

Ana Isabel Janeiro

Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides



Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2011



# Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Ana Isabel Janeiro

# Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides



Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2011

# Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Autor:

Ana Isabel Janeiro

Vectores lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

---

(assinatura)

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte de requisitos para a obtenção de grau de licenciada em Ciências Farmacêuticas.

### Resumo

As patologias inflamatórias da pele (e.g. dermatite, psoríase) requerem frequentemente administração tópica de corticosteróides. Os vectores lipídicos, como os lipossomas, as emulsões, as microemulsões e as nanopartículas lipídicas, são frequentemente utilizados na via tópica, sendo vantajosos pois diversos compostos apresentam uma boa solubilidade em lípidos. Deve ser também referida a inocuidade destes vectores, que por serem semelhantes aos lípidos fisiológicos e biodegradáveis, não irritam a pele e supõe-se apresentarem uma toxicidade reduzida.

O presente estudo, realizado no âmbito da Tecnologia Farmacêutica, teve como objectivo o desenvolvimento e caracterização de um vector lipídico nanoestruturado (NLC) para aplicação tópica do propionato de fluticasona. Neste sentido, avaliou-se a solubilidade de diversas concentrações do fármaco em dois lípidos líquidos. Posteriormente, testou-se as compatibilidades de diversos lípidos sólidos com o líquido seleccionado (Cetiol<sup>®</sup> HE). Pelo método da microemulsão a quente, preparou-se uma formulação placebo com nanopartículas de lípidos sólidos (SLN), contendo álcool cetílico como líquido. Utilizando igual método, o mesmo líquido sólido, e como líquido líquido, o Cetiol<sup>®</sup> HE, foi preparada outra formulação placebo contendo NLC. Um segundo par de formulações contendo NLC foi desenvolvida, devido à fraca estabilidade do primeiro. Para tal, utilizou-se o líquido sólido Dynasan<sup>®</sup> e o líquido líquido Cetiol<sup>®</sup> HE. Após preparação, as partículas das formulações foram medidas por espectrofotometria de correlação fotónica. O primeiro par de formulações SLN e NLC apresentou diâmetros médios de partícula de 2850 nm e 600,1 nm, respectivamente, com índices de polidispersão de 0,314 e 0,629. Para o segundo par de formulações, o diâmetro de partícula da formulação de NLC placebo foi de 3009 nm e para a formulação NLC com fármaco foi de 1105 nm. Os respectivos índices de polidispersão foram de 1 e de 0,796. A toxicidade do segundo par de formulações foi avaliada através de testes realizados em *Drosophila melanogaster*, tendo sido observada genotoxicidade para as formulações NLC contendo propionato de fluticasona, nas concentrações testadas.

**Abstract**

Inflammatory pathologies of the skin (e.g. dermatitis, psoriasis) frequently require topic delivery of corticosteroids. Lipid vectors, such as liposomes, emulsions, microemulsions and lipid nanoparticles are frequently used in topic administration, being advantageous since several compounds present a good solubility in lipids. It must also be mentioned the innocuousness of these vectors, that being physiologic and biodegradables do not irritate the skin and are likely to have reduced toxicity.

The purpose of this study was, in the scope of pharmaceutical technology, the development and characterization of a nanostructured lipid carrier (NLC) for topic administration of fluticasone propionate. In this sense it was evaluated the solubility of several concentrations of the drug in two liquid lipids. Subsequently a compatibility screening of several solid lipids with the selected liquid lipid (Cetiol<sup>®</sup> HE) was also realized. From this study a placebo formulation with solid lipid nanoparticles (SLN) was prepared with the solid lipid, Cetyl Alcohol, using the method of hot microemulsion. By means of the same method and solid lipid and using Cetiol<sup>®</sup> HE as the liquid lipid a placebo formulation with NLC was prepared. A second pair of NLC formulations was developed due to the lack of stability of the first, containing Dynasan<sup>®</sup> as solid lipid and Cetiol<sup>®</sup> HE as liquid lipid. The particles of the formulations were measured by photon correlation spectroscopy at 25°C (PCS, Malvern Zetasizer Nanoseries). For the first pair of formulations SLN and NLC it was respectively obtained a mean particle size of 2850 nm and 600.1 nm with a polydispersity index of 0.314 and 0.629. For the second pair the mean particle size was of 3009 nm for the placebo NLC and 1105 nm for the NLC with drug. The respective polydispersity indexes were of 1 and 0.796. The toxicity of the second pair of formulations was evaluated through tests realized in *Drosophila melanogaster*, being observed genotoxicity for the tested concentrations of NLC formulations with fluticasone.

## **Agradecimentos**

É de bom grado que dedico o seguinte espaço para agradecer a um conjunto de pessoas que estiveram presentes no decorrer da elaboração desta monografia e sem as quais não teria conseguido terminar esta etapa da licenciatura.

Gostaria de começar por agradecer à Prof. Dra. Carla Martins, minha orientadora, por toda a atenção que me demonstrou, bem como dedicação, disponibilidade, carinho e empenho. A sua ajuda foi, sem dúvida, vital no decorrer da elaboração deste trabalho.

Agradeço, igualmente, à Prof. Dra. Eliana Souto, que esteve sempre presente para ajudar e esclarecer qualquer dúvida, com grande simpatia.

Quero agradecer à minha colega Joana Fangueiro, pela sua companhia nas deslocações a Vila Real, mas principalmente por toda a sua ajuda, colaboração, companheirismo, carinho e amizade.

À colega Slavomíra Doktorovová, pelos conhecimentos que partilhou e por toda a orientação em laboratório, pois sem a sua atenção não seria possível a elaboração do presente trabalho.

Agradeço à Universidade de Trás-os-Montes (UTAD), por ter cedido o material e equipamento necessários à elaboração dos testes toxicológicos. Um especial agradecimento à Prof. Dra. Paula Martins Lopes e à D. Isabel pela ajuda, paciência e simpatia demonstradas.

Quero agradecer à minha família, que esteve sempre presente nas várias etapas da licenciatura, que sempre me apoiou e incentivou na realização do presente trabalho. Sem esta não seria possível a conclusão da minha monografia, bem como da licenciatura. Um especial agradecimento à minha mãe, Isabel Janeiro, que sempre acreditou em mim e sempre me apoiou e incentivou, com o seu amor incondicional.

A todos os meus colegas que no decorrer do curso se tornaram amigos e que formam um pilar base na conclusão da minha licenciatura, bem como na minha vida, um muito obrigado.

**Índice geral**

	<b>Pág.</b>
Resumo	5
Abstract	6
Agradecimentos	7
Índice geral	8
Índice de tabelas	11
Índice de figuras	12
Lista de abreviaturas	13
Capítulo I	
Administração tópica: veiculação de compostos activos em nanopartículas lipídicas	
1. A via tópica	14
2. Nanopartículas lipídicas destinadas à via tópica	20
2.1. Vantagens e desvantagens das nanopartículas lipídicas	26
2.2. Propriedades físico-químicas e organolépticas das SLN e dos NLC	28
2.2.1. Aspectos protectores e adesão	28
2.2.2. Oclusão e hidratação cutânea	29
2.2.3. Lubrificação e emoliência	31
2.2.4. Efeito osmótico e controlo de pH	31
2.2.5. Efeito branqueador	32
2.3. Propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas das nanopartículas lipídicas	33
2.3.1. Estabilização de compostos activos lábeis	33
2.3.2. Modificação do perfil de libertação	35
2.4. Produção de nanopartículas lipídicas	38

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

2.4.1.	Produção de formulações tópicas	41
2.4.2.	Incorporação em formulações tópicas	42
2.5.	Nanopartículas lipídicas: Aplicações tópicas	43
2.5.1.	Corticosteróides veiculados por SLN/NLC	44
3.	Nanotoxicologia	46
3.1.	Testes genotóxicos	47

## Capítulo II

### Parte I – Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas de propionato de fluticasona para aplicação tópica

1.	Materiais e métodos	49
1.1.	Lipid Screening	49
1.2.	Preparação de placebos com álcool cetílico (Formulações A)	51
1.2.1.	Procedimento experimental	52
1.3.	Preparação de formulações NLC com Dynasan <sup>®</sup> (Formulações B)	53
1.3.1.	Procedimento experimental	54
1.4.	Caracterização das partículas	55
1.5.	Testes toxicológicos em <i>Drosophila melanogaster</i>	55
1.5.1.	Preparação do meio de crescimento	57
1.5.2.	Preparação dos frascos com as amostras	58
1.5.3.	Ensaio de genotoxicidade nas moscas adultas	58

### Parte II – Apresentação e discussão dos resultados obtidos

1.	<i>Lipid Screening</i>	60
2.	Preparação de SLN e NLC placebo com álcool cetílico (Formulações A)	61
3.	Preparação de formulações NLC com Dynasan <sup>®</sup> (Formulações B)	63
4.	Caracterização das partículas	65
5.	Testes toxicológicos em <i>Drosophila melanogaster</i>	68

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Capítulo III	
Conclusão	71
Referências bibliográficas	73

**Índice de tabelas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> - <i>Lipid screening</i> entre o propionato de fluticasona e o lípido líquido	50
<b>Tabela 2</b> - Reagentes usados na preparação das formulações placebos de SLN e NLC	51
<b>Tabela 3</b> - Reagentes usados na preparação de formulações de NLC contendo fármaco	53
<b>Tabela 4</b> - Descrição dos materiais, reagentes e material biológico usados nos testes genotóxicos	57
<b>Tabela 5</b> - Volumes medidos dos vários constituintes e a concentração do propionato de fluticasona	58
<b>Tabela 6</b> - Solubilidade de diversas concentrações do propionato de fluticasona nos lípidos líquidos Cetiol <sup>®</sup> LC e Cetiol <sup>®</sup> HE	60
<b>Tabela 7</b> - Resultados do <i>screening</i> de compatibilidade de lípidos	61
<b>Tabela 8</b> - Sobrevivência da descendência relativamente à formulação placebo de NLC	68
<b>Tabela 9</b> - Sobrevivência da descendência relativamente à formulação de NLC contendo fármaco	69

**Índice de figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> - Representação esquemática do corte transversal da pele	15
<b>Figura 2</b> - Estádios da diferenciação celular dos queratinócitos	16
<b>Figura 3</b> - Diferenças morfológicas entre a matriz lipídica cristalina perfeita das SLN e a matriz lipídica com imperfeições dos NLC	24
<b>Figura 4</b> - Diferentes tipos de morfologia de matriz	25
<b>Figura 5</b> - Oclusão proporcionada pelas partículas lipídicas à superfície da pele	30
<b>Figura 6</b> - Protecção química de fármacos lábeis	34
<b>Figura 7</b> - Fenómeno de supersaturação	37
<b>Figura 8</b> - Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	48
<b>Figura 9</b> - Dimorfismo sexual na <i>Drosophila melanogaster</i>	56
<b>Figura 10</b> - Formulação placebo de SLN	62
<b>Figura 11</b> - Formulação placebo de NLC	63
<b>Figura 12</b> - Formulações de NLC	64
<b>Figura 13</b> - Cristais do propionato de fluticasona	65
<b>Figura 14</b> - Análise por espectrofotometria de correlação fotónica: formulação placebo de SLN contendo álcool cetílico (A <sub>1</sub> ), ao fim de sete dias de armazenamento à temperatura ambiente	66
<b>Figura 15</b> - Análise por espectrofotometria de correlação fotónica: formulação placebo de NLC contendo álcool cetílico (A <sub>2</sub> ), ao fim de sete dias de armazenamento à temperatura ambiente	67
<b>Figura 16</b> - Análise por espectrofotometria de correlação fotónica: formulação placebo de NLC contendo Dynasan <sup>®</sup> (B <sub>1</sub> ), ao fim de sete dias de armazenamento à temperatura ambiente	67
<b>Figura 17</b> - Análise por espectrofotometria de correlação fotónica: formulação com PF de NLC contendo Dynasan <sup>®</sup> (B <sub>2</sub> ), ao fim de sete dias de armazenamento à temperatura ambiente	68
<b>Figura 18</b> - Gráfico de dispersão da descendência viva em função da concentração de propionato de fluticasona para a formulação de NLC contendo o fármaco	70

**Lista de abreviaturas**

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**FDA** - Food and Drug Administration

**HPH** - Homogeneização a Alta Pressão (*High Pressure Homogenization*)

**NLC** - Vector Lipídico Nanoestruturado (*Nanostructured Lipid Carrier*)

**PCS** - Espectrofotometria de Correlação Fotónica (*Photon Correlation Spectrophotometry*)

**PEG** - Polietilenoglicol

**PF** - Propionato de Fluticasona

**PLI** - Índice de Polidispersão (*Polydispersity Index*)

**Raios UV** - Raios ultra-violeta

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

**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de Determinação

## Capítulo I

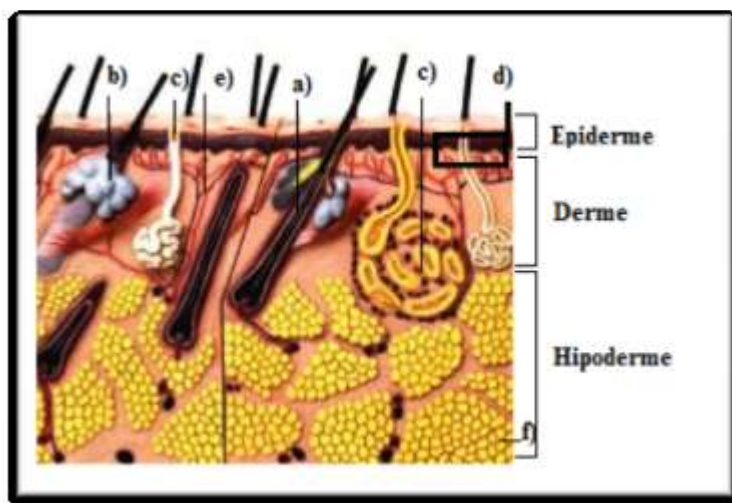
### Administração tópica: veiculação de compostos activos em nanopartículas lipídicas

#### 1. A via tópica

A pele, o órgão mais extenso do corpo, apresenta funções fisiológicas que visam a protecção do organismo (Souto e Müller, 2008). Como barreira física e química, impede eficaz e selectivamente a penetração ou a eliminação de diversas substâncias, resguardando o organismo das agressões externas e oferece protecção imunológica. Este órgão intervém também na manutenção da homeostasia do organismo, ao controlar a temperatura dos tecidos vivos e dos fluidos corporais por dissipação de calor e controlo da troca de água, minerais e proteínas dissolvidas entre o corpo e o ambiente. A protecção conferida pelo metabolismo cutâneo é desempenhada por enzimas presentes na camada basal da epiderme e nos espaços extracelulares do estrato córneo, que catalisam as substâncias que tentem permear a pele. Por outro lado, a pele representa uma porta de entrada para os compostos activos, incluindo os fármacos. Neste sentido, é necessário compreender e explorar os mecanismos de protecção da pele para obter formulações capazes de a penetrar e a permear com sucesso (Prow *et al.*, 2011; Souto e Müller, 2007; Wiedersberg *et al.*, 2008).

A pele apresenta também uma importante actividade endócrina e exócrina, a sua excreção sudorípara pode exceder, em volume, a excreção renal, no entanto, a actividade excretora é inferior no que diz respeito à eliminação de resíduos sólidos (Souto e Müller, 2008). Algumas doenças sistémicas, carências de vitaminas ou perturbações nas glândulas endócrinas, podem alterar a capacidade da pele exercer as suas funções. Perante estas situações é frequentemente necessário administrar fármacos com uma actividade farmacológica específica (Souto e Müller, 2008).

Na sua essência a pele apresenta três camadas funcionais, a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1).



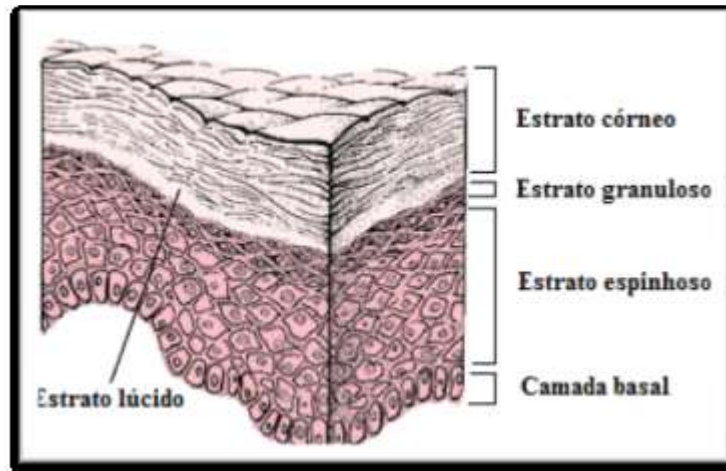
**Figura 1 - Representação esquemática do corte transversal da pele:** a) folículo piloso, b) glândula sebácea, c) glândula sudorípara, d) junção dermo-epidérmica, e) vasos sanguíneos, f) células adiposas (adaptado de Bear *et al.*, 2002).

A hipoderme, ou tecido celular subcutâneo, é a camada mais profunda da pele composta por células adiposas, tecido fibroso, nervos e vasos sanguíneos de maior calibre. Esta camada funciona como isolante térmico através da acumulação de energia, como protector contra agressões físicas e como depósito nutritivo de reserva (Wiedersberg *et al.*, 2008).

A derme, também designada por *cútis* ou *córion*, é a camada intermediária da pele que dá sustentação à epiderme. Esta camada apresenta na sua composição colagénio, fibras elásticas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. As principais células presentes na derme são os fibroblastos, células responsáveis pela produção da substância fundamental, que estão envolvidos na resposta imune e inflamatória por possuírem receptores glucocorticóides. A derme contacta com a epiderme através da junção dermo-epidérmica, uma zona papilar que proporciona maior área de superfície à difusão passiva de nutrientes para a epiderme que é avascular (Wiedersberg *et al.*, 2008).

A epiderme tem uma estrutura dividida em vários estratos, designadamente, estrato córneo, estrato granuloso, estrato lúcido, estrato espinhoso e camada basal, reflectindo os vários

estádios da diferenciação celular dos queratinócitos (Figura 2) (Wiedersberg *et al.*, 2008; Chapman e Walsh, 1990).



**Figura 2 - Estádios da diferenciação celular dos queratinócitos** (adaptado de Anderson e Dorland, 2000).

Durante a fase proliferativa, iniciada na lâmina basal, as células (queratinócitos) modificam-se de forma ordenada, dividindo-se e aumentando de tamanho, passando de células metabolicamente activas a células mortas completamente queratinizadas, sendo as últimas designadas de corneócitos. Quando devidamente diferenciadas, estas células constituem uma matriz organizada de queratina com microfibrilas, que fornece resistência mecânica. Os corneócitos encontram-se rodeados de proteínas estruturalmente definidas e inseridos numa emulsão óleo/água, o filme hidrolipídico, formando a camada mais exterior da epiderme, o estrato córneo. Os corneodesmosomas permitem a ligação entre corneócitos adjacentes, de forma a garantir a coesão do estrato córneo. Durante a formação e maturação do estrato córneo, os desmosomas são modificados e o seu número diminui ao longo das camadas da pele, até atingirem a camada mais superficial da epiderme na forma de corneodesmosomas (Wiedersberg *et al.*, 2008; Chapman e Walsh, 1990).

