

Cecília Pinto Marques

Formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas lipídicas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Porto – 2010

Cecília Pinto Marques

Formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas lipídicas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Porto – 2010

Cecília Pinto Marques

Formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas lipídicas

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de licenciatura em ciências farmacêuticas

(Cecília Pinto Marques)

Porto – 2010

Agradecimentos

À professora Dr.^a Eliana Souto, por todo o empenho e disponibilidade, pelo incentivo, pelos conselhos, pela paciência e pela amizade demonstrada ao longo destes meses.

À professora Dr.^a Carla Lopes, pelo incentivo e apoio e amizade sempre demonstrada durante estes longos meses de trabalho.

Dedicatórias

É de um modo muito especial, que dedico e presenteio este trabalho aos meus pais, pois sem a ajuda deles certamente não seria possível realizar os meus projectos, sendo um deles a conclusão da minha licenciatura.

A todos os meus amigos e amigas pela amizade, compreensão e incentivo ao longo de todos estes meses.

Resumo

Como a pele um órgão capaz de realizar trocas directas com o meio envolvente é possível aplicar-lhe formas farmacêuticas tópicas com o intuito de embelezar ou tratar uma determinada área corporal.

As formas farmacêuticas tópicas que contem nanopartículas lipídicas na sua composição conseguem manter uma maior estabilidade físico-química da substância activa, aumentar a sua biodisponibilidade e a sua capacidade de carga.

Recentemente tem-se vindo cada vez mais a assistir ao desenvolvimento da nanotecnologia principalmente na área da tecnologia farmacêutica de forma a aperfeiçoar-se as estruturas já desenvolvidas. O resultado desta investigação são as formas farmacêuticas tópicas bem sucedidos já a serem comercializadas no mundo do mercado.

| | |
|---|-----------|
| Índice | Página(s) |
| 1. Capítulo 1 - Nanopartículas lipídicas para aplicação tópica Introdução | 1 |
| 1.1. Introdução..... | 1-3 |
| 1.2 A pele humana | 4 |
| 1.2.1. Anatomia da pele | 5 |
| 1.2.2. Histologia da pele | 6 |
| 1.2.2.1 Epiderme..... | 6-8 |
| 1.2.2.2 Derme | 8-9 |
| 1.2.3. Hipoderme | 10 |
| 1.2.4. Funções da pele | 10-11 |
| 1.3 Definição e propriedades das nanopartículas lipídicas..... | 12 |
| 1.3.1. Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN)..... | 13 |
| 1.3.1.2 Tipo I..... | 13 |
| 1.3.1.3 Tipo II..... | 14 |
| 1.3.1.4 Tipo III..... | 14-15 |

| | |
|---|-------|
| 1.3.2. Sectores lipídicos nanoestruturados (NLC)..... | 15 |
| 1.3.2.1 Tipo I..... | 15-16 |
| 1.3.2.2 Tipo II..... | 16 |
| 1.3.2.3 Tipo III..... | 17 |
| 1.4 Métodos de produção | 18 |
| 1.4.1. HPH | 18-19 |
| 1.4.1.1 HPH a quente..... | 19-21 |
| 1.4.1.2 HPH a frio..... | 22-24 |
| 1.4.2. Microemulsão | 24-27 |
| 1.4.3. Emulsificação-evaporação do solvente | 27-30 |
| 1.4.4. Substituição do solvente | 30-32 |
| 1.4.5. Emulsificação-difusão do solvente..... | 32-33 |
| 1.4.6. Inversão de fases..... | 34 |
| 1.4.7. Fluidos supercríticos..... | 34-35 |

| | |
|--|-------|
| 2. Capítulo 2 - Nanopartículas lipídicas para aplicação tópica Introdução | 36 |
| 2.1. Vantagens para a administração tópica | 36 |
| 2.1.1. Adesividade para superfícies | 36 |
| 2.1.2. Oclusão e hidratação..... | 37-39 |
| 2.1.3. Lubrificação e emoliência | 40 |
| 2.1.4. Antienvhecimento..... | 41 |
| 2.1.5. Efeito de protecção solar | 41 |
| 2.2. Métodos de produção das formas farmacêuticas tópicas que contêm nanopartículas lipídicas..... | 42 |
| 2.2.1. Incorporação de dispersões aquosas de nanopartículas em bases hidrófilas | 42-45 |
| 2.2.2. Incorporação de dispersões aquosas de nanopartículas em bases hidrófobas | 45-46 |
| 2.3. Cosméticos existentes no mercado com nanopartículas lipídicas | 46-47 |
| 3. Capítulo 3 - Conclusão | 48 |
| 4. Capítulo 4 - Bibliografia..... | 49-53 |

Lista de abreviaturas:

CC – Capacidade de carga

EE – Eficácia de encapsulação

HPH – Homogeneização a alta pressão

IP – Índice de polidispersão

NLC – Sectores lipídicos nanoestruturados

O/A – Óleo /Água

PEG – Polietilenoglicóis

S.A – Substância activa

SLN – Nanopartículas de lípidos sólidos

UV – raios ultravioletas

| Índice de figuras: | Página |
|---|--------|
| 1. Figura 1: O aspecto físico da superfície da pele humana | 4 |
| 2. Figura 2: Representação esquemática da estrutura da pele humana..... | 5 |
| 3. Figura 3: Representação esquemática das camadas da epiderme e a membrana basal | 8 |
| 4. Figura 4: Microfotografia da derme | 9 |
| 5. Figura 5: SLN do tipo I | 13 |
| 6. Figura 6: SLN do tipo II | 14 |
| 7. Figura 7: SLN do tipo III..... | 15 |
| 8. Figura 8: NLC do tipo I..... | 16 |
| 9. Figura 9: NLC do tipo II..... | 16 |
| 10. Figura 10: NLC do tipo III | 17 |
| 11. Figura 11: Procedimento esquemático da técnica de HPH a quente | 20 |
| 12. Figura 12: Procedimento esquemático da técnica de HPH a frio | 23 |
| 13. Figura 13: Procedimento esquemático da obtenção de nanopartículas lipídicas pela técnica de microemulsão | 26 |
| 14. Figura 14: Procedimento esquemático da obtenção de nanopartículas pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente | 29 |

| | |
|---|----|
| 15. Figura 15: Procedimento esquemático da preparação de SLN pela técnica substituição do solvente..... | 31 |
| 16. Figura 16: Procedimento esquemático da preparação de SLN pela técnica da emulsificação- difusão do solvente..... | 33 |
| 17. Figura 17: Representação esquemática do efeito oclusivo das partículas lipídicas de acordo com o seu tamanho. | 39 |
| 18. Figura 18: Representação esquemática da estrutura tridimensional da incorporação de nanopartículas de natureza lipídica em hidrogeles | 44 |

1. Capítulo 1 - Nanopartículas lipídicas para aplicação tópica Introdução

1.1 Introdução

A pele humana está considerada como sendo o maior órgão do corpo humano. É constituída por duas camadas distintas, firmemente unidas entre si: a epiderme e a derme. É um órgão resistente, flexível, plástico, relativamente impermeável e contém uma elevada capacidade de auto-reparação. Este órgão para além de variadas funções que possui tem ainda: protecção contra as agressões do meio exterior, termorregulação, função sensorial, função imunitária e função metabólica é importante realçar que este mesmo também tem a capacidade de realizar trocas directas com o meio envolvente (Franceschini, P., 1994 e Seeley et al., 2001).

Sendo assim pode-se aplicar na pele produtos cosméticos, ou produtos medicamentosos de uso tópico com a respectivamente finalidade de embelezar ou tratar uma determinada área corporal. Para isso é necessária investigação na área da tecnologia farmacêutica de forma a desenvolver formas farmacêuticas que sejam relativamente seguras quanto à sua forma de libertação da S.A, sua eficácia na penetração, na oclusão, na lubrificação e na utilização de excipientes inócuos.

Nos últimos anos tem-se vindo a assistir ao desenvolvimento da nanotecnologia, sendo esta uma área que se dedica ao estudo das características e aplicabilidades de estruturas de dimensões extremamente pequenas (escala nanométrica). Essas estruturas preparadas por tecnologias várias denominam-se por nanopartículas e consoante o material empregue para o seu fabrico, estas são classificadas em poliméricas, polissacarídicas, proteínas e lipídicas.

A presente monografia tem como objectivo realçar a importância do uso de nanopartículas lipídicas em formas farmacêuticas para aplicação tópica, cuja sua principal função é transportar substâncias activas, aumentar a sua estabilidade físico-química e a sua biodisponibilidade. Sendo assim, torna-se importante fornecer um breve resumo histórico no que concerne ao seu aparecimento, aplicações terapêuticas e sucessos no mercado dermocosmético.

As primeiras nanopartículas preparadas com materiais de natureza lipídica foram desenvolvidas por Speiser et al em Zurique no começo dos anos oitenta , no qual implicava o procedimento de uma emulsão.

Era necessário recorrer ao emprego de agitação de alta velocidade na mistura da fase oleosa com a aquosa. A fase aquosa teria que estar quente e conter o agente tensioactivo e a fase oleosa devia ter o lípido no seu estado líquido. Após a mistura procedia-se ao arrefecimento obtendo-se então partículas contendo substâncias activas e que foram inicialmente denominadas *nanopellets* lipídicas (Souto E. B. et al., 2007).

Um procedimento semelhante ao descrito foi também empregue por Domb mas que implicava o uso de ultrasons para a técnica de emulsificação das fases produzindo assim, partículas denominadas por lipoesferas.

Para ultrapassar algumas dificuldades inerentes à utilização destas primeiras nanopartículas têm sido propostos outros métodos de preparação como homogeneização a alta pressão (HPH) a quente e a frio (Müller, R. H. e Lucks, J. S., 1996; Fukui et al., 1998), microemulsão (Gasco, M.R., 1993; Heiati et al., 1998), emulsificação- evaporação do solvente (Sjöström et al., 1992), substituição do solvente (Hu et al., 2002; Dubes et al., 2003; Schubert, M. A. e Müller-Goymann C. C., 2003), emulsificação-difusão do solvente (Trotta et al., 2003), inversão de fases (Heurtault. B., et al., 2002) e fluidos supercríticos (Chattopadhyay, P. et al., 2007).

A primeira geração de partículas de tamanho nanométrico patenteadas apareceu em 1991 na sequência dos trabalhos de Müller e Lucks com as nanopartículas de lípidos sólidos (SLN), produzidas por (HPH). Simultaneamente Maria Rosa Gasco patenteou em Itália sistemas semelhantes mas produzidos pela via da microemulsão (Gasco, M.R., 1993).

A primeira geração de nanopartículas lipídicas apareceu com as SLN (Souto E. B. et al., 2007). Possuem uma matriz sólida idêntica às nanopartículas poliméricas e foram idealizadas substituindo o lípido líquido no caso das emulsões por um lípido sólido à temperatura ambiente, o qual traz muitas vantagens.

Os excipientes e a sua produção possuem custos relativamente acessíveis à sua fabricação.

A segunda geração de nanopartículas apareceu com as NLC. A principal diferença entre SLN e NLC reside no facto de que a última tem uma matriz com o lípido nanoestruturado de forma a aumentar a capacidade de carga em S.A. e impedir a expulsão desta de uma maneira descontrolada durante o armazenamento.

Contudo, estes procedimentos estão associados a algumas desvantagens, tais como o elevado tamanho médio das partículas e do seu índice de polidispersão, bem como das concentrações relativamente elevadas dos tensioactivos normalmente requeridas para obter um diâmetro médio da partícula na escala nanométrica.

Uma vantagem do uso das partículas de natureza lipídica reside no facto da matriz ser preparada por excipientes fisiológicos (ex: colesterol), reduzindo o risco toxicológico agudo ou crónico.

O resultado da investigação nesta área, encontram-se já demonstrado nos produtos comercializados no mercado contendo nanopartículas lipídicas (SLN e NLC).

1.2 A pele humana

A pele humana é considerada o maior órgão do corpo humano porque pode chegar a pesar 4 a 5 Kg num indivíduo adulto, possui uma superfície média que normalmente varia entre 1,5 e 2 m², e a sua espessura pode variar entre 0,04 milímetros sobre as pálpebras a 1,5 milímetros sobre as palmas da mão e as plantas dos pés (Franceschini, P., 1994).

É constituída por duas camadas distintas, firmemente unidas entre si: a epiderme e a derme (Nogueira Prista, L. *et al.*, 2008).

É a pele que determina as características específicas que permitem diferenciar a raça, o sexo e a identidade de cada indivíduo. É um órgão resistente, flexível, plástico, relativamente impermeável e com uma elevada capacidade de auto-reparação. Para além destas funções e devido à sua inervação, vascularização e presença de neuromediadores, a pele possui uma elevada capacidade sensorial e imunológica, que lhe permitem desempenhar importantes funções na manutenção da homeostasia corporal. Devido a todas as suas complexas funções, a pele é considerada o órgão de protecção do corpo humano (Fitzpatrick.J E. e Aeling J.L., 2000) A figura 1 a seguir, demonstra o aspecto físico da superfície da pele humana.



Figura 1: O aspecto físico da superfície da pele humana (adaptado de <http://ensinarevt.com>)

1.2.1 Anatomia da pele

A pele é constituída por duas camadas tissulares distintas, que são a epiderme e a derme. A primeira é formada por um epitélio pavimentoso estratificado, de tipo especial, e a segunda por tecido conjuntivo denso. A derme, também designada por *cútis* ou *córion*, é contínua em geral, com o tecido celular laxo subcutâneo, o qual forma a hipoderme, habitualmente rica ainda em tecido adiposo (Prista L, *et al.*, 2002). Da hipoderme surgem os apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas) que atravessam toda a estrutura da pele e vão até à sua superfície. A figura 2 representa esquematicamente a estrutura da pele humana.

