibilidade dos fármacos. Alguns estudos realizados com fármacos anti-inflamatórios, demonstraram que as SLN melhoraram a sua biodisponibilidade após administração ocular (Gan *et al.*, 2013; Souto *et al.*, 2010). A ciclosporina A tem pouca solubilidade em água, o que diminui a sua biodisponibilidade. A libertação do fármaco pode ocorrer por difusão na matriz e por degradação da mesma.

Como é difícil simular a degradação no intestino, este efeito não pode ser revisto, sendo necessário o desenvolvimento de um ensaio *in vivo* para garantir a optimização das dispersões de SLN quando incorporam a ciclosporina A, evitando o risco da concentração plasmática ultrapassar a janela terapêutica (Müller *et al.*, 2008). A associação da nanotecnologia e à biotecnologia contribui para o aperfeiçoamento da veiculação dos fármacos, o que permite estabelecer uma relação entre a estrutura e a função das biomoléculas (Rawat *et al.*, 2006).

Os produtos resultantes da nanobiotecnologia ajudam a ultrapassar vários problemas relacionados com a entrega dos fármacos, como anteriormente referido, e desta forma garantir o sucesso do desenvolvimento tecnológico e a sua aplicação na nanomedicina (i.e. monitorização, reparação, construção e controlo de sistemas biológicos humanos ao nível molecular, usando dispositivos e estruturas de tamanhos nanométricos) (Rawat *et al.*, 2006; Venugopal *et al.*, 2008). Com recurso à nanotecnologia obtêm-se sistemas de veiculação de fármacos à nano-escala, aumentando assim a eficácia e o potencial de aplicação dos sistemas, o que representa uma revolução na terapêutica (Buse e El-Aneed, 2010; Duffin *et al.*, 2007).

IV. Produtos biofarmacêuticos incorporados em sistemas lipídicos. Exemplos de utilização terapêutica

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de estudos relacionados com a veiculação de produtos biofarmacêuticos em sistemas de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC). Nos parágrafos seguintes serão descritos em detalhe alguns destes estudos.

Tabela 1 – Exemplos de produtos biofarmacêuticos veiculados em nanopartículas lipídicas.

Nanopartícu a lipídica	Produto biofarmacêutico	Via de administração	Referência
SLN	Insulina	Oral	(Sarmiento <i>et al.</i> , 2007)
SLN	Insulina	Pulmonar	(Liu <i>et al.</i> , 2008)
SLN	Calcitonina	Oral	(Garcia-Fuentes <i>et al.</i> , 2005a)
SLN	Calcitonina	Oral	(Martins <i>et al.</i> , 2009)
SLN	Interferão α	*	(Li <i>et al.</i> , 2010)
SLN	Interleucina 2	Parentérica	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
SLN	Antigénio da superfície do vírus da Hepatite B (AgHBs)	Subcutânea	(Mishra <i>et al.</i> , 2010)
SLN	Cisteína proteinase I	Intraperitoneal	(Doroud <i>et al.</i> , 2011a)
SLN	Anticorpo monoclonal anti-factor de crescimento epidérmico (HB-EGF)		(Kuo e Shih-Huang, 2014)
NLC	siRNA	Inalatória	(Taratula <i>et al.</i> , 2013)
SLN	Gene MCL-1	*	(Yu <i>et al.</i> , 2011)
SLN	Gene p53	*	(Choi <i>et al.</i> , 2008)

*Nota: Apenas existem resultados de estudos *in vitro*.

Para que a libertação de insulina seja viável, após a administração por via oral, é necessário encapsular a proteína em nanossistemas, como por exemplo, as SLN. Alguns estudos demonstraram que a absorção de insulina é otimizada quando se usam SLN revestidas por polímeros (por exemplo, o quitosano), pois estes promovem a sua permeação intestinal, devido às propriedades mucoadesivas dos polímeros (evitando a sua degradação ao longo do TGI) e permitem a sua libertação controlada (Sarmiento *et al.*, 2007; Gallarate *et al.*, 2009; Sarmiento *et al.*, 2011).