O filme hidrolipídico contém proteases, enzimas com um papel crucial no processo de descamação natural da pele, e factores naturais de hidratação da pele, uma mistura de aminoácidos, ácido láctico, ureia, citrato e sacarose, com função emoliente e humectante (Wiedersberg *et al.*, 2008). O conjunto do filme hidrolipídico e dos factores naturais de hidratação evita a perda de água por evaporação, de forma a manter a pele hidratada.

Enquanto as membranas biológicas são geralmente compostas por fosfolípidos, o estrato córneo é essencialmente composto por ceramidas (40%), ácidos gordos livres (10%), colesterol (25%) e uma pequena percentagem de sulfato de colesterol e triglicérides.

Os lípidos presentes no estrato córneo são originários de corpos lamelares sintetizados nas camadas superiores viáveis da epiderme, sendo secretados para o espaço intercelular pelas células. Estes lípidos, organizados em bicamada, regulam o fluxo passivo da água pelo estrato córneo e são considerados muito importantes para a função de barreira protectora da pele (Wiedersberg *et al.*, 2008).

A função protectora da pele reside na sua maioria no estrato córneo (Bouwstra *et al.*, 2003). Deste modo, o processo de absorção de um composto através da pele é uma sequência da deposição no estrato córneo, difusão pela epiderme e passagem pela derme papilar. Estes tecidos podem metabolizar os fármacos, particularmente a epiderme, na qual estão presentes a maioria das enzimas catabólicas. Adicionalmente, a derme contém capilares permeáveis, sendo provável que muitas moléculas entrem rapidamente para a microcirculação (Souto *et al.*, 2008).

No estrato córneo, os lípidos estão organizados em grupos hidrófilos (polares) e grupos hidrófobos (não polares), dispondo-se em direcções opostas. A organização lamelar e assimétrica dos lípidos neste local é responsável pelas características de transporte da pele (Caussin *et al.*, 2008; Souto *et al.*, 2008). Estudos prévios relacionam as perturbações na estrutura lamelar e as alterações da polaridade dos lípidos no estrato córneo com o aumento da absorção percutânea (Ibrahim e Li, 2010; Warner *et al.*, 2003).

Aquando da aplicação da formulação na pele ocorre a libertação do fármaco, contactando primeiramente com o filme hidrolipídico, bactérias e outros materiais exógenos presentes à superfície da pele.

O processo de absorção do fármaco pode seguir a via transepidérmica ou ocorrer através dos anexos cutâneos, sejam estes folículos pilosos, glândulas sudoríparas ou glândulas sebáceas. Uma vez que as estruturas referidas são muito vascularizadas, as substâncias activas podem ser imediatamente absorvidas para a circulação sistémica, o que pode ser vantajoso ou não, dependendo do objectivo da formulação (Souto *et al.*, 2008).

Em Tecnologia Farmacêutica devem ser considerados diversos aspectos, tais como a estabilidade, a compatibilidade e a tolerância do veículo e da substância activa. A biodisponibilidade do fármaco é também um parâmetro muito importante a considerar, principalmente nos casos de tratamentos ao nível da derme ou da hipoderme (Souto e Müller, 2007). O efeito de um fármaco é determinado pelo seu perfil de libertação, o qual depende de diversos factores, como por exemplo, das características físico-químicas da substância activa e dos excipientes (e.g. solubilidade), da composição em excipientes da formulação, bem como, do método de produção. O parâmetro em questão é de grande importância na determinação do tipo de acção farmacológica obtido. Ao modificar o perfil de libertação do fármaco por manipulação da formulação é possível desenvolver desde formulações apropriadas para acção local, a formulações direccionadas à absorção transdérmica, que permitam obter uma acção farmacológica em locais distantes do ponto de aplicação (Souto *et al.*, 2008). Adicionalmente, o conteúdo hidrolipídico e as condições fisiológicas da pele também afectam significativamente a absorção da substância activa e, conseqüentemente, o efeito farmacológico da mesma (Wiedersberg *et al.*, 2008; Souto e Müller, 2007).

As preparações tópicas, dérmicas e transdérmicas têm como característica ímpar o facto das suas propriedades reológicas serem tão importantes quanto as propriedades e a concentração em substâncias activas (Souto e Müller, 2007). A composição do veículo merece uma ênfase especial, não só pela possibilidade de exercer uma importante função protectora dos fármacos, mas também pelo facto do contacto íntimo com a pele poder ser acompanhado de problemas toxicológicos, risco de reacção adversa e irritação cutânea (Souto e Müller, 2007).

A quantidade mínima de substância activa necessária para produzir um efeito farmacológico, nas formulações que actuam na derme e na hipoderme, não pode ser prevista com certeza.

Esta falta de precisão deve-se à variabilidade da penetração da substância activa na pele, que ocorre não só pelas razões acima apresentadas, mas também pela sua sujeição à espessura da epiderme, à membrana de queratina presente e à possível remoção mecânica da formulação quando a área afectada não é coberta (Souto e Müller, 2007).

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Actualmente, as companhias farmacêuticas oferecem aos consumidores diversas substâncias, em diferentes dosagens, formuladas para a aplicação tópica. As formulações para administração tópica podem ser pós, líquidos ou semi-sólidos. Durante o desenvolvimento destas formulações, o farmacêutico deve ter em atenção diversas variáveis, como por exemplo, a estabilidade da formulação, a compatibilidade dos constituintes da preparação, a biocompatibilidade do veículo e da substância activa. Por se assemelham à composição da pele, as formulações constituídas por excipientes de natureza lipídica e biodegradáveis, semelhantes aos lípidos fisiológicos, são mais apropriadas e toleráveis para a administração por via tópica (Souto e Müller, 2008).

## 2. Nanopartículas lipídicas destinadas à via tópica

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem despertado um grande interesse nos investigadores em diversas áreas, nomeadamente na área Farmacêutica. A Nanotecnologia Farmacêutica é uma área das Ciências Farmacêuticas que se dedica ao estudo e aplicabilidade de estruturas com dimensões nanométricas, semelhantes às dimensões das moléculas corporais ou vesículas biológicas (Wanga e Thanou, 2010). O objectivo desta área compreende a engenharia de sistemas terapêuticos e de diagnóstico (i.e., desenvolvimento, caracterização e aplicação) à escala nanométrica, implicando um tamanho de partícula inferior a 1  $\mu\text{m}$ . O estudo dos sistemas nanométricos visa estudar, para diferentes tamanhos de partícula, novas propriedades de superfície e, conseqüentemente, novas propriedades biológicas (Moghuimi *et al.*, 2005). A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, o diagnóstico, a monitorização e o controlo de sistemas biológicos foi denominada de “nanomedicina” pelo *National Institute of Health*, nos Estados Unidos (Moghuimi *et al.*, 2005).

As estruturas nanométricas são desenvolvidas com o objectivo de aumentar a biodisponibilidade e diminuir os efeitos secundários, de modo a tornar o diagnóstico ou a terapêutica mais seguros, simplificados e economicamente optimizados (Wanga e Thanou, 2010; Sakata *et al.*, 2007). Estas estruturas apresentam diversas vantagens, tais como, a possibilidade de direccionamento de fármacos a alvos específicos; o aumento da estabilidade do fármaco, protegendo-o contra a degradação e/ou inactivação; a modelação da libertação do fármaco, possibilitando, por sua vez, uma diminuição do número de doses necessárias para obter o efeito terapêutico pretendido e a diminuição dos picos plasmáticos (Sakata *et al.*, 2007).

Do ponto de vista farmacêutico, e considerando as suas dimensões, as nanopartículas são partículas cujo tamanho está compreendido entre 1 e 1000 nm (Shegokar e Müller, 2010). Estas partículas podem ser preparadas por diferentes métodos e com diferentes materiais, tais como os polímeros, as macromoléculas e os lípidos. A presente secção tem como objectivo definir e caracterizar os dois principais tipos de nanopartículas lipídicas e fazer referência ao estado da arte da aplicação tópica destes sistemas.

As nanopartículas lipídicas são preparadas à base de materiais lipídicos. A utilização de nanopartículas lipídicas em formas farmacêuticas para administração por via tópica baseia-se na capacidade destas estruturas nanométricas transportarem fármacos, aumentarem a estabilidade físico-química e a biodisponibilidade dos compostos.

Os lípidos e os fosfolípidos utilizados na preparação das nanopartículas lipídicas têm a grande vantagem de serem biodegradáveis e de composição idêntica ou muito semelhante à dos compostos fisiológicos, sendo de prever uma boa tolerância fisiológica associada a uma reduzida toxicidade crónica e aguda.

Estes materiais possuem boa solubilidade e afinidade para a via transepidérmica, uma vez que o meio através do qual realizam a permeação apresenta características apolares (grupos apolares dos lípidos) e polares (queratina hidratada e grupos polares dos lípidos). Adicionalmente, não estão relatados na literatura casos de irritação cutânea associados com a sua aplicação (Doktorovová *et al.*, 2009). O uso dos materiais lipídicos é bastante comum na Indústria Farmacêutica, sendo geralmente classificados como substâncias GRAS (“*generally recognized as safe*”) pela Food and Drug Administration (FDA) (United States Food and Drug Administration, 2011). Considerando a natureza lipófila da pele e as razões acima apresentadas, os veículos lipídicos são frequentemente usados em diversas formulações tópicas com fins terapêuticos ou cosméticos (Müller e Souto, 2008).

Actualmente, a maioria das moléculas em desenvolvimento na Indústria Farmacêutica são pouco hidrossolúveis e pouco solúveis em solventes orgânicos (Merisko-Liversidge e Liversidge, 2008). A solubilidade reduzida dos compostos representa um desafio à administração das substâncias activas, não se obtendo frequentemente a biodisponibilidade adequada (Shegokar e Müller, 2010). Na área da Tecnologia Farmacêutica, os investigadores têm estudado estratégias no intuito de ultrapassar a reduzida solubilidade de certos fármacos. Alguns exemplos destas estratégias são o uso de formulações lipídicas e a redução do tamanho das partículas a dimensões nanométricas (Eerdenbrugh *et al.*, 2009).

De acordo com dados publicados na literatura, as partículas de tamanho inferior a 1 µm, quando aplicadas na pele, asseguram um contacto íntimo com o estrato córneo, provocando um aumento da quantidade de substância activa no local de acção (Müller e Souto, 2008).

De forma a conciliar as estratégias anteriormente referidas, foram introduzidas na dermofarmácia e cosmética as nanopartículas lipídicas. Estas partículas representam veículos coloidais com diversas propriedades vantajosas, como por exemplo, a adesão, a oclusão, a hidratação cutânea, o aumento de absorção e da penetração de fármacos e a capacidade de modelar o perfil de libertação (Souto e Müller, 2007).

O uso de matrizes lipídicas em Tecnologia Farmacêutica encontra-se descrito na literatura científica desde há várias décadas. No entanto, as primeiras micropartículas à base de materiais de natureza lipídica foram desenvolvidas por Speiser e seus colaboradores no início dos anos oitenta, envolvendo o procedimento utilizado na preparação de uma emulsão (Eldem *et al.*, 1991).

As nanopartículas lipídicas derivam de emulsões óleo/água, substituindo-se o lípido líquido por um lípido sólido à temperatura ambiente e corporal, característica que possibilita a formação de uma matriz lipídica sólida cuja temperatura de fusão pode ser manipulada com a selecção de diferentes lípidos (Mehnert *et al.*, 2005).

Durante a formação das nanopartículas lipídicas é geralmente observada uma diminuição do ponto de fusão do lípido sólido. Esta será mais pronunciada quando uma substância activa ou agente tensioactivo se encontram dissolvidos na matriz lipídica. No caso do agente tensioactivo, ocorre partição do mesmo pela fase aquosa até à fase lipídica. Em suma, comparando o lípido sólido e os sistemas nanoparticulados obtidos, as temperaturas de fusão e de recristalização são diferentes. Na produção das nanopartículas lipídicas, a diferença referida pode variar entre os 10°C e 20°C, originando por vezes misturas superarrefecidas, para as quais a cristalização ocorre a temperaturas inferiores à do ambiente (Souto e Müller, 2007).

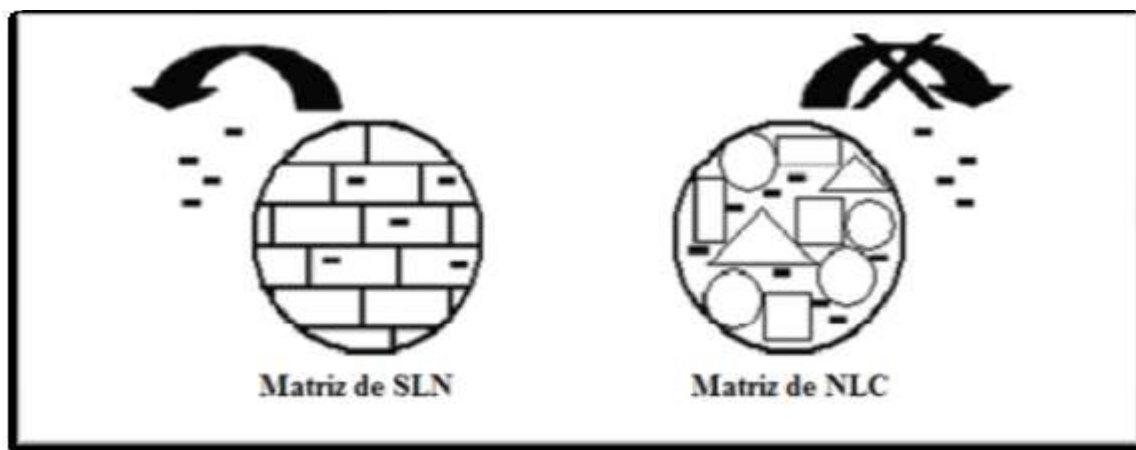
As nanopartículas de lípidos sólidos, designadas por “*Solid Lipid Nanoparticles*” (SLN), representam a primeira geração de nanopartículas lipídicas patenteadas, desenvolvidas nos anos 90 pelo grupo de pesquisa de Müller e Lucks na Alemanha, produzidas pela técnica de homogeneização a alta pressão (HPH) (Müller *et al.*, 1995), com o objectivo de ultrapassar as limitações apresentadas pelos sistemas coloidais tradicionais, e.g. lipossomas, nanopartículas

poliméricas, micro e nanoemulsões. Simultaneamente, o grupo de Gasco, em Itália, patenteou sistemas semelhantes, produzidos pela via da microemulsão (Gasco, 1993).

A estrutura das SLN é formada por uma matriz, constituída por lípidos sólidos à temperatura ambiente e corporal, revestida por agentes tensioactivos. Os lípidos podem ser de elevada pureza, como por exemplo, a triestearina, ou uma mistura menos definida de acilgliceróis (e.g. o Compritol<sup>®</sup> ou o Imwitor<sup>®</sup>) (Mehnert *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Teeranachaidekul *et al.*, 2008).

A segunda geração de nanopartículas lipídicas, vectores lipídicos nanoestruturados (“*Nanostructured Lipid Carriers*”, NLC), foi desenvolvida em 2000, de forma a ultrapassar algumas limitações das partículas anteriores (Mehnert *et al.*, 2005). Os NLC são preparados a partir de misturas de lípidos sólidos com lípidos líquidos (óleos), que se tem de manter sólida a pelo menos 40°C, revestidas por uma camada de moléculas de agente tensioactivo, criando-se uma nanoestruturação da matriz lipídica que permanece no estado amorfo, pois não cristaliza totalmente. A matriz lipídica das partículas resultantes apresenta um ponto de fusão inferior ao do lípido sólido quando usado isoladamente, embora continue a ser sólida à temperatura ambiente e corporal. A matriz dos NLC apresenta diversas imperfeições, permitindo acomodar uma maior quantidade da substância activa. Devido à cristalização incompleta, os NLC apresentam também uma maior estabilidade, prevenindo a expulsão da substância activa do interior das nanopartículas durante o tempo de acondicionamento e protegendo as substâncias mais sensíveis contra as agressões do meio, como a água ou o oxigénio (Mehnert *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Teeranachaidekul *et al.*, 2008). Pelo contrário, a matriz das SLN apresenta uma grande organização de moléculas de tamanho semelhante, limitando a capacidade de incorporação e sendo mais provável a perda das substâncias activas (Hu *et al.*, 2006; Mehnert *et al.*, 2005).

De acordo com a Figura 3, a principal diferença entre as SLN e os NLC baseia-se na composição da matriz, a qual origina distintas estruturas morfológicas. A estrutura cristalina perfeita das SLN é comparada a um muro de tijolos. A estrutura imperfeita dos NLC é originada pela mistura espacial de diferentes moléculas lipídicas (Müller e Souto, 2008).

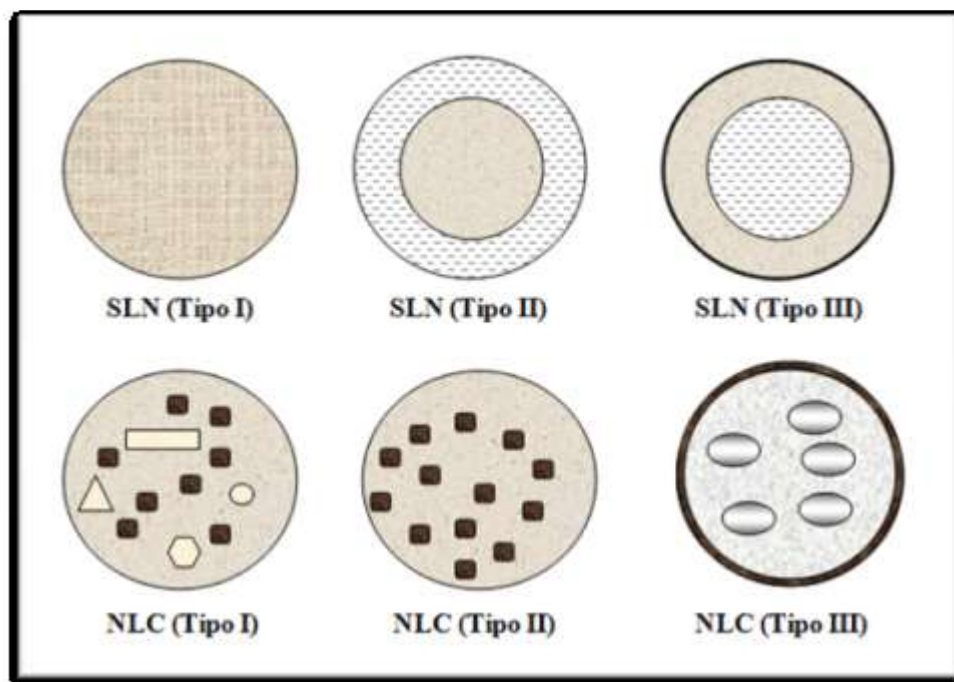


**Figura 3 - Diferenças morfológicas entre a matriz lipídica cristalina perfeita das SLN e a matriz lipídica com imperfeições dos NLC (adaptado de Souto *et al.*, 2008).**

A natureza dos lípidos seleccionados para a preparação das nanopartículas é responsável pela forma física destas estruturas. Por exemplo, no caso da utilização de lípidos com elevado grau de pureza (e.g. tristearina ou o palmitato de cetilo), como as moléculas são todas idênticas, as nanopartículas adoptam uma forma mais cúbica e originam uma matriz cristalina mais densa (Mehnert *et al.*, 2005; Souto *et al.*, 2008). Pelo contrário, com a utilização de misturas lipídicas polidispersas, usadas preferencialmente em cosmética, uma vez que as moléculas apresentam diferentes tamanhos, as nanopartículas adoptam uma forma esférica. Neste caso, a utilização de diferentes moléculas, como os acilgliceróis de cadeias longas dos lípidos sólidos e os acilgliceróis de cadeia curta dos lípidos líquidos, obtêm-se estruturas com diversas imperfeições, aumentando a capacidade de carga. Nestas condições, cria-se um espaço adicional para a incorporação da substância activa (Mehnert *et al.*, 2005; Souto *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm centrado o seu objectivo nas alterações das propriedades físico-químicas dos NLC por manipulação da sua composição lipídica (i.e., teor em lípido líquido e lípido sólido). As referidas propriedades físico-químicas, como por exemplo, o tamanho de partícula, o potencial zeta e a organização da estrutura cristalina, têm grande influência sob o perfil de libertação do fármaco. De um modo geral, os NLC com maior conteúdo em lípido líquido revelam uma velocidade e uma percentagem de libertação de fármaco superior quando comparadas com as SLN e com os NLC contendo menor teor em lípido líquido (Teeranachaideekul *et al.*, 2008).