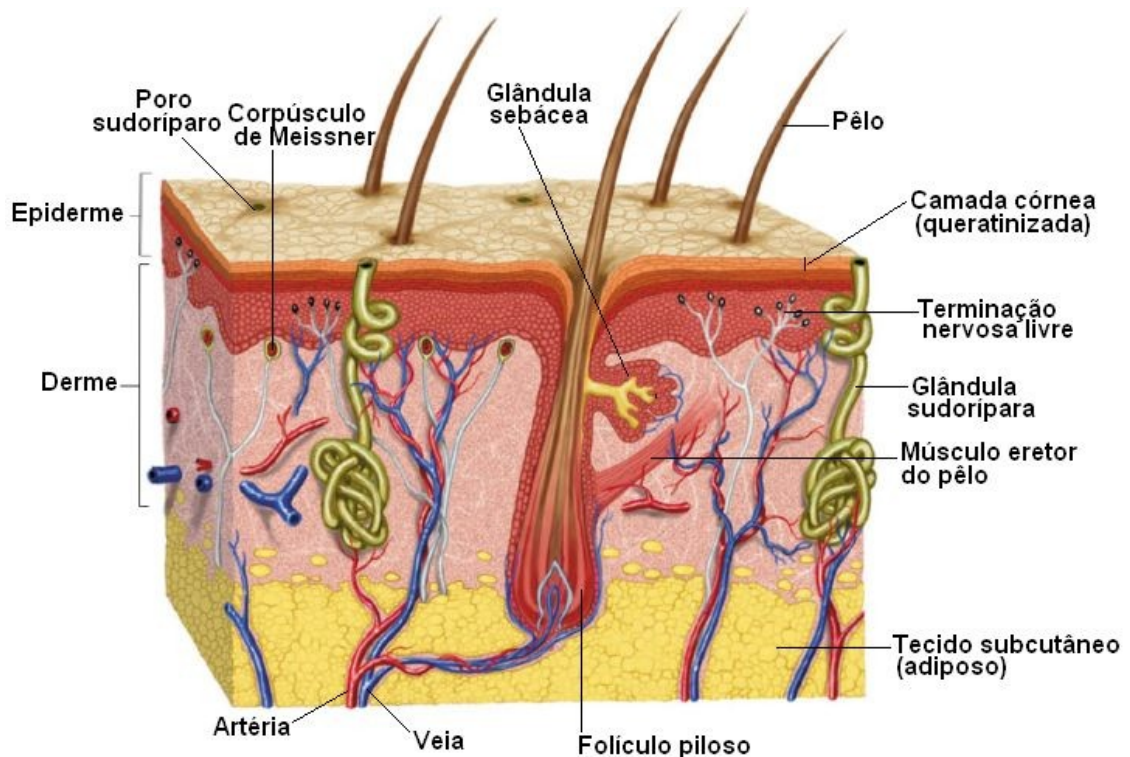


Figura 2: Representação esquemática da estrutura da pele humana (adaptado de www.afh.bio.br)

1.2.2 Histologia da pele

1.2.2.1 Epiderme

A epiderme é um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso. Tem como principal função a produção de camadas de células córneas que nos envolve inteiramente e constitui desta forma a nossa protecção contra as agressões do meio exterior (Franceschini, P., 1994).

Este epitélio é composto por cinco tipos de células histologicamente distintas que se encontram organizadas em camadas/estratos que de fora para dentro são designados por estrato córneo, estrato lúcido, estrato granular, estrato espinhoso e camada basal (Obagi, Z. E., 2004).

O estrato córneo possui uma dezena de camadas de células totalmente achatadas e desprovidas de núcleo (Franceschini, P., 1994). Estas células são muito ricas em queratina e resultam da dos elementos epiteliais profundos que se deslocam para a periferia, ocorrendo com esse deslocamento a sua degenerescência e morte celular. Em torno das células encontram-se lípidos libertados pelos corpos lamelares. Os lípidos são sobretudo responsáveis por muitas das características de permeabilidade da pele (Seeley *et al.*, 2001). O conteúdo hídrico desta camada é relativamente pequeno, apresentando apenas 7 a 20 % da quantidade total da água da pele.

O estrato lúcido, ou camada transição é formado essencialmente por células translúcidas, justapostas e ricas em eleidina (substância química precursora da queratina) (Nogueira Prista, L. *et al.*, 2008). Este estrato só está presente apenas em áreas mais espessas como a planta dos pés e as palmas das mãos.

O estrato granular é constituído por apenas algumas camadas de células achatadas a alongadas horizontalmente que possuem dois tipos de grânulos dispersos no seu citoplasma (Seeley *et al.*, 2001). Grânulos de querato-hialina e os pequenos grânulos lamelares ou também designados por corpúsculos de Odland. Os primeiros possuem na sua composição uma proteína, a filagrina, que intervém no processo de formação dos agregados de fibrilas de queratina. Os segundos por conter capacidade de hidrólise ácida podem agir como lisossomas

(Obagi, Z. E., 2004). Estes, ao contrário dos outros organelos não degeneram (Seeley *et al.*, 2001).

O estrato espinhoso é rico em células com forma poligonal. As suas células possuem um citoplasma com características basófilas e os núcleos arredondados são os que ocupam um maior volume de todas as camadas que é composta a epiderme (Obagi, Z. E., 2004).

A camada basal ou então também designada por camada germinativa é a camada de células mais profunda da epiderme. Possui apenas uma única fiada de células. As células que compõem esta camada têm forma cúbica (Franceschini, P., 1994) ou cilíndrica (Seeley *et al.*, 2001) e são dotadas de grande vitalidade (Nogueira Prista, L. *et al.*, 2008). Entre estas células pode-se encontrar os melanócitos e as células de Merkel (Franceschini, P., 1994).

A membrana basal é uma membrana que separa a epiderme da derme. Tem a função de barreira e de filtro e permite a passagem dos nutrientes para as restantes células da epiderme (Franceschini, P., 1994). Esta membrana é responsável por assegurar a camada basal da epiderme pela força estrutural que é conferida pelos hemidesmossomas, que fixam a epiderme à membrana basal e pelos desmossomas que mantêm juntos os queratinócitos. Os queratinócitos são reforçados internamente por fibras de queratina que se inserem nos desmossomas (Seeley *et al.*, 2001). Na figura 3 encontra-se representado esquematicamente o assunto descrito.

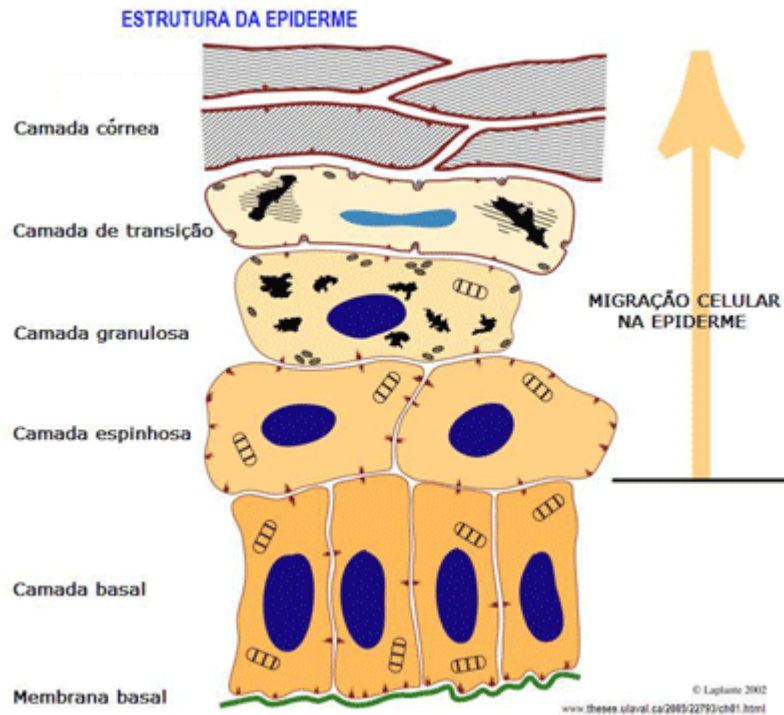


Figura 3: Representação esquemática das camadas da epiderme e a membrana basal (adaptado de <http://projetoferidas.zip.net/>)

1.2.2.2 Derme

A derme tem uma constituição bastante diferente da epiderme (Souza R.R., 2001). É composta por tecidos de suporte, designados por tecidos conjuntivos, da mesma forma que os ossos e as cartilagens. “É a parte sólida da pele” (Franceschini, P., 1994). Possui uma espessura de 500 a 1000 micrómetros (Obagi, Z. E., 2004). É constituída pelos fibroblastos (que são responsáveis pela produção da substância fundamental), pelas fibras de colagénio e em menor quantidade pelas fibras de elastina (Franceschini, P., 1994). Possui uma superfície mais ou menos ondulada dependendo da região do corpo onde se encontra. Essas projecções da derme designadas por papilas, preenchem os espaços das depressões da epiderme o que proporciona uma maior superfície de contacto entre as duas camadas.

A derme é subdividida em duas partes: a derme papilar e a derme reticular. Estas estão representadas na figura 4. A derme papilar é a parte que se encontra junto da membrana basal (Franceschini, P., 1994). É constituída por uma camada fina de tecido conjuntivo frouxo, as

fibras de colagénio e de elastina encontram-se dispostas de forma vertical, é rica em vasos sanguíneos, em substância fundamental e em terminações nervosas. A derme reticular encontra-se abaixo da derme papilar. Representa quatro quintos da espessura da derme é a camada mais espessa e a maior da derme. Possui fibras de colagénio entrelaçadas e as fibras de elásticas dispõem-se de forma densa, compactas e orientadas na horizontal (Obagi, Z. E., 2004).

“A derme é atravessada pelas glândulas sudoríparas e sebáceas, as quais constituem uma das melhores vias de penetração para os medicamentos. As glândulas sebáceas estão alojadas na zona superficial da derme e fazem parte, na sua quase totalidade, do folículo piloso. Apenas uma em cada dez aflora directamente à superfície da epiderme. Do folículo piloso, espécie de saco conjuntivo-epitelial que envolve a raiz do pêlo, sai o pêlo propriamente dito. Constitui, como as glândulas sebáceas, uma porta de entrada para a medicação cutânea” (Nogueira Prista, L. *et al.*, 2008).

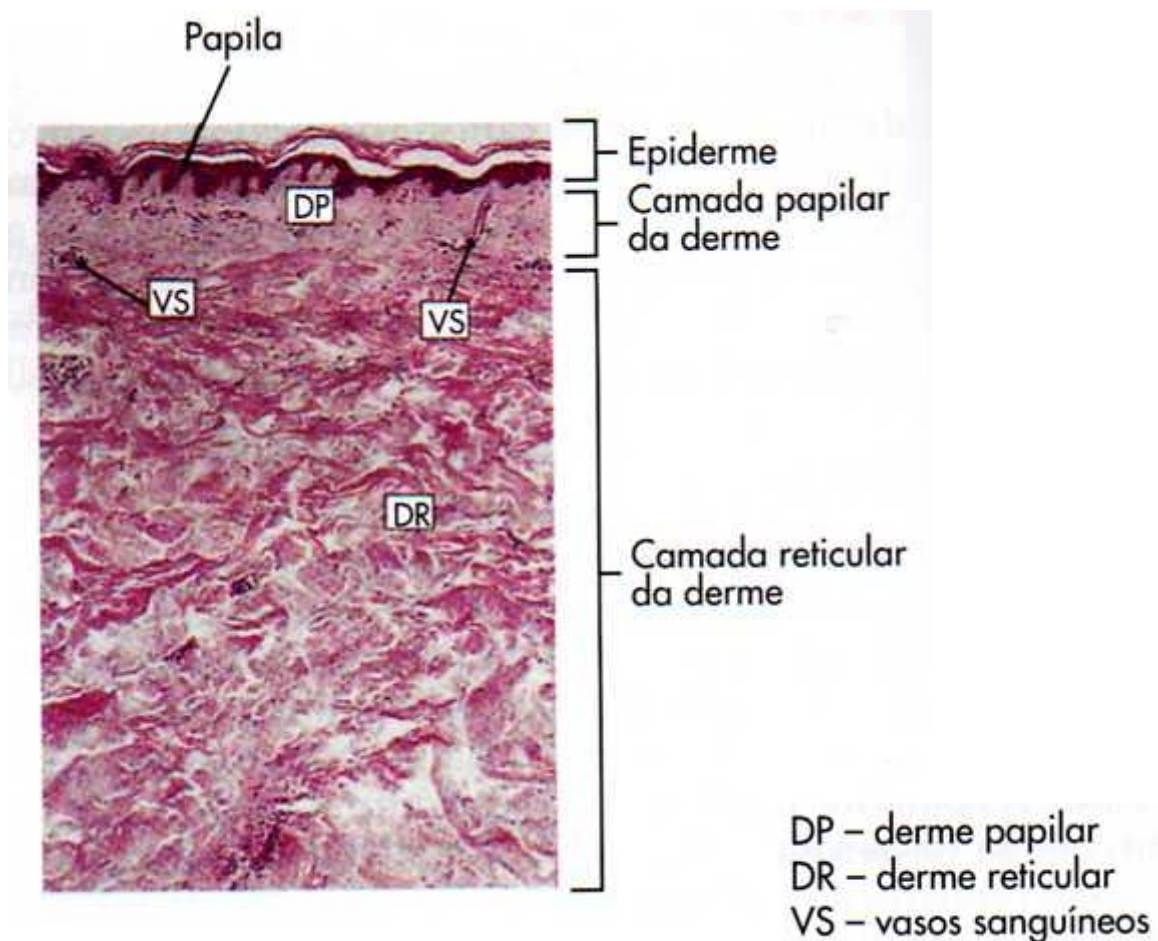


Figura 4: Microfotografia da derme, adaptado de Seeley *et al.*, 2001

1.2.3 Hipoderme

A hipoderme fica localizada abaixo da derme reticular. É composta por duas porções, uma delas fibro-adiposa e uma outra mais interior eminentemente fibrosa. É rica sobretudo em tecido adiposo. São várias as funções que nomeadamente tem: reserva, amortecedor e protecção térmica (Franceschini, P., 1994).

Metade da gordura armazenada no corpo encontra-se na hipoderme e a sua quantidade e localização variam com a idade, com o sexo e com a alimentação (Seeley *et al.*, 2001).

1.2.4 Funções da pele

A pele é um órgão vital no qual desempenha inúmeras funções relevantes para o nosso organismo sendo mas mais importantes as seguintes: protecção contra as agressões do meio exterior, termorregulação, função sensorial, função imunitária e função metabólica (Franceschini, P., 1994 e Seeley *et al.*, 2001).