Nos estudos realizados por Sarmiento *et al.* observou-se que, a administração oral de SLN contendo insulina a ratos diabéticos, diminuiu a glicemia de forma mais intensa, em comparação com uma solução aquosa de insulina (após 6 horas o decréscimo dos níveis de glicose no sangue foi de 20 %). Verificou-se também que a diminuição da concentração de glicose sistémica, após a administração das SLN que contêm insulina, ocorreu em duas fases, tendo a primeira sofrido uma diminuição de 25%, entre as 4-8h, e a segunda ocorreu entre as 12-24h, libertando os restantes 75%. Deduziu-se que a segunda fase poderia ser causada pela degradação das SLN, que libertam assim a insulina encapsulada no sistema. Tendo em conta os resultados obtidos, os autores concluíram que a utilização de SLN pode vir a representar uma forma efectiva para a administração oral da insulina (Sarmiento *et al.*, 2007).

Zhang *et al* estudaram a acção da modificação da superfície das SLN para a administração oral da insulina. As SLN foram conjugadas com aglutinina de gérmen do trigo. Nos ensaios *in vitro*, realizados com SLN contendo a insulina (com e sem modificação), verificou-se que ambos protegem a insulina da acção enzimática.

No entanto, as SLN modificadas apresentaram maior estabilidade, sendo a biodisponibilidade oral da insulina maior, em comparação com as não modificadas. Desta forma concluiu-se que a modificação da superfície das SLN favorece a libertação de insulina para administração oral (Zhang *et al.*, 2006).

Em estudos relacionado com a administração pulmonar de insulina utilizaram-se nanopartículas lipídicas com diâmetro de 300 nm e deposição pulmonar de 45%, contendo óleos essenciais para estabilizar a suspensão e formar inaladores pressurizados de dose calibrada (pMDI), promissores para a libertação de insulina. Os óleos essenciais podem contribuir para a estabilidade da suspensão de nanopartículas de insulina nos pMDI, onde a formulação óptima se caracteriza por um elevado desempenho em aerossol, que assegura que a dose adequada de insulina chegue aos locais alvo do pulmão para, de seguida, ocorrer a absorção sistémica da insulina (Nyambura *et al.*, 2009). Liu *et al* realizaram ensaios *in vivo* em ratos e verificaram que a utilização de SLN veiculando insulina diminuiu significativamente os níveis de glicose no sangue, após a administração pulmonar. A distribuição das SLN nos alvéolos pulmonares demonstrou ser homogénea e a libertação da insulina foi prolongada, tendo esta apresentada uma biodisponibilidade 4 vezes maior que a insulina não incorporada nas SLN. A partir destes resultados os autores concluíram que as SLN são uma boa opção para a administração de insulina pela via pulmonar, de forma a ultrapassar os problemas relacionados com a administração sistémica desta proteína (Liu *et al.*, 2008).

A calcitonina, a hormona responsável pela regulação dos níveis sanguíneos de cálcio, foi veiculada em sistemas de nanopartículas lipídicas para administração oral, com o objectivo de verificar se ocorria um aumento da sua eficácia terapêutica. Em estudos *in vivo* efectuados em ratos, usando calcitonina encapsulada em SLN, revestidas com diferentes moléculas na superfície (quitosano e PEG). Verificou-se que a calcitonina pode ser eficientemente encapsulada, independentemente da composição lipídica das SLN.

Por outro lado, as SLN revestidas por quitosano reduziram de forma mais eficaz os níveis de calcitonina na corrente sanguínea, comparando com uma solução de calcitonina e com as SLN revestidas com PEG (Garcia-Fuentes *et al.*, 2005a; Garcia-Fuentes *et al.*, 2005b).