Para ambas as nanopartículas lipídicas, SLN e NLC, foram propostos três modelos de matriz para descrever a sua estrutura e a sua forma (Souto *et al.*, 2008; Souto e Müller, 2007).



**Figura 4 - Diferentes tipos de morfologia de matriz:** SLN (Tipo I) – modelo de matriz homogênea; SLN (Tipo II) – modelo de concha enriquecida com fármaco; SLN (Tipo III) – modelo de núcleo enriquecido com fármaco; NLC (Tipo I) – modelo múltiplo; NLC (Tipo II) – modelo amorfo; NLC (Tipo III) – modelo cristalino imperfeito (adaptado de Souto e Müller, 2007).

Os modelos propostos para a incorporação das SLN diferem na posição e distribuição das moléculas de fármaco no interior do núcleo sólido. O primeiro modelo, modelo de matriz homogênea (SLN do tipo I), apresenta o fármaco dissolvido na matriz lipídica, estando este molecularmente disperso no núcleo das SLN ou presente na forma de *clusters* amorfos.

No segundo modelo, modelo de concha enriquecida com fármaco (SLN do tipo II), o núcleo lipídico não contém substância activa ou a sua concentração é reduzida. Neste caso, as moléculas do fármaco encontram-se à superfície da partícula. As SLN do tipo III revelam um núcleo enriquecido com fármaco coberto por lípidos com função protectora, formando-se quando a concentração de fármaco está relativamente próxima da solubilidade de saturação do lípido ou quando uma nanoemulsão sofre refrigeração ocorrendo uma diminuição da solubilidade de saturação (Souto *et al.*, 2008).

Relativamente aos NLC também existem, descritos na literatura, três modelos relativos à incorporação de fármaco, diferindo estes principalmente no método de produção e na composição da mistura lipídica das nanopartículas. Os NLC podem respeitar um modelo cristalino imperfeito (NLC do tipo I), um modelo amorfo (NLC do tipo II) ou um modelo múltiplo (NLC do tipo III). Os NLC do tipo I são obtidos quando são misturados lípidos sólidos com pequenas quantidades de lípido líquido. Devido aos diferentes tamanhos das cadeias de ácidos gordos e misturas de mono-, di- e triacilgliceróis, a matriz NLC é pouco organizada, criando várias imperfeições cristalinas para a incorporação de moléculas de fármaco. O modelo amorfo, NLC do tipo II, é criado por uma mistura de lípidos especiais (e.g. miristato de isopropilo) que não recristalizam após a homogeneização e arrefecimento. Este modelo minimiza a perda de fármaco durante o tempo de armazenamento (Souto *et al.*, 2008; Souto e Müller, 2007). O modelo múltiplo, NLC do tipo III, é formado quando são misturados lípidos sólidos com lípidos líquidos de cadeia média (e.g. os triacilgliceróis), ou longa (e.g. o ácido oleico), numa razão tal que a solubilidade das moléculas do lípido líquido no lípido sólido é excedida. Durante o processo de arrefecimento da nanoemulsão então formada, pequenas gotículas de lípido líquido precipitam no lípido sólido fundido e após solidificação são fixados em nanocompartimentos de lípido líquido no seio da matriz lipídica sólida, obtendo-se ainda mais imperfeições na estrutura. A vantagem do modelo múltiplo é o aumento da capacidade de incorporação de fármacos cuja solubilidade é normalmente superior nos lípidos líquidos do que nos lípidos sólidos (Souto *et al.*, 2008; Souto e Müller, 2007).

A natureza cristalina da matriz lipídica é também um factor dominante na capacidade de incorporação de fármacos, no perfil de libertação dos mesmos e na estabilidade a longo prazo das SLN e dos NLC. Este parâmetro precisa de ser cuidadosamente monitorizado durante a produção de nanopartículas lipídicas (Souto e Müller, 2007).

### **2.1. Vantagens e desvantagens das nanopartículas lipídicas**

O interesse das nanopartículas lipídicas na administração cutânea é fundamentado pela natureza lipófila da pele. Estes vectores são bastante adequados para o uso na via tópica, por

serem desenvolvidos com recurso a lípidos semelhantes aos lípidos fisiológicos, biocompatíveis e biodegradáveis, respeitando o equilíbrio do filme hidrolipídico da pele (emulsão protectora natural existente à superfície da pele) (Müller e Souto, 2008; Hu *et al.*, 2006). Outra vantagem é a possibilidade das nanopartículas lipídicas serem preparadas sem a utilização de solventes orgânicos ou outros aditivos tóxicos, o que reduz ainda mais o risco toxicológico, permitindo minimizar o aparecimento de dermatites induzidas pelo contacto com o fármaco (Souto *et al.*, 2008). Para uma certa concentração de lípido, o grau de oclusão aumenta com a diminuição do tamanho das partículas de uma formulação (Müller *et al.*, 2007). Deste modo é assegurado um contacto íntimo com o estrato córneo, o que possibilita um aumento da quantidade de fármaco presente no local de acção (Müller e Souto, 2008; Müller *et al.*, 2007; Almeida e Souto, 2007).

Quando formuladas em dispersões aquosas, as SLN e os NLC devem apresentar uma estabilidade física razoável, ou seja, limitada agregação de partículas e uma viscosidade adequada (Bauer *et al.*, 1999). Esta propriedade é um pré-requisito indispensável na formulação de nanopartículas lipídicas. Em virtude do seu tamanho reduzido (escala nanométrica), as partículas permanecem em suspensão devido aos movimentos Brownianos das moléculas da água. Considerando a carga eléctrica à superfície das nanopartículas, estas são estabilizadas por repulsão electrostática. A estabilidade física destas dispersões pode ser ajustada não só pela utilização de agentes tensoactivos, como o Tween 80 ou o poloxamer, mas também através da incorporação das nanopartículas em cremes, geles ou loções já existentes. As SLN e os NLC apresentam ainda como vantagem a possibilidade de quantificação da sua estabilidade através da técnica de calorimetria diferencial de varrimento. Com este método é determinada a energia, em Joule por grama, libertada pelas nanopartículas que se difundem no lípido líquido da formulação onde estão incorporadas. Pela comparação do valor obtido no dia em que as nanopartículas foram incorporadas com o que será auferido após o designado tempo de armazenamento, é possível calcular a percentagem total de nanopartículas presentes na formulação (Souto e Müller, 2007; Mehnert *et al.*, 2005; Dingler *et al.*, 1998).

Uma das principais vantagens das nanopartículas lipídicas é a facilidade de transposição do método de produção para larga escala, apresentando baixo custo de produção, tanto dos excipientes como das linhas de produção. Este tipo de produção implica a disponibilidade do

equipamento apropriado e a demonstração de que as preparações obtidas possuem estabilidade física e química, uma vez que as condições de preparação das partículas influenciam fortemente a qualidade do produto final (Souto e Müller, 2007).

Quando comparadas com sistemas farmacêuticos convencionais, como são as emulsões simples ou múltiplas, as nanopartículas lipídicas apresentam algumas vantagens para a administração tópica, tais como: (i) permitem a obtenção de dispersões contendo geralmente uma percentagem elevada de lípido ( $\approx$  entre 20-30%); (ii) a oclusão nestas preparações é obtida sem o uso de óleos gordurosos, como as parafinas, uma vez que a hidratação é potenciada pela retenção de água no estrato córneo. A pele torna-se suave e flexível (mais elástica), devido à formação de um filme de nanopartículas flexível à superfície da pele, ao contrário do filme mais compacto formado pelas parafinas (Souto e Müller, 2008).

Uma desvantagem das dispersões líquidas contendo SLN/NLC é a baixa viscosidade (geralmente de 100 mPas). Para obter uma preparação de consistência semi-sólida apropriada para aplicação cutânea, as nanopartículas podem ser incorporadas em bases tópicas (e.g. hidrogeles ou cremes) na dosagem apropriada. No entanto, a diluição provocada pelo referido método pode danificar o equilíbrio do sistema coloidal ou o estado sólido do lípido (Lippacher *et al.*, 2001). Adicionalmente, uma certa incompatibilidade ou toxicidade proveniente dos constituintes do creme ou do hidrogel representa também um inconveniente, particularmente quando são usados agentes tensioactivos e conservantes (Lippacher *et al.*, 2001).

## **2.2. Propriedades físico-químicas e organolépticas das SLN e dos NLC**

### **2.2.1. Aspectos protectores e adesão**

As propriedades protectoras conferidas pelas nanopartículas lipídicas são maioritariamente concedidas pelas dimensões reduzidas que apresentam (Souto e Müller, 2008). Por adoptar uma forma esférica, estas apresentam propriedades adesivas quando em contacto com as superfícies, estando a mesma dependente do diâmetro médio da partícula (Müller e Souto, 2008).

As nanopartículas lipídicas apresentam um efeito sinérgico com os filtros UV moleculares, permitindo a redução da sua concentração na formulação para protecção cutânea. Deste modo, observou-se uma menor penetração das moléculas de filtro solar na pele, quando comparadas uma preparação de SLN com uma emulsão O/A tradicional (Wissing e Müller, 2002), e uma redução de efeitos secundários (i.e. irritação cutânea e reacções alérgicas), mantendo-se o nível de protecção UV (Mehnert *et al.*, 2005).

Em geral, a adesividade às superfícies é uma característica muito atractiva das nanopartículas. Em teoria estimou-se que aproximadamente 4% das nanopartículas lipídicas com um diâmetro de cerca de 200 nm formam uma monocamada quando 4 mg de formulação é aplicada por centímetro quadrado (Wissing *et al.*, 2001).

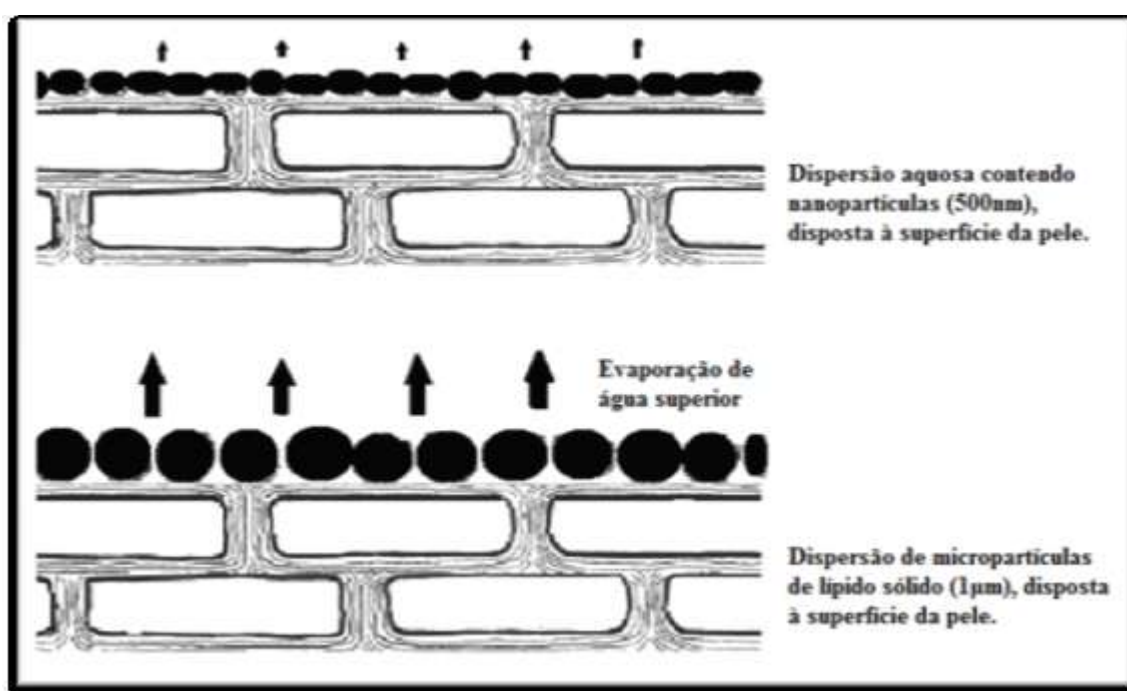
### **2.2.2. Oclusão e hidratação cutânea**

Quando uma formulação contendo nanopartículas é aplicada na pele origina um filme constituído por partículas dispostas em monocamada. Devido ao seu carácter hidrófobo, o filme formado apresenta acção oclusiva, promovendo a hidratação cutânea ao reduzir a perda transepidérmica da água por evaporação (Müller e Souto, 2008; Souto e Müller, 2008; Mehnert *et al.*, 2005).

O grau de oclusão de uma formulação pode ser determinado experimentalmente através do teste de Vringer (De Vringer, 1992). Neste teste, a formulação é aplicada num filtro de acetato de celulose que cobre um goblé com água. Posteriormente, a evaporação de água é quantificada em função do tempo. De forma a monitorizar o teste, utiliza-se como branco um goblé coberto com papel de filtro. Quando é obtido um factor de oclusão de 0, não ocorre oclusão e a evaporação da água da amostra e do branco são idênticas. Quando o factor de oclusão apresenta o valor de 100 ocorre oclusão máxima.

Em estudos publicados verificou-se que o factor de oclusão de partículas com diâmetro superior a 1 µm foi apenas de 10%, comparando com um factor de 50% quando usadas nanopartículas lipídicas com aproximadamente 200 nm (Müller e Dingler, 1998). Tais resultados podem ser compreendidos por diferenças na estrutura do filme formado à

superfície da pele pelas micropartículas e nanopartículas. A presença de poros preenchidos com ar num filme denso de partículas é independente do tamanho de partícula, no entanto, as dimensões dos poros são muito superiores num filme de micropartículas em relação aos conseguidos com as nanopartículas. Em suma, quanto maiores os poros apresentados pelo filme de partículas maior a evaporação de água. Desta forma, quando aplicada uma dispersão de nanopartículas na pele a pressão leva à fusão de partículas, promovida pelas forças capilares resultantes da evaporação da água, formando-se um filme denso com poros de menores dimensões (Figura 5) (Souto e Müller, 2008; Mehnert *et al.*, 2005). Como resultado potencia-se a hidratação cutânea.



**Figura 5 - Oclusão proporcionada pelas partículas lipídicas à superfície da pele (adaptado de Souto e Müller, 2008).**

A composição da matriz lipídica permite manipular o tamanho das partículas obtidas, conferindo diferentes graus de oclusão consoante a finalidade da formulação (Müller e Souto, 2008). Quando a matriz lipídica é muito cristalina, como no caso das SLN, produzidas com lípidos muito puros (e.g. a triestearina e a tripalmitina), verifica-se uma elevada oclusão e hidratação. As misturas superarrefecidas podem ser obtidas usando triglicerídeos de cadeia média com baixo ponto de fusão, como por exemplo a trilaurina e a tricaprina, proporcionando uma baixa oclusividade (Müller e Souto, 2008; Souto e Müller, 2008;

Mehnert *et al.*, 2005). Como consequência das suas propriedades oclusivas, as SLN e os NLC podem ser usadas para aumentar a penetração dos fármacos na pele (Souto e Müller, 2008).

### **2.2.3. Lubrificação e emoliência**

Um dos desafios na área da dermofarmácia e cosmética é a produção de formulações que reduzam o prurido evitando o aumento da lesão cutânea. A barreira mecânica, a hidratação e a lubrificação, proporcionadas pelas nanopartículas lipídicas protegem a pele, sendo particularmente útil em situações de irritação cutânea e reacções alérgicas (Souto e Müller, 2008; Müller e Souto, 2008).

Devido ao formato esférico adoptado pelas nanopartículas lipídicas, estas apresentam, à superfície da pele, um efeito suavizante e também lubrificante, essencial para que a formulação não seja mecanicamente removida. Na prática, estudos reológicos referem que as dispersões lipídicas são suficientemente viscosas ou fluidas para serem facilmente aplicadas na pele, mas devidamente elásticas para aderir e fixar na pele (Souto e Müller, 2008).

A lubrificação, a emoliência e as propriedades viscoelásticas concedidas pelas SLN e pelos NLC estão relacionadas com a hidratação cutânea. Mais uma vez, as propriedades citadas dependem da concentração do lípido e do tamanho de partícula apresentado pela formulação. Por sua vez, o tamanho das partículas e o respectivo índice de recristalização são influenciados pelo tipo de lípidos e de agentes tensioactivos empregues. O controlo do grau de hidratação conseguido com estes veículos permite ajustar a emoliência das formulações (Souto e Müller, 2008; Müller e Souto, 2008).

### **2.2.4. Efeito osmótico e controlo de pH**

As nanopartículas lipídicas devem apresentar uma osmolaridade e um valor de pH semelhantes aos da pele, de forma a evitar a irritação cutânea, as reacções alérgicas ou outros efeitos deletérios resultantes da administração tópica das mesmas (Souto e Müller, 2008; Müller e Souto, 2008).

Relativamente à isotonia da formulação, o estrato córneo intacto apresenta alguma tolerância a alterações osmóticas, no entanto, uma superfície cutânea danificada pode ser mais susceptível. Um desvio marcado da isotonia pode originar um efeito irritante na pele, dependendo da sensibilidade de cada pessoa, podendo determinar o abandono da terapêutica (Souto e Müller, 2008; Müller e Souto, 2008).

Em relação ao controlo do valor de pH, a superfície cutânea é ligeiramente acídica (pH entre 4.0 e 6.0), devido à presença de ácidos gordos provenientes das secreções das glândulas sebáceas e de ácido carboxílico presente no suor produzido pelas glândulas sudoríparas (Lambers *et al.*, 2006; Pappinen *et al.*, 2007; Kitagawa *et al.*, 1995). A pele apresenta uma certa resistência a ligeiras alterações de pH, sem que ocorram efeitos danosos permanentes. No entanto, formulações fortemente ácidas ou alcalinas podem ser irritantes mesmo na pele saudável. Perante este facto é aconselhável proceder ao ajuste do pH com, por exemplo, soluções tampão. As nanopartículas lipídicas estabilizadas revelam, geralmente, um pH ótimo para as formulações tópicas e quando necessário também permitem o uso de soluções tampão (Souto e Müller, 2008; Müller e Souto, 2008).

Além do referido anteriormente, o pH tem uma forte influência na estabilidade física das nanopartículas lipídicas. Kuo e Chen (2007) observaram que a valores baixos de pH as propriedades electrostáticas das SLN (carregadas negativamente) são mais fracas, o que leva à diminuição da estabilidade a longo prazo.