A protecção contra agressões do mundo exterior é mais do que evidente. A pele tem a capacidade de funcionar de amortecedor devido ao facto de esta estar assente numa camada rica de tecido adiposo (a hipoderme), a elasticidade da derme a extensibilidade da camada córnea também contribui para esta função (Franceschini, P., 1994). Para além do mencionado, a pele intacta forma uma barreira física que evita a entrada de microorganismos e outras substâncias estranhas (Seeley *et al.*, 2001). E o facto da pele conter melanócitos que são responsáveis por produzir melanina, esta substância confere-nos protecção contra as radiações ultravioletas.

Quanto à função de termorregulação esta executa-se exclusivamente pela pele. Quando a temperatura do corpo aumenta por exemplo com a actividade física, com a febre, ou simplesmente com o aumento da temperatura ambiente, o organismo tende a repor a homeostasia fazendo libertar esse calor da seguinte forma: os vasos sanguíneos da derme dilatam-se, logo permite que mais sangue flua através da pele, transferindo desta forma o calor dos tecidos localizados mais profundos para a pele. Se acontecer o contrário, ou seja, se a temperatura do corpo começar a descer abaixo da temperatura normal, ocorrerá o fenómeno

da horripilação (ericação dos pêlos), ou seja, o calor pode ser conservado por uma diminuição do diâmetro dos vasos sanguíneos, reduzindo assim desta forma o fluxo do sangue para a pele (vasoconstrição) (Franceschini, P., 1994). Mas se a temperatura da nossa pele diminuir 15°C abaixo da nossa temperatura considerada normal (37°C), os vasos sanguíneos dilatam-se para evitar danos nos tecidos devido ao frio.

A função sensorial da pele é sobretudo representada pelos receptores sensoriais que ela possui, incluindo os receptores do tacto na epiderme e nas papilas da derme, os receptores da dor, do calor, do frio e de pressão na derme e em tecidos mais profundos (Seeley *et al.*, 2001). A função sensorial dá a informação essencial do que entra em contacto com a pele (Franceschini, P., 1994).

A função imunitária da pele limita-se á actividade das células de Langerhans, que provêm da medula óssea e na produção de citoquinas pelos queratinócitos que de certa forma interagem com os linfócitos (provenientes do sangue) que circulam na pele (Franceschini, P., 1994).

A produção da vitamina D representa essencialmente a função metabólica da pele. A sua síntese inicia-se pela pele exposta á radiação ultravioleta. O nosso organismo pode produzir toda a vitamina de que necessita desde que haja radiação suficiente. Mas também é possível adquirir esta vitamina através da ingestão de determinados alimentos tais como o fígado (particularmente o de peixe), a gema de ovo e produtos lácteos. A sua função é importantíssima para manter o metabolismo normal dos ossos, dos nervos e dos músculos, pois esta vitamina estimula o consumo do ião cálcio e do ião fosfato nos intestinos, promove a sua libertação nos ossos, reduz a perda de cálcio a partir dos rins, e aumenta os níveis de cálcio e fosfato no sangue (Seeley *et al.*, 2001).

1.3 Definições e propriedades das nanopartículas lipídicas

As primeiras nanopartículas preparadas com materiais de natureza lipídica foram desenvolvidas por Speiser et al em Zurique no começo dos anos oitenta e implicava o procedimento de uma emulsão. Neste procedimento era necessário recorrer ao emprego da agitação a alta velocidade, na mistura da fase oleosa com a aquosa. A fase aquosa teria que estar quente e conter o agente tensioactivo e a fase oleosa devia ter o lípido no seu estado líquido. Após a mistura procedia-se ao arrefecimento obtendo-se então partículas contendo a substância activa. Essas mesmas partículas lipídicas foram denominadas inicialmente *nanopellets*.

A primeira geração de partículas com tamanho nanométrico apareceu em 1991 com as SLN, por HPH e pela técnica da microemulsão.

As SLN possuem uma estabilidade química e física por um longo período de tempo e são capazes se estarem optimamente estabilizadas fisicamente numa dispersão aquosa durante 12 a 24 meses. Embora o tamanho submicrométrico dos seus núcleos e o seu baixo índice de polidispersão (IP) sejam os principais factores que afectam a sua estabilidade a longo prazo, o seu rendimento de produção é geralmente medido em função da eficácia de encapsulação (EE) e da capacidade de carga (CC) que são determinadas como segue:

$$EE = ((Pa - Ps) / Pa) \times 100$$

$$CC = ((Pa - Ps) / Pa Ps + PL) \times 100$$

onde Pa é o peso da S.A adicionado à formulação, Ps é o peso da S.A analisado no sobrenadante (após a separação do lípido e da fase aquosa por centrifugação), e PL é o peso do lípido adicionado na formulação. EE é definido pela razão entre o peso da S.A apreendida e a peso total da S.A e o CC é a relação entre o peso da S.A apreendida e o peso total do lípido.

Um problema relacionado com as SLN é que somente compostos de lípidos sólidos podem diminuir o EE e a CC devido ao processo de recristalização durante o tempo de armazenamento. Os NLC parecem superar tais inconvenientes, uma vez que são compostos

por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos, numa relação em que também o corpo sólido e a mistura do lípido são realizados à temperatura ambiente. A mistura do lípido pretende conseguir o modo de libertação da S.A encapsulada dentro dos NLC (Souto E. B. et al., 2007).

1.3.1 Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN)

SLN

Basicamente, a estrutura das nanopartículas lipídicas é composta por um núcleo sólido coberto por uma camada de moléculas de agente tensioactivo.

Para a incorporação de SLN foram propostos três modelos que diferem entre eles na posição e distribuição das moléculas da S.A no interior do núcleo sólido.

1.3.1.1 Tipo I

O tipo I de SLN é definido como o modelo homogéneo de matriz, porque a S.A é dispersada molecularmente no núcleo do lípido. Este modelo é obtido ao aplicar a HPH quente ou a frio numa relação optimizada da S.A e do lípido. Como consequência desta estrutura, as SLN do tipo I, podem mostrar propriedades de libertação da S.A de forma controlada (Souto E. B. et al., 2007).

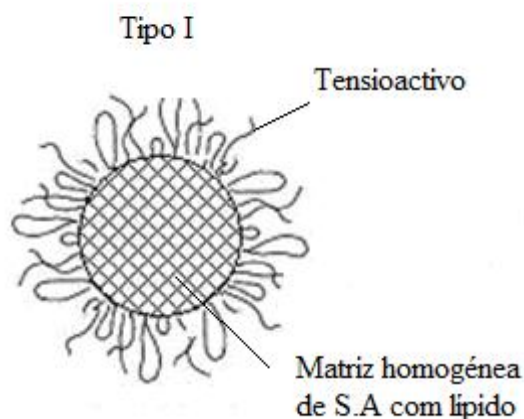


Figura 5: SLN do tipo I (adaptado de Souto E. B. et al., 2007)

1.3.1.2 Tipo II

As SLN do tipo II, são obtidas quando se aplica a técnica HPH a quente e a concentração da S.A é baixa no lípido fundido.

Durante a refrigeração no processo de homogeneização de uma nanoemulsão, as moléculas lipídicas precipitam primeiramente, conduzindo a uma concentração crescente de S.A na fracção do lípido fundido. Quando ocorre a saturação da S.A no lípido fundido ocorre a formação de um núcleo sólido no exterior contendo a S.A na sua forma livre.

Este modelo não é apropriado para ocorrer a libertação controlada da S.A. No entanto pode ser usado para obter uma libertação rápida da S.A, para além das propriedades oclusivas do lípido (Souto E. B. et al., 2007).

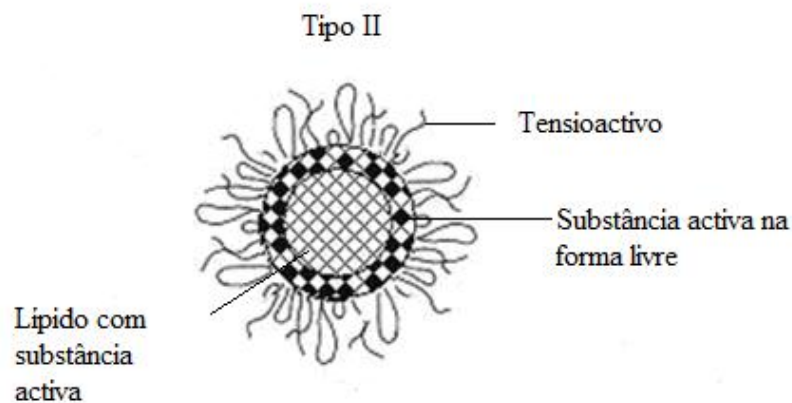


Figura 6: SLN do tipo II (adaptado de Souto E. B. et al., 2007)

1.3.1.3 Tipo III

As SLN do tipo III ou o modelo da S.A enriquecida no centro do núcleo, forma-se quando a concentração da S.A está relativamente próxima da solubilidade de saturação do lípido. Ou quando uma nanoemulsão é submetida à refrigeração levando a uma diminuição da

solubilidade de saturação. A S.A precipita e é coberta por um lípido que forma um escudo protector (Souto E. B. et al., 2007).

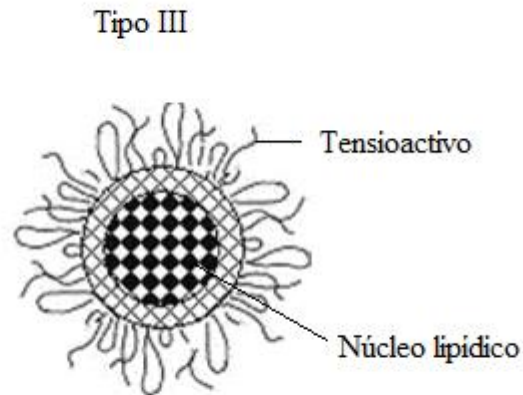


Figura 7: SLN do tipo III (adaptado de Souto E. B. et al., 2007)

1.3.2 NLC

Os NLC são compostos também por um núcleo sólido coberto por agente tensioactivo usado durante a produção.

Para estas nanopartículas também existem três modelos da incorporação descritos na literatura. Os três modelos diferem principalmente nos lípidos usados para sua produção.

1.3.2.1 Tipo I

Os NLC do tipo I, ou modelo de cristal imperfeito, consiste numa matriz imperfeita com vácuos que pode acomodar as moléculas de S.A. Este modelo é obtido quando se mistura lípidos sólidos com determinadas quantidades de lípidos líquidos. Devido aos diferentes comprimentos das cadeias dos ácidos gordos e da mistura de mono -, di- e os triacilgliceróis, a matriz dos NLC não possui uma estrutura altamente requisitada para incorporar a S.A (Souto E. B. et al., 2007).

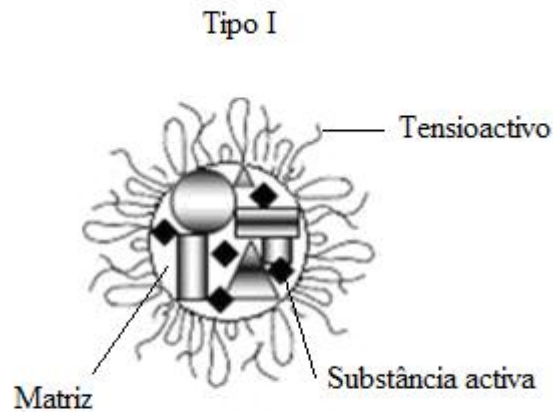


Figura 8: NLC do tipo I (adaptado de Souto E. B. et al., 2007)

1.3.2.2 Tipo II

As NLC do tipo II, ou também designado por modelo amorfo, são criadas quando os lípidos (por exemplo, [hydroxyoctacosanylhydroxystearate](#), [isopropylmyristate](#), [adipate dibutyl](#)) são misturados mas não são recristalizados após a homogeneização e a refrigeração da nanoemulsão. Estes lípidos podem criar partículas sólidas de estrutura amorfa, que pode evitar a ocorrência de recristalização do lípido sob refrigeração durante a vida útil, minimizando a libertação da S.A durante o tempo de armazenamento (Souto E. B. et al., 2007).

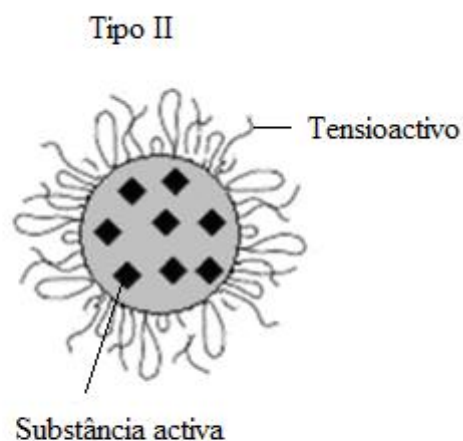


Figura 9: NLC do tipo II (adaptado de Souto E. B. et al., 2007)

1.3.2.3 Tipo 3

As NLC do tipo III ou o modelo múltiplo.

Os nanocompartimentos dos NLC do tipo III são formados por compostos oleosos criados dentro da matriz do lípido sólido das nanopartículas numa fase durante o processo de separação. Isto resulta da mistura de lípidos sólidos com óleos (por exemplo, triacilgliceróis de cadeia média e longa e ácido oleico).

Durante o processo de arrefecimento da nanoemulsão, as gotas do lípido alcançam a miscibilidade quando atingem 40°C. Seguidamente o óleo fundido começa a solidificar e precipita em pequenas gotas. Subsequentemente o lípido no estado sólido conduz à fixação dos nanocompartimentos oleosos.

A vantagem deste modelo é o aumento de CC para as substâncias activas que mostram geralmente uma solubilidade mais elevada nos lípidos no estado líquido do que nos lípidos no estado sólido (Souto E. B. et al., 2007).