Outro estudo *in vivo* analisou a actividade farmacológica da calcitonina encapsulada em SLN administradas por via oral, onde se verificou que este sistema reduziu os níveis de cálcio no sangue em cerca de 20% (Martins *et al.*, 2009). Com estes estudos conclui-se que as nanopartículas lipídicas, designadamente, as SLN, são uma opção promissora para veicular a calcitonina, possibilitando a sua administração oral, embora sejam necessários mais estudos para comprovar a eficiência destes sistemas.

Os interferões (IFN) são citocinas que medeiam as reacções imunológicas do organismo, em caso de infecção viral (Rosa *et al.*, 2012). Para entender a utilidade do INF animal em tratamentos veterinários, realizaram-se estudos *in vitro*, onde o yak, o interferão α recombinante (IFN- α), foi veiculado em SLN. A libertação controlada do IFN- α , a partir das SLN para as células alvo, demonstrou que, quando o IFN- α foi libertado do complexo apresentou actividade anti-viral. Deste modo, estes sistemas demonstraram ser promissores para serem usados como uma alternativa terapêutica futura no tratamento das infecções virais em animais (Li *et al.*, 2010).

As interleucinas 2 (IL-2) são citocinas produzidas pelos linfócitos T CD_4^+ e CD_8^+ , células dendríticas e células *natural killer* (NK), que têm como função estimular a proliferação dos linfócitos B e T e as próprias células NK (Rosa *et al.*, 2012). A encapsulação de IL-2 em SLN foi estudada para verificar qual a sua influência na resposta imunológica, podendo esta aplicação ser vantajosa para o uso em vacinas. Para o efeito foram efectuados estudos *in vivo* em ratos imunizados com SLN contendo IL-2 e um antigénio (forma inactiva do vírus responsável pela febre-aftosa). Os resultados demonstraram que este sistema aumenta a produção de anticorpos específicos, a proliferação de linfócitos T e B e a concentração de IFN, tendo-se concluído que a IL-2 veiculada em SLN pode vir a ser utilizada na terapêutica (Chen *et al.*, 2014).

As SLN podem ter um papel preponderante no tratamento da Hepatite B. Mishra *et al.* desenvolveram estudos em volta dessa hipótese, onde incorporaram nas SLN antigénios de superfície do vírus da Hepatite B (AgHBs) e administram, por via subcutânea, a

ratos. Os resultados evidenciaram que as SLN contendo AgHBs aumentam a captura celular, a indução da proliferação das células Th₁ e a produção de anticorpos, em comparação com a administração do AgHBs em solução (Mishra *et al.*, 2010).

A leishmaniose é uma doença parasitária de elevada incidência em países tropicais, representando um grande problema de saúde pública, sendo importante o desenvolvimento de uma vacina contra este agente infeccioso (Doroud *et al.*, 2011b). Tendo em conta que a cisteína é um aminoácido presente nas proteínas, estando por isso codificada no código genético, esta pode ser usada em vacinas contra a leishmaniose. No entanto, é necessário desenvolver um sistema de transporte da cisteína (Mutiso *et al.*, 2010). Neste sentido, realizaram-se vários estudos, tendo sido veiculada a cisteína proteinase I em SLN administradas por via intraperitoneal. Os resultados demonstraram que o complexo induziu uma resposta imune, uma vez que aumentaram os níveis de células Th₁ (Doroud *et al.*, 2011a). Em outro estudo, foi veiculada uma mistura de genes que codificam a expressão da cisteína proteinase, em sistemas lipídicos catiónicos. Os resultados demonstraram que o complexo foi capaz de libertar os genes no núcleo das células (Doroud *et al.*, 2010).

Os anticorpos monoclonais podem ser acoplados à superfície dos sistemas lipídicos, de forma a direccioná-los para locais-alvo. Como exemplos desta aplicação temos o direccionamento de siRNA e de fármacos (saquinovir) encapsulados em nanopartículas lipídicas com anticorpos monoclonais à superfície. A libertação selectiva de siRNA em células tumorais foi efectuada adicionando à superfície de nanopartículas lipídicas um anticorpo monoclonal anti-factor de crescimento epidérmico (HB-EGF). Os estudos *in vitro* permitiram verificar que estas SLN foram capturadas pelas células MDA-MB-231, presentes no cancro da mama, e que expressam de forma exacerbada o gene HB-EGF.