### **2.2.5. Efeito branqueador**

De acordo com estudos de mercado, a aparência é um factor extremamente importante para a indústria cosmética, não sendo só valorizada a embalagem mas também a aparência do produto (Mehnert *et al.*, 2005). As propriedades branqueadoras apresentadas pelas nanopartículas lipídicas são interessantes na medida em que tornam as formulações mais atractivas ao consumidor (Souto e Müller, 2008). Exemplificando, a coenzima Q10 apresenta uma pigmentação amarela característica, corando as formulações onde é incorporada.

Considerando o facto de os produtos brancos serem preferidos pelos consumidores, a adição de uma dispersão de nanopartículas lipídicas, de aspecto branco leitoso agradável, permite reduzir a cor conferida pela coenzima Q10 ao produto (Souto e Müller, 2008; Mehnert *et al.*, 2005; Souto *et al.*, 2008).

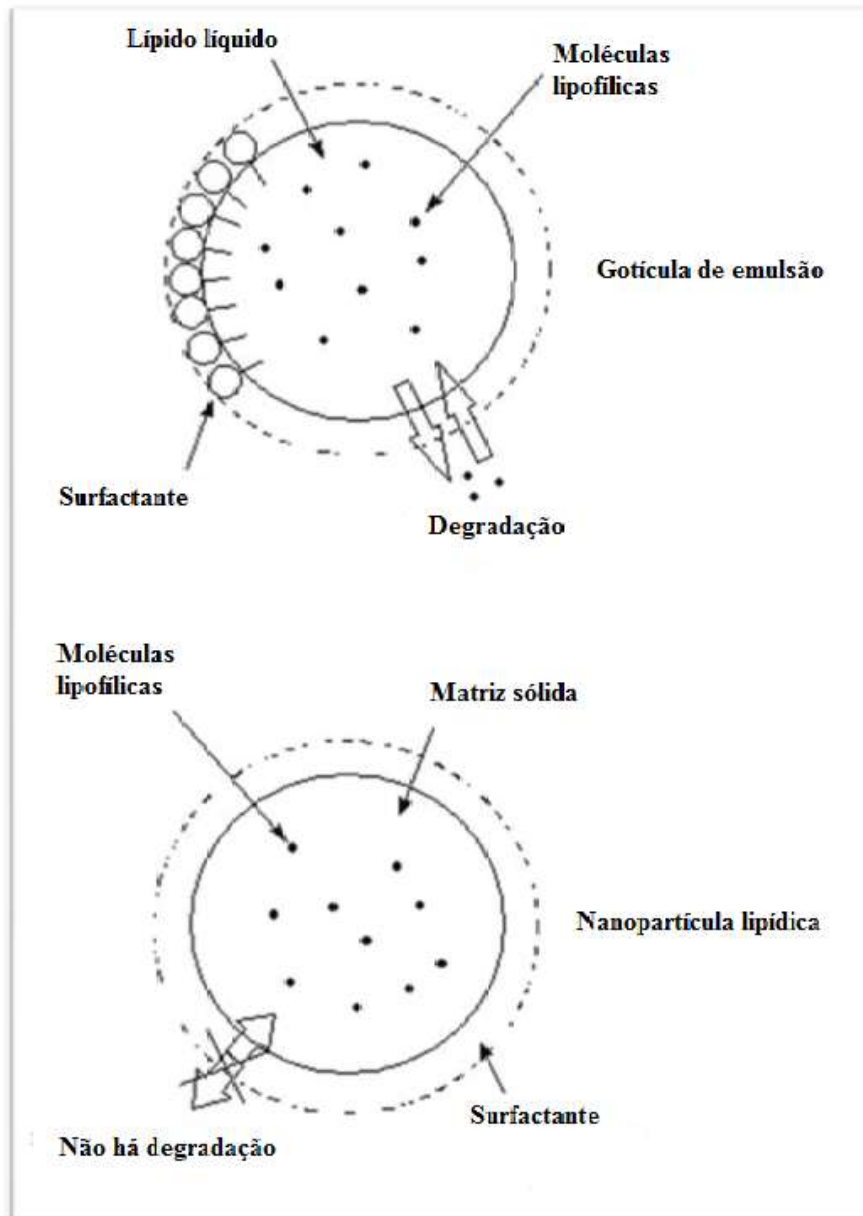
O efeito branqueador assume também um papel relevante na área da dermofarmácia. Um exemplo típico desta aplicação é com a vitamina C, a qual sofre alteração de cor durante o armazenamento, sem que o seu prazo de validade tenha terminado (Mehnert *et al.*, 2005; Souto e Müller, 2008).

### **2.3. Propriedades Biofarmacêuticas e Farmacocinéticas das nanopartículas lipídicas**

#### **2.3.1. Estabilização de compostos activos lábeis**

A matriz sólida das nanopartículas lipídicas é capaz de incorporar moléculas no seu interior, o que evita a perda das mesmas para o ambiente externo e permite a estabilização de substâncias activas quimicamente lábeis contra a degradação provocada por espécies reactivas, tais como a água ou o oxigénio (Souto e Müller, 2008; Souto *et al.*, 2008).

Como demonstrado pela Figura 6, nas gotículas de uma emulsão convencional ocorre a libertação espontânea de fármaco degradado ou intacto. Com a utilização de uma formulação de nanopartículas lipídicas, os fármacos encontram-se retidos no estado sólido e protegidos da degradação (Souto e Müller, 2008; Souto *et al.*, 2008).



**Figura 6 - Protecção química de fármacos lábeis:** Representação esquemática da degradação de fármaco apresentada pelas gotículas de emulsão convencional em comparação com as nanopartículas lipídicas (adaptado de Souto e Müller, 2007).

Pople e Singh (2006) demonstraram que a estabilidade do retinol (Vitamina A) pode ser aumentada por incorporação da molécula em NLC compostos por Compritol 888 ATO e Miglyol 812. O mesmo efeito pode ser observado com a encapsulação da Coenzima Q10, uma molécula relativamente estável quando incorporada numa embalagem protectora, mas que se

degrada facilmente quando exposta à luz, especialmente quando esta é artificial (Mehnert *et al.*, 2005).

### 2.3.2. Modificação do perfil de libertação

A libertação das substâncias activas encapsuladas nas nanopartículas lipídicas é o primeiro requisito quando uma formulação é aplicada, a qual determina a actuação das mesmas no local de acção. As nanopartículas lipídicas demonstram ter a capacidade de modelar a velocidade de libertação e de penetração das substâncias activas através da pele, conforme o efeito farmacológico e local de acção pretendidos (Jain *et al.*, 2005). Em certas circunstâncias, como no caso dos corticosteróides, a incorporação do fármaco em nanopartículas lipídicas é particularmente vantajosa, pois permite direccionar a absorção do mesmo à epiderme, evitando efeitos secundários dos corticosteróides tópicos, como a absorção sistémica e a atrofia cutânea (Gohla *et al.*, 2000; Souto e Müller, 2008).

O perfil de libertação das substâncias activas a partir das nanopartículas lipídicas pode ser manipulado de forma a maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de libertação modificada e facilitar a sua posologia (Das e Das, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

Através da manipulação do perfil de libertação podem ser obtidas as formas farmacêuticas de libertação modificada (e.g. prolongada, retardada, sequencial). No primeiro caso, o fármaco é libertado gradualmente e a concentração plasmática mantida em níveis terapêuticos por um longo período de tempo, o que irá prolongar o efeito farmacológico. Um perfil de libertação retardada pretende libertar o fármaco num local específico ou após um período definido de tempo. As formas farmacêuticas de libertação sequencial ou pulsátil, são um tipo especial de forma farmacêutica de libertação modificada que se caracteriza por uma libertação da(s) substância(s) activa(s) durante um período de tempo mais longo ao verificado numa forma farmacêutica de libertação convencional e de um modo intermitente no tempo.

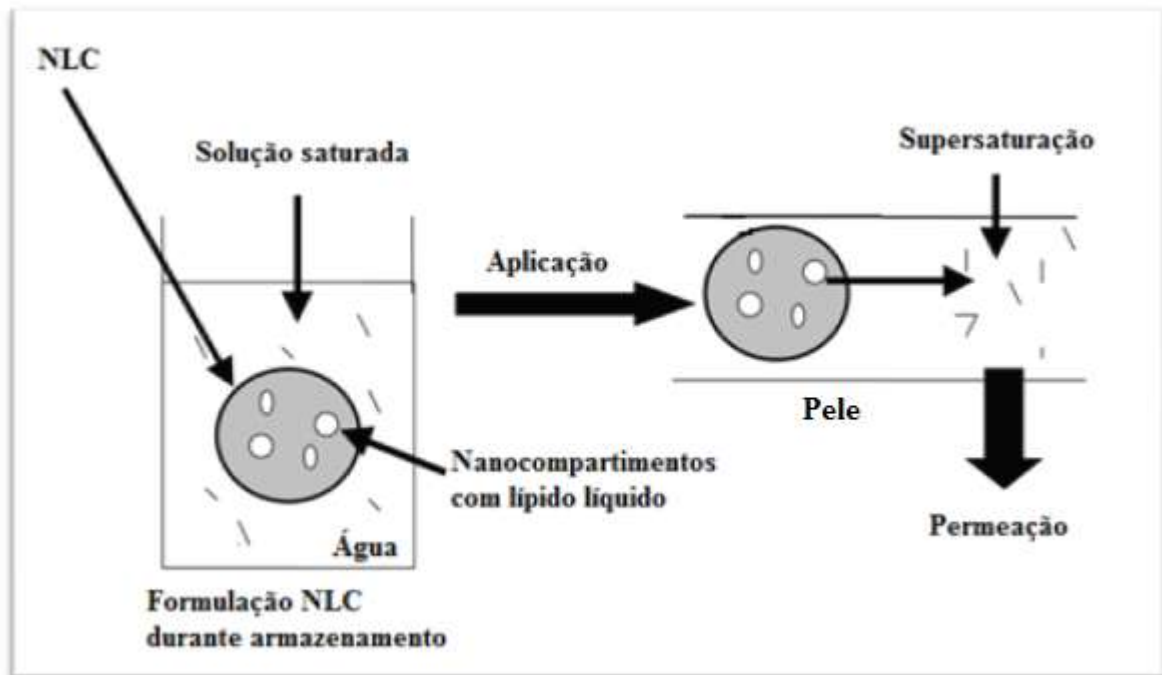
As formas farmacêuticas de libertação controlada ou de ordem zero são sistemas farmacêuticos com libertação de uma quantidade constante de substância(s) activa(s) por unidade de tempo. As formas farmacêuticas de libertação acelerada são preparações que

apresentam uma velocidade de libertação da(s) substância(s) activa(s) superior às formas de libertação convencional, quando administrada pela mesma via. As formas farmacêuticas de libertação bifásica são preparações que se caracterizam por dois períodos diferentes de libertação do fármaco rápida/lenta ou lenta/rápida (Costa e Lobo, 1999; Lin *et al.*, 2004; Alderborn, 2005; Jung *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

O coeficiente de difusão das substâncias activas através do estrato córneo não deve ser considerado constante, mas dependente da concentração e natureza da substância activa e da acção dos outros constituintes da formulação, como por exemplo, os promotores de absorção (Souto e Müller, 2008; Mehnert *et al.*, 2005). Geralmente, um aumento na quantidade de fármaco incorporado traduz-se num aumento da velocidade de difusão do fármaco. No entanto, em certas situações, o efeito pode ser contrário devido à possibilidade de cristalização do fármaco dentro das nanopartículas (Souto e Müller, 2007). O método de produção das nanopartículas lipídicas, a sua composição e a concentração em lípidos e agentes tensioactivos e as propriedades de dissolução dos constituintes da formulação influenciam também o perfil de libertação dos fármacos ao modificar a estrutura interna da partícula (Souto e Müller, 2008).

Uma forma de otimizar a formulação, aumentando a sua capacidade de incorporação de fármaco, para que ocorra um aumento da difusão cutânea do mesmo, é o fenómeno de supersaturação (Figura 7). Este fenómeno é alcançado ao incorporar nanopartículas lipídicas carregadas de substância activa em formulações tópicas convencionais, tais como cremes, pomadas, emulsões ou geles, contendo a mesma substância activa (Müller e Souto, 2008).

Durante o armazenamento, o fármaco está aprisionado na matriz dos NLC, pois estas partículas mantêm uma forma polimórfica desordenada. Ao aplicar a formulação contendo os NLC, devido ao aumento da temperatura e da evaporação de água, a matriz lipídica adopta uma forma polimórfica mais ordenada, o que provoca a expulsão de substância activa para um sistema saturado com a mesma. A supersaturação é um fenómeno que aumenta a actividade termodinâmica, causando um aumento da pressão e da penetração de moléculas por difusão na pele (Mehnert *et al.*, 2005; Müller e Souto, 2008).



**Figura 7 - Fenómeno de supersaturação** (adaptado de Mehnert *et al.*, 2005).

O conceito de libertação de substâncias activas num local de acção específico (“*target delivery*”) beneficiou, igualmente, com o uso das nanopartículas, sendo possível direccionar a libertação dos fármacos (Müller *et al.*, 2005).

O ajuste das propriedades de superfície das nanopartículas lipídicas destinadas à via tópica é indispensável, uma vez que estas influenciam grandemente a forma como as mesmas são metabolizadas e, conseqüentemente, a libertação dos fármacos.

Ao modificar o padrão de adsorção de proteínas sanguíneas, por alteração da superfície das partículas, é alterada a forma de reconhecimento das mesmas pelo sistema mononuclear fagocitário, proporcionando-se a circulação do fármaco no sangue ou a acumulação noutros locais do corpo, como o fígado ou baço (Ganta *et al.*, 2009). O referido ajuste pode ser realizado de tal forma que as partículas adsorvem automaticamente as proteínas plasmáticas responsáveis pela acumulação no local de acção desejado. Este conceito de adsorção proteica diferencial foi explorado para direccionar fármacos incapazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica ao cérebro (Shegokar e Müller, 2010).

A manipulação da superfície das nanopartículas pode, por exemplo, ser realizada com a adição de cadeias hidrófilas, como o polietilenoglicol (PEG). Estas cadeias visam o aumento do tempo de permanência da formulação no sangue ao resistir à adsorção proteica, reduzindo ou evitando o processo de opsonização natural que transporta as substâncias para o fígado ou baço através de macrófagos (Müller *et al.*, 2005).

### **2.4. Produção de nanopartículas lipídicas**

De acordo com o que foi referido anteriormente, as condições de produção das nanopartículas lipídicas afectam a estrutura interna da sua matriz, condicionando a formulação relativamente à biodisponibilidade, qualidade, eficácia e segurança (Mehnert *et al.*, 2005).

A literatura científica descreve diversos métodos de produção destes veículos, como a homogeneização por alta pressão, desenvolvida por Müller e Lucks (Müller *et al.*, 1995); a técnica da microemulsão, desenvolvida por Gasco (1993); a técnica de emulsificação/evaporação com solvente, descrita por Sjöström e Bergenstahl (1992); a técnica de substituição de solvente (Hu *et al.*, 2002, Dubes *et al.*, 2003); a técnica de emulsificação-difusão de solvente (Quitana-Guerrero *et al.*, 2005); a inversão de fases (Heurtault *et al.*, 2002); a emulsificação de solventes por ultrassons (Trotta e Caputo, 2003) e a técnica dos fluidos supercríticos (Chattopadhyay *et al.*, 2007).

O método da homogeneização por alta pressão e a técnica da microemulsão encontram-se descritos detalhadamente neste trabalho. O primeiro por representar o método mais utilizado na produção de nanopartículas lipídicas (Mehnert *et al.*, 2005) e a técnica da microemulsão por ser o método utilizado no presente trabalho para preparar as nanopartículas lipídicas de propionato de fluticasona para aplicação tópica (ver Capítulo II).

A produção das SLN por homogeneização a alta pressão pode ser realizada a quente ou a frio. Em ambas as situações, a substância activa é dissolvida ou dispersa no lípido fundido antes do processo de homogeneização (Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2000). Neste método, a probabilidade de ocorrer agregação das nanopartículas obtidas é reduzida uma vez que são

produzidas partículas de tamanho reduzido e homogéneo, apresentando baixo índice de polidispersão (Yang e Zhu, 2002; Souto *et al.*, 2007).

A técnica mais utilizada é realizada a quente, decorrendo o processo a temperaturas superiores ao ponto de fusão do lípido utilizado. Nesta técnica, preparam-se duas fases distintas à mesma temperatura, a fase lipídica, contendo o lípido fundido com o fármaco, e a fase aquosa, uma solução onde os polímeros hidrófilos ou proteínas se encontram dissolvidas. As fases são posteriormente misturadas por homogeneização a elevada velocidade, com recurso ao ultraturrax, ou por ultrassons. Este procedimento quebra as partículas grandes de lípido na fase interna, reduzindo o seu tamanho. A pré-emulsão formada é depois processada pelo homogeneizador a alta pressão, em ciclos de homogeneização, que normalmente variam de um a três, com uma pressão que pode variar entre os 250 e 1500 bar. Nesta fase, o produto obtido é uma nanoemulsão devido ao estado líquido do lípido. Com o arrefecimento, material lipídico recristaliza formando as nanopartículas lipídicas sólidas (Müller *et al.*, 2005; Mehnert *et al.*, 2005).

A técnica de homogeneização a alta pressão realizada a frio apresenta um ritmo acelerado de arrefecimento, favorecendo a distribuição homogénea de substância activa na matriz lipídica. Nesta técnica, o gelo seco ou o nitrogénio líquido é adicionado ao lípido fundido contendo a substância activa, de forma a aumentar a fragilidade do lípido. Posteriormente, o tamanho das partículas é facilmente reduzido por atrito físico, obtendo-se as micropartículas. As partículas produzidas são suspensas, a frio, com um agente tensioactivo, podendo neste momento ser realizada a homogeneização por alta pressão à temperatura ambiente ou inferior, originando as nanopartículas lipídicas (Mehnert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2005).

A homogeneização por alta pressão a frio minimiza a exposição da amostra às temperaturas elevadas, não a evitando completamente, devido à fusão do lípido para incorporação do fármaco, realizada na etapa inicial do processo. Esta técnica é vantajosa para substâncias extremamente sensíveis à temperatura (e.g. péptidos e proteínas) ou hidrófilas por passarem da fase lipídica à aquosa, por partição.

As nanopartículas produzidas por este método apresentam um tamanho médio ligeiramente superior em relação às obtidas por homogeneização a alta pressão a quente, com o mesmo

lípidos, e segundo os mesmos parâmetros de pressão, temperatura e número de ciclos de homogeneização. De modo a reduzir o tamanho de partícula e minimizar a polidispersão, pode ser aplicado um maior número de ciclos de homogeneização (Müller e Souto, 2008; Müller *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006).

Na preparação das SLN e dos NLC usando a técnica da microemulsão, desenvolvida por Gasco (1993), a fase lipídica, comumente 10% de lípido sólido, é fundida à mesma temperatura (60/70°C) que a fase aquosa, onde se encontra 15% de agente tensioactivo O/A e 10% de co-agente tensioactivo. As duas fases são adicionadas e misturadas formando-se uma microemulsão. A nanoemulsão é obtida quando a microemulsão é diluída num excesso de água fria (2-3°C), sob agitação, que estimula a quebra das micropartículas por choque térmico. A recristalização da nanoemulsão em nanopartículas ocorre à medida que a formulação arrefece. Para finalizar, o excesso de água é removido por ultra-filtração ou por liofilização para eliminar o efeito de diluição das partículas obtidas (Wissing *et al.*, 2005; Mehnert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006).