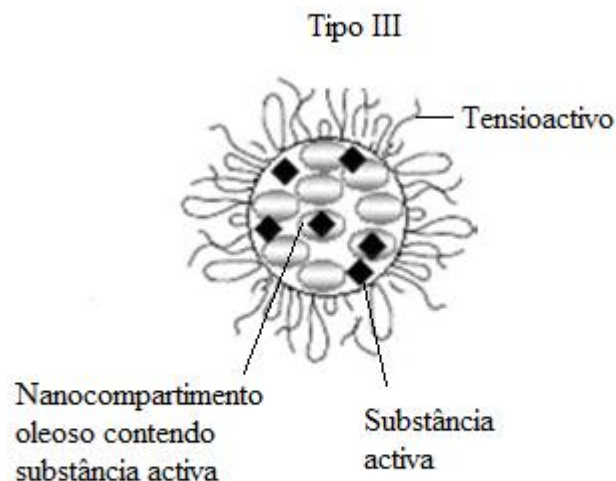


Figura 10: NLC do tipo III (adaptado de Souto E. B. et al., 2007)

1.4 Métodos de produção

A literatura científica descreve três métodos de produção que podem ser utilizados para produzir SLN e NLC. Esses métodos consistem no emprego da técnica da HPH (Müller, R. H. e Lucks, J. S., 1996; Fukui et al., 1998) que pode ser realizada quer a quente quer a frio, a técnica de preparação de microemulsões (Gasco, M.R., 1993; Heiati et al., 1998) e a técnica emulsificação-evaporação do solvente (Sjöström et al., 1992).

Mais recentemente, outras técnicas também foram testadas para a preparação de SLN e de NLC nomeadamente a técnica de substituição do solvente (Hu et al., 2002; Dubes et al., 2003; Schubert, M. A. e Müller-Goymann C. C., 2003), a técnica de emulsificação-difusão do solvente (Battaglia et al., 2007; Shahgaldian et al., 2003; Quitanar-Guerrero et al., 2005), a inversão de fases (Heurtault. B., et al., 2002), a emulsificação de solventes por ultra-sons (Trotta et al., 2003) e por fim a técnica dos fluidos supercríticos (Chattopadhyay, P. et al., 2007). Todas estas técnicas mencionadas serão descritas a seguir.

1.4.1 HPH

Durante muitos anos a HPH foi usada para preparar nanoemulsões (ex: Intralipid[®] e o Lipofundin[®]) que se destinavam sobretudo à nutrição pela via parenteral (Müller, R. H. e Lucks, J. S., 1996). Há pouco mais de uma década Müller e Lucks decidiram recorrerem aos princípios básicos desta técnica e desenvolveram-na de forma a produzirem nanopartículas de natureza lipídica. O sucesso desta técnica foi de tal ordem que foi considerada de imediato como uma técnica ideal para a preparação de SLN e que para além disso ainda possui a vantagem de poder ser realizada tanto a frio como a quente. Em ambos os casos, a S.A é dissolvida ou então dispersada no lípido que deve estar no seu estado líquido (Müller, R.H., et al., 1995; Müller, R.H., et al., 2000) e com uma concentração apropriada até 40%. Normalmente com este método obtém-se partículas homogêneas, de pequeno tamanho e com um baixo IP (Yang, S.C., et al., 1999; Yang, S.C. e J.B. Zhu., 2002).

O facto das partículas obtidas serem praticamente todas do mesmo tamanho contribui bastante para a estabilidade física da dispersão da fase aquosa e como também possui um baixo IP, o risco de ocorrer agregação é muito reduzido (Souto E. B., et al., 2007).

Os homogeneizadores do tipo **rotor...** e os ultrassons determinam a energia de uma forma mais heterogénea, enquanto que a homogeneização por HPH origina uma distribuição de energia mais homogénea porque o tamanho da abertura do seu homogeneizador é mais pequeno. Como este último é o mais eficaz em relação aos outros, logo também é o mais usado.

A HPH implica que o líquido passe por uma abertura muito estreita (escala micrométrica) a uma elevada pressão (100-2000 bar) numa curta distância. O líquido desta forma consegue atingir uma velocidade consideravelmente elevada, cerca de 1000 km/h, o que permite obter partículas com dimensões e características desejadas (escala inferior à submicrométrica) (Mäder, K. e Mehnert, W., 2001).

1.4.1.1 HPH a quente

A HPH a quente é uma técnica realizada a temperaturas superiores ao ponto de fusão do lípido a empregar, e pode ser considerada uma homogeneização de uma emulsão.

O procedimento da preparação de nanopartículas de natureza lipídicas por HPH a quente é representado esquematicamente na seguinte Figura (Müller, R.H., et al., 2006).

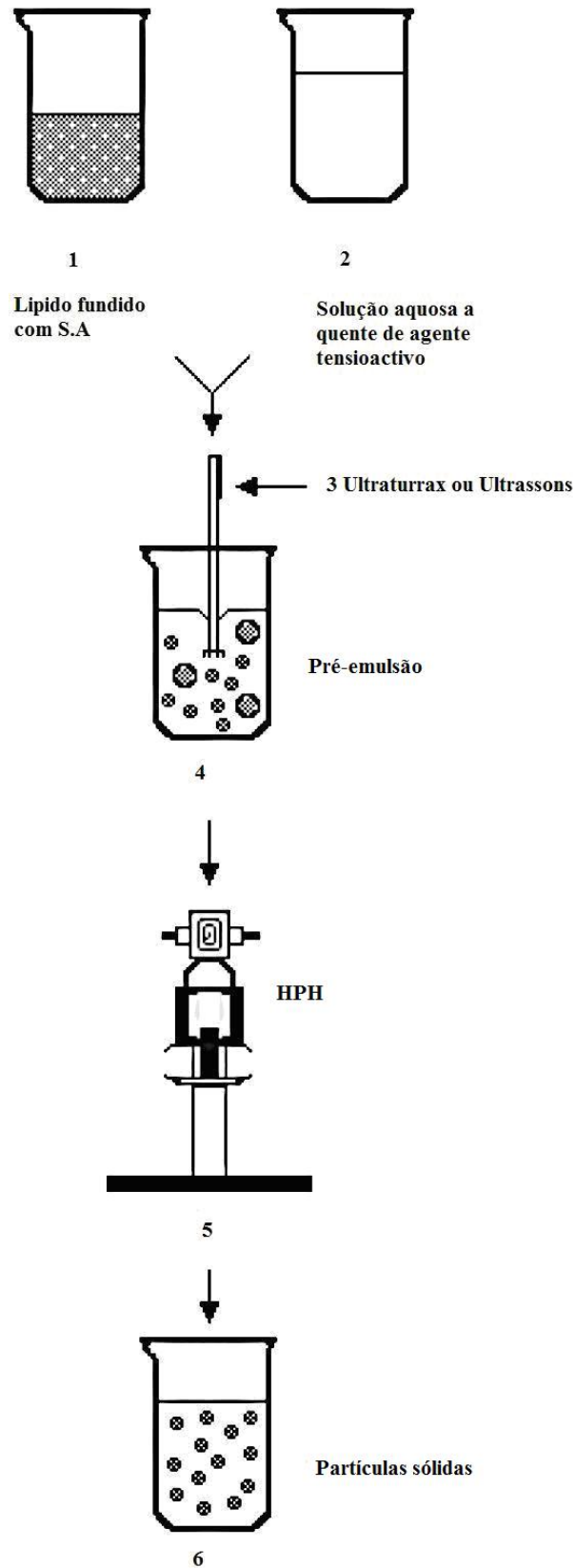


Figura 11: Procedimento esquemático da técnica de HPH a quente (adaptado de Souto E. B. e Müller, R. H., 2006)

A S.A e o lípido fundido (1) são dispersados numa solução aquosa a quente de agente tensioactivo (2) à mesma temperatura, com uma elevada agitação realizada pelo ultraturrax (Sjöström, B. and B. Bergenstahl., 1992) ou pelo ultrassons (3). Este procedimento leva à ruptura das gotas de grandes dimensões, originando gotas com menores dimensões.

A pré-emulsão obtida (4) passa através de um HPH (5). Na maioria dos casos 3 a 5 ciclos com uma pressão entre 500-1500 bar são suficientes. O aumento da pressão sobre o número dos ciclos, resulta frequentemente num aumento do tamanho das partículas devido á aproximação das partículas que ocorre em consequência da elevada energia cinética das partículas.

O produto preliminar da homogeneização a quente é uma nanoemulsão devido ao estado líquido do lípido. Com a refrigeração obtém-se as partículas sólidas (6).

A qualidade da pre-emulsão afecta a qualidade do produto final, desde logo é desejável obter-se gotas de pequenas dimensões (escala micrométrica).

A HPH da pre-emulsão como é realizada a temperaturas superiores ao do ponto de fusão do lípido, estas altas temperaturas podem promover a formação de partículas com tamanhos inferiores devido à diminuição da viscosidade da fase interna. E para além disso, temperaturas elevadas também podem levar ao aumento da taxa de degradação da S.A e dos componentes a serem usados. A etapa de homogeneização pode ser repetida várias vezes mas deve-se ter sempre em mente, que a HPH aumenta a temperatura da amostra (aproximadamente 10°C para uma pressão de 500 bar).

Esta técnica é aplicada com bastante frequência para a incorporação de substâncias de natureza lipófila que são insolúveis num determinado solvente (Müller, R.H., et al., 2006; Müller, R.H., et al., 2007). Quanto ao emprego desta técnica para substâncias com características hidrófilas, este procedimento não é o mais apropriado, uma vez que durante a homogeneização da fase lipófila com a substância hidrófila, esta última não se incorpora na fase lipófila devido as suas características, obtendo-se assim uma taxa de encapsulação demasiado baixa.

1.4.1.2 HPH a frio

Enquanto que a HPH a quente é realizada com o lípido no estado líquido, na HPH a frio esta técnica é realizada com o lípido no estado sólido. Na HPH a frio é importante fazer o controle da temperatura de uma forma eficaz e manter o seu regulamento a fim de assegurar que o lípido não funda devido no aumento na temperatura durante a homogeneização.

A HPH a frio foi desenvolvida sobretudo para superar três problemas da técnica de homogeneização a quente, sendo eles: (i) a temperatura que induz a degradação da S.A; (ii) a distribuição da S.A na fase aquosa durante o processo de homogeneização; (iii) e a complexidade da etapa de cristalização na nanoemulsão que conduz a diversas modificações (Mäder,K. e Mehnert,W.,2001). O procedimento da HPH a frio é representado esquematicamente na Figura 12.

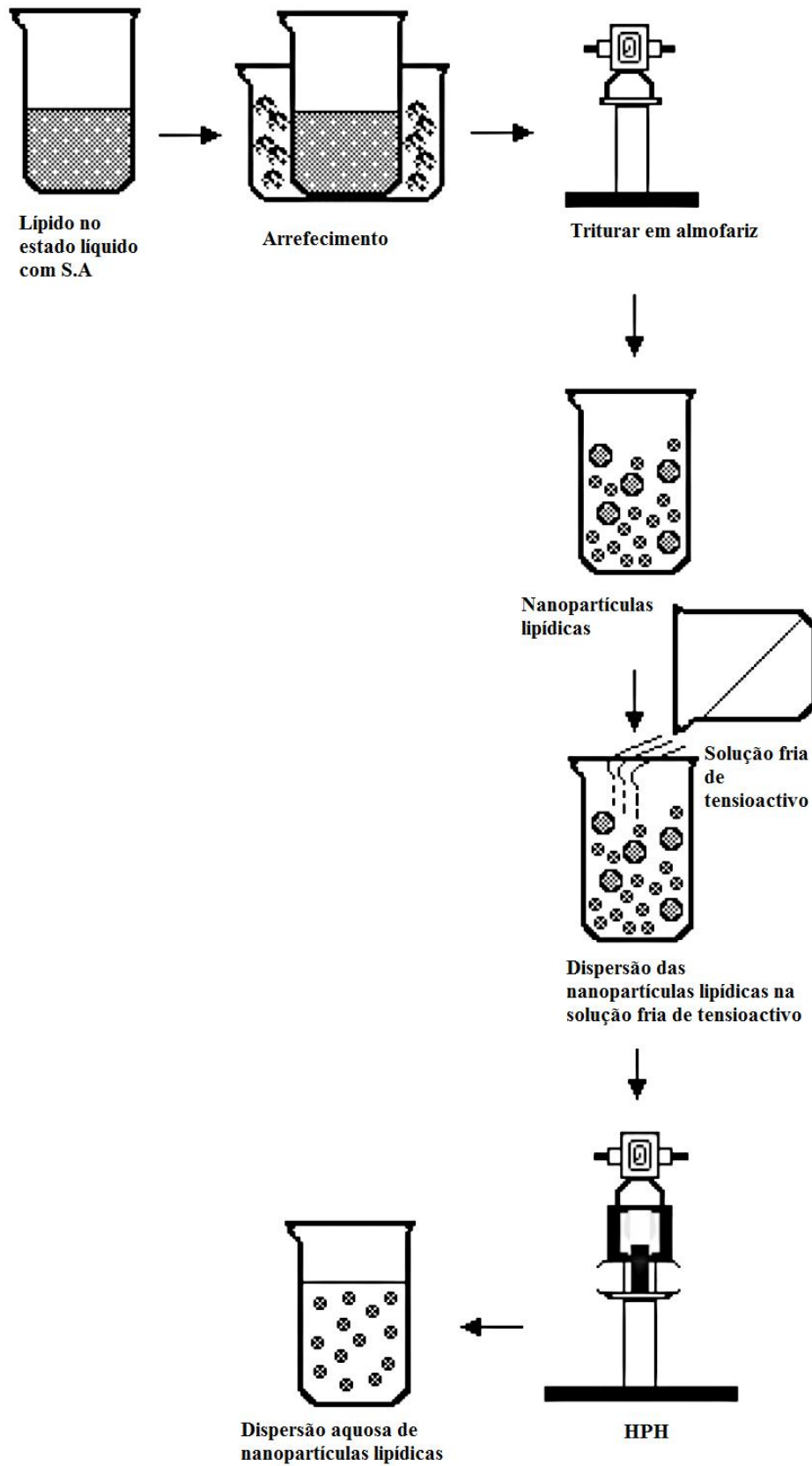


Figura 12: Procedimento esquemático da técnica de HPH a frio (adaptado de Souto E. B. e Müller, R. H., 2006)

A primeira etapa é igual ao procedimento da HPH a quente que inclui a solubilização ou a dispersão da S.A no lípido fundido, mas as etapas seguintes são diferentes uma vez que a S.A que está solubilizada ou dispersa no lípido fundido tem que ser rapidamente refrigerada por gelo seco ou por azoto líquido. A elevada taxa de refrigeração favorece uma distribuição homogénea da S.A dentro da matriz do lípido. O sólido obtido, S.A que contem o lípido, é fragmentado em micropartículas. As dimensões típicas das partículas obtidas encontram-se entre 50-100 μm . As baixas temperaturas aumentam a fragilidade do lípido e facilitam, conseqüentemente a redução do tamanho das partículas.