O siRNA veiculado nas SLN suprimiu de forma selectiva o mRNA e, consequentemente, a expressão das proteínas MDA-MB-231 (Okamoto *et al.*, 2014). Em outro estudo, SLN encapsulando saquinovir e carmustina e contendo anticorpos monoclonais à superfície foram usadas para direccionar estes fármacos para as células cerebrais endoteliais microvasculares (HB-MEC). Verificou-se que a presença do anticorpo monoclonal à superfície das SLN aumenta a passagem do sistema pela barreira hemato-encefálica, aumentando assim a captura do fármaco por parte das células HB-MEC, ou seja, aumentando a biodisponibilidade do fármaco (Kuo e Shih-Huang, 2013; Kuo e Ko, 2013; Kuo e Shih-Huang, 2014).

Taratula *et al.* estudaram o efeito de siRNA veiculados em NLC administrados por via inalatória, para diminuir a resistência aos fármacos provocada por proteínas. As proteínas envolvidas no cancro do pulmão são as MRP1, responsáveis pelo efluxo do fármaco pelas células cancerígenas, e a BCL2, responsável pela inibição da apoptose das células cancerígenas. Os NLC usadas neste estudo são constituídas por DOTAP e contêm siRNA direccionados para o mRNA que codifica a expressão das MRP1 e BCL2 (Taratula *et al.*, 2013; Taratula *et al.*, 2011). Através da análise dos resultados observou-se que ao veicular siRNA em NLC ocorreu supressão eficaz do crescimento das células alvo do pulmão, sem que os órgãos saudáveis fossem afectados, concluindo que os NLC possuem grande eficácia para veicular siRNA para libertar em células específicas, como as células cancerígenas (Taratula *et al.*, 2013; Xue e Wong, 2011; Pirollo e Chang, 2008). Outro estudo foi realizado com base na veiculação do gene p53 em SLN constituídas por lípidos catiónicos. Este sistema foi introduzido em células pulmonares humanas cancerígenas, onde se verificou que a transfecção do gene p53 aumentou os níveis de mRNA e, como consequência, aumentou os níveis de expressão das proteínas p53. Ao aumentar os níveis da proteína p53, há restauração e indução da apoptose, o que inibe o crescimento tumoral (Choi *et al.*, 2008).

Yu *et al.* introduziram um complexo formado por SLN, siRNA (MCL-1 (gene responsável pela leucemia das células mielóides)) e um fármaco (paclitaxel) em células cancerígenas, e observaram que os níveis de mRNA de MCL-1 diminuíram de forma abrupta, inibindo o avanço tumoral (Yu *et al.*, 2011).

V. Conclusões e perspectivas

As limitações da administração de produtos biofarmacêuticos está relacionada com as suas características moleculares, principalmente o tamanho molecular e o baixo tempo de semi-vida plasmática.

As nanopartículas lipídicas apresentam inúmeras vantagens em relação aos outros sistemas coloidais, tais como o aumento da biodisponibilidade de fármacos, redução dos efeitos citotóxicos, aumento da estabilidade e protecção do fármaco. Neste sentido, têm sido efectuados diversos estudos com SLN e NLC para veicular produtos biofarmacêuticos, tendo-se verificado que estes sistemas melhoram, de forma significativa, a entrega e a eficácia dos produtos biofarmacêuticos, sendo por isso considerados uma boa opção para a aplicação terapêutica. No entanto são necessários mais estudos *in vivo* para comprovar estes benefícios.

O desenvolvimento da nanotecnologia médica, designadamente, a aplicada às nanopartículas lipídicas, continuará no futuro, com o objectivo de ultrapassar algumas das suas limitações, tais como a dificuldade em avaliar a toxicidade exercida por estes sistemas e a sua eficácia para aplicação *in vivo*. Desta forma será possível introduzir no mercado, de forma segura e eficaz, novas formulações de produtos biofarmacêuticos veiculados em nanopartículas lipídicas.