Comparando as metodologias descritas anteriormente, a homogeneização por alta pressão é a técnica mais usada nas diferentes áreas, sendo habitualmente usada na indústria farmacêutica, nomeadamente para a produção de emulsões para nutrição parenteral (Intralipid<sup>®</sup> e Lipofundin<sup>®</sup>) (Müller *et al.*, 1995). Adicionalmente, este método ultrapassa o grande obstáculo da produção em larga escala, permitindo um melhor controlo da temperatura, originando formulações de melhor qualidade (partículas à escala nanométrica de tamanho reduzido e homogéneo) (Mehnert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006). A homogeneização a alta pressão apresenta também a vantagem de utilizar apenas um passo na produção das nanopartículas lipídicas, com um conteúdo em partículas de 50% ou mais (Müller e Souto, 2008). No entanto, as temperaturas elevadas usadas pela homogeneização a alta pressão podem ser contra-indicadas, aumentando a velocidade de degradação de fármacos e dos veículos, ou induzindo modificações conformacionais em certas moléculas (e.g. péptidos ou proteínas) (Hu *et al.*, 2006).

A técnica da microemulsão também citada tem como desvantagem a diluição da suspensão de partículas com água, que depois necessita de ser removida. No entanto, desta forma pode ser

evitado o colapso das cadeias hidrófilas à superfície das nanopartículas (Mehnert e Mäder, 2001; Mehnert *et al.*, 2005).

### 2.4.1. Produção de formulações tópicas

As formulações tópicas podem ser constituídas unicamente por nanopartículas lipídicas, apresentando vantagens, uma vez que a libertação das substâncias activas depende unicamente da matriz lipídica, sem existir a influência do veículo. As propriedades requeridas podem ser ajustadas na formulação, manipulando as características das nanopartículas, sendo também este um processo relativamente simples (Mehnert *et al.*, 2005).

Para a produção de dispersões óleo/água contendo nanopartículas lipídicas é necessário adicionar o lípido em diferentes momentos da preparação da formulação, devido à concentração elevada em lípido. Inicialmente, uma dispersão é preparada por homogeneização a alta pressão contendo 50% de nanopartículas lipídicas. Posteriormente, o lípido fundido é adicionado pouco a pouco e disperso, aumentando a concentração em lípido até aos 80% ou 90%. No estado fundido a formulação é líquida, apresentando uma baixa viscosidade, após arrefecimento, dependendo do conteúdo em lípido, o produto final adquire uma textura cremosa, pastosa ou sólida (Mehnert *et al.*, 2005; Müller e Souto, 2008).

De acordo com a patente das SLN, a concentração em lípido deve encontrar-se entre os 0,1% e os 30,0% (Müller e Lucks, 1996). Esta afirmação baseia-se no facto de que quando aplicadas concentrações de lípido superiores formam-se pomadas. No que respeita aos NLC, a concentração em lípidos pode alcançar os 50% ou os 60%, originando partículas bem definidas por homogeneização e não pomadas. A viscosidade aumenta com a concentração em lípido, quando esta se encontra entre os 40% e os 50%, as preparações são cremosas, acima dos 50% as formulações apresentam-se mais pastosas e para valores mais elevados, 80% ou 90%, as dispersões tornam-se sólidas. As preparações no estado sólido não são próprias para aplicação dérmica, no entanto, podem apresentar grande interesse para a administração oral (Mehnert *et al.*, 2005; Müller e Souto, 2008).

Considerando a produção de geles, 4% a 10% em conteúdo de nanopartículas lipídicas é suficiente. Tendo em atenção a diluição que ocorre no produto final, primeiro prepara-se uma dispersão aquosa apresentando uma concentração elevada em nanopartículas lipídicas. Posteriormente, é adicionado o agente gelificante, que preferencialmente não deve conter electrólitos para evitar a agregação de partículas. Os derivados da celulose são usados com frequência, sendo um bom exemplo de agente gelificante sem electrólitos (Müller e Souto, 2008; Mehnert *et al.*, 2005).

### **2.4.2. Incorporação em formulações tópicas**

As nanopartículas lipídicas podem ser incorporadas em bases hidrófilas, como por exemplo hidrogeles ou cremes óleo/água. Este procedimento apresenta o benefício bastante atractivo de melhorar as formulações, aumentando a viscosidade, através de um processo relativamente simples (Müller *et al.*, 2008; Mehnert *et al.*, 2005).

De modo a produzir cremes óleo/água contendo nanopartículas lipídicas é necessário adicionar dispersões concentradas, com cerca de 40% de conteúdo lipídico sólido. A adição de nanopartículas lipídicas a cremes pode ocorrer durante ou após a produção do mesmo. No primeiro caso, uma parte da água que compõe o creme é substituída pela dispersão de nanopartículas lipídicas concentrada, que apresenta estabilidade suficiente para evitar a coalescência com a parte lipídica da emulsão. Caso o processo de produção da emulsão seja realizado a uma temperatura superior ao ponto de fusão das nanopartículas lipídicas, estas fundem, para posteriormente recristalizar durante o processo de arrefecimento da formulação final (Müller *et al.*, 2008). A adição das nanopartículas após a preparação do creme segue as etapas seguintes: o creme é formulado de forma habitual, contudo com uma quantidade menor de água, de forma a compensar a que será adicionada com a dispersão concentrada em nanopartículas lipídicas. Após a produção do creme, a dispersão é adicionada, com agitação, a temperaturas superiores a 30°C ou à temperatura ambiente. Este processo evita a fusão das nanopartículas lipídicas, prevenindo a alteração da estrutura interna das mesmas (Müller *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2005).

A incorporação das nanopartículas lipídicas em hidrogeles é também um procedimento bastante simples. Os componentes do gel são misturados e uma dispersão de nanopartículas lipídicas concentrada é adicionada antes de iniciar a etapa de gelificação. Neste processo deve ser usado um agente gelificante neutro. Os electrólitos, como o hidróxido de sódio ou de potássio, podem destabilizar a dispersão de nanopartículas, reduzindo o seu potencial zeta e ocorrendo a agregação das mesmas. Após a preparação do gel, a agregação das partículas deixa de ser um problema, uma vez que as partículas são incorporadas na sua rede e tornam-se fisicamente estáveis (Mehnert *et al.*, 2005).

### **2.5. Nanopartículas lipídicas: Aplicações tópicas**

No desenvolvimento de novas formulações, o aperfeiçoamento das características farmacocinéticas é de elevada importância. Neste sentido, encontram-se publicados alguns exemplos de fármacos e formulações cujas propriedades beneficiaram com o desenvolvimento da nanotecnologia (Xia *et al.*, 2007; Souto *et al.*, 2008; Wanga e Thanou, 2010; Doktorovová *et al.*, 2009).

Estudos realizados em células de difusão de Franz demonstraram uma adequada absorção transepidérmica de substâncias activas como o retinol (Jenning *et al.*, 2000), a isotretionina (Liu *et al.*, 2007) e glucocorticóides (Sivaramakrishnan *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2000), quando encapsuladas em SLN.

A libertação prolongada proporcionada pelas nanopartículas lipídicas é também vantajosa na formulação de perfumes, tornando o odor persistente ao longo de diversas horas com uma única aplicação. Comparando este veículo com as típicas emulsões óleo/água, a libertação do odor é retardada (Hommos *et al.*, 2005; Wissing *et al.*, 2000). Após 6 horas, 100% do perfume foi libertado da emulsão, enquanto apenas 75% do mesmo foi libertado das SLN (Wissing *et al.*, 2000). A mesma propriedade é também vantajosa na veiculação de repelentes de insectos para administração cutânea (Frederiksen *et al.*, 2003).

Recentemente, tem sido estudada a possibilidade da incorporação de filtros UV moleculares, físicos ou a combinação de ambos em SLN e NLC (Müller *et al.*, 2000; Villalobos-Hernandez

e Muller-Goymann, 2005; Wissing e Müller, 2001; Saupe *et al.*, 2003). Devido às suas propriedades, as nanopartículas lipídicas actuam como bloqueadores de raios UV. Desta forma, a inclusão de filtros solares na matriz das SLN e dos NLC apresenta um efeito sinérgico (Xia *et al.*, 2007). Este efeito sinérgico permite reduzir o conteúdo em filtro solar molecular na formulação, mantendo o nível de protecção. Para finalizar, a incorporação de filtros moleculares na matriz de nanopartículas lipídicas permite obter um perfil de libertação prolongado, reduzir a penetração dos filtros na pele e, conseqüentemente, os efeitos secundários e os custos da formulação (Müller e Wissing, 2002; Souto *et al.*, 2008).

### **2.5.1. Corticosteróides veiculados por SLN/NLC**

A absorção percutânea de uma formulação de aplicação tópica contendo glucocorticóides envolve diversas etapas, tais como a libertação do fármaco da formulação; a sua penetração no estrato córneo e a permeação ou difusão através do mesmo; a passagem do fármaco por partição para a epiderme viável e derme; e a difusão do fármaco até aos receptores de glucocorticóides, nos quais se liga selectivamente (Cross *et al.*, 2003; Caron *et al.*, 1990). A eficácia *in vivo* da formulação contendo glucocorticóides depende da biodisponibilidade do fármaco no seu local de acção. A biodisponibilidade é, por sua vez, determinada pela velocidade de partição e transporte através do estrato córneo, processos muito influenciados pelas propriedades físico-químicas do fármaco e do veículo (Wiedersberg *et al.*, 2008).

Nas células-alvo, queratinócitos e fibroblastos, presentes na epiderme e derme viável, encontram-se os receptores de glucocorticóides. Uma vez atingidos os receptores, não só a biodisponibilidade mas também o tempo de permanência e a afinidade do glucocorticóide determinam a eficácia clínica do mesmo. O processo em questão é geralmente realizado através de difusão passiva, envolvendo uma associação rápida e não específica à membrana celular, seguida de um processo mais lento que conduz a uma ligação forte do fármaco à célula (Wiedersberg *et al.*, 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos glucocorticóides aparentam ser maioritariamente mediados pela regulação de genes. No citoplasma, os esteróides ligam-se aos receptores de glucocorticóides, formando um complexo que é rapidamente transportado

para o núcleo. No núcleo, o complexo formado liga-se à região apropriada de ADN para estimular ou inibir a transcrição e regular o processo inflamatório. Os glucocorticóides aparentam também inibir a transcrição de diversos genes, podendo estes ser responsáveis pela proliferação das células T, precursores da imunidade dependente das células T, ou produtores de citocinas pró-inflamatórias, das quais são exemplo as interleucinas. O efeito vasoconstritor dos glucocorticóides contribui para a sua actividade anti-inflamatória, diminuindo o eritema (Wiedersberg *et al.*, 2008).

A administração tópica de glucocorticóides para o tratamento de doenças de pele requer a garantia da administração de uma dose adequada, na área da pele indicada, prevenindo efeitos indesejáveis, como a fotossensibilidade, a irritação cutânea ou a atrofia da espessura da pele, causados pela absorção sistémica dos corticosteróides. No sentido de melhorar a biocompatibilidade e a biodisponibilidade deste tipo de fármacos, têm sido testadas formulações contendo SLN e NLC (Müller e Souto, 2008; Pardeike *et al.*, 2009). Usando as nanopartículas lipídicas é possível direccionar a libertação do fármaco para a epiderme e controlar a sua penetração, prevenindo os efeitos secundários dos glucocorticóides mencionados anteriormente (Doktorovová *et al.*, 2010).

Diversas formulações aquosas contendo SLN foram propostas para a administração tópica de diversos glucocorticóides, como o propionato de clobetasol (Hu *et al.*, 2006), a dexametasona (Xiang *et al.*, 2007) ou a betametasona (Sivaramakrishnan *et al.*, 2004).

O propionato de fluticasona (PF) é um glucocorticóide, com propriedades vasoconstritoras, anti-inflamatórias e anti-pruríticas recorrentemente formulado em pomadas, loções ou cremes, para o tratamento de problemas de pele, como a dermatite atópica ou a psoríase. Este fármaco, sendo uma molécula lipófila, é um excelente candidato à incorporação em NLC. Em comparação com moléculas menos recentes, a fluticasona tem um menor potencial para causar efeitos secundários sistémicos e a sua degradação forma um produto inactivo, o ácido carboxílico (Spencer e Wiseman, 1997; Doktorovová *et al.*, 2010).

### 3. Nanotoxicologia

A nanotecnologia e as suas aplicações têm vindo a progredir de forma célere, apresentando actualmente uma larga variedade de materiais nanoestruturados úteis em áreas como a indústria farmacêutica, a medicina ou a cosmética (Holsapple *et al.*, 2005; Shegokar *et al.*, 2010). Apesar das propriedades físico-químicas únicas atribuídas às nanopartículas, o seu impacto na saúde humana é ainda bastante imprevisível, podendo eventualmente ocorrer novos efeitos tóxicos. Desta forma, a nanotoxicologia apresenta uma crescente importância no desenvolvimento de veículos nanométricos (Holsapple *et al.*, 2005; Shegokar *et al.*, 2010).

A avaliação da segurança toxicológica da nanotecnologia abrange diversas áreas, tais como a biologia, toxicologia, biologia molecular, bioinformática química, física, ciências dos materiais, engenharia e higiene do trabalho, sendo crucial recorrer à criação de um campo de pesquisa multidisciplinar que as combine (Krug e Wick, 2011).

As partículas de maior preocupação toxicológica correspondem àquelas que possuem tamanho abaixo dos 100 nm, uma vez que estas apresentam grandes diferenças em relação às partículas com tamanho situadas entre os 200 e os 800 nm (FDA - United States Food and Drug Administration, 2011). Quando absorvidas sistemicamente, as partículas nanométricas de maiores dimensões podem ser captadas por macrófagos e exercem actividade dentro do mesmo, mas as partículas abaixo dos 150 nm podem ser captadas por qualquer célula, via pinocitose. A possibilidade das nanopartículas poderem ser captadas por diversos tipos de células do corpo, permite que as partículas sejam capazes de exercer acção sob as mesmas, o que pode aumentar o nível de citotoxicidade (Shegokar *et al.*, 2010).

Na avaliação toxicológica das nanopartículas é necessário considerar factores como a capacidade de entrar nas células através de outros meios de transporte (e.g. pinocitose) e a relação entre a área de superfície em relação ao volume, já que para a mesma quantidade de substância activa absorvida, o organismo entra em contacto com uma quantidade superior de moléculas. Nestes casos a relação dose-efeito não pode ser assumida como sendo a mesma dos veículos tradicionais (Rabinow, 2005).

O tipo de composto químico envolvido e a sua conformação não pode ser ignorado, assim sendo, para assegurar a segurança das formulações é importante investigar o potencial efeito

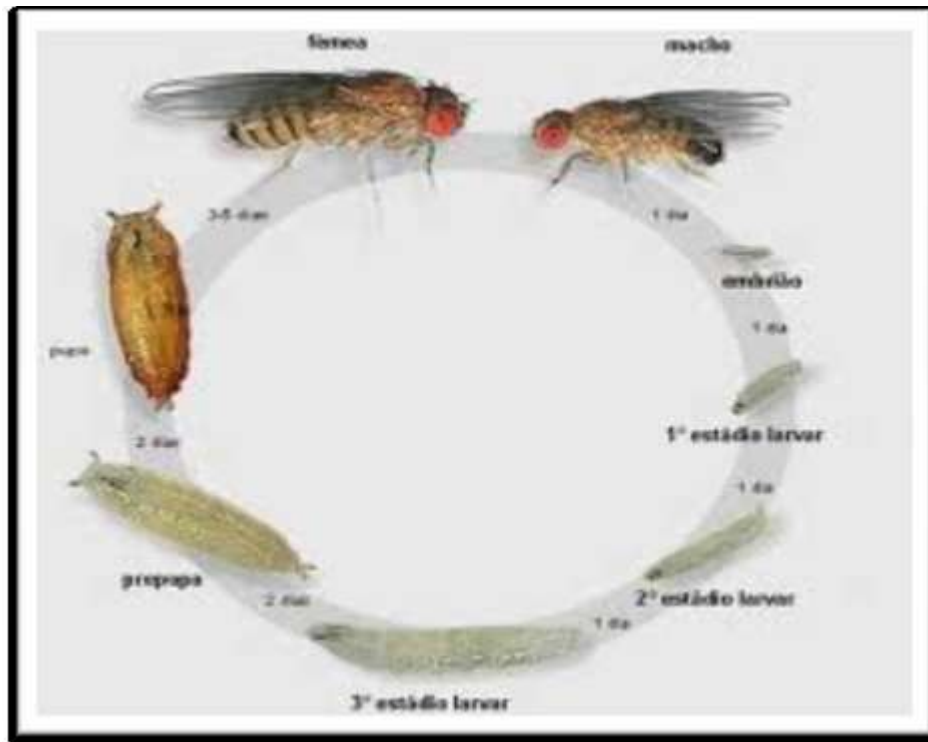
citotóxico das nanopartículas em particular, mesmo quando formuladas com lípidos biodegradáveis (Shegokar *et al.*, 2010; Krug e Wick, 2011).

### 3.1. Testes Genotóxicos

Os testes biológicos que avaliam a toxicidade e genotoxicidade permitem fornecer resultados passíveis de serem aplicados ao homem, directamente extrapoláveis ou não. No caso de não serem directamente extrapoláveis, devem, de qualquer modo, fornecer dados precisos sobre eventuais riscos para o homem. Estes testes devem também ser sensíveis, específicos, precisos, reproduzíveis, adaptáveis a um grande número de situações práticas, rápidos e pouco onerosos (Tweats, 1993; in Gaivão, 1999).

A *Drosophila melanogaster* é um organismo teste muito usado como modelo biológico, salvaguardando preocupações fundamentais para a ciência e a ética, o seu uso é recomendado pelo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), cujo objectivo é reconhecer métodos alternativos que reduzam ou substituam o uso de animais de laboratório (Benford *et al.*, 2000). O género *D. melanogaster* compreende mais de 1700 espécies de moscas com dimensões reduzidas, distribuídas por todas as regiões do mundo (Bächli, 2006), alimentando-se de microrganismos presentes em fungos e de vegetais em decomposição (Carson, 1971). O acentuado dimorfismo sexual no abdómen do adulto é bastante útil na realização de testes genotóxicos, permitindo distinguir facilmente os indivíduos do sexo feminino e masculino.

Em média, o ciclo de vida, representado pela Figura 8, demora cerca de nove dias a completar-se. Este inicia-se com um período embrionário que ocorre no interior do ovo, seguido de três estágios larvais e uma fase curta de pré-pupa. Durante a fase de pupa, e sob influência hormonal, ocorre lise dos tecidos larvais, dando oportunidade aos tecidos adultos para se diferenciarem a partir dos discos imaginais. A partir da pupa emerge finalmente a mosca adulta (Blauth, 2005).



**Figura 8 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* (adaptado de UCM).**

Epilogando as diversas razões que tornam tão útil e vantajoso o uso deste organismo, em estudos genotóxicos, assinala-se o ciclo de vida relativamente curto, cerca de nove dias, com uma temperatura de 24°C até gerar descendência, a elevada reprodutibilidade e a semelhança da sua espermatogénese à dos mamíferos (Blauth, 2005; Gaivão, 1999). Deve também ser referida a excelente caracterização genética das *D. melanogaster* e o facto de possuírem um sistema enzimático microsomal de desintoxicação semelhante ao dos mamíferos (Citocromo P450).