Os lípidos sólidos são dispersados numa solução fria de agente tensioactivo. A pré-suspensão é sujeita à HPH ou ao arrefecimento da temperatura ambiente.

Geralmente, na homogeneização a frio obtém-se partículas maiores e com uma distribuição mais ampla comparativamente com a homogeneização a quente.

O método de homogeneização a frio minimiza a exposição térmica da amostra, mas não a evita devido à fusão do lípido com a mistura da S.A na etapa inicial.

Esta técnica é recomendada para compostos extremamente sensíveis à temperatura, tais como péptidos, proteínas e os compostos hidrófilos que podem separar a fase lipófila da fase hidrófila durante HPH a quente. Para minimizar a perda de compostos hidrófilos na fase aquosa da suspensão, a água pode ser substituída por líquidos com baixa solubilidade para a S.A tais como óleos e glicóis de polietileno de baixo peso molecular (PEG 600 ou PEG 800) (Müller, R.H., Mäder, K, Gohla, S., 2000).

1.4.2 Microemulsão

A técnica da microemulsão foi desenvolvida por Gasco e seus colegas de trabalho com o objectivo de preparar SLN por diluição de microemulsões (Gasco, M.R., 1993).

Gasco e outros cientistas consideram microemulsões como sistemas bifásicos, compostos por uma fase interna e uma fase externa, como por exemplo microemulsões do tipo O/A. As

microemulsões são realizadas por excitação de uma mistura óptica transparente entre 65-70°C que é composta tipicamente por um ácido gordo com um baixo ponto de fusão (exemplo: ácido esteárico), um agente tensoactivo (por exemplo polissorbato 20, polissorbato 60, fosfatidilcolina de soja e o sal ácido taurodeoxicólico de sódio), co-tensoactivos (monoetilfosfato de sódio e butanol) e água. Ainda a quente a microemulsão é dispersada em água fria (2-3°C) sob agitação. A proporção da microemulsão a quente em água fria pode ser de 1:25 a 1:50. O processo da diluição é determinado criteriosamente pela composição da microemulsão.

Outros colaboradores franceses, nomeadamente Fessi também usou técnicas similares para o procedimento de nanopartículas. Fessi produziu partículas poliméricas através da diluição de soluções poliméricas em água e posteriormente o tamanho das suas partículas foi determinado rigorosamente pela velocidade dos processos de distribuição.

Também foram produzidas nanopartículas somente com solventes que se distribuem muito rapidamente na fase aquosa (acetona), enquanto que partículas de maiores dimensões foram obtidas com solventes mais lipófilos. A **temperatura de gradiente** e o valor fixo de pH reparam a qualidade do produto para além da composição da microemulsão. As elevadas **temperaturas de gradiente** facilita a rápida cristalização do lípido e impede a agregação. Devido à etapa da diluição, os índices do lípido são consideravelmente mais baixos comparados com as formulações baseadas em HPH (Mäder, K. e Mehnert, W., 2001). O procedimento de uma microemulsão encontra-se representado esquematicamente na Figura 13.

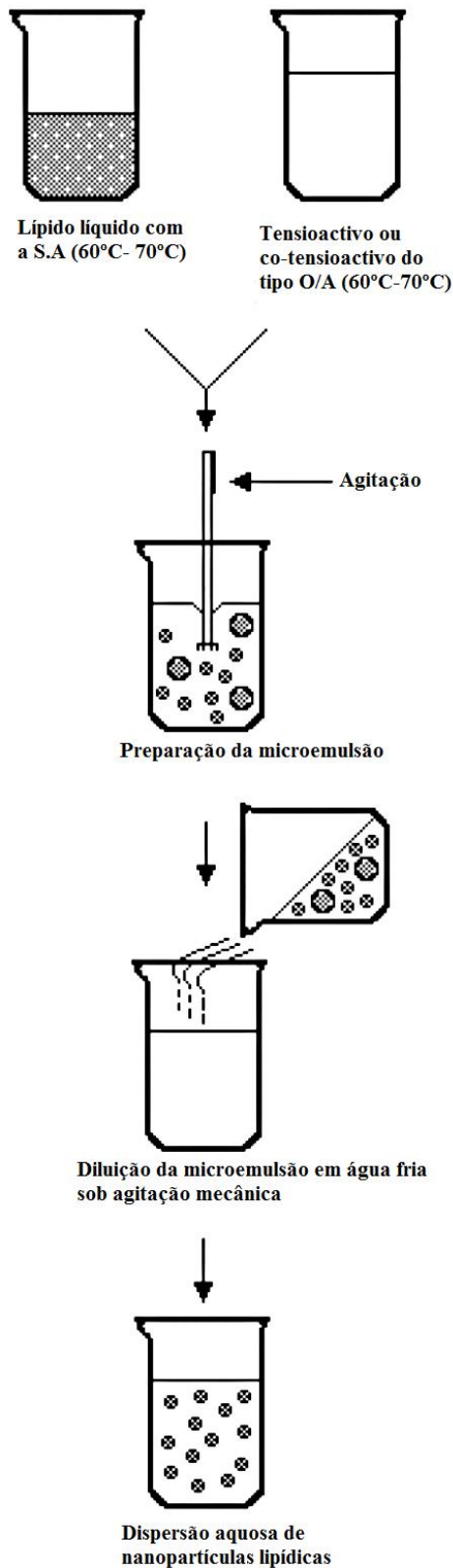


Figura 13: Procedimento esquemático da obtenção de nanopartículas lipídicas pela técnica de microemulsão (adaptado de Souto E. B. e Müller, R. H., 2006)

O lípido é fundido com a S.A a uma temperatura entre 60°C e 70°C e o agente tensioactivo ou o co-tensioactivo do tipo O/A que contem a fase aquosa é aquecido separadamente também à mesma temperatura.

A fase lipófila e a fase hidrófila são misturadas por agitação mecânica de modo a obter-se relações típicas que variam entre 1:25 a 1:50 e assim originar a tão desejada microemulsão (Heiati, H., Tawashi, R., e Phillipps, N.C., 1998; Zhang, Q., et al., 2000; Ugazio, E., Cavalli R., e Gasco, M. R., 2002; Bekerman, T. e Golenser, A. J. D., 2004 e Rudolph, C., et al., 2004). Ainda a quente, a microemulsão é diluída num excesso da água fria (Heiati, H., Tawashi, R., e Phillipps, N.C. 1998; Sjöström, B. e Bergenstahl, B., 1992).

Este procedimento conduz à "quebra" da microemulsão, convertendo-a numa nanoemulsão ultrafina, que recristaliza a fase interna do lípido dando forma às partículas. As razões para isto acontecer, são nomeadamente a diluição em água, a diminuição da temperatura e a composição típica da microemulsão: 10-15% de lípidos, 15-25% de tensioactivo, 2-10% de co-solvente e 50-73% de água (Ishikado, A., et al., 2005).

As desvantagens da técnica de microemulsão são sobretudo a diluição da suspensão da partícula com água e da necessidade de se recorrer a elevadas concentrações de agentes tensioactivos, de co-solventes (exemplo o butanol) e essências para estabilizar a formulação (Battaglia, L., et al., 2007).

1.4.3 Emulsificação-evaporação do solvente

Sjöström e Bergenstahl foram os autores da técnica emulsificação-evaporação do solvente que serve para preparar dispersões de nanopartículas por precipitação em emulsões do tipo O/A.

O método consiste basicamente no seguinte: o material lipófilo é dissolvido num solvente orgânico imiscível em água (por exemplo: ciclohexano) que depois é emulsionado na fase aquosa. Após a evaporação do solvente é formada uma dispersão de nanopartículas pela precipitação do lípido em meio aquoso. O diâmetro médio das partículas obtidas é de 25 nm quando se utiliza o acetato de colesterol, a S.A e a mistura lecitina/glicolato de sódio como agente tensioactivo.

Westesen também preparou nanopartículas. Mas este em vez de recorrer ao acetato de colesterol utilizou o tripalmitico. Dissolveu o triglicérido no clorofórmio. Posteriormente esta solução foi emulsionada na fase aquosa por HPH e depois foi removido o solvente orgânico da emulsão pela evaporação sob pressão reduzida (40-60 mbar).

O tamanho médio das partículas obtidas com estes constituintes podem variar entre 30 e os 100 nm dependendo da mistura de lecitina / co-solvente. Também é possível obter-se partículas com os diâmetros médios inferiores a 30 nm através da utilização de sais de biliare como co-solventes.

O tamanho médio de partícula normalmente depende da concentração do lípido na fase orgânica. A crescente satisfação da eficiência dos lípidos levou ao declínio da homogeneização, devido à viscosidade ser mais elevada na fase dispersa (Mehnert, W. e Mäder, K., 2001).

Esta técnica emulsificação-evaporação do solvente está representada esquematicamente na Figura 14 (Müller, R.H., et al., 2006).

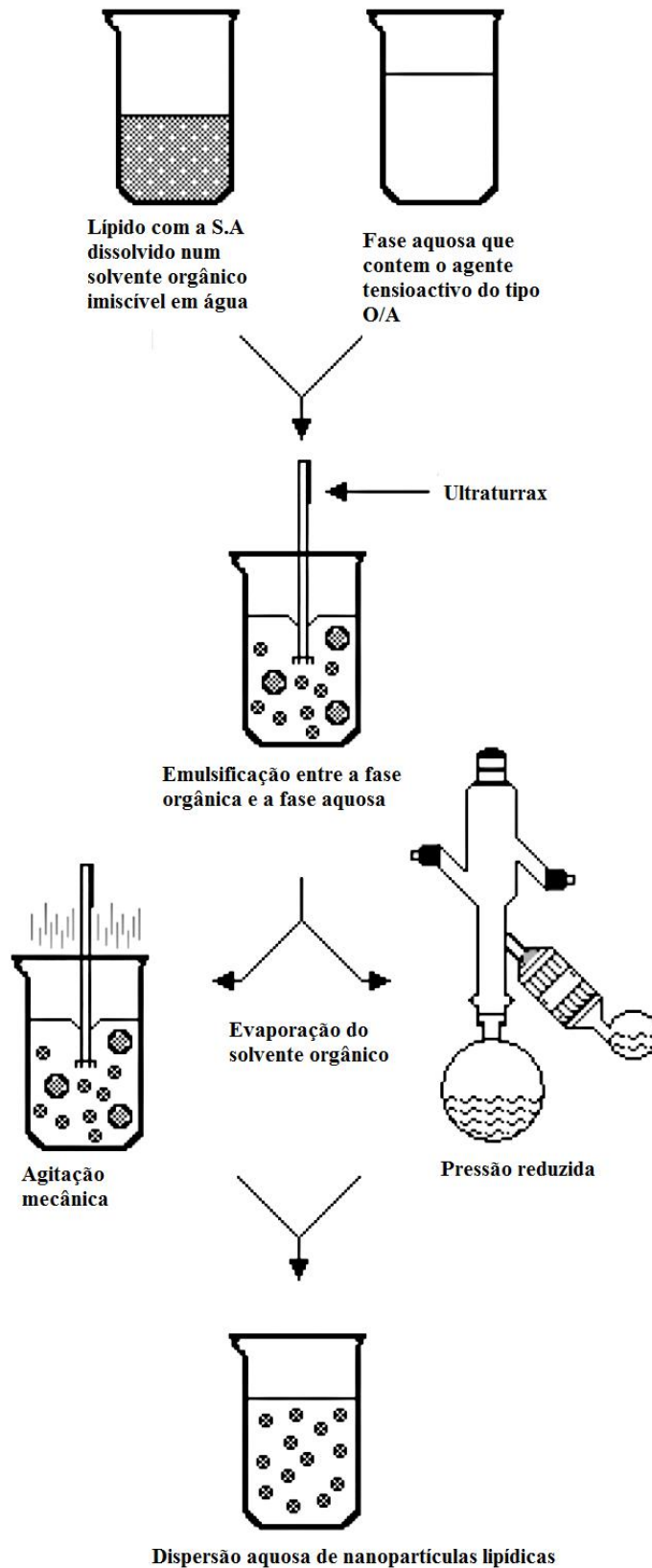


Figura 14: Procedimento esquemático da obtenção de nanopartículas pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente (adaptado de Souto E. B. e Müller, R. H., 2006)

O lípido é dissolvido num solvente orgânico imiscível em água, tal como o ciclohexano, o clorofórmio, o acetato de etilo ou o cloreto de metileno. A substância activa é dissolvida ou dispersada previamente na fase orgânica que contem o lípido (Sjöström, B. e Bergenstahl, B., 1992; Siekmann, B., Westesen, K., 1996).

Esta fase orgânica é emulsionada por agitação mecânica numa fase aquosa que contem o tensoactivo do tipo O/A, Seguidamente o solvente orgânico da emulsão O/A obtida, é evaporado sob agitação mecânica ou por pressão reduzida. As nanopartículas são dispersas sob a forma de precipitação no meio aquoso (Siekmann, B., Westesen, K., 1996).

Este método pode ser aplicado para a incorporação de moléculas hidrófilas tais como péptidos e proteínas, que devem ser previamente dissolvidas numa fase aquosa que se prepara neste caso numa emulsão do tipo A/O/A (Battaglia, L., et al., 2007).

A principal vantagem deste procedimento em relação à técnica HPH a frio é essencialmente evitar o stress térmico e a principal desvantagem é sobretudo o uso dos solventes orgânicos (Mehnert, W. e Mäder, K., 2001).

1.4.4 Substituição do solvente

A técnica de substituição do solvente foi descrita primeiramente por Fessi e seus colaboradores para a preparação de nanopartículas poliméricas (Galindo- Rodriguez, S.A., et al., 2005).

Mas recentemente os princípios desta técnica foram utilizados para preparar SLN. O seu procedimento é descrito esquematicamente na Figura 15 (Müller, R.H., et al., 2006).

Formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas lipídicas

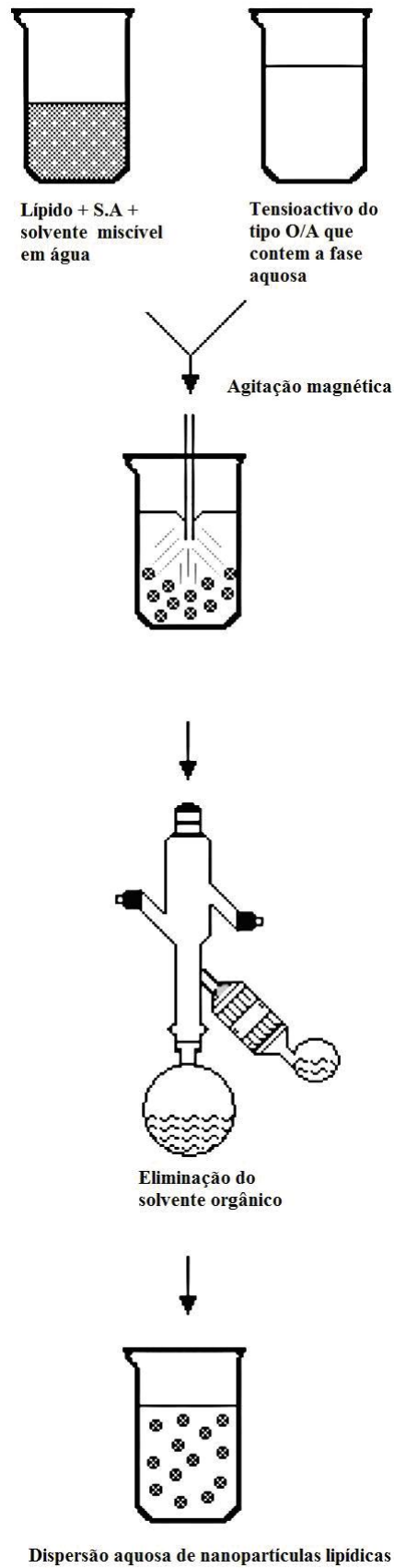


Figura 15: Procedimento esquemático da preparação de SLN pela técnica substituição do solvente (adaptado de Souto E. B. e Müller, R. H., 2006)

Neste processo, o lípido é dissolvido num solvente miscível parcialmente em água (semipolar) tal como o etanol, a acetona, ou o metanol, e a S.A é dissolvida ou dispersada nesta fase. Simultaneamente a esta fase, é preparado um tensioactivo do tipo O/A que contem a fase aquosa. A fase orgânica é adicionada à fase aquosa sob agitação magnética de forma violenta para conseguir-se obter a miscibilidade das fases. As gotas do solvente são de dimensão nanométrica e são quebradas da relação O/A. Mas são estabilizadas rapidamente pelas moléculas de agente tensioactivo que se encontra na fase aquosa. A remoção do solvente pode ser executada por destilação e nanopartículas de natureza lipídica são formadas após a completa evaporação deste (Müller, R.H, et al., 2006).

1.4.5 Emulsificação-difusão do solvente

Quintanar-Guerrero e Fessi desenvolveram a técnica da emulsificação-difusão do solvente para produzir nanopartículas poliméricas baseados em polímeros sintéticos (Quintanar-Guerrero, D., et al., 1998).

Entretanto, esta técnica tem sido aplicada recentemente para preparar nanopartículas lipídicas. Este procedimento envolve o uso de um solvente parcialmente solúvel em água tal como o álcool benzílico, o ácido isobutírico ou o tetrahydrofurano, previamente saturado com água para assegurar o equilíbrio termodinâmico inicial entre os dois líquidos (água e solvente). O lípido é dissolvido no solvente saturado, produzindo uma fase orgânica onde a S.A é adicionada. Esta fase orgânica é então emulsionada, sob agitação vigorosa, numa solução aquosa que contem agente estabilizador para obtenção de uma emulsão do tipo O/A.

Seguidamente, a água é adicionada ao sistema, sob agitação mecânica de forma moderada, o que vai facilitar a difusão do solvente na fase externa, e o lípido inicia a precipitação.

Dependendo de seu ponto de ebulição, o solvente pode ser eliminado por ultrafiltração ou por destilação.

Depois da eliminação completa do solvente orgânico, as nanopartículas lipídicas são formadas numa dispersão aquosa (Muller, R.H., et al., 2006). A representação esquemática da técnica encontra-se na Figura 16 (Muller, R.H., et al., 2006).

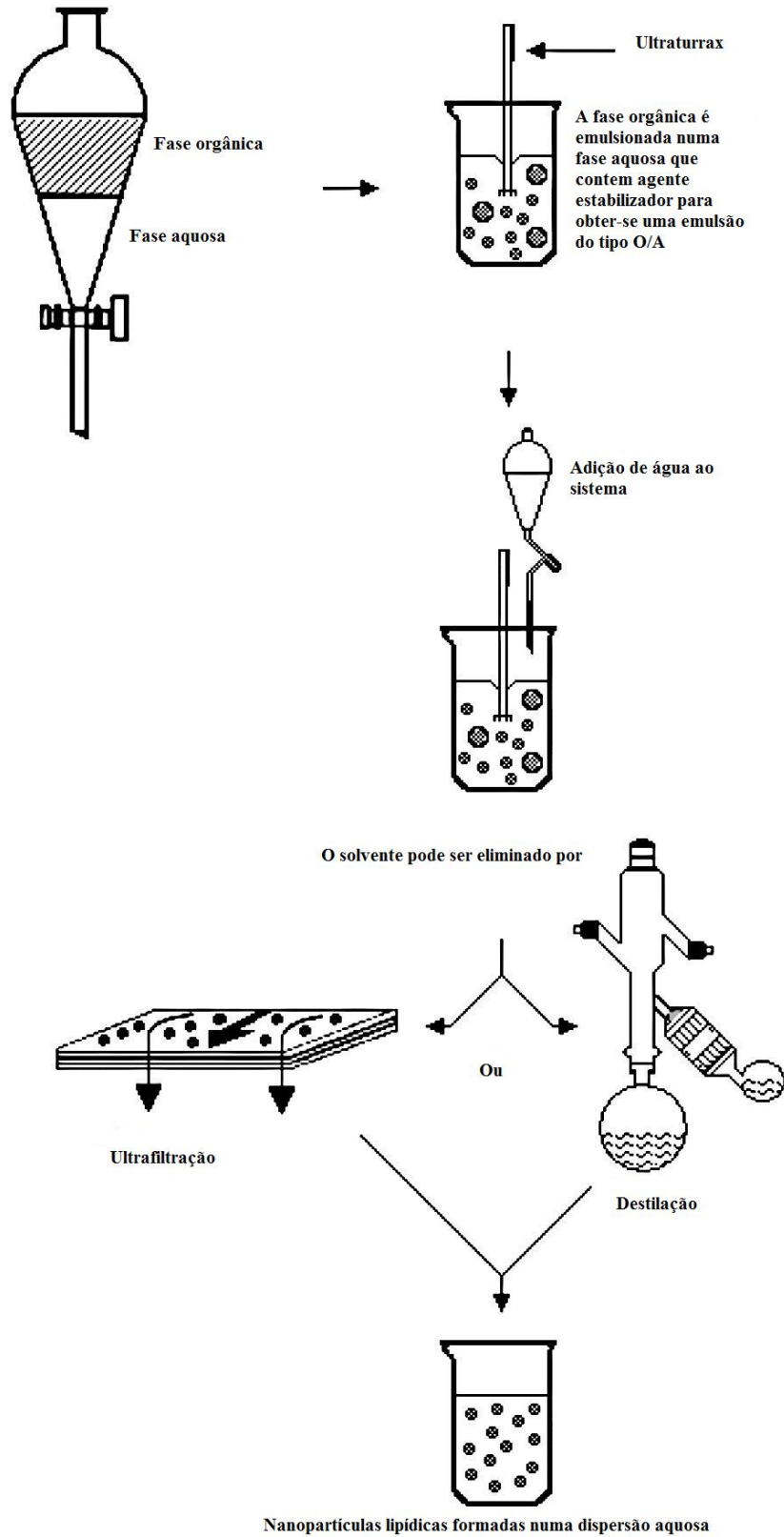


Figura 16: Procedimento esquemático da preparação de SLN pela técnica da emulsificação-difusão do solvente (adaptado de Muller, R.H., et al., 2006).

1.4.6 Inversão de fases

A técnica inversão de fases foi descrita por Heurtault et al (Heurtault, B. et al., 2000 e Heurtault, B. et al., 2002) e esta técnica também é utilizada para preparar nanopartículas de natureza lipídica.

A fase inicial consiste na agitação magnética de todos os constituintes da formulação. Após esta fase realizam-se 3 ciclos de temperatura (85 – 60 – 85 – 60 – 85°C) que são aplicados com uma taxa de 4°C por minuto. Este tratamento térmico promoverá a inversão da emulsão.

A fase seguinte consiste na diluição sob condições de refrigeração, com água destilada fria (aproximadamente 0°C). Esta diluição causará um choque irreversível à mistura e quebrará o sistema em nanopartículas lipídicas.

Mais tarde, emprega-se agitação magnética de forma lenta para evitar a agregação das partículas (Souto E. B. et al., 2007).

Esta técnica tem a vantagem de se modificar a escala da temperatura, sendo este um ponto muito importante a ter em consideração para a incorporação das substâncias activas sensíveis à temperatura (Heurtault, B. et al., 2002). Uma vez que o período de aquecimento é pequeno, não é esperado a degradação da S.A. A inversão de fases evita também o uso de solventes orgânicos, o que é desejável para administração dos sistemas.

1.4.7 Fluidos supercríticos

A técnica de fluidos supercríticos consiste num novo método de produção para suspensões de SLN, que depois serão utilizadas em aerossóis nomeadamente para administração pulmonar. As SLN além de terem a vantagem de incorporar substâncias activas hidrófobas, possuem também uma boa biodisponibilidade, são de fácil bioadesividade ao pulmão e uma rápida dissolução da S.A .

As nanosuspensões lipídicas são produzidas pela extracção de fluidos supercríticos do solvente orgânico das emulsões do tipo O/A. Desta maneira, a flexibilidade da engenharia da partícula usar sistemas de emulsão é combinada com a elevada eficiência e estabilidade do fluido supercrítico na extracção contínua.

O tempo de processamento requerido para a precipitação da partícula normalmente é curto, o que facilita uma operação consistente, controlada e uma distribuição do tamanho uniforme da partícula. A interacção entre o fluido supercrítico (CO₂) e o lípido durante a extracção podem conduzir à diminuição da temperatura de transição do vidro ou à supressão do ponto de fusão, e dar origem á oportunidade de criar partículas com estruturas e propriedades físicas diferentes.

O procedimento experimental consiste então em dissolver o lípido (tripalmitina, TP; tristearina, TS ou Gelucire 50/13, GC) e a S.A (a indometacina ou cetoprofeno, KP) numa solução de clorofórmio com lecitina de soja (tensioactivo). Depois dispersa-se esta solução numa fase aquosa de glicolato de sódio. Seguidamente aplica-se HPH a fim de se obter uma emulsão do tipo O/A com partículas de tamanho que podem variar entre 30 – 100 nm.

A emulsão O/A é introduzida dentro de uma coluna de extracção (comprimento-1metro e volume- 4 L) com um fluxo constante de 2 ml por minuto e simultaneamente também é introduzido o CO₂ (P = 80 bar e T = 35° C) com um fluxo de 40 g por minuto. As condições experimentais de pressão e temperatura são seleccionadas de forma a minimizar as perdas devido à dissolução do lípido e da S.A no CO₂ durante a eficácia máxima da extracção.

As suspensões puras de SLN são produzidas em apenas 2 minutos, sendo removidas no fundo da coluna de extracção (Chattopadhyay, P. et al., 2007).

Capítulo 2- Desenvolvimento e caracterização de formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas de lípidos sólidos

2.1 Vantagens para a administração tópica

As partículas transportadoras de substâncias activas para aplicação tópica de uso dermatológico, devem ser biocompatíveis com a pele e estáveis para não sofrerem alterações físico-químicas a fim de provocarem irritação cutânea. A irritação local normalmente está associada ao tipo de S.A empregue numa formulação e/ou sistema de libertação desta mesma. Sendo assim, o uso de SLN e NLC, para incorporarem as substâncias activas, são bem tolerados fisiologicamente, uma vez que possuem na sua composição lípidos biodegradáveis usados na indústria farmacêutica e cosmética cuja sua própria composição já foi bem estudada e aprovada para o seu uso.

2.1.1 Adesividade para superfícies

As nanopartículas foram conhecidas por revelar propriedades adesivas quando estão em contacto com as superfícies. Como as nanopartículas são esféricas, o grau de adesividade dependente de seu diâmetro médio e pode ser facilmente avaliado por meio da análise da textura. Uma vez que o tamanho das partículas de SLN e de NLC são similares, ambas podem ser comparadas a respeito das suas propriedades de superfície de viscosidade e de *stringiness*. Sendo assim, estas podem ser incorporadas em formas farmacêuticas como por exemplo geles.

A substância que dá forma ao gel normalmente é o Carbopol® 940. Este é usado para produzir hidrogéis e a rede do gel não é interrompida pela insolubilidade das nanopartículas lipídicas em água. As NLC em hidrogéis de poliacrilato mostram um ligeiro aumento no que corresponde às propriedades adesivas em comparação com os geles que têm SLN (Souto E.B., Müller R.H., 2008).

2.1.2 Oclusão e hidratação

Observou-se experimentalmente que o factor da oclusão para micropartículas lipídicas com um diâmetro de 1 μm é somente de 10%. Mas para nanopartículas lipídicas que tem um tamanho médio de 200 nm possuem um factor de 50% (Mustata, G. e S.M. Dinh, 2006).

O grau da oclusão geralmente é determinado experimental aplicando o teste de Vringer (Kullberg, E.B. et al., 2005) e este realiza-se da seguinte forma: uma taça com água é coberta com papel de filtro, a formulação é aplicada nesse filtro e a evaporação da água é medida à temperatura da pele (32°C) sobre um determinado período de tempo (geralmente até 12 horas). O ensaio a branco consiste numa taça com água coberta unicamente com o papel de filtro.

O factor da oclusão pode ser calculado aplicando a seguinte equação:

$F (\%) = ((A-B)/A)*100$, onde A é a perda de água sem amostra (branco) e B é a perda de água com amostra.