VI. Bibliografia

- Al-Dosari, M. e Gao, X. (2009). Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress, *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 11(4), pp. 671-681.
- Alberts, B., Bray, D. e Ciwi, S. (2006). *Introducción a la Biología Celular*. 2. Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Anajwala, C. C., Jani, G. K. e Swamy, S. V. (2010). Current trends of nanotechnology for cancer therapy, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 3(3), pp. 1043-1056.
- Berman, H. M., Olson, W. K., Beveridge, D. L., *et al.* (1992). The nucleic acid database. A comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids, *Biophysical Journal*, 63(3), pp. 751-759.
- Boukany, P. E., Wu, Y., Zhao, X., *et al.* (2013). Nonendocytic delivery of lipoplex nanoparticles into living cells using nanochannel electroporation, *Advanced Healthcare Materials*, 3(5), pp. 682-689.
- Buse, J. e El-Aneed, A. (2010). Properties, engineering and applications of lipid-based nanoparticle drug-delivery systems: current research and advances, *Nanomedicine*, 5(8), pp. 1237-1260.
- Cardoso, E. M. (2012). Imunoglobulinas. *In*: Arosa, F.; Cardoso, E. e Pacheco, F. (Eds.). *Fundamentos de Imunologia*. 2. Lisboa, LIDEL, pp. 195-214.

- Castro, G. A., Orefice, R. L., Vilela, J. M., *et al.* (2007). Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne, *Journal of Microencapsulation*, 24(5), pp. 395-407.
- Celia, C., Cosco, D., Paolino, D., *et al.* (2011). Nanoparticulate devices for brain drug delivery, *Medicinal Research Reviews*, 31(5), pp. 716-756.
- Chakraborty, S., Shukla, D., Vuddanda, P. R., *et al.* (2010). Utilization of adsorption technique in the development of oral delivery system of lipid based nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), pp. 563-569.
- Chen, G., Zeng, S., Jia, H., *et al.* (2014). Adjuvant effect enhancement of porcine interleukin-2 packaged into solid lipid nanoparticles, *Research in Veterinary Science*, 96(1), pp. 62-68.
- Choi, S. H., Jin, S.-E., Lee, M.-K., *et al.* (2008). Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), pp. 545-554.
- Das, S., Ng, W. K. e Tan, R. B. H. (2014). Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: I. Effect of formulation variables on the physicochemical properties, drug release and stability of clotrimazole-loaded nanoparticles, *Nanotechnology*, 25(10), pp. 1-14.
- Date, A. A., Desai, N., Dixit, R., *et al.* (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances, *Nanomedicine*, 5(10), pp. 1595-1616.
- Denli, A. M. e Hannon, G. J. (2003). RNAi: an ever-growing puzzle, *Trends in Biochemical Sciences*, 28(4), pp. 196-201.

- Desai, P. P., Date, A. A. e Patravale, V. B. (2012). Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations - opportunities and limitations, *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(2), pp. e87-e95.
- Doroud, D., Vatanara, A., Zahedifard, F., *et al.* (2010). Cationic solid lipid nanoparticles loaded by cysteine proteinase genes as a novel anti-leishmaniasis DNA vaccine delivery system: characterization and in vitro evaluations, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(3), pp. 320-335.
- Doroud, D., Zahedifard, F., Vatanara, A., *et al.* (2011a). Cysteine proteinase type I, encapsulated in solid lipid nanoparticles induces substantial protection against *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice, *Parasite Immunology*, 33(6), pp. 335-348.
- Doroud, D., Zahedifard, F., Vatanara, A., *et al.* (2011b). Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania major* infection, *Journal of Controlled Release*, 153(2), pp. 154-162.
- Duffin, R., Tran, L., Brown, D., *et al.* (2007). Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity, *Inhalation Toxicology*, 19(10), pp. 849-856.
- Eisenhaber, F., Persson, B. e Argos, P. (1995). Protein structure prediction: recognition of primary, secondary, and tertiary structural features from amino acid sequence, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(1), pp. 1-94.
- Eliana B. Souto e Lopes, C. M. (2011). *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.