Representando uma poupança, em termos económicos, relativamente a outros sistemas desenvolvidos em mamíferos, os meios de cultura utilizados apresentam baixo custo e rápida preparação, necessitando de pouco espaço para realizar a manutenção, uma vez que é apenas necessária uma câmara climatizada com ciclo de luz. Para finalizar o organismo revela um fácil manuseamento, mesmo tendo que se lidar com centenas de indivíduos (Gaivão, 1999).

## Capítulo II

### Parte I – Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas de propionato de fluticasona para aplicação tópica

#### 1. Materiais e métodos

A via tópica é vantajosa para a administração de corticosteróides, como é o propionato de fluticasona (PF), pois restringe a sua absorção à área da pele afectada, evitando os efeitos secundários resultantes de uma exposição sistémica. A selecção apropriada dos excipientes que compõem uma formulação e do seu método de produção determinam a eficácia do fármaco, garantindo também a qualidade e a segurança do mesmo.

Os materiais, métodos e procedimentos descritos neste capítulo tiveram como propósito o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas lipídicas para aplicação tópica de propionato de fluticasona. Com este objectivo e tomando como base o trabalho em desenvolvimento de uma aluna de investigação, realizou-se um *lipid screening*, avaliando-se a solubilidade do fármaco em dois lípidos líquidos, Cetiol<sup>®</sup> HE e Cetiol<sup>®</sup> LC) e a compatibilidade de alguns lípidos sólidos com o lípido líquido mais adequado (Cetiol<sup>®</sup> HE).

#### 1.1. Lipid Screening

De modo a obter um veículo lipídico nanoestruturado (NLC) avaliou-se a solubilidade do fármaco escolhido, o propionato de fluticasona, em concentrações crescentes em dois lípidos líquidos, o Cetiol<sup>®</sup> HE (PEG-7 glicerilo-cocoato) e o Cetiol<sup>®</sup> LC (cococaprilato/caprato).

O Cetiol<sup>®</sup> HE é um óleo hidrófilo inodoro, de aparência límpida e ligeiramente amarelado. Este óleo é frequentemente utilizado como promotor da solubilidade de óleos essenciais e fármacos (Cognis carechemicals, Cetiol<sup>®</sup> HE).

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

O Cetiol<sup>®</sup> LC é um óleo semi-polar, límpido, de coloração amarelada e ligeiro odor a gordura, tradicionalmente, usado como emoliente (Cognis carechemicals, Cetiol<sup>®</sup> LC).

Para realizar o *lipid screening*, as preparações referidas na Tabela 1 foram realizadas em matrizes rolhados, com ajuda de uma vareta de vidro e colocadas a 100°C, em estufa. Posteriormente, analisou-se visualmente o aspecto obtido relativamente à dispersão do fármaco no líquido após diferentes intervalos de tempo, especificamente ao fim de 15, 30, 45, 60 e 75 minutos.

**Tabela 1** - *Lipid Screening* entre o propionato de fluticasona (PF) e o líquido lípido.

Tubos de ensaio	Concentração	PF	Lípido Líquido
1	0,3 %	0,003 g	Cetiol HE = 1,000 g
2	0,3 %	0,003 g	Cetiol LC = 1,000 g
3	0,5 %	0,005 g	Cetiol HE = 1,000 g
4	1,0 %	0,010 g	Cetiol HE = 1,000 g

No decorrer do teste de *lipid screening*, verificou-se que o Cetiol<sup>®</sup> HE foi o líquido lípido mais adequado para solubilizar o propionato de fluticasona. Posteriormente, prosseguiu-se com o *screening* lipídico, avaliando a compatibilidade entre o líquido lípido seleccionado e alguns lípidos sólidos. Para tal, foram colocados a fundir a 100°C, em estufa, 0,9 g de líquido lípido e 0,1 g de Cetiol<sup>®</sup> HE, analisando-se visualmente a possível formação de uma mistura homogénea imediatamente após a fusão do líquido lípido com o líquido lípido. A estabilidade da mistura foi avaliada após arrefecimento e novamente três dias depois da realização do *screening* lipídico, não devendo ocorrer separação de fases após espatulação.

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Os lípidos sólidos testados na compatibilidade com o Cetiol<sup>®</sup> HE foram os seguintes:

Cutina cP (Vaz Pereira)  
Gelucire 50/13 (Gattefossé)  
Compritol 888 (Gattefossé)  
Precirol ATO 5 (Gattefossé)  
Imwitor 900 (SASOL)  
Imwitor 491 (SASOL)  
Witepsol E75 (SASOL)  
Softisan 100 (SASOL)  
Dynasan 118 (SASOL)  
Álcool Cetílico (Acofarma)  
Acido Esteárico (Vaz Pereira)

### 1.2. Preparação de placebos com álcool cetílico (Formulações A)

A Tabela 2 apresenta a composição das formulações placebo das formulações de SLN e NLC desenvolvidas.

**Tabela 2** - Reagentes usados na preparação das formulações placebo de SLN e NLC.

Reagentes SLN (A <sub>1</sub> )	Reagentes NLC (A <sub>2</sub> )
Álcool cetílico (Guinama <sup>®</sup> ) = 2,0 g	Álcool cetílico (Guinama <sup>®</sup> ) = 1,8 g
Tween 80 = 0,50 g	Cetiol <sup>®</sup> HE = 0,2 g
Ácido cólico (sal de sódio) = 0,04 g	Tween 80 = 0,50 g
Água ultra pura = 17,46 g	Ácido cólico (sal de sódio) = 0,04 g
	Água ultra pura = 17,46 g

A formulação placebo contendo SLN (A<sub>1</sub>) foi desenvolvida com o álcool cetílico como lípido sólido, permitindo verificar a compatibilidade dos agentes tensoactivos óleo/água (ácido cólico e Tween 80) com o lípido sólido.

As NLC (A<sub>2</sub>), cuja composição também está representada na Tabela 2, foram produzidas com o mesmo lípido sólido, o álcool cetílico, e o lípido líquido utilizado foi o Cetiol<sup>®</sup> HE. Analisou-se a compatibilidade de ambos os lípidos com os agentes tensioactivos e a estabilidade da formulação.

### 1.2.1. Procedimento experimental

Ambas as formulações placebo foram preparadas segundo o método da microemulsão a quente descrito por Gasco (1993). O método da microemulsão, já referido no Capítulo I, envolve uma de homogeneização, a uma velocidade elevada, recorrendo-se ao ultra-turrax T25 IKA<sup>®</sup>, da fase lipídica com uma fase aquosa contendo um agente tensioactivo óleo/água.

Durante a preparação das formulações placebo utilizaram-se três goblés devidamente identificados. O goblé I continha a fase lipídica, o álcool cetílico no caso das SLN (A<sub>1</sub>) e a mistura do álcool cetílico com o Cetiol<sup>®</sup> HE no caso da formulação de NLC (A<sub>2</sub>). O goblé II, igual para ambas as formulações (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>), com a fase aquosa, contendo o Tween 80, o ácido cólico e 7,46 g de água ultra pura. O goblé III, também igual para as duas formulações, continha 10,0g de água ultra pura.

Os goblés I e II foram aquecidos à mesma temperatura (60/70°C), aproximadamente 10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido, em placa de aquecimento, permitindo a fusão do lípido sólido. Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica e para o controlo da temperatura utilizou-se um termómetro digital. Após a confirmação da temperatura em ambas as fases, a fase aquosa foi adicionada à fase lipídica e homogeneizadas durante dez minutos a uma velocidade de 8000 rpm utilizando o ultra-turrax T25 IKA<sup>®</sup>. O ultra-turrax foi pré-aquecido, a uma temperatura 10° C acima do ponto de fusão do lípido sólido, para evitar que o choque térmico solidifica-se antes do momento indicado para a recristalização. Deste procedimento, obteve-se uma microemulsão.

Teoricamente, a microemulsão só se transforma numa nanoemulsão aquando da quebra das micropartículas e a recristalização em nanopartículas.

A quebra das micropartículas foi realizada através da diluição com água ultra-pura presente no goblé III, arrefecida durante cinco minutos no congelador. Posteriormente, colocou-se a emulsão no agitador magnético durante 10 minutos para garantir a homogeneidade do tamanho das partículas.

Após a preparação das nanoemulsões, retirou-se uma amostra de 3,0 µl, medidos com uma micropipeta de 5,0 µl, para observação em microscópio óptico. A formulação A<sub>1</sub> foi conservada à temperatura ambiente. Quanto à formulação A<sub>2</sub>, não foi possível a recristalização da formulação devido à descida do ponto de fusão do lípido sólido abaixo da temperatura ambiente. A mistura superarrefecida obtida permaneceu por mais dez minutos no agitador magnético e foi colocada num matraz rolhado no frigorífico, a uma temperatura de 8°C, durante 24 horas de modo a permitir a recristalização.

### 1.3. Preparação de formulações de NLC com Dynasan<sup>®</sup> (Formulações B)

O segundo par de formulações (B) apresenta no seu conteúdo o lípido sólido Dynasan<sup>®</sup> e o lípido líquido Cetiol<sup>®</sup> HE (Tabela 3). As formulações B, placebo e contendo o propionato de fluticasona, foram produzidas devido à fraca estabilidade apresentadas pelas formulações A.

**Tabela 3** - Reagentes usados na preparação de formulações de NLC contendo fármaco (PF).

Reagentes NLC (B <sub>1</sub> ) (100 g placebo)	Reagentes NLC (B <sub>2</sub> ) (100 g de formulação com PF)
Dynasan <sup>®</sup> (SASOL <sup>®</sup> ) = 9,0 g	Dynasan <sup>®</sup> (SASOL <sup>®</sup> ) = 9,0 g
Cetiol <sup>®</sup> HE = 1,0 g	Cetiol <sup>®</sup> HE = 0,988 g
Lutrol <sup>®</sup> F68 (BASF) = 2,50 g	PF a 0,12 mg/ml = 0,0120 g
Água ultra pura = 87,5 g	Lutrol <sup>®</sup> F68 (BASF) = 2,50 g
Etanol absoluto = 4,0 ml	Água ultra pura = 87,5 g
	Etanol absoluto = 4,0 ml

### 1.3.1. Procedimento experimental

As formulações com NLC (B) referidas foram produzidas de modo semelhante ao procedimento descrito anteriormente, ou seja, segundo uma adaptação do método da microemulsão a quente descrito por Gasco (1993).

Para tal, foram utilizados dois goblés devidamente identificados e todas as pesagens efectuadas em balança analítica. O goblé I continha a fase lipídica com o lípido sólido Dynasan<sup>®</sup> e o lípido líquido Cetiol<sup>®</sup> HE. O goblé II continha a fase aquosa, constituída por água ultra-pura e o agente tensioactivo óleo/água, o Lutrol<sup>®</sup> F68 (poloxamer 188), seleccionado como ideal para estabilizar as formulações B, de acordo com os resultados de diversos trabalhos publicados (Kumar *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006; Suresh *et al.*, 2007). No caso das NLC contendo o fármaco (B<sub>2</sub>), o propionato de fluticasona foi previamente dissolvido no lípido líquido em estufa a 100°C. Os goblés I e II foram aquecidos à mesma temperatura (60/70°C), em placa de aquecimento, permitindo a fusão dos lípidos. Após a confirmação, com termómetro digital, que ambas as fases estavam à mesma temperatura, estas foram misturadas e homogeneizadas, a uma velocidade de 8000 rpm, durante vinte minutos, utilizando o ultra turrax T25 IKA<sup>®</sup>. Tal como no procedimento anterior, o ultra turrax foi pré-aquecido 10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido, evitando o choque térmico. A emulsão foi colocada no agitador magnético até que a temperatura descesse abaixo dos 30°C. Este arrefecimento foi controlado com o termómetro. Quando a temperatura da preparação foi inferior aos 30°C, adicionou-se o etanol absoluto que permitiu a quebra das partículas, tal como a água fria utilizada no procedimento anterior.

Durante os 30 minutos posteriores, a formulação permaneceu no agitador magnético para arrefecer até à temperatura ambiente e garantir a homogeneidade do tamanho das partículas. Depois da preparação das formulações, uma amostra de 3,0 µl das preparações foram medidas, usando uma micropipeta de 5,0 µl, para observação em microscópio óptico. As formulações B foram conservadas à temperatura ambiente, em matrizes rolhados.

#### 1.4. Caracterização das partículas

As partículas das formulações A e B foram caracterizadas por espectrofotometria de correlação fotónica (PCS Malvern Zetasizer Nanoseries), realizada a 25°C. As amostras foram previamente diluídas com água ultra-pura para a análise ocorrer num intervalo de concentrações aceitável. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

Os parâmetros avaliados nesta análise foram o diâmetro médio da partícula (*Z-average*) e o índice de polidispersão (*PI*), que representa o grau de homogeneidade do diâmetro das partículas. O *PI* pode variar entre 0, quando todas as partículas da dispersão apresentam aproximadamente o mesmo tamanho, e 1, quando o diâmetro médio das partículas é bastante heterogéneo. A caracterização morfológica das partículas é extremamente importante para confirmar que a formulação preparada se encontra dentro dos parâmetros propostos e para avaliar a estabilidade física da mesma.

#### 1.5. Testes toxicológicos em *Drosophila melanogaster*

As formulações contendo as nanopartículas lipídicas, apesar de serem biocompatíveis e biodegradáveis, devem ser alvo de avaliação toxicológica, de modo a prever alguma citotoxicidade associada aos constituintes da fase aquosa, como os agentes tensioactivos e conservantes (Souto *et al.*, 2008).

Tal como já foi referido anteriormente, a *Drosophila melanogaster* é um organismo teste muito usado como modelo biológico, uma vez que muitos dos mecanismos genéticos demonstrados no homem foram primeiramente descritos neste insecto e, também, pelo facto de todos os seus genes já terem sido mapeados (Panizzi e Parra, 1991). As características da *D. melanogaster*, a abundante morfologia adulta e embrionária, a complexidade fisiológica, o comportamento estereotipado e a variedade de adaptações ecológicas, são igualmente razões que contribuem para a expansão da sua utilização a nível da investigação genética (Molnar *et al.*, 2006).

Outro factor importante é o dimorfismo sexual acentuado no abdómen do adulto. Enquanto as fêmeas apresentam um abdómen de maiores dimensões com uma alternância típica de listas claras e escuras, os machos apresentam a extremidade do abdómen negra devido à coalescência dos segmentos terminais.

No entanto, as diferenças não são claras nos indivíduos recentemente eclodidos da pupa devido à fraca pigmentação (Figura 9).



**Figura 9 – Dimorfismo sexual na *Drosophila melanogaster*:** A fêmea apresenta-se à esquerda, com maiores dimensões e o macho à direita, menor, e com o abdómen escuro (imagem observada e fotografada à lupa).

A toxicidade das formulações B, ou seja, as dispersões de NLC contendo Dynasan<sup>®</sup> como lípido sólido, foi avaliada utilizando a *Drosophila melanogaster*.

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Para a execução dos referidos testes toxicológicos, utilizaram-se os reagentes e o material biológico descritos pela Tabela 4.

**Tabela 4** - Descrição dos materiais, reagentes e material biológico usados nos testes genotóxicos.

Reagentes	Material Biológico
Levedura	<i>Drosophila melanogaster</i>
Açúcar	
Agar-agar	
NaCl (Sal)	
Formulação Placebo e NLC	
Éter sulfúrico	
Dynasan	

### 1.5.1. Preparação do meio de crescimento

Numa panela, dissolveu-se, em placa de aquecimento, 18,0 g de agar-agar em 1000,0 ml de água destilada, mexendo-se lentamente com uma colher de pau. Posteriormente, dissolveu-se na solução 150,0 ml de sacarose. Num goblé, dissolveu-se a frio e separadamente entre 125 a 150 g de fermento de padeiro (alimento da *Drosophila melanogaster*) em 500,0 ml de água destilada, que depois se adicionou lentamente à mistura da panela. Após o ponto de ebulição, mexeu-se a mistura, durante um período de 20 minutos com a colher de pau, para que o agar-agar cozesse bem, sem ocorrer separação de fases. Por fim, retirou-se do lume e adicionou-se 7,5 ml de ácido propiónico, que actua como agente antifúngico. Todas as medidas foram efectuadas utilizando proveta de vidro e para a pesagem foi utilizada uma balança semi-analítica.

### 1.5.2. Preparação dos frascos com as amostras

Para que seja possível construir uma recta de regressão linear e atribuir um significado relativamente à toxicidade da formulação, devem ser testadas várias concentrações de fármaco e placebo em duplicado. A Tabela 5 indica os volumes de cada componente a transferir para cada frasco de vidro de 200,0 ml. Segundo esta tabela, as amostras foram diluídas com água destilada para perfazer um volume final de 5,0 ml, calculando-se a concentração de fármaco presente em cada frasco. Posteriormente, a mistura foi dispersada, agitando-se cuidadosamente, em 25,0 ml de meio de crescimento previamente introduzido no frasco. Os volumes apresentados foram medidos utilizando micropipetas de 10,0; 100,0 e 1000,0  $\mu$ l.

**Tabela 5** - Volumes medidos dos vários constituintes e a concentração do PF.

Volume de amostra (ml)	Volume de água destilada (ml)	Volume de meio de crescimento (ml)	Concentração de PF (mg/ml)
<b>0,0 (Branco)</b>	5,0	25	0,0
<b>1,0</b>	4,0	25	0,024
<b>3,0</b>	2,0	25	0,072
<b>5,0</b>	0,0	25	0,12

Sendo o procedimento, igual para as amostras de placebo e de formulação com fármaco, após a solidificação do meio de crescimento com a amostra nele dispersada, foram adicionados 30 casais de moscas *D. melanogaster* em cada frasco de amostra.

### 1.5.3. Ensaio de genotoxicidade nas moscas adultas

Para conseguir colocar os 30 casais de moscas nos respectivos frascos teste, as *Drosophilas melanogaster* foram imobilizadas através de uma breve anestesia (30 a 40 segundos) com vapores de éter sulfúrico num eterizador. Desta forma é possível colocar as moscas num papel branco para as contar e separar por sexo de acordo com o dimorfismo sexual.

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

Os insectos foram observados com ajuda de uma lupa e manipulados com uma pinça e um pincel guache nº 2 para evitar danos na sua integridade física.

As moscas, *Drosophila melanogaster*, foram depositadas nas paredes dos frascos teste, que permaneceram deitados na bancada até que as moscas recuperassem da anestesia, evitando que estas ficassem coladas ao meio de cultura. Durante o tempo da anestesia dos insectos, os frascos foram devidamente rolhados com algodão cardado e hidrófilo.

As fêmeas dos 30 casais de *D. melanogaster* já se encontravam previamente fecundadas, estando os machos presentes para que estas não sofram alterações comportamentais e não deixem de por os seus ovos. Após uma semana de incubamento à temperatura ambiente, foram retirados os casais de forma a permitir o desenvolvimento da descendência durante a semana seguinte. No final das duas semanas, contou-se a descendência viva gerada, procedendo-se à anestesia, manipulação e contagem de acordo com as especificações referidas anteriormente.