Um factor da oclusão de 0 não significa nenhum efeito oclusivo e 100 significa o factor máximo de oclusão. O branco que não tem nenhum retardamento na evaporação tem um factor da oclusão de 0%, e o factor de oclusão de 100% faz com que a água não se evapore.

Tanto as SLN como as NLC podem ser usadas para controlar a extensão da oclusão das formulações cosméticas que existem já no mercado.

É de notar que a oclusividade de tais cremes ou loções pode ser por aumento ou diminuição do tamanho de partícula (numa determinada concentração de lipídeo).

O aumento resultante da oclusão na hidratação da pele é independente da composição da matriz do lipídeo.

As partículas altamente cristalinas (SLN) podem ser produzidas usando lípidos muito puros tais como o tripalmitico e a tristearina, criando uma oclusividade elevada e realçando conseqüentemente a hidratação.

Para se obter uma baixa oclusividade deve-se usar lípidos com baixas temperaturas de fusão tais como o tricaprina e o trilaurina.

A hidratação da pele pode ser facilmente medida *in vivo* por meio de um **corneometer**. Com este aparelho analisa-se a capacidade eléctrica da pele antes e depois das aplicações das formulações.

Realizou-se um estudo com voluntários para comparar a hidratação da pele ao aplicar um creme de dia e de noite, e após ter substituído uma parte da fase oleosa do creme por SLN. O creme de elevada qualidade usado nesse estudo mostrou efeitos da elevada hidratação, ou seja a adição de SLN promove realmente a hidratação da pele.

Embora estudos deste tipo não imitam inteiramente as condições naturais de perda de humidade, pode-se verificar através da Figura 17 que quanto mais pequeno for o tamanho das partículas melhor é a barreira para evitar a evaporação, uma vez que estas encontram-se mais juntas impossibilitando desta forma a fuga de água.

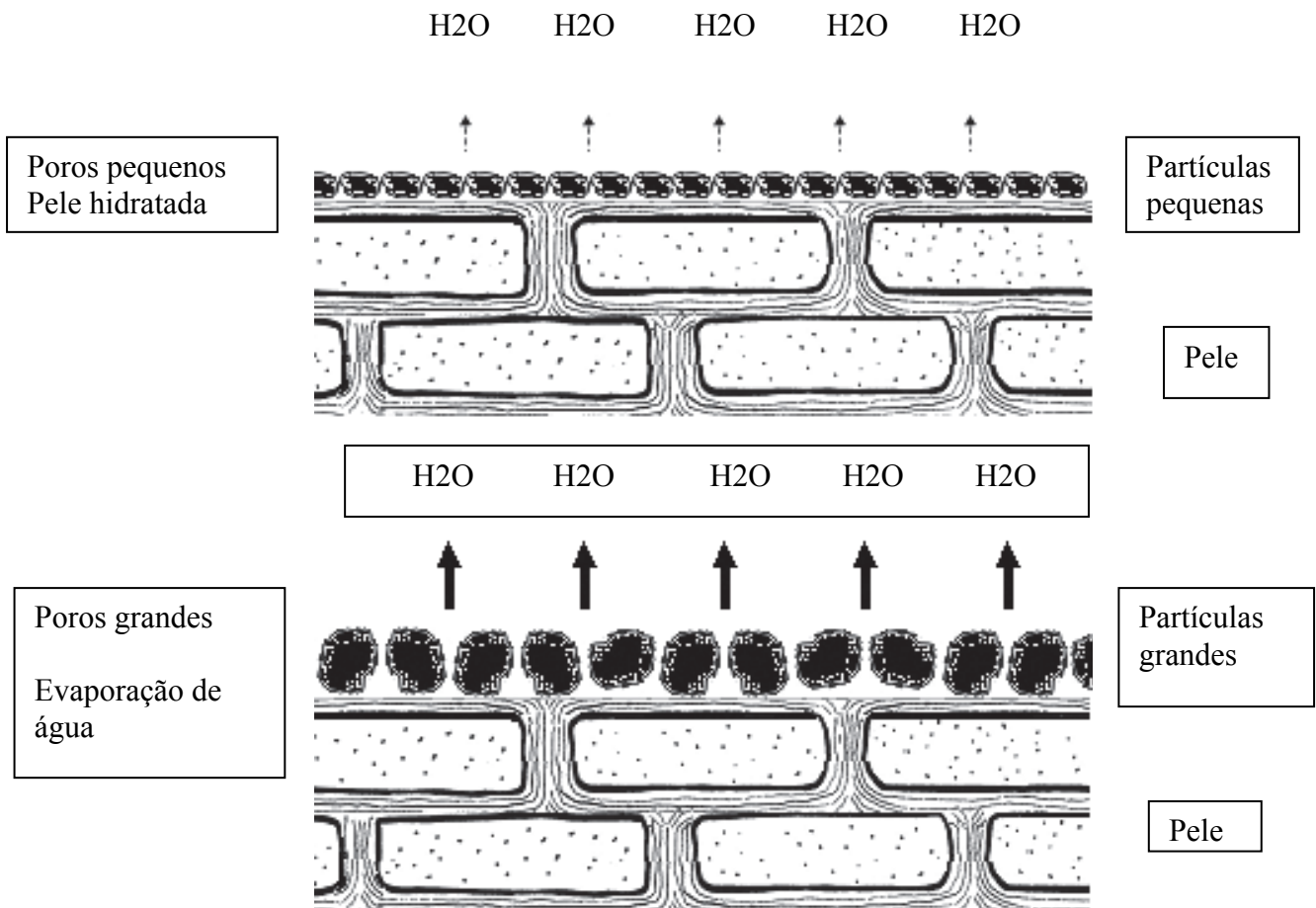


Figura 17: Representação esquemática do efeito oclusivo das partículas lipídicas de acordo com o seu tamanho. A cima encontra-se representado nanopartículas e abaixo micropartículas (adaptado de Souto, E. B. e Müller, R. H., 2008).

A oclusão típica produzida pelas formulações não asseguram uma hidratação rápida, particularmente se a córnea estiver excessivamente seca, logo é desejável usar uma preparação capaz de fornecer água. As suspensões de nanopartículas lipídicas são apropriadas para esta finalidade porque quando aplicadas na pele, a pressão exercida leva à fusão das partículas que dão forma a uma película densa. Esta fusão é promovida pelas forças capilares envolvidas durante a evaporação da água. A formação desta película foi comprovada por microscopia electrónica de varrimento (Souto, E. B. e Müller, R. H., 2008).

2.1.3 Lubrificação e emoliência

A lubrificação e a emoliência de dispersões aquosas de SLN e de NLC são dependentes do tamanho do lípido e da concentração da partícula. A estabilização de SLN e de NLC em dispersões aquosas concentradas são usadas nas tecnologias de fabricação das formulações de produtos cosméticos.

Dispersões aquosas de SLN e NLC são estabilizadas geralmente pela adsorção de uma camada emulsionada em torno da superfície das nanopartículas.

A formação de uma camada emulsionada de espessura apropriada é crucial para a estabilização de dispersões lipídicas contendo concentrações elevadas de nanopartículas.

As camadas finas conduzem a agregação das partículas, uma vez que o lípido usado pode não ter propriedades tensioactivas. Senso assim, é necessário a formação de camadas grossas para evitar a agregação.

Os tensioactivos convencionais usados na tecnologia das nanopartículas lipídicas (por exemplo: poloxâmeros, tweens e lecitina), não permitem um controle sistemático da espessura da camada da superfície da partícula. Como alternativa, as SLN e NLC são adicionadas aos sistemas semi-sólidos para conseguir consistência desejada para serem aplicados na pele.

Um efeito macio de forma significativo na epiderme pode ser conseguido com os uso de nanopartículas de natureza lipídica que se utilizam em produtos cosméticos porque a hidratação da camada córnea é feita pela selecção do tipo de lípidos e de tensioactivos usados para estabilizarem as SLN e NLC (Souto E.B e Müller R.H., 2008)

Além disso, cada vez mais estão se a usar nanopartículas de natureza lipídica nos produtos cosméticos como forma de diminuir danos na pele, pois se nanopartículas referidas figurarem na formulação, a barreira mecânica e o efeito lubrificante de tais portadores podem proteger a pele de irritação e reacções alérgicas.

2.1.4 Antienvelhecimento

As alterações fisiológicas que ocorrem na pele aquando do envelhecimento da derme surgem sobretudo quando esta começa a perder a sua capacidade de elasticidade. A pele esticada pelo movimento muscular não encolhe e o seu aspecto liso normal dá lugar as formas enrugadas. Por causa das propriedades de hidratação das nanopartículas de natureza lipídica, supõem-se que estas possam realçar a elasticidade da pele (Martins, S., et al., 2007), e desta forma são empregues para formular produtos anti-envelhecimento.

2.1.5 Efeito de protecção solar

A face é a única área á superfície do nosso corpo que se encontra mais exposta à influência climática durante todo o ano e do ponto de vista estético da aparência e de cada vez mais do ponto de vista da saúde devido ao aumento do número de indivíduos com melanoma, torna-se uma necessidade real de proteger esta área. A epiderme facial é uma epiderme fina o que realça ainda mais o significado da importância da protecção.

Os cosméticos protectores solares que têm a capacidade de absorver os UV, possuem um papel verdadeiramente protector. As moléculas bloqueadoras de UV podem ser incorporadas em nanopartículas lipídicas e assim exercerem a sua função. Contudo, estas moléculas não são isentas de efeitos secundários, pois conseguem penetrar na pele provocando irritações cutâneas ou mesmo reacções alérgicas.

A principal molécula responsável pelo efeito bloqueador dos raios UV e também pelos efeitos laterais é o dióxido de titano. Contudo a redução da quantidade desta substância na formulação parece diminuir os efeitos indesejáveis e quando esta é incorporada em SLN verifica-se relativamente aos sistemas tradicionais de emulsões do tipo O/A, uma menor penetração cutânea, logo menos efeitos prejudiciais, conseguindo manter o mesmo grau de protecção (Souto E. B. e Müller R. H., 2008).

2.2 Métodos de produção das formas farmacêuticas tópicas que contêm nanopartículas de lípidos sólidos

De todas as formulações tópicas que existem, os semi-sólidos são os mais característicos e os mais comuns, porque são de aplicabilidade fácil. São explorados como veículos para transportarem grandes quantidades de S.A numa solução ou em suspensão que têm tendência à separação. Pretendidas unicamente para aplicação cutânea para actividade superficial ou para a penetração da pele.

Os semi-sólidos têm um efeito irritante mecânico manifestado pelas partículas sólidas que possuem. Mas estas partículas sólidas têm a capacidade de restringirem a evaporação da humidade por muito mais tempo comparativamente com os líquidos.

As dispersões aquosas de SLN/NLC são produzidas geralmente com uma taxa de lípido de 20-30%, mostrando uma consistência baixa (a viscosidade é geralmente 100 mPas). Para se formar uma formulação apropriado para a aplicação cutânea, diversas aplicações têm que ser executadas, por exemplo, incorporação destas partículas em bases hidrófilas, bases hidrófobas ou em geles (Souto, E., Almeida, A.J. e Müller, R. H., 2007).

2.2.1 Incorporação de dispersões aquosas de nanopartículas em bases hidrófilas

As dispersões aquosas de SLN/NLC podem ser usadas para melhorar a viscosidade das formulações hidrófilas de uso tópico. As bases hidrófilas incluem sistemas de fase monofásica (hidrogeles) e sistemas bifásicos (cremes O/A ou loções).

Os hidrogeles são soluções aquosas apresentadas na forma semi-sólida como um gel produzido pelo uso de um colóide protector na concentração elevada. Os exemplos são poliacrilatos e derivados de hidroxietilcelulose.

Os hidrogeles diferem em ter um índice substancial de água e que acabam por exercer um efeito refrescante distinto.

A incorporação de nanopartículas lipídicas em hidrogeles é obtida da seguinte forma: inicialmente misturaram-se os componentes do gel e antes de começar o processo de gelificação adiciona-se um concentrado de nanopartículas dispersas. Contudo, os electrólitos podem destabilizar as nanopartículas lipídicas. Assim caso se proceda à preparação de geles contendo poliacrilatos recomenda-se usar agentes neutralizantes tais como o Tristan® (tromethamine) e o Neutrol® TE (N, N, N, N-tetra(2-hydroxypropyl)ethylenediamine), em vez do hidróxido de sódio, antes da adição das nanopartículas lipídicas. Caso contrário, o potencial zeta das partículas é reduzido fortemente conduzindo a agregação das mesmas.

Para produzir formulações do tipo O/A contendo nanopartículas lipídicas é necessário adicionar uma dispersão altamente concentrada, isto é como um índice de 50% de sólido. Esta concentração é suficiente para criar um efeito oclusivo ou para carregar compostos quimicamente instáveis que são estabilizados pela incorporação em SLN/NLC.

A adição de nanopartículas lipídicas em cremes pode ser executado durante ou após a produção de cremes do tipo O/A. No primeiro caso, uma parte da água a ser usada para a formulação do creme é substituída por uma dispersão altamente concentrada, e o restante processo de produção funciona normalmente.

As nanopartículas lipídicas são suficientemente estabilizadas com as gotas de óleo da emulsão evitando a sua coalescência. Se o processo de produção da emulsão for executado com uma temperatura superior ao ponto de fusão do lípido das nanopartículas, estas recristalizam durante do processo de refrigeração realizado no fim. No segundo caso, o creme é produzido como o habitual, de qualquer modo com índice de água reduzido a fim de compensar a água adicionada com a dispersão de nanopartículas lipídicas.

Após a produção do creme, a dispersão concentrada é misturada com agitação a uma temperatura maior ou igual a 30 °C. Esta temperatura evita a fusão das nanopartículas, o que pode conduzir a uma mudança indesejada da estrutura interna da partícula.

Quando as nanopartículas lipídicas forem dispersadas numa rede de gel ou num creme do tipo O/A será obtido um sistema tridimensional similar ao da Figura 18.