- Emery, A. E. (1984). *An introduction to recombinant DNA*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Ezan, E. (2013). Pharmacokinetic studies of protein drugs: Past, present and future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(8), pp. 1065-1073.
- Fischbach, M. A., Bluestone, J. A. e Lim, W. A. (2013). Cell-based therapeutics: The next pillar of medicine, *Science Translational Medicine*, 5(179), pp. 179/1-179/7.
- Fricker, G., Kromp, T., Wendel, A., *et al.* (2010). Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery, *Pharmaceutical Research*, 27(8), pp. 1469-1486.
- Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L., *et al.* (2009). Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation, *Journal of Microencapsulation*, 26(5), pp. 394-402.
- Gan, L., Wang, J., Jiang, M., *et al.* (2013). Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers, *Drug Discovery Today*, 18(5-6), pp. 290-297.
- Garcia-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D., *et al.* (2005a). A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1), pp. 133-143.
- Garcia-Fuentes, M., Torres, D. e Alonso, M. J. (2005b). New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin, *International Journal of Pharmaceutics*, 296(1-2), pp. 122-132.

- Harris, R. P. e Kilby, P. M. (2014). Amino acid misincorporation in recombinant biopharmaceutical products, *Current Opinion in Biotechnology*, 30, pp. 45-50.
- Joshi, M. D. e Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), pp. 161-172.
- Khafagy, E.-S., Morishita, M., Onuki, Y., *et al.* (2007). Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(15), pp. 1521-1546.
- Knäblein, J. (2013). *Modern Biopharmaceuticals: Recent Success Stories*. Weinheim, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co.
- Kuo, Y.-C. e Ko, H.-F. (2013). Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles, *Biomaterials*, 34(20), pp. 4818-4830.
- Kuo, Y.-C. e Shih-Huang, C.-Y. (2013). Solid lipid nanoparticles carrying chemotherapeutic drug across the blood-brain barrier through insulin receptor-mediated pathway, *Journal of Drug Targeting*, 21(8), pp. 730-738.
- Kuo, Y.-C. e Shih-Huang, C.-Y. (2014). Solid lipid nanoparticles with surface antibody for targeting the brain and inhibiting lymphatic phagocytosis, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), pp. 1154-1163.
- Kwon, K.-C., Verma, D., Singh, N. D., *et al.* (2013). Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(6), pp. 782-799.

- Li, S., Zhao, B., Wang, F., *et al.* (2010). Yak interferon-alpha loaded solid lipid nanoparticles for controlled release, *Research in Veterinary Science*, 88(1), pp. 148-153.
- Lima, H. N. C. (2007). Facts and myths about immunomodulators, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82(3), pp. 207-221.
- Liu, J., Gong, T., Fu, H., *et al.* (2008). Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin, *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), pp. 333-344.
- Martins, S., Sarmiento, B., Ferreira, D. C., *et al.* (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), pp. 595-607.
- Martins, S., Silva, A. C., Ferreira, D. C., *et al.* (2009). Improving oral absorption of salmon calcitonin by trimyristin lipid nanoparticles, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(1), pp. 76-83.
- Mehnert, W. e Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), pp. 165-196.
- Mishra, D., Mishra, H., Mishra, P. K., *et al.* (2010). Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis B surface antigen for vaccination using subcutaneous route, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 13(4), pp. 495-509.
- Mitragotri, S., Burke, P. A. e Langer, R. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies, *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), pp. 655-672.

Morris-Jones, R. (2014). *ABC of dermatology*. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.

Muchow, M., Maincent, P. e Müller, R. H. (2008). Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(12), pp. 1394-1405.