**Parte II – Apresentação e discussão dos resultados obtidos**

**1. Lipid Screening**

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos no *screening* dos dois lípidos líquidos testados no sentido de verificar a compatibilidade com o propionato de fluticasona. De acordo com a Tabela 6, verificou-se que o fármaco é solúvel no líquido Cetiol<sup>®</sup> HE. As concentrações de fármaco para as quais foi possível a sua dissolução no líquido foram de 0,3% e 0,5%, obtendo-se nestes casos uma mistura visualmente homogénea, sem formação de precipitado, mesmo após arrefecimento à temperatura ambiente.

**Tabela 6** – Solubilidade de diversas concentrações do PF nos lípidos líquidos Cetiol<sup>®</sup> LC e Cetiol<sup>®</sup> HE (o [-] figura formação de precipitado e o [+] indica obtenção de mistura homogénea).

Tubos de ensaio	15 Minutos	30 Minutos	45 Minutos	60 Minutos	75 Minutos
<b>Cetiol<sup>®</sup> LC</b> [PF] = 0,3%	-	-	-	-	Não foi testado
<b>Cetiol<sup>®</sup> HE</b> [PF] = 0,3%	-	+	+	+	Não foi testado
<b>Cetiol<sup>®</sup> HE</b> [PF] = 0,5%	-	-	+	+	Não foi testado
<b>Cetiol<sup>®</sup> HE</b> [PF] = 1,0%	-	-	-	-	-

Para analisar a compatibilidade entre os lípidos, a fusão dos lípidos sólidos e líquido deve originar, após solidificação, uma mistura homogénea, com boa adesividade às paredes do tubo de ensaio. Adicionalmente, os lípidos fundidos devem ser suficientemente estáveis para se manterem numa mistura homogénea após espatulação e durante o maior período de tempo possível.

Atendendo às especificações referidas e pela análise da Tabela 7, os lípidos que se revelaram compatíveis com o Cetiol<sup>®</sup> HE foram o Dynasan<sup>®</sup> 118 e o álcool cetílico.

Apesar do álcool cetílico não ter formado uma mistura homogénea com o Cetiol<sup>®</sup> HE aquando da solidificação, após espatulação, a mistura tornou-se homogénea, mantendo-se estável durante os três dias avaliados pelo *screening* de compatibilidade.

**Tabela 7** - Resultados do *screening* de compatibilidade de lípidos (o [-] indica separação de fases, o [+] indica obtenção de mistura homogénea).

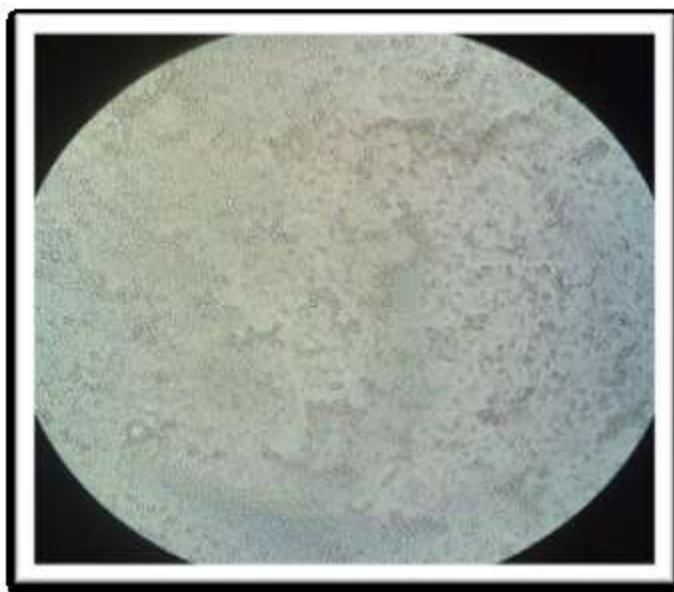
Lípidos sólidos	Imediatamente	Depois de solidificar	Três dias depois
<b>Cutina cP</b>	+	-	-
<b>Gelucire 50/13</b>	+	+	-
<b>Compritol 888</b>	+	-	-
<b>Precirol ATO 5</b>	+	-	-
<b>Imwitor 900</b>	+	+	-
<b>Imwitor 491</b>	+	-	-
<b>Witepsol E75</b>	+	+	-
<b>Softisan 100</b>	+	-	-
<b>Dynasan 118</b>	+	+	+
<b>Álcool Cetílico</b>	+	-	+
<b>Acido Esteárico</b>	+	-	-

## 2. Preparação de SLN e NLC placebo com álcool cetílico (Formulações A)

As Figuras 10 e 11 apresentam respectivamente as formulações placebos de SLN e NLC (Formulações A), contendo álcool cetílico como lípido sólido, formulados pelo método da microemulsão a quente. Estas foram obtidas através da máquina fotográfica digital (Nikon Coolpix 995) acoplada ao microscópio óptico composto, cujo poder de resolução (distância mínima necessária entre dois pontos para que estes possam ser distinguidos) é de 200 nm.

Para a formulação placebo de SLN (A<sub>1</sub>), obtiveram-se partículas aparentemente pequenas e homogéneas mas ligeiramente aglomeradas (Figura 10). A formulação placebo de NLC (A<sub>2</sub>), com o mesmo lípido sólido e Cetiol<sup>®</sup> HE, não originou uma formulação branca de aspecto leitoso como a anterior.

Neste caso não ocorreu a recristalização da formulação, mesmo após 24 horas armazenada a uma temperatura de 8°C, razão pela qual não foram observadas partículas ao microscópio óptico (Figura 11). Uma possível explicação reside no facto do lípido líquido poder ter provocado uma descida do ponto de fusão do lípido sólido abaixo da temperatura ambiente. Está descrito na literatura científica que o uso de lípidos de cadeia média ou de baixo ponto de fusão, como é o caso do álcool cetílico (49°C), origina uma mistura superarrefecida (Wissing *et al.*, 2001; Wissing e Müller, 2002; Souto e Müller, 2008).



**Figura 10 - Formulação placebo de SLN:** imagem observada ao MOC com ampliação de 40x.



**Figura 11 - Formulação placebo de NLC:** Imagem observada ao MOC com ampliação de 40x.

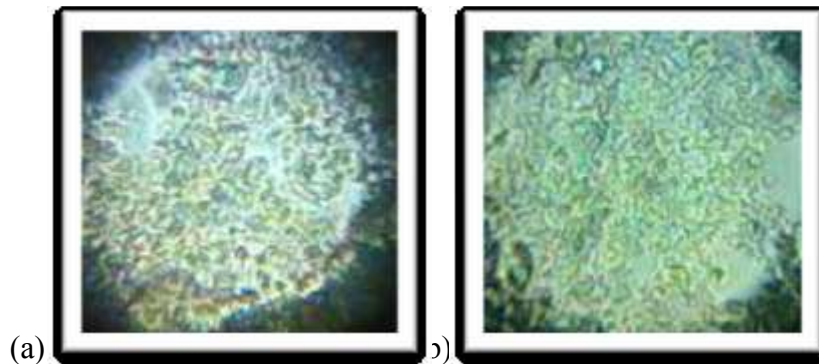
A estabilidade física das formulações A foi avaliada uma semana depois da sua produção por análise visual do aspecto da dispersão. As formulações placebo de nanopartículas lipídicas apresentaram-se perfeitamente estáveis, não ocorrendo separação de fases. No entanto, 15 dias após a sua preparação, as formulações revelaram a sua fraca estabilidade, observando-se duas fases distintas no recipiente de acondicionamento. A falta de estabilidade pode estar relacionada com uma homogeneidade reduzida das partículas obtidas, parâmetro cujos resultados serão oportunamente referidos na caracterização das partículas (Souto *et al.*, 2007).

### **3. Preparação de formulações NLC com Dynasan<sup>®</sup> (Formulações B)**

As formulações A, preparadas com o álcool cetílico, não apresentaram uma estabilidade satisfatória, uma vez que ocorreu separação de fases 15 dias após a sua preparação. Atendendo a estes resultados preliminares, foram desenvolvidas novas formulações de NLC (formulações B) contendo o Dynasan<sup>®</sup>, outro lípido sólido compatível, com o lípido líquido, Cetiol<sup>®</sup> HE. De acordo com os resultados de diversos trabalhos publicados na literatura científica seleccionou-se o poloxamer 188 (Lutrol<sup>®</sup> F68) como agente tensioactivo para estabilizar as formulações B (Kumar *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006; Suresh *et al.*, 2007).

De acordo com a Figura 12 (a), a formulação placebo de NLC (B<sub>1</sub>) apresentou partículas de tamanho pouco homogêneo e bastante aglomeradas, resultando portanto numa formulação mais cremosa. A formulação de NLC contendo propionato de fluticasona (B<sub>2</sub>), representada na Figura 12 (b), revelou a presença de partículas semelhantes, embora aparentemente mais homogêneas, quando observadas ao microscópio óptico.

A Figura 13 apresenta os cristais de propionato de fluticasona, obtidos pela observação de uma gota da solução contendo 0,12 mg/ml de fármaco dissolvido em Cetiol<sup>®</sup> HE. A concentração em fármaco é a mesma presente na formulação de NLC contendo propionato de fluticasona (B<sub>2</sub>). Uma vez que na preparação B<sub>2</sub>, Figura 12 (b), não foram observados ao microscópio óptico cristais de propionato de fluticasona, supostamente o fármaco está incorporado nas partículas lipídicas produzidas. As imagens apresentadas foram também obtidas através da máquina fotográfica digital (Nikon Coolpix 995) acoplada ao microscópio óptico composto.



**Figura 12 - Formulações de NLC:** a) Formulação B<sub>1</sub> b) Formulação B<sub>2</sub> (imagens observadas ao MOC com ampliação de 40x).



**Figura 13 - Cristais do propionato de fluticasona:** imagem observada ao MOC com ampliação de 40x.

A estabilidade das formulações foi avaliada uma semana e quinze dias após preparação e armazenamento em matraz rolhado à temperatura ambiente não se verificando a ocorrência de separação de fases no recipiente de acondicionamento.

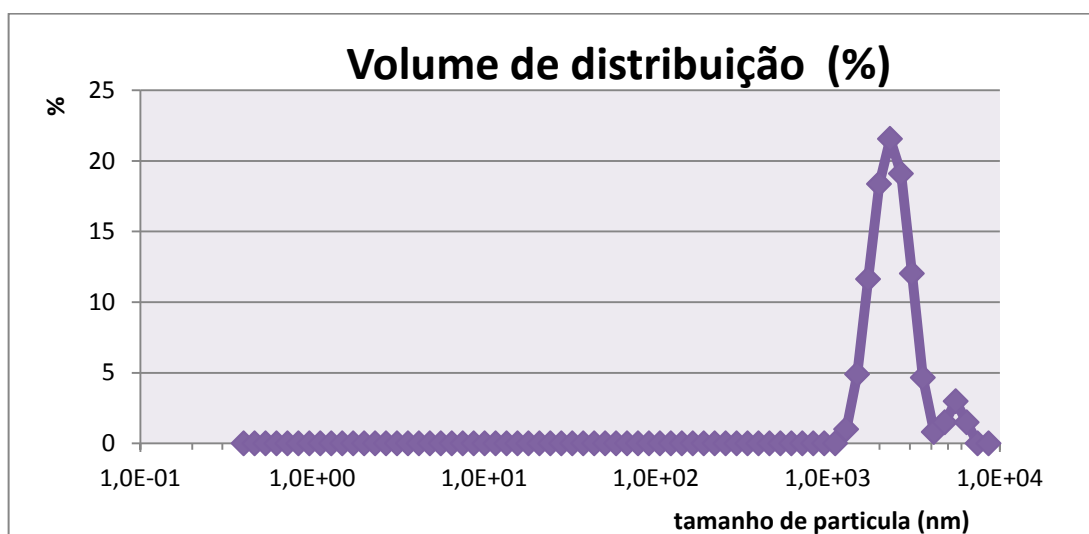
#### **4. Caracterização das partículas**

As formulações preparadas foram sujeitas à caracterização morfológica das partículas através da espectrofotometria de correlação fotônica.

Com os vários constituintes utilizados e com o método de preparação empregue não se conseguiu preparar nanopartículas, uma vez que o tamanho médio das partículas obtido para todas as formulações preparadas foi superior a 1000 nm (Moghuimi *et al.*, 2005). No entanto, pela observação das figuras abaixo apresentadas (Figuras 14, 15, 16 e 17) e pela análise do índice de polidispersão das diferentes formulações, o tamanho das partículas não é homogêneo.

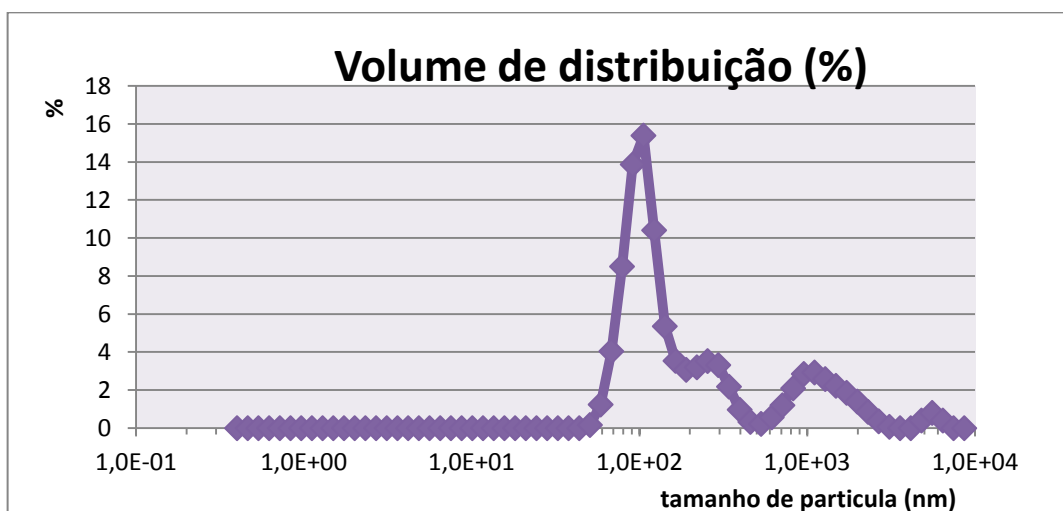
Assim, identificam-se para as formulações A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Figuras 15, 16 e 17) algumas populações contendo partículas de tamanho nanométrico, não sendo possível distinguir se estas representam nanopartículas, microorganismos, sujidade ou algum dos constituintes da formulação.

Em relação às formulações placebo A, contendo o álcool cetílico como lípido sólido, obteve-se um tamanho médio de partícula de 2850 nm e um índice de polidispersão de 0,0314 para a formulação A<sub>1</sub>. Relativamente à formulação A<sub>2</sub>, o tamanho médio das partículas lipídicas obtidas foi de 600,1 nm, apresentando um índice de polidispersão de 0,629. Considerando que o índice de polidispersão pode assumir valores entre 0, quando todas as partículas têm aproximadamente o mesmo tamanho, e 1, quando o diâmetro das partículas medidas é bastante heterogéneo, pode afirmar-se que a formulação A<sub>1</sub>, apesar de apresentar graficamente duas populações de partículas, possui um tamanho de partícula relativamente homogéneo. As Figuras 14 e 15 representam o volume de distribuição das partículas lipídicas de acordo com o respectivo tamanho de partícula das formulações A.



**Figura 14 - Análise por espectrofotometria de correlação fotónica:** formulação placebo de SLN contendo álcool cetílico (A<sub>1</sub>), ao fim de 7 dias de armazenamento à temperatura ambiente.





**Figura 17 - Análise por espectrofotometria de correlação fotônica:** formulação com PF de NLC contendo Dynasan<sup>®</sup> (B<sub>2</sub>), ao fim de 7 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

### 5. Testes toxicológicos em *Drosophila melanogaster*

Analisando os resultados obtidos no ensaio da avaliação da genotoxicidade (Tabela 8), demonstrada pela descendência viva das moscas expostas à formulação placebo de NLC, B<sub>1</sub>, as concentrações testadas não demonstraram toxicidade para a descendência dos casais de *Drosophila melanogaster*.

**Tabela 8 -** Sobrevivência da descendência relativamente à formulação placebo de NLC.

Volume de amostra testado (ml)	Réplica 1 (nº descendência viva)	Réplica 2 (nº descendência viva)	Média (nº descendência viva)
<b>0,0 (Branco)</b>	202	198	200
<b>1,0</b>	134	167	151
<b>3,0</b>	166	201	184
<b>5,0</b>	131	154	143

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

De acordo com a Tabela 8, a média de descendência originada é pouco variável, entre 143 e 200 indivíduos, não se verificando qualquer padrão indicativo de correlação linear entre a descendência viva originada e o volume de amostra testado. Tendo em conta os resultados obtidos e a reduzida dimensão da amostra, não é possível comprovar uma relação directa dose/efeito tóxico para a formulação placebo NLC contendo Dynasan<sup>®</sup>.

Apesar de previstos, uma vez que as formulações testadas foram produzidas com lípidos semelhantes à composição da pele, os resultados permitem também despistar uma eventual citotoxicidade associada à fase aquosa das formulações contendo os agentes tensioactivos.

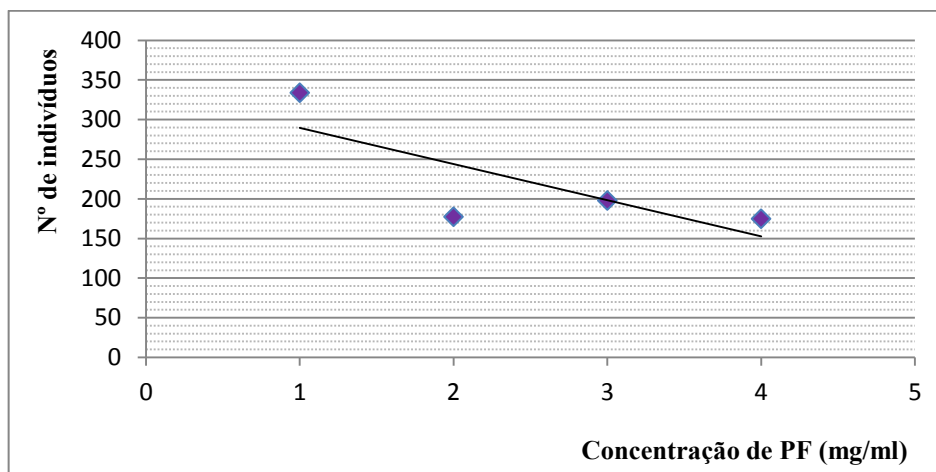
Segundo os resultados demonstrados pela Tabela 9, para a formulação B<sub>2</sub>, contendo o propionato de fluticasona, os valores de descendência são bastante estáveis (143 a 200 indivíduos). No entanto, observou-se uma diminuição média de 151 indivíduos entre o branco (0,0 ml de amostra com 0,0 mg/ml de propionato de fluticasona) e as restantes concentrações utilizadas de fármaco.