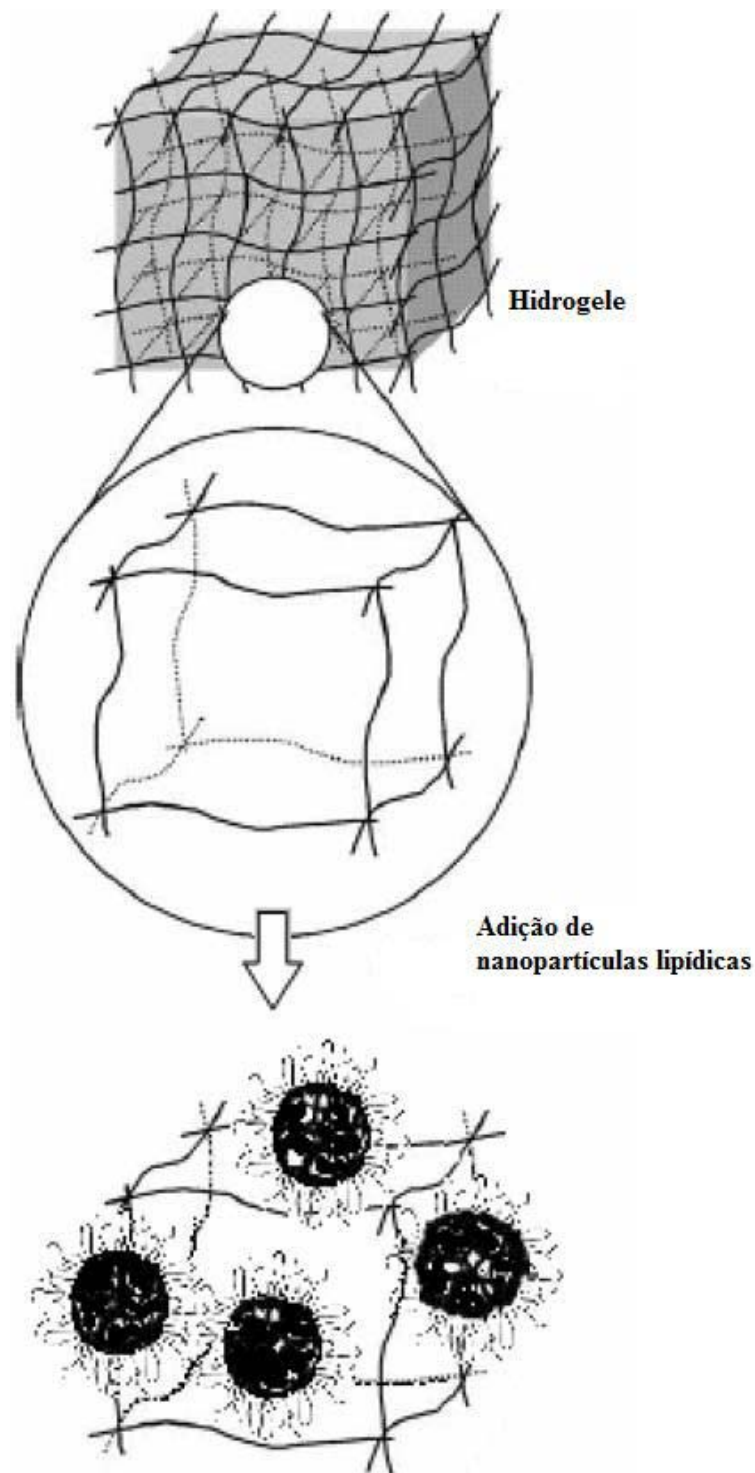


Figura 18: Representação esquemática da estrutura tridimensional da incorporação de nanopartículas de natureza lipídica em hidrogéis (adaptado de Souto, E., Almeida, A.J. e Müller, R. H., 2007)

A Figura 18 descreve um hidrogel com uma rede que contém nanopartículas lipídicas interpenetradas. A S.A pode ser empregue nas nanopartículas de natureza lipídica, dissolvida no gel ou então em ambas as formas. Se a S.A estiver em ambas as fases, pode favorecer o desenvolvimento de um sistema supersaturado. O princípio da supersaturação em microemulsões de uso tópico foi explorado para aumentar a penetração da S.A de forma a atingir os tecidos inferiores ao estrato córneo.

Quando se aplica topicamente uma microemulsão saturada com S.A, a água que faz parte da composição da pele difunde na microemulsão aumentando assim o seu índice de água. O aumento da solubilidade de saturação conduzirá a uma pressão aumentada de difusão da S.A na pele.

Sistemas similares podem ser desenvolvidos quando nanopartículas lipídicas contendo a S.A são dispersadas nas bases semi-sólidas saturadas previamente com a S.A. Durante o armazenamento, a S.A remanesce na matriz lipídica, uma vez que estas partículas preservam a sua modificação. Após a aplicação tópica, ocorre a uma modificação na estrutura do lípido devido ao aumento na temperatura e da perda de água que é responsável pela expulsão da S.A da matriz do lípido. A S.A é expelida dentro do veículo semi-sólido (hidrogel ou creme hidrófilo) já saturado com a S.A, conduzindo a supersaturação, permitindo dessa forma a penetração da S.A na pele (Souto, E., Almeida, A.J. e Müller, R. H., 2007).

2.2.2 Incorporação de dispersões aquosas de nanopartículas em bases hidrófobas

As bases hidrófobas/ hidrofóbicas tais como a parafina, os óleos vegetais e álcoois gordos podem ser usadas para dispersar nanopartículas de natureza lipídica em sistemas do tipo A/O.

Estas bases são apropriadas se o alvo a atingir for somente um efeito tópico, uma vez que evita a exposição sistémica da S.A. Se os constituintes forem solúveis nos compostos oleosos das nanopartículas lipídicas, estes quando dispersados em bases hidrofóbicas terão um baixo nível de penetração na pele em comparação com os sistemas do tipo O/A.

A evaporação da água ocorre mais rapidamente na utilização de sistemas A/O do que somente nas bases hidrofóbicas. Contudo, os anteriores são suficientemente oclusivos, o que implica que tenham uma boa acção emoliente.

As bases hidrofóbicas podem ser caracterizadas de acordo com a sua composição, que inclui geralmente um agente tensoactivo do tipo A/O junto com um diluente lipófilo.

Nenhuma fase aquosa está presente a não ser aquela que se adiciona com as dispersões das nanopartículas de natureza lipídica. Portanto, seria viável usar alguns agentes emulsionantes do tipo A/O como por exemplo o colesterol e cera branca.

Embora um sistema do tipo A/O com quantidades moderadas da água, não é possível a sua mistura caso este possua um excesso de água, os resíduos na pele não são facilmente removidos apenas com água.

A principal vantagem das nanopartículas lipídicas dispersadas em bases hidrofóbicas é a redução do seu carácter gordo ao fornecer oclusão suficiente sem penetração intensiva da S.A (Souto, E., Almeida, A.J. e Müller, R. H., 2007).

2.2.3 Cosméticos existentes no mercado com nanopartículas lipídicas

O creme Nanobase® patenteado por Yamanouchi, surgiu na Polónia e foi o primeiro produto à base de nanopartículas lipídicas (SLN) a ser introduzido no mercado. Este creme possui propriedades de boa aplicação, aderência e hidratação da pele. As substâncias activas encontram-se dissolvidas na fase aquosa do creme.

Também o Dr. Rimpler GmbH, na Alemanha, lançou uma gama de produtos cosméticos com base em NLC, como por exemplo NanoRepair Q10 e NanoVital Q10. Esta gama consegue incorporar uma grande concentração de **ubidecarenona**, co-enzima Q10, cujo efeito destina-se ao anti-envelhecimento da pele. A primeira vez que surgiu publicidade desta gama foi em Outubro de 2005 em Munique.

Mais recentemente, a empresa Chemisches Laboratorium do Dr. Kurt Richter GmbH (Berlim na Alemanha) também lançou em Abril de 2006 seu primeiro cosmético contendo NLC na feira de cosméticos em Barcelona (Souto E. B. e Müller R. H., 2008).

3. Conclusão

Vários foram os autores responsáveis pelo aparecimento das nanopartículas lipídicas utilizadas hoje em dia. As técnicas por eles desenvolvidas desde da HPH a quente e a frio, microemulsão, emulsificação-evaporação do solvente, substituição do solvente, emulsificação-difusão do solvente, inversão de fases até fluidos supercríticos, todas elas possuem variadíssimas vantagens e desvantagens. Uma das principais vantagens do uso das partículas de natureza lipídica reside no facto da matriz ser preparada por excipientes fisiológicos (ex: colesterol), reduzindo o risco toxicológico agudo ou crónico. As desvantagens são o elevado tamanho médio das partículas, o seu índice de polidispersão e concentrações relativamente elevadas dos tensioactivos para obter um diâmetro médio da partícula na escala nanométrica.

A principal diferença entre SLN e NLC consiste sobretudo na última ter uma matriz com o lípido nanoestruturado de forma a aumentar a capacidade de carga em S.A. e impedir a expulsão desta de uma maneira descontrolada durante o armazenamento.

O mundo científico está cada vez mais atento a estas nanoestruturas que estabilizam as propriedades físico-químicas da S.A como também a sua estabilidade a longo prazo e pretende com elas desenvolver ou então aperfeiçoar algumas características de maneira a torna-las partículas de primeira escolha a serem cada vez mais utilizadas nas formas farmacêuticas tópicas.

Bibliografia

Battaglia, L., et al. (2007). Solid lipid nanoparticles formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique: Development and influence on insulin stability. *Journal Microencapsulation*, 24(7), pp. 672-684.

Bekerman, T. e Golenser, A.J.D. (2004). Cyclosporin Nanoparticulate Lipospheres for Oral Administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, p. 1264 - 1270.

Chattopadhyay, P., Shekunov, B.Y., Yim, D., Cipolla, D., Boyd, B., Farr, S. (2007). Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Sciencedirect* ,59, p.446

Dubes, A., et. al. (2003). Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55, pp. 279-282.

Fitzpatrick J. E. e Aeling J.L. (2000) *Segredos em Dermatologia*, editora Artmed, Porto Alegre – Brasil.

Franceschini, P. (1994). *A pele e o seu envelhecimento*, Lisboa.

Fukui, H., et al. (1998). Characteristics of NS-718, a low-dose therapeutic system for amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS[®]). *International Symposium Controlled Release Bioactive Materials*, 25, p. 388 - 389.

Galindo-Rodriguez, S.A., et al. (2005). Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 22(5), p. 419-64.

Gasco, M.R. (1993). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. United States of America.

Heiati, H., Tawashi, R., e Phillipps, N.C. (1998). Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving storage and lyophilization. *Journal of Microencapsulation*, 15, pp. 173 - 184.

Heurtault, B., et al. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research*, 19, pp. 875 - 880.

Hu, F.Q., et al. (2002). Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 239, pp. 121 - 128.

Ishikado, A., et al. (2005). Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull*, 28(9), p. 1717-21.

Kullberg, E.B., et al. (2005). EGF-receptor targeted liposomes with boronated acridine: growth inhibition of cultured glioma cells after neutron irradiation. *Int J Radiat Biol*, 81(8), p. 621-9.

Mäder, K. e Mehnert, W. (2001) Solid lipid nanoparticles – Production, characterization and Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, p.171

Mehnert, W. e Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, p. 165 - 196.

Müller, R.H., et al. (2007). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN((R))): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

Müller, R.H., et al. (2006). Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics*, 317(1), p. 82-9.

Müller, R.H., et al. (1995). Solid lipid nanoparticles (SLN) - An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41, pp. 62 - 69.

Müller, R. H., Lucks, J. S. (1996). Azneistoffträger aus festen Lipidteilchen- feste Lipid Nanosphären (SLN), Germany.

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

Mustata, G. e Dinh ,S.M. (2006). Approaches to oral drug delivery for challenging molecules. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 23(2), p. 111-35.

Nogueira Prista, L. et al. (2008). *Tecnologia Farmacêutica*, I Volume, 7º Edição, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

O aspecto físico da superfície da pele humana. Disponível em: <<http://ensinarevt.com/>> [Acesso em 23/03/10].

Obagi, Z.E, (2004). *Restauração e rejuvenescimento da pele- Incluindo classificação básica dos tipos de pele*, editora Revintor, Tijuca-Rio de Janeiro-Brasil.

Prista, L. et al., (2002). *Tecnologia Farmacêutica*, I Volume, 6º Edição, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Porto.

Quintanar-Guerrero, D., et al. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res*, 15(7) p. 1056-62.

Quitana-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Gamen-Quintamar, A., Allémann, E., Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, pp. 211 - 218.

Representação esquemática da estrutura da pele humana. Disponível em: <www.afh.bio.br/> [Acesso em 23/03/10].

Representação esquemática das camadas da epiderme e a membrana basal. Disponível em: <<http://projetoferidas.zip.net/>> [Acesso em 23/03/10].

Rudolph, C. et al. (2004). Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Research*, 21(9), p. 1662-9.

Schubert, M. A. e Müller-Goymann C. C. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - evaluation of the method and process parameters *European Journal of Pharmaceutics e Biopharmaceutics*, 55, pp. 125 - 131.

Seeley e tal., (2001) *Anatomia e fisiologia*, 3ª edição, Ed. Lusodidacta, Lisboa.

Siekman, B., Westesen, K. (1996). Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic*, 43, p. 104 – 109.

Sjöström, B. e Bergenstahl, B. (1992). Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *International Journal of Pharmaceutics*, 88, pp. 53 - 62.

Souto, E. B., Almeida, A. J. e Müller, R. H. (2007). Lipid Nanoparticles (SLN®, NLC®) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, p.3.

Souto, E. B. e Müller, R. H., (2008), Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN , NLC), *International Journal of Cosmetic Science*, pp 158-162.

Souto E. B. e Müller, R. H. (2006) *Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Drug Delivery*, chapter 5.

Souza, R.R, (2001). *Anatomia Humana*, editora Manole, Tamboré-Brasil.

Shahgaldian, P., et al. (2003). A study of the freeze-drying conditions of calixarene based solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55, pp.181-184.

Trotta, M. D.F., Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1-2), pp153160.

Ugazio, E., Cavalli R., e Gasco, M.R. (2002). Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 241, p. 341 -344.

Yang, S.C., et al. (1999). Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *Journal Control Release*, 59(3), pp. 299-307.

Yang, S.C. e Zhu, J.B. (2002). Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28, pp. 265 - 274.

Zhang, Q., et al. (2000). Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 200, p. 153 - 159.

