

Dany Michel Taveira Alves

**Nanocápsulas Obtidas por Automontagem Eletrostática como Sistemas de Libertação
Controlada de Fármacos**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Dany Michel Taveira Alves

**Nanocápsulas Obtidas por Automontagem Eletrostática como Sistemas de Libertação
Controlada de Fármacos**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

**Nanocápsulas Obtidas por Automontagem Eletrostática como Sistemas de Liberação
Controlada de Fármacos**

Orientador: Professor Doutor Sérgio Barreira

Autor: Dany Michel Taveira Alves

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

Resumo

As formas farmacêuticas convencionais possuem inconvenientes que incluem baixa biodisponibilidade, baixa estabilidade *in vivo*, baixa solubilidade e absorção intestinal, dificuldades na entrega sustentada e direcionada para o local de ação, fraca eficácia terapêutica, efeitos laterais, e causam flutuações na concentração plasmática que, por via disso, ou fica abaixo da mínima eficaz, ou excede a terapêutica segura. A nanotecnologia surge como uma abordagem alternativa para superar estes desafios, através do desenvolvimento e fabrico de nanoestruturas que podem vir a funcionar como as formas farmacêuticas do futuro.

Desde a última década do século XX, vários grupos investigam cápsulas transportadoras obtidas por automontagem de polieletrólitos. Essas cápsulas de dimensão nanométrica são fabricadas pela técnica de deposição camada a camada de polieletrólitos com base em interações eletrostáticas sobre um molde esférico que é subsequentemente removido. São extremamente versáteis na sua construção podendo incorporar moléculas para interagirem com recetores celulares específicos por forma a atuarem somente no local alvo. O seu carregamento com a molécula de interesse é facilmente levado a cabo e a libertação do fármaco pode também ser facilmente modulada por diversos estímulos químicos, físicos e biológicos. Estas nanocápsulas têm também a vantagem de possuírem alta eficiência de encapsulação do fármaco, baixo teor de excipiente em comparação com as formas farmacêuticas convencionais, proteção da substância incorporada através do invólucro polimérico contra fatores de degradação tais como pH e luz, e a redução da irritação dos tecidos vivos, também devido ao invólucro polimérico. Em suma as nanocápsulas obtidas por montagem camada a camada com base em interações eletrostáticas parecem reunir todas as características necessárias para resolver dois grandes problemas de uma forma farmacêutica: entregar o agente terapêutico num local específico, durante um período de tempo também específico.

Já foram desenvolvidos estudos para utilização de nanocápsulas obtidas por automontagem com base em interações eletrostáticas para os mais variados tipos de substâncias ativas e das mais diversas classes, desde anti-inflamatórios a antineoplásicos, passando por antidiabéticos e ADN. Estes estudos já realizados

parecem indicar que a utilização das nanocápsulas para liberação controlada de substâncias ativas pode oferecer inúmeras vantagens em relação às formas de dosagem convencionais, uma vez que podem aumentar a atividade terapêutica dos fármacos e, ao mesmo tempo, diminuir os seus efeitos secundários, reduzindo assim o número de doses necessárias durante o tratamento.

Antevê-se assim, que estes novos métodos de liberação de fármacos possam permitir às empresas farmacêuticas reformular medicamentos existentes no mercado, alargando assim a vida dos produtos, melhorando o seu desempenho, aceitabilidade, aumentando a eficácia, bem como a segurança e aderência do paciente e, conseqüentemente reduzir os custos dos cuidados de saúde. Podem ainda ser de grande utilidade no tratamento de doenças crônicas como o cancro, SIDA e a diabetes.

Palavras-chave: camada por camada, nanocápsulas, entrega de fármacos, liberação controlada, nanotecnologia.

Abstract

Conventional dosage forms have several drawbacks including low bioavailability, low *in vivo* stability, poor solubility and intestinal absorption difficulties in sustained and targeted delivery to the site of action, weak therapeutic efficacy, side effects, and cause fluctuations in the plasma concentration that, make it fall below the minimum effective, or exceed the safe therapeutic level. Nanotechnology appears as a promising approach to overcome these challenges through the development and manufacture of nanostructures that may function as dosage forms of the future.

Since the last decade of the twentieth century, several research groups focused their efforts to the development of capsule carriers obtained by self-assembly of polyelectrolytes. These nanoscale capsules are manufactured by the technique layer-by-layer deposition of polyelectrolytes based on electrostatic interactions over a spherical template, which is subsequently removed. They are extremely versatile in its construction and may incorporate molecules to interact with specific cellular receptors in order to act only at the target site. The loading with the molecule of interest is easily carried out and the drug release can also be easily modulated by different biological, chemical and physical stimuli. These nanocapsules have also the advantage of having high drug encapsulation efficiency, low content of excipient, compared to the conventional pharmaceutical forms, protecting the incorporated substance through the polymeric shell against degradative factors such as pH and light, and reduced irritation of living tissues, also due to the polymeric shell. In short, nanocapsules obtained by assembling layer by layer based on electrostatic interactions seem to meet all the necessary features to solve two major issues in a pharmaceutical form: to deliver the therapeutic agent at a specific location and for a specific period of time.

Studies have been developed in order to assess the use of nanocapsules obtained by self-assembly based on electrostatic interactions as carriers for various sorts of active substances and of different therapeutic classes, including, for example, anti-inflammatory, anticancer, antidiabetic and DNA. These studies seem to indicate that the use of nanocapsules for the controlled release of active substances may offer numerous advantages over conventional dosage forms, since they can increase the therapeutic

activity of the drugs decreasing, at the same time their side effects, thereby reducing the number of doses needed during treatment.

So it is predictable that these new methods of drug delivery can enable pharmaceutical companies to reformulate existing drugs on the market, thus extending the life of products, improving their performance, acceptability, increasing the effectiveness and safety and adherence patients and consequently reduce the costs of health care. They may also be useful in the treatment of chronic diseases like cancer, AIDS and diabetes.

Keywords: Layer-by-layer, nanocapsules, drug delivery, controlled release, nanotechnology.

Dedicatórias

Aos meus pais, José da Glória Alves e Maria Ondina Taveira Alves, e à minha irmã, Patricia Taveira Alves, por todo o apoio, amor e carinho que me transmitiram ao longo destes anos.

Agradecimentos

Queria começar por agradecer ao Professor Sérgio Barreira com quem tive o orgulho e privilégio de colaborar, agradeço todos os estímulos e desafios que me incutiu, assim como toda a disponibilidade e atenção que me prestou. Foi sem dúvida a pessoa que mais diretamente contribuiu para a realização deste trabalho, e que fez com que elevasse os meus conhecimentos científicos, mas acima de tudo, fez com que chegasse ao fim desta etapa com um enorme sentimento de satisfação.

Aos meus amigos, por todos os grandiosos momentos bem passados, toda a ajuda que me prestaram ao longo destes anos e por todo o apoio que me transmitiram.

À Bonnie, que apesar de contribuir de forma indireta me ajuda bastante nos momentos de maior stress através da sua constante boa disposição.

À Andreia, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos.

E por fim, e mais importante de tudo, à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, um enorme obrigado por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o amor, carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

A todos vocês, o meu mais sincero muito obrigado!

Índice Geral

Resumo	I
Abstract	III
Dedicatórias.....	V
Agradecimentos	VI
Índice de Figuras	IX
Índice de Quadros.....	XII
Índice de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIV
I. Introdução.....	1
1. Estrutura e organização da tese.....	3
II. A técnica da automontagem camada-a-camada (Layer-by-layer).....	4
1. Perspetiva histórica	4
2. Materiais de revestimento e substratos	7
<i>i. Polieletrólitos</i>	<i>7</i>
<i>ii. Substratos</i>	<i>9</i>
3. Propriedades mecânicas estruturais dos filmes obtidos por LbL.....	10
<i>i. Influência do pH.....</i>	<i>11</i>
<i>ii. Influência da força iónica</i>	<i>13</i>
<i>iii. Indução da formação de ligações covalentes</i>	<i>14</i>
III. A adsorção em superfícies esféricas com vista à produção de nanocápsulas por automontagem com base em interações eletrostáticas	18
1. Fabrico de micro e nanocápsulas usando LbL.....	20
2. Métodos de Encapsulamento	26
3. Processo de Liberação da cápsula.....	28
<i>i. Estímulos que afetam a permeabilidade das cápsulas.....</i>	<i>29</i>

IV. Utilização das nanocápsulas para a liberação controlada de fármacos.....	32
V. Comparação das nanocápsulas obtidas por automontagem eletrostática com nanocápsulas produzidas por outros métodos	43
VI. Outros tipos de nanoestruturas estudadas com vista a servirem de veículo para fármacos	46
VII. Desafios colocados às nanoestruturas como sistemas de entrega de fármacos	51
VIII. Conclusão	56
IX. Bibliografia	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Ilustração esquemática da adsorção alternada das espécies de polieletrólitos para produzir uma estrutura de múltiplas camadas. (A) imersão na solução de poliacrilato; (B) imersão num solvente de lavagem; (C) imersão na solução de polianilina; (D) imersão num solvente de lavagem para o polianilina; (E) O processo é repetido n vezes para produzir um filme de n camadas; (adaptada de De Villiers <i>et al.</i> , 2011)	6
Figura 2 - Esquema da deposição de camadas LbL por pulverização (adaptada de Bruening and Dotzauer, 2009).....	6
Figura 3 - Ilustração esquemática dos vários modelos que podem ser utilizados como substratos, assim como as nanoestruturas que se podem obter através da técnica LbL (adaptada de Wang <i>et al.</i> , 2007)	9
Figura 4 - Fórmulas da estrutura dos carregenanos (Λ , κ e ρ)	10
Figura 5 - Representação dos resultados do módulo de elasticidade E em função do pH das soluções de montagem com polianilina PAA (preto) e poliacrilato PAH (cinza) (adaptada de Thompson <i>et al.</i> , 2005)	12
Figura 6 - Variação do Módulo de Young de cápsulas de polieletrólito em função do aumento da concentração de sal, onde os quadrados indicam uma espessura constante, e os losangos a conservação do volume do material na parede (adaptada de Heuvingh <i>et al.</i> , 2005).....	13
Figura 7 - Medição por perfilometria da mudança de espessura de filmes conforme a intensidade de ligação cruzada. A espessura do filme sem modificação diminui rapidamente após a introdução em tampão fosfato salino, enquanto os filmes com ligações cruzadas sofrem uma diminuição mais lenta (adaptada de Kim <i>et al.</i> , 2009a). 14	14
Figura 8 - Módulo de Young E_0 determinado pela técnica nanoindentação MFA para várias concentrações de EDC até 100 mg mL^{-1} (adaptada de Boudou <i>et al.</i> , 2010).	15
Figura 9 - Estrutura química da benzofenona.....	16
Figura 10 - Variação do módulo de elasticidade em relação ao grau de enxertia x dos derivados de HA-xVB utilizados na construção dos filmes (adaptada de Pozos Vázquez <i>et al.</i> , 2009).....	17

Figura 11 - Ilustração de procedimentos para a preparação de esferas ocas inorgânicas e híbridas para as partículas de látex PS (adaptada de Caruso et al., 1998).....	19
Figura 12 - Obtenção de cápsulas pelo método LbL (adaptada de Wohl and Engbersen, 2012).....	20
Figura 13 - Caracterização das cápsulas de polieletrólito através de MEV e MCVL. (A) imagem MEV de partículas MF originais, sem revestimentos de polieletrólito. (B) partículas de MF cobertas (gelatina / PDDA) ₅ . (C) partículas de MF cobertas com [(gelatina / PDDA) ₅ + (nanopartículas-YG/PDDA)]. (D) Imagem ampliada de MEV da cápsula individual da imagem C. (E) Imagem de MEV de cápsulas vazias após decomposição dos núcleos MF. (F) Imagem de MCVL de cápsulas ocas dispersas em tampão PBS (adaptada de Ai <i>et al.</i> , 2005).....	21
Figura 14 - Encapsulamento de ADN em microcápsulas LbL (adaptada de Ariga <i>et al.</i> , 2011).....	23
Figura 15 - Ilustração esquemática da automontagem de cápsulas de polieletrólito com várias funcionalidades: I) automontagem LbL de polieletrólitos em modelos híbridos; II) decomposição molde; III) purificação da matriz polimérica contida nas cápsulas de polieletrólitos; IV) carregamento dos agentes terapêuticos nas cápsulas; V) adição de várias funções conforme o desejado (adaptada de Ai, 2011)	24
Figura 16 - Esquema para a obtenção de cápsulas de polieletrólitos revestidas por lípidos e adição de partículas com função de vírus (adaptada de Tong and Gao, 2008).25	
Figura 17 - Funcionalização do anticorpo monoclonal A33 e uma azida com um ligante NHS-PEG2000-Az e posterior funcionalização da cápsula (adaptada de Kamphuis <i>et al.</i> , 2010).....	26
Figura 18 - Métodos de encapsulação da carga dentro de cápsulas LbL. a) Utilização da carga como um constituinte da parede da cápsula. b) Pré-carregamento com a carga antes da formação da cápsula. c) Pós-carregamento por alteração da permeabilidade da cápsula e aprisionando da carga no seu interior (adaptada de Becker <i>et al.</i> , 2010)	28
Figura 19 - Ilustração esquemática de estímulos que podem afetar a permeabilidade das cápsulas (adaptada de Delcea <i>et al.</i> , 2011).....	29
Figura 20 - Abertura através de um estímulo eletromagnético de cápsulas carregadas com FITC (Isotiocianato de fluoresceína)-dextrano e multicamadas de	

(PSS/PAH) ₃ (PSS/AuNRs)(PAH/PSS) ₂ . a) Representação esquemática; b) efeito de irradiação com laser infravermelho (830 nm); (adaptada de Loretta <i>et al.</i> , 2010).....	31
Figura 21 - Esquema do efeito da concentração dos fármacos no organismo quando utilizam diferentes métodos de administração (adaptada de Coelho <i>et al.</i> , 2010).	32
Figura 22 - Ilustração esquemática da preparação de cápsulas ocas biodegradáveis e do sistema de liberação do fármaco encapsulado através de degradação enzimática (adaptada de Itoh <i>et al.</i> , 2006)	35
Figura 23 - Fórmula de estrutura da rifampicina.....	36
Figura 24 - Fórmula de estrutura da artemisinina	37
Figura 25 - Fórmula de estrutura da doxorubicina.....	37
Figura 26 - Ilustração esquemática do processo LbL de cápsulas multicamadas de polieletrólitos PAH/PSS, carregamento com doxorubicina e liberação <i>in vitro</i> com aplicação de um campo magnético de alta frequência (adaptada de Liu <i>et al.</i> , 2010) ...	38
Figura 27 - (A) Imagem confocal de nanocápsulas CS-HP carregadas com doxorubicina mostra as nanocápsulas localizados na membrana celular como pontos após 1 hora. (B) imagem confocal de doxorubicina livre de 1 hora depois mostra que ela foi distribuída uniformemente (adaptada de Thomas <i>et al.</i> , 2013).....	39
Figura 28 - (A) Ensaio de MTT para avaliação citotóxica em células MCF-7, onde o efeito de citotoxicidade de diferentes concentrações de cápsulas vazias (CS-HP livre), carregadas com doxorubicina (CS-HP-DOX) e doxorubicina na forma livre foram medidas. (B) Estudos de biodistribuição feitos por injeção de uma dose única de 10 mg/kg de doxorubicina sob a forma livre (DOX) e encapsulada (CS-HP-DOX), onde o soro foi coletado em diferentes períodos de tempo e medida a concentração de doxorubicina (adaptada de Thomas <i>et al.</i> , 2013)	39
Figura 29 - Tendências de seleção do método de produção das nanocápsulas (adaptada de Mora-Huertas <i>et al.</i> , 2010).....	45
Figura 30 - Ilustração esquemática de algumas nanoestruturas A) nanopartículas poliméricas esféricas; B) lipossomas; C) nanopartículas lipídicas sólidas; D) nanoemulsões; E) nanocápsulas; F) nanotubos de carbono; G) dendrímero; H) micela polimérica; (adaptada de Ochekepe <i>et al.</i> , 2009b)	46

Índice de Quadros

Quadro 1 - Estrutura molecular de alguns dos polieletrólitos sintéticos mais utilizados na produção de PEM's. 7

Quadro 2 - Estrutura molecular de alguns dos polieletrólitos naturais mais utilizados na produção de PEM's. 8

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo de fármacos já estudados com vista a serem veiculados através de nanocápsulas obtidas por LbL	40
Tabela 2 - Análise comparativa de alguns métodos utilizados para produção de nanocápsulas para utilização na liberação controlada de fármacos tendo em conta estudos feitos e informações sobre nanoencapsulação disponíveis em bases de dados. A maior parte destas pesquisas foram feitas em escala laboratorial (adaptada de Mora-Huertas <i>et al.</i> , 2010).....	43
Tabela 3 - Sistemas nano de administração de fármacos no mercado (adaptada de Ochekpe <i>et al.</i> , 2009b).....	51

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ι - Iota

λ – Lambda

min - minutos

nm – nanómetros

μm – micrómetro

ADN – ácido desoxirribonucleico

ALG – alginato de sódio

ART – artemisinina

ASGPR – receptor asialoglicoproteína

AuNRs – nanobarras de ouro

CaCo-2 – células de adenocarcinoma colorretal epitelial humano

CMC – carboximetilcelulose

CS – quitosano

Cu (I) – cobre (I)

DEX – dextrano

DMPA – ácido fosfatídico L-alfa-dimiristoílo

DOX - doxorrubicina

DS – sulfato de dextrano

E – módulo de elasticidade

EDC - [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida]

EDTA – ácido etilendiaminotetracético

EMA - *European Medicines Agency*, Agência Europeia de Medicamentos

FDA - *Food and Drug Administration*

Fe₃O₄ – óxido de ferro

FITC - isotiocianato de fluoresceína

GPa – GigaPascal

HA - ácido hialurónico

HepG2 – células tumorais derivadas do tecido do fígado

HF – ácido fluorídrico

HSA – albumina de soro humano

ISO/TC 229 – Comité Técnico 229 da Organização Internacional de Normalização

LB - Langmuir-Blodgett

LbL – Layer-by-layer

mAb huA33 - anticorpo monoclonal A33

MCF-7 – células do cancro da mama

MCVL - Microscópio Confocal de Varrimento a Laser

MEV - Microscópio Eletrónico de Varrimento

MF – melamina formaldeído

MFA – Microscopia de Força Atómica

MnCO₃ – carbonato de magnésio

MPa –MegaPascal

MS – sílica mesoporosa

MTT – método colorimétrico

NaCl – cloreto de sódio

NLCs – transportadores lipídicos nanoestruturados

NP – nanopartículas ouro

PA - poli (L-arginina)

PAA - poli (ácido acrílico)

PAArVBA – poli (ácido acrílico-ran-vinilbenzilacrilato)

PAH - poli (cloridrato de alilamina)

PBS – tampão fosfato-salino

PDADMAC - poli (cloreto de dialildimetilamônio)

PDDA - poli (dialildimetilamônio)

PEI - poli (etilenimina)

PEM's - *polyelectrolyte multilayers*

PG - poli [β -ácido glucurônico-(1-3)-N-acetil- β -galactosamina-6-sulfato (1-4)]

PGA – poli (ácido L-glutâmico)

PGEDMC – poli (cloreto de vinil galactose éster-co-metacriloxietil trimetilamônio)

PLA - poli (ácido láctico)

PLL - poli (L-lisina)

PMLA - poli (ácido alfa- β -L-málico)

PMA – poli (ácido metacrílico)

PNIPAM - poli (N-isopropil acrilamida)

PS – poliestireno

PSS - poli (estirenosulfonato)

PTX - paclitaxel

PVP – poli (vinilpirrolidona)

PVPON - poli (N-vinilpirrolidona)

PVPONAlk - poli (N-vinilpirrolidona) funcionalizado com alquinos

PVS - poli (vinil sulfato)

RM – ressonância magnética

RPL's - *rubella-like particles*

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SiO₂ – dióxido de silício

SH – cisteína

SLN – nanopartículas lipídicas sólidas

T_f – temperatura de fusão

Tg – temperatura de transição vítrea

UV – ultravioleta

VB – vinil-benzil

WSC – quitosano solúvel em água

YG- Fluoresbrite® marcador fluorescente

I. Introdução

O presente trabalho submetido como tese de conclusão de ciclo para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, teve como objetivo apresentar o estado da arte no que se refere à produção e utilização de nanocápsulas obtidas por automontagem eletrostática como sistemas de liberação controlada de fármacos. Como se poderá verificar pela leitura do mesmo, a produção de sistemas manoscópicos para liberação controlada de fármacos é uma área recente e de extrema importância no dias que correm nas áreas farmacêutica e médica, uma vez que se supõe vir a permitir ultrapassar barreiras e limitações impostas a certos fármacos, tanto na sua formulação, com durante o seu transporte e liberação no organismo, aspeto essencial no tratamento de algumas doenças que têm um grande impacto negativo na nossa sociedade, principalmente doenças oncológicas.

Os desenvolvimentos recentes na indústria farmacêutica levaram à descoberta de novos fármacos que visam doenças específicas, desordens genéticas e crónicas (Branco and Schneider, 2009). Devido às limitações de biodisponibilidade e formulação, associadas com as formas farmacêuticas convencionais, houve a necessidade de desenvolver novas técnicas, e/ou melhorar as já existentes, para formular e os libertar no organismo, em locais específicos e em doses desejáveis, maximizando a sua biodisponibilidade e diminuindo o risco de reações adversas inesperadas (Branco and Schneider, 2009, Habibi *et al.*, 2011, Johnston *et al.*, 2006).

Os avanços na nanotecnologia poderão vir a representar um avanço enorme neste campo, proporcionando uma via com grande potencial para o desenvolvimento de novos materiais com precisão molecular, que permitem fabricar dispositivos de liberação de fármacos em nanoescala que integram o reconhecimento molecular e entrega num local específico (Labouta and Schneider, 2010). Estes novos materiais têm geralmente tamanhos que variam entre 5-10 nm, podendo ir até um máximo de aproximadamente 1000 nm, apesar da escala normalmente obtida ser entre 100-500 nm (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Estes sistemas à escala nanométrica mostram-se promissores como vetores ativos, devido à sua capacidade de transportar, proteger e libertar fármacos, a sua dimensão subcelular permitir uma carga relativamente mais elevada do que outros sistemas, poderem melhorar a estabilidade das substâncias ativas, e serem biocompatíveis com o tecido e células, quando sintetizados a partir de materiais que são biocompatíveis ou biodegradáveis (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

A capacidade de introduzir moléculas bioativas em recipientes de escala micro/nano tem, por todos os motivos que acabaram de ser referidos, atraído grande atenção nestes últimos anos por parte de diversos grupos em todo o mundo (Habibi *et al.*, 2011). Assim, diversos sistemas de liberação controlada na escala micro e nano têm vindo a ser investigados, nomeadamente nanocápsulas, nanopartículas poliméricas, lipossomas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas, nanopartículas metálicas e nanomateriais de carbono (Ariga *et al.*, 2011, Ocheke *et al.*, 2009b).

Dos diferentes sistemas à base de polímeros que têm sido desenvolvidos utilizando métodos diferentes que variam desde a polimerização, nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsão, emulsão-coacervação e revestimento de polímeros (Habibi *et al.*, 2011), o método camada por camada (do inglês, *layer-by-layer* (LbL)) que consiste na adsorção sucessiva de macromoléculas de carga oposta (Ariga *et al.*, 2011, Becker *et al.*, 2010, Johnston *et al.*, 2006, Radtchenko *et al.*, 2002) sobre um substrato sólido carregado, tem-se destacado, e é visto como muito promissor devido à sua simplicidade e versatilidade (De Villiers *et al.*, 2011, Glinel *et al.*, 2007, Wohl and Engbersen, 2012).

Desde os fim dos anos 90 do século passado até ao início de 2012, mais de 1000 trabalhos científicos foram publicados por ano, dezenas de patentes foram registadas, e já alguns produtos comerciais baseados na técnica LbL foram introduzidos no mercado (Michel *et al.*, 2012).

1. Estrutura e organização da tese

Na primeira parte deste trabalho é descrita a técnica de automontagem com base em interações eletrostáticas utilizada no processo LbL, nos seus mais diversos aspetos. De seguida é feita a introdução à adsorção em superfícies esféricas com vista a produção de nanocápsulas seguindo-se a descrição e análise da sua utilização como sistemas de liberação controlada de fármacos. As vantagens que se esperam obter através destas nanoestruturas, comparativamente às formas convencionais para veicular fármacos bem como a outros sistemas nanométricos utilizados para o efeito, são também objeto de análise. Finalmente apresenta-se ainda uma breve descrição de outros métodos para a obtenção de nanocápsulas.

Para a realização deste trabalho efetuou-se uma pesquisa extensiva em várias bases de dados como Science Direct, B-on, NCBI, ACS Publications e Google Académico entre 1966 e 2013, com as palavras-chave Layer-by-layer, nanocapsules, drug delivery, controlled release, nanotechnology.

II. A técnica da automontagem camada-a-camada (Layer-by-layer)

1. Perspetiva histórica

Desde a antiguidade que a modificação de superfícies se tem revelado uma área com grande interesse tecnológico não apenas para alterar a aparência estética de um material, mas também para lhe conferir proteção contra a ação do meio ambiente ou fornecer-lhe uma funcionalidade adicional, que é particularmente importante na modificação de biomateriais (Michel *et al.*, 2012).

A necessidade de um melhor controlo sobre o processo de modificação motivou a investigação sobre a deposição de camadas moleculares individuais em superfícies (Johnston *et al.*, 2006). Assim, durante a primeira metade do século 20, a investigação da deposição de polímeros e colóides procurou solucionar o problema da deposição de monocamadas (Michel *et al.*, 2012).

A construção camada por camada de filmes molecularmente organizados só começou a ser investigada a partir dos anos 30 do século XX, quando Blodgett e Langmuir introduziram a transferência de monocamadas insolúveis, da superfície da água, para suportes sólidos (Blodgett e Langmuir *cit. in Decher et al.*, 1998).

Posteriormente Sagiv e colaboradores (*cit. in Decher et al.*, 1998) tentaram evitar vários inconvenientes dos filmes Langmuir-Blodgett (LB) (tais como a falta de estabilidade e a necessidade de equipamentos dispendiosos para os produzir), optando pela produção de filmes multicamadas por adsorção química (quimissorção) utilizando silanos. Mallouk e colaboradores (*cit. in Decher et al.*, 1998), por seu lado, utilizaram a automontagem de derivados de metais de transição e bifosfonatos para fins semelhantes. No entanto todas estas abordagens sofriam de uma ou mais limitações, nomeadamente o facto de serem limitadas a certas classes de moléculas, conduzirem a filmes que se rearranjam de forma imprevisível após o seu fabrico e que requerem equipamentos complexos (Decher *et al.*, 1998).

Em 1966, Iler observou que colóides de cargas opostas podiam ser montados alternadamente sobre substratos de vidro (Iler, 1966), e muito rapidamente este conceito foi adaptado para a adsorção alternada de polímeros de carga oposta, isto é, polieletrólitos (Michel *et al.*, 2012). Foi então que mais tarde já nos anos 90 do século XX, Decher e os seus colaboradores usaram os tais polieletrólitos, mais propriamente polímeros com grupos laterais ionizáveis (poliíões) para depositar camadas sucessivamente sobre um substrato por interação eletrostática (Decher *et al. cit. in* De Villiers *et al.*, 2011). Desde então, foi realizado um extenso trabalho sobre a aplicação desta técnica para desenvolver filmes de multicamadas ultrafinas de uma grande variedade de compostos sobre os mais diversos substratos (Ariga *et al.*, 2007, Boudou *et al.*, 2010, Habibi *et al.*, 2011).

A técnica de Layer-by-layer, ou camada por camada, como passou a ser designada, popularizou-se muito rapidamente tornando-se no método de eleição na preparação de filmes em escala nano, e com as características químicas e físicas desejadas (Boudou *et al.*, 2010, Delcea *et al.*, 2011, Wohl and Engbersen, 2012). Como o próprio nome indica, consiste na deposição de várias camadas de carga oposta, ou seja, o processo de LbL começa com a adsorção de uma espécie carregada sobre um substrato de carga oposta, o que conduz à inversão da carga da superfície do substrato. Outras camadas podem ser então depositadas pela adsorção de espécies de carga oposta sobre o substrato, até que a espessura da película desejada seja alcançada (De Villiers *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007). Os passos de adsorção têm que ser alternados com etapas de lavagem com o solvente (geralmente água ou uma solução aquosa de eletrólito), a fim não só de remover polieletrólitos fracamente adsorvidos, mas também para evitar a contaminação cruzada das soluções contendo as moléculas a serem depositadas (Michel *et al.*, 2012), Figura 1. O filme assim obtido designa-se *polyelectrolyte multilayer* (PEM).

Para além do método usual de revestimento de filmes baseado na imersão numa solução, um outro processo tem vindo a ser estudado de forma a tornar a técnica ainda mais rápida, e que se baseia na pulverização direta sobre os substratos. Vários grupos têm relatado o uso de sprays para a obtenção de filmes automontados (Figura 2), através da deposição de camadas em 60 segundos, também alternadas por etapas de lavagem, e

que são de qualidade comparável aos desenvolvidos a um ritmo de 25 minutos por camada, através do método de imersão. Esta redução drástica no tempo de processo pode ser atribuída a um acelaramento do processo de transferência de massa do polielectrólito a partir da solução para a superfície do substrato, e é um avanço importante na técnica LbL.

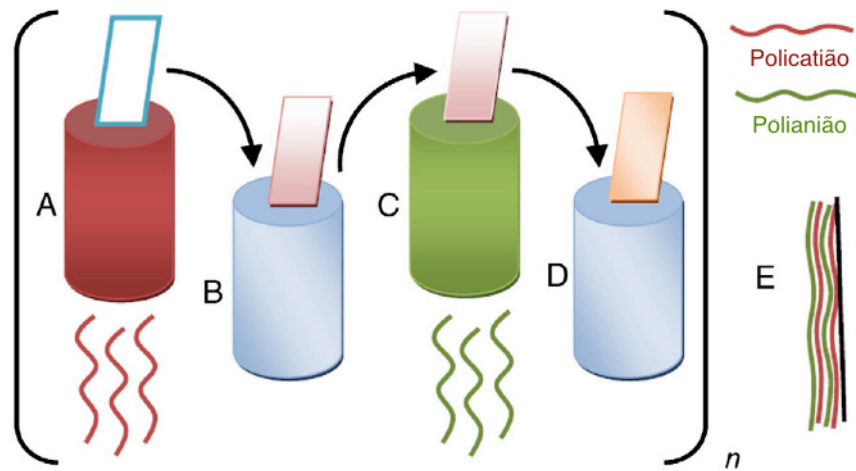


Figura 1 - Ilustração esquemática da adsorção alternada das espécies de polielectrólitos para produzir uma estrutura de múltiplas camadas. (A) imersão na solução de policatião; (B) imersão num solvente de lavagem; (C) imersão na solução de polianião; (D) imersão num solvente de lavagem para o polianião; (E) O processo é repetido n vezes para produzir um filme de n camadas; (adaptada de De Villiers *et al.*, 2011).

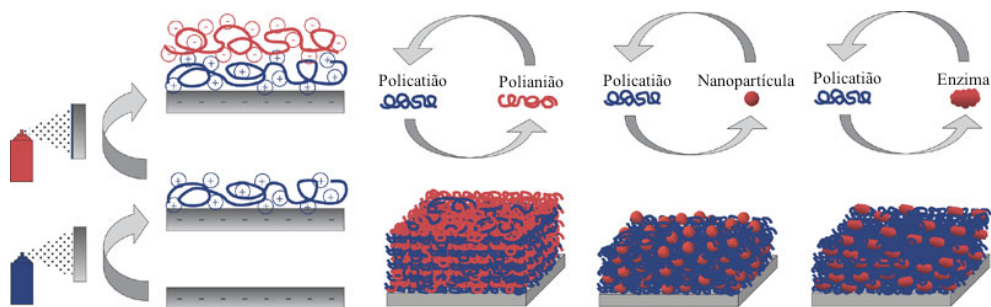


Figura 2 - Esquema da deposição de camadas LbL por pulverização (adaptada de Bruening and Dotzauer, 2009).

Durante o processo de atomização envolvido no revestimento por pulverização pode também reduzir-se a aglomeração das nanopartículas em soluções, alargando-se por esta via a gama de materiais que podem ser depositados electrostaticamente. Infelizmente, o método de pulverização LbL ainda é uma área pouco estudada, e os mecanismos em

jogo durante a pulverização têm que ser investigados mais aprofundadamente, assim como as soluções e substratos aplicáveis a esta tecnologia que ainda estão relativamente inexplorados (Fukao *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2009b, Krogman *et al.*, 2007).

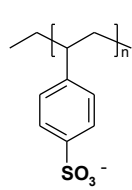
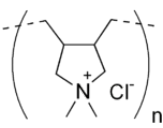
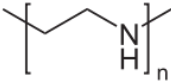
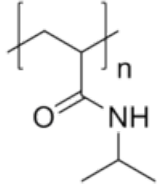
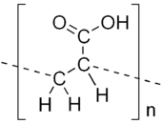
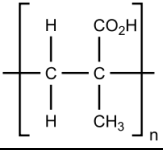
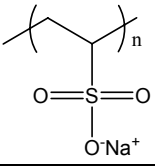
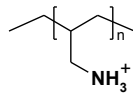
As propriedades dos filmes automontados com base na técnica LbL, tais como a composição, espessura, função, carga de superfície, permeabilidade e elasticidade podem ser ajustadas, simplesmente variando o tipo de espécies adsorvidas, o número de camadas