**Tabela 9** - Sobrevivência da descendência relativamente à formulação de NLC com PF.

Volume de amostra testado (ml)	Concentração de PF (mg/ml)	Réplica 1 (n° descendência viva)	Réplica 2 (n° descendência viva)	Média (n° descendência viva)
<b>0,0 (Branco)</b>	0,0	329	339	334
<b>1,0</b>	0,024	186	169	177
<b>3,0</b>	0,072	187	209	198
<b>5,0</b>	0,12	177	173	175

A Figura 18 representa o gráfico da dispersão da descendência viva em função da concentração de fármaco para a formulação B<sub>2</sub>. Pela análise do gráfico confirma-se uma possível citotoxicidade da formulação, nas concentrações testadas, para a *Drosophila melanogaster*, pois observa-se uma diminuição do número de indivíduos vivos com o aumento da concentração em propionato de fluticasona. Ao interpretar os resultados obtidos, verifica-se que a presença do propionato de fluticasona está aparentemente associada ao aumento da genotoxicidade, devido à diminuição média de moscas adultas entre o branco e as restantes amostras. De forma a avaliar a genotoxicidade das formulações NLC com maior

rigor científico, seria necessário o recurso a mais amostras, com concentrações mais elevadas e um maior número de réplicas.



**Figura 18 – Gráfico de dispersão da descendência viva em função da concentração de propionato de fluticasona para a formulação de NLC contendo o fármaco (B<sub>2</sub>).**

### Capítulo III

#### Conclusão

Este trabalho visava a produção de um veículo lipídico nanoestruturado (NLC) destinado à aplicação tópica do propionato de fluticasona. Este estudo foi realizado sem êxito, apesar de comprovado que o fármaco é solúvel no líquido utilizado, Cetiol<sup>®</sup> HE, até concentrações de 0,5%.

Os lípidos utilizados no primeiro par de formulações produzidas, o Cetiol<sup>®</sup> HE e o álcool cetílico, foram seleccionados com base nos resultados do *lipid screening* de compatibilidade previamente realizado. Com os métodos e materiais aplicados foi obtida uma mistura superarrefecida, concluindo-se que para preparar os NLC com os lípidos em questão deve realizar-se uma selecção cuidadosa do agente tensioactivo, ajustando de forma adequada a sua concentração.

A reduzida estabilidade alcançada para as formulações placebos contendo SLN e NLC, impulsionou o desenvolvimento de uma nova formulação, contendo como lípido sólido o Dynasan<sup>®</sup>, também compatível com o Cetiol<sup>®</sup> HE. Apesar de ser mais estável, a nova associação de lípidos e tensioactivos resultou numa formulação mais cremosa, sem presença de nanopartículas e contendo diferentes populações de partículas.

Para os volumes de formulações NLC, contendo Dynasan<sup>®</sup>, testados no ensaio de genotoxicidade realizado em *Drosophila melanogaster*, não foi possível estabelecer correlação dose/efeito tóxico entre a formulação placebo de NLC, preparada com o Dynasan<sup>®</sup>, e a descendência de *Drosophila melanogaster* gerada. No entanto, para a formulação contendo fármaco confirma-se a existência de genotoxicidade associada à presença do propionato de fluticasona. Para retirar conclusões com maior rigor científico acerca da genotoxicidade das formulações, deviam ser realizados novos ensaios, utilizando um maior número de amostras, com concentrações mais elevadas e maior número de réplicas.

As nanopartículas lipídicas têm um notável leque de propriedades, demonstrando elevado controlo da penetração de substâncias na pele. Este veículo não aparenta representar um perigo tóxico, podendo ser usadas com segurança em dermofarmácia e cosmética, para

## Vectores Lipídicos para Administração Tópica de Corticosteróides

satisfazer diferentes finalidades. Apesar de tudo, no campo da toxicologia, estes veículos não devem deixar de ser considerados como uma nova classe de materiais.

### Referências bibliográficas

Alderborn, G. (2005). Comprimidos e compressão. In: Aulton, M. E. (Ed.). *Delineamento de formas farmacêuticas*. Artmed, Chapter 27, pp. 403-443.

Almeida, A. J., Souto, E. B. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 478-490.

Anderson, D. M., Dorson, W. A. (2000). *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. Philadelphia, Saunders.

Bächli, G. (2006). Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. [Em linha] Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch/>. [Consultado em 2011-02-10].

Bauer, K. H., Frömmling K. H., Führer C. (1999). *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. 6ª Edição. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2002). *Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso*. Porto Alegre, Artmed Editora.

Benford, D., Hanley, B., Bottrill, K. (2000). Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. *Alternative Laboratory of Animals*, 28, pp. 119-131.

Blauth, M. (2005). *Expressão de elementos transponíveis em Drosophila willistoni*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S., Ponc, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, 42(1), pp. 1-36.

Caron, D., Queille-Roussel, C., Shah, V. P., Schaefer, H. (1990). Correlation between the drug penetration and the blanching effect of topically applied hydrocortisone creams in human beings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 23(3), pp. 458-462.

Carson, H. (1971). *The ecology of Drosophila breeding sites*. Harold Lyon Arboretum Lecture, University of Hawaii, 2, pp.1-28.

Caussin J., Gooris G. S., Janssens M., Bouwstra J. A. (2008). Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramids model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, pp. 1472-1482.

Chapman, S. J., Walsh, A. (1990). Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Archives of Dermatological Research*, 282(5), pp. 304-310.

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. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), pp. 444-453.

Chen, H., Chang, X., Du, D., Liu, W., Liu, J., Weng, T., Yang, Y., Xu, H., Yang, X. (2006). Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *Journal of Controlled Release*, 110(2), pp. 296-306.

Cognis carechemicals, Cetiol HE. *Product Data Sheet*. [Em linha]. Disponível em [www.products.cognis.com/COGNIS/prodleaf.nsf/\(SBU\\_Catalog\)/DEDA834A5E98CB9B41256B4100427614/\\$File/CETIOL\\_r\\_HE\\_E.pdf](http://www.products.cognis.com/COGNIS/prodleaf.nsf/(SBU_Catalog)/DEDA834A5E98CB9B41256B4100427614/$File/CETIOL_r_HE_E.pdf). [Consultado em 2011-09-01].

Cognis carechemicals, Cetiol LC. *Product Data Sheet*. [Em linha]. Disponível em [www.products.cognis.com/cognis/prodleaf.nsf/\(\\$ProductsbyDocID\\_PL-Header\)/REF6E464EF3C10C73C641256B7A002C8D8B/\\$file/CETIOL\\_r\\_LC\\_E.pdf](http://www.products.cognis.com/cognis/prodleaf.nsf/($ProductsbyDocID_PL-Header)/REF6E464EF3C10C73C641256B7A002C8D8B/$file/CETIOL_r_LC_E.pdf). [Consultado em 2011-09-01].

Costa, P., Lobo, J. M. S. (1999). Formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Portuguesa de Farmácia*, 49(4), pp.181-190.

Cross, S. E., Magnusson, B. M., Winckle, G., Anissimov, Y. G., Roberts, M. S. (2003). Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), pp. 759-764.

Das, N. G., Das, S. K. (2003). Controlled-release of oral dosage forms, *Formulation, Fill & Finish, 2003 – a Technology Primer – Supplement to Pharmaceutical Technology*, 27, pp. 10-16 [Em linha]. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/232003/59302/article.pdf>. [Consultado em 2011-07-20].

De Vringer T. (1992). Topical preparation containing a suspension of solid lipid particles, *European Patent No. 91200664*.

Dingler, A., Hildebrand, G., Niehus, H., Müller, R. H. (1998). Cosmetic anti-aging formulation based on vitamin E-loaded solid-lipid nanoparticles. *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, 25, pp. 433-434.

Doktorovová, S., Araújo, J., Garcia, M. L., Rakovsky, E., Souto, E. B. (2010). Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(2), pp. 538-542.

Doktorovová, S., Lopes, C. M., Souto, E. B. (2009). Lipid nanoparticle mediated drug delivery for safer cancer treatment: example of paclitaxel. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 6, pp. 84-93.

Dubes, A., Parrot-Lopez, H., Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H., Shahgaldian, P., Coleman, A. W. (2003). Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(3), pp. 279-282.

Eerdenbrugh, B. V., Stuyven, B., Froyen, L., Van Humbeeck, J., Martens J. A., Augustijns, P., Van den Mooter, G. (2009). Downscaling drug nanosuspension production: processing aspects and physicochemical characterization. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 10(1), pp. 44-53.

Eldem, T., Speiser, P., Hincal, A. (1991). Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy, *Pharmaceutical Research*, 8(1), pp. 47-54.

Frederiksen, H. K., Kristensen, H. G., Pedersen, M. (2003). Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalothrin-incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations. *Journal of Controlled Release*, 86(2-3), pp. 243-252.

Gaivão, I. (1999). Avaliação genotóxica de compostos indutores de espécies reactivas de oxigénio: um estudo em *Drosophila melanogaster*. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Ganta, S., Paxton, J. W., Baguley, B. C., Garg, S. (2009). Formulation and pharmacokinetic evaluation of an asulacrine nanocrystalline suspension for intravenous delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 367, pp. 179-186.

Gasco, M. R. (1993). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. United States Patent 5,250,236.

Gohla, S. H., Gysler, A., Jennings, V., Schäfer-Korting, M. (2000). Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(3), pp. 211-218.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., Benoit, J. P. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research*, 19(6), pp. 875-880.

Holsapple, M. P., Farland, W. H., Landry, T. D., Monteiro-Riviere, N. A., Carter, J. M., Hu, F., Jiang, S., Du, Y., Yuan, H., Ye, Y., Zeng, S. (2006). Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1), pp. 83-89.

Hommos, A., Souto, E. B., Müller, R. H. (2005). Assessment of the release profiles of a perfume incorporated into NLC dispersions in comparison to reference nanoemulsions. *American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition*, pp. 6-10.

Hu, F. Q., Jiang, S. P., Du, Y. Z., Yuan, H., Ye, Y. Q., Zeng, S. (2006). Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1), pp. 83-89.

Hu, F. Q., Yuan, H., Zhang, H. H., Fang, M. (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 (1-2), pp. 121-128.

Ibrahim, S. A., Li, S. K. (2010). Chemical enhancer solubility in human stratum corneum lipids and enhancer mechanism of action on stratum corneum lipid domain. *International Journal of Pharmaceutics*, 383(1-2), pp. 89-98.

Jain, S. K., Chourasia, M. K., Masuriha, R., Soni, V., Jain, A., Jain, N. K., Gupta, Y. (2005). Solid lipid nanoparticles bearing flurbiprofen for transdermal delivery. *Drug Delivery*, 12(4), pp. 207-215.

Jenning, V., Schäfer-Korting, M., Gohla, S. (2000). Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*, 66(2-3), pp. 115-126.

Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X., Kissel, T. (2000). Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Peptides: Is There a Role for Polymers to

affect Mucosal Uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), pp. 147-160.

Kitagawa, S., Yokochi, N., Murooka, N. (1995). pH-dependence of phase transition of the lipid bilayer of liposomes of stratum corneum lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 126(1-2), pp. 49-56.

Krug, H. F., Wick, P. (2011). How safe is nano? Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge, *ScienceDaily*. [Em linha]. Disponível em [www.sciencedaily.com/releases/2011/02/110201132521.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2011/02/110201132521.htm). [Consultado em 05-09-2011].

Kumar, V. V., Chandrasekhar, D., Ramakrishna, S., Kishan, V., Rao, Y. M., Diwan, P. V. (2007). Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 335(1), pp. 167-175.

Kuo, Y. C., Chen, I. C. (2007). Evaluation of surface charge density and surface potential by electrophoretic mobility for solid lipid nanoparticles and human brainmicrovascular endothelial cells. *Journal of Physics and Chemistry B*, 111(38), pp. 11228-11236.

Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), pp. 359-370.

Lin, S., Lin, K., Li, M. (2007). Formulation design of double-layer in the outer shell of dry-coated tablet to modulate lag time and time-controlled dissolution function: studies on micronized ethylcellulose for dosage form design (VII). *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 6(3) [Em linha]. Disponível em <http://www.aapsj.org>. [Consultado em 2011-01-07].

Lippacher, A., Müller, R. H., Mäder, K. (2001). Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 214(1-2), pp. 9-12.

Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H., Yang, X. (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 328(2), pp. 191-195.

Lopes, C. M., Lobo, J. M. S., Costa P. (2005). Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(2), pp. 143-154.

Maia, C.S., Mehnert, W., Schläfer-Korting, M. (2000). Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *International Journal of Pharmaceutics*, 196, pp. 165-167.

Mehnert, W., Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles - production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), pp. 165-196.

Mehnert, W., Müller, R. H., Souto, E. B. (2005). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for dermal delivery. In: Bronaugh, R. L., Maibach, H. I. (Eds.). *Percutaneous Absorption: Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods, 4th Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*. New York, Basel, Hong-Kong, Marcel Dekker, Inc., Chapter 53, pp. 719-738.

Merisko-Liversidge, E. M., Liversidge, G. G. (2008). Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicologic Pathology*, 36(1), pp. 43-48.

Moghuimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(3), pp. 311-330.

Molnar, C., Terriente, A., Celis, J. (2006). Drosophila as a model system for genetic and genomic research. *Recent Research Developments in Entomology*, 5, pp. 69-93.

Müller R. H., Dingler A. (1998). The next generation after the liposomes: solid lipid nanoparticles (SLN™, Lipopearls™) as dermal carriers in cosmetics. *Eurocosmetics*, 7(8), pp. 19-26.

Müller, R. H., Lucks, J. S. (1996). Azneistoffträger aus festen Lipidteilchen – feste Lipid Nanosphären (SLN), European Patent 0605497. Alemanha.

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(1), pp. 161-177.

Müller, R. H., Mehnert, W., Lucks, J. S., Schwarz, C., zur Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C., Rühl, D. (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. H., Petersen, R. D., Hommoss, A., Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), pp. 522-530.

Müller, R. H., Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release*, 81(3), pp. 225-233.

Müller, R. H., Souto, E. B. (2008). Challenging cosmetics: Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC). In: Wiechers, J., Kozlowski, A. (Eds.). *Science and Applications of Skin Delivery Systems*. Allured Publishing, Carol Stream, Chicago, USA, Chapter 13, pp. 227-250.

Müller, R. H., Souto, E. B., Göppert, T., Gohla, S. (2005) Production of biofunctionalized SLN for site-specific drug delivery. In: Kumar, C. (Ed.). *Nanotechnologies for Life Sciences*, Volume 2, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Chapter 10, pp. 287-303.

Panizzi, A., Parra, J. (1991). Ecologia nutricional de insectos e as suas implicações no manejo de pragas. São Paulo, Editora Manole.

Pappinen, S., Hermansson, M., Kuntsche, J., Somerharju, P., Wertz, P., Urtti, A., Suhonen, M. (2007). Comparison of rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) with intact human skin: Lipid composition and thermal phase behavior of the stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1778(4), pp. 824-834.

Pardeike, J., Hommoss, A., Muller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), pp. 170-184.

Pople, P. V., Singh, K. K. (2006). Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 7(4), Article 91.

Prow, T. W., Grice, J. E., Lin L. L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., Wurm, E. M. T., Yoong, C., Robertson, T. A., Soyer, H. P., Roberts, M. S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), pp. 470-491.

Rabinow, B. (2005). Pharmacokinetics of drugs administered in nanosuspension. *Discovery Medicine*, 5(25), pp. 74-79.

Quitánar-Guerrero, D., Tamayao-Esquivel, D., Gamen-Quintamar, A., Allémann, E., Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanopheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), pp. 211-218.

Sakata, S., Uchida, K., Kaetsu, I., Kita, Y. (2007). Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(4), pp. 733-737.

Saupe, A., Wissing, S. A., Müller, R. H. (2003). Increasing the protection effect of titanium dioxide by incorporation in solid lipid nanoparticles (SLN), *American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition*.

Shegokar, R., Müller, R. H. (2010). Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *International Journal of Pharmaceutics* 399(1-2), pp. 129-139.

Sivaramakrishnan, R., Nakamura, C., Mehnert, W., Korting, H. C., Kramer, K. D., Schäfer-Korting, M. (2004). Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - characterization by pectroscopy and influence on dermal uptake. *Journal of Controlled Release*, 97(3), pp. 493-502.

Sjöström, B., 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(2), pp. 53-62.

Spencer, C. M., Wiseman, L. R. (1997). Topical fluticasone propionate: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of dermatological disorders. *BioDrugs*, 7(4), pp. 318-334.

Souto, E. B., Almeida, A. J., Müller, R. H. (2007). Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and Skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, pp. 317-331.

Souto, E. B., Müller, R. H. (2007). Lipid nanoparticles (solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) for cosmetic, dermal and transdermal applications. In: Thassu, D., Deleers, M., Pathak, Y. (Eds.) *Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Trends and Emerging Technologies*. CRC Press, Berlin, Chapter 14, pp. 213-233.

Souto, E. B., Müller, R. H. (2008). Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®). *International Journal of Cosmetic Science*, 30(1), pp. 157-165.

Souto, E. B., Petersen, R. D., Müller, R. H. (2008). Lipid nanoparticles with solid matrix for dermal delivery. In: Rathbone, M.J., Hadgraft, J., Roberts, M.S., Lane, M (Eds.). *Modified Release Drug Delivery Technology*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong-Kong, Chapter 27, pp. 357-379.

Suresh, G., Manjunath, K., Venkateswarlu, V., Satyanarayana, V. (2007). Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, PharmSciTech*, 8, pp. 24.

Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E. B., Müller, R. H., Junyaprasert, V. B. (2008). Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*, 128(2), pp. 134-141.

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), pp. 153-160.

UCM – Universidad Complutense de Madrid. [Em linha]. Disponível em <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>. Consultado em [2011-03-26].

FDA. United States Food and Drug Administration Homepage. [Em linha]. Disponível em <http://www.fda.gov/default.htm>. [Consultado em 14-05-2011].

Yang, S. C. e Zhu, J. B. (2002). Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(3), pp. 265-274.

Warner, K. S., Li, S. K., He, N., Suhonen, T. M., Chantasart, D., Bolikal, D., Higuchi, W. I. (2003). Structure – activity relationship for chemical skin permeation enhancers: probing the chemical microenvironment of the site of action *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(6), pp. 1305-1322.

Wanga, M., Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62(2), pp. 90-99.

Wiedersberg, S., Leopold, C. S., Guy, R. H. (2008). Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), pp. 453-466.

Wissing, S., A., Kayser, O., Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), pp. 1257-1272.

Wissing, S. A., Lippacher, A., Müller, R. H. (2001). Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Cosmetic Science*, 52, pp. 313-324.

Wissing, S. A., Mäder, K., Müller, R. H. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN®) as a novel carrier system offering prolonged release of the perfume Allure (Chanel), *International Symposium Control Release*, 27, pp. 311-312.

Wissing, S. A., Müller, R. H. (2001). Solid lipid nanoparticles (SLN) - a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie*, 56(10), pp. 783-786.

Wissing, S. A., Müller, R. H. (2002). *In vitro* and *in vivo* skin permeation of sunscreens from solid lipid nanoparticles (SLN™), supercooled melts and emulsions. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Meeting*, Florence, pp. 1135-1136.

Villalobos-Hernandez, J. R., Muller-Goymann, C. C. (2005). Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(1), pp. 113-122.

Xiang, Q. Y., Wang, M. T., Chen, F., Gong, T., Jian, Y. L., Zhang, Z. R., Huang, Y. (2007). Lung targeting delivery of dexamethasone acetate loaded solid lipid nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 30, pp. 519-525.

Xia, Q., Saupe, A., Müller, R. H., Souto, E. B. (2007). Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(6), pp. 473-482.

Zhang, Q., Wang, X., Dai, J., Chen, Z., Zhang, T., Xia, G., Nagai, T. (2004). Bioavailability and Pharmacokinetics of Cyclosporine A-loaded pH-sensitive Nanoparticles for Oral Administration. *Journal of Controlled Release*, 97(3), pp. 421-429.