Müller, R., Mehnert, W., Lucks, J.-S., *et al.* (1995). Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(1), pp. 62-69.

Müller, R., Radtke, M. e Wissing, S. (2002a). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), pp. 121-128.

Müller, R., Rühl, D., Runge, S., *et al.* (1997). Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, *Pharmaceutical Research*, 14(4), pp. 458-462.

Müller, R., Runge, S., Ravelli, V., *et al.* (2008). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug- lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), pp. 535-544.

Müller, R. H. (2007). Lipid nanoparticles: Recent advances, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), pp. 375-376.

Müller, R. H., Mäder, K. e Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), pp. 161-177.

- Müller, R. H., Radtke, M. e Wissing, S. A. (2002b). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, Supplement, S131-S155.
- Muller, R. H., Shegokar, R. e Keck, C. M. (2011). 20 Years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): Present state of development & industrial applications, *Current Drug Discovery Technologies*, 8(3), pp. 207-227.
- Mutiso, J. M., Macharia, J. C. e Gicheru, M. M. (2010). A review of adjuvants for Leishmania vaccine candidates, *Journal of Biomedical Research*, 24(1), pp. 16-25.
- Nakamura, R. (1982). Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications, *Clinical Physiology and Biochemistry*, 1(2-5), pp. 160-172.
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G. J., *et al.* (2007). Nanotechnology applications in cancer, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 257-288.
- Nyambura, B. K., Kellaway, I. W. e Taylor, K. M. (2009). Insulin nanoparticles: Stability and aerosolization from pressurized metered dose inhalers, *International Journal of Pharmaceutics*, 375(1-2), pp. 114-122.
- Okamoto, A., Asai, T., Kato, H., *et al.* (2014). Antibody-modified lipid nanoparticles for selective delivery of siRNA to tumors expressing membrane-anchored form of HB-EGF, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(4), pp. 460-465.
- Owens, D. R., Zinman, B. e Bolli, G. (2003). Alternative routes of insulin delivery, *Diabetic Medicine*, 20(11), pp. 886-898.

- Pardeike, J., Hommoss, A. e Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), pp. 170-184.
- Patil, M. N. e Pandit, A. B. (2007). Cavitation-a novel technique for making stable nano-suspensions, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(5), pp. 519-530.
- Patton, J. S. (1996). Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19(1), pp. 3-36.
- Pirollo, K. F. e Chang, E. H. (2008). Targeted delivery of small interfering RNA: Approaching effective cancer therapies, *Cancer Research*, 68(5), pp. 1247-1250.
- Pouton, C. W. e Porter, C. J. (2008). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), pp. 625-637.
- Powell, K. (2004). Inhaled insulin products puff along, *Nature Biotechnology*, 22(10), pp. 1195-1196.
- Prausnitz, M. R. e Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery, *Nature Biotechnology*, 26(11), pp. 1261-1268.
- Raju, K. K., Sudhakar, B. e Murthy, K. (2014). Factorial design studies and biopharmaceutical evaluation of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles for improving the oral bioavailability, *Hindawi Publishing Corporation*, 2014, 1-8.
- Ranade, V. V. (1989). Drug Delivery Systems-2. Site-Specific Drug Delivery Utilizing Monoclonal Antibodies, *The Journal of Clinical Pharmacology*, 29(10), pp. 873-884.

- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., *et al.* (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), pp. 1790-1798.
- Riangjanapatee, P. e Okonogi, S. (2012). Effect of surfactant on lycopene-loaded nanostructured lipid carriers, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(3), pp. 163-168.
- Roque, A., Cecília, A., Lowe, C. R., *et al.* (2004). Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification, *Biotechnology Progress*, 20(3), pp. 639-654.
- Rosa, M., Pinto, A., Todo-Bom, A., *et al.* (2012). Citocinas. *In: Arosa, F.; Cardoso, E. e Pacheco, F. (Eds.). Fundamentos de Imunologia. 2.* Lisboa, LIDEL, pp. 301-315.
- Sarmiento, B., Martins, S., Ferreira, D., *et al.* (2007). Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), pp. 743-749.
- Sarmiento, B., Mazzaglia, D., Bonferoni, M. C., *et al.* (2011). Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system, *Carbohydrate Polymers*, 84(3), pp. 919-925.
- Schäfer-Korting, M., Souto, E. e Müller, R. (2010). Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes. *In: Schäfer-Korting, M. (Ed.). Drug Delivery.* Berlin, Springer Berlin Heidelberg, pp. 115-141.
- Schöler, N., Zimmermann, E., Katzfey, U., *et al.* (2000). Effect of solid lipid nanoparticles (SLN) on cytokine production and the viability of murine peritoneal macrophages, *Journal of Microencapsulation*, 17(5), pp. 639-650.

- Silva, A., Martins, S., Santos, D., *et al.* (2011a). Nanopartículas Lipídicas. *In: Souto, E. e Lopes, C. (Eds.). Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos.* Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 297-334.
- Silva, A. C., Amaral, M. H., Lobo, J. M. S., *et al.* (2015a). Lipid Nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), pp. 291-302.
- Silva, A. C., González-Mira, E., García, M. L., *et al.* (2011b). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), pp. 158-165.
- Silva, A. C., Lopes, C. M., Lobo, J. M. S., *et al.* (2015b). Nucleic Acids Delivery Systems: a challenge for pharmaceutical, *Current Drug Metabolism*.
- Silva, A. C., Santos, D., Ferreira, D., *et al.* (2012). Lipid-based nanocarriers as an alternative for oral delivery of poorly water- soluble drugs: peroral and mucosal routes, *Current Medicinal Chemistry*, 19(26), pp. 4495-4510.
- Souto, E. B., Doktorovova, S., Gonzalez-Mira, E., *et al.* (2010). Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs, *Current Eye Research*, 35(7), pp. 537-552.
- Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M., *et al.* (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), pp. 71-77.

- Taratula, O., Garbuzenko, O. B., Chen, A. M., *et al.* (2011). Innovative strategy for treatment of lung cancer: targeted nanotechnology-based inhalation co-delivery of anticancer drugs and siRNA, *Journal of Drug Targeting*, 19(10), pp. 900-914.
- Taratula, O., Kuzmov, A., Shah, M., *et al.* (2013). Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA, *Tenth International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium*, 171(3), pp. 349-357.
- Tropp, B. E. (2012). *Molecular Biology: Genes to Proteins*. 4. Sudbury, Jones & Bartlett Learning.
- Tros De Ilarduya, C., Sun, Y. e Düzgüneş, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), pp. 159-170.
- Venugopal, J., Prabhakaran, M. P., Low, S., *et al.* (2008). Nanotechnology for nanomedicine and delivery of drugs, *Current Pharmaceutical Design*, 14(22), pp. 2184-2200.
- Veuillez, F., Kalia, Y. N., Jacques, Y., *et al.* (2001). Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 51(2), pp. 93-109.
- Walsh, G. (2003). *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. 2. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.
- Walsh, G. (2004). Second-generation biopharmaceuticals, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), pp. 185-196.

- Walsh, G. (2005). Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions, *Trends in Biotechnology*, 23(11), pp. 553-558.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical biotechnology: Concept and application*. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.
- Wissing, S. A., Kayser, O. e Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), pp. 1257-1272.
- Xue, H. Y. e Wong, H. L. (2011). Tailoring nanostructured solid-lipid carriers for time-controlled intracellular siRNA kinetics to sustain RNAi-mediated chemosensitization, *Biomaterials*, 32(10), pp. 2662-2672.
- Yu, J., Du, K. T., Fang, Q., *et al.* (2010). The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat, *Biomaterials*, 31(27), pp. 7012-7020.
- Yu, Y. H., Kim, E., Park, D. E., *et al.* (2011). Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), pp. 268-273.
- Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., *et al.* (2006). Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin, *International Journal of Pharmaceutics*, 327(1-2), pp. 153-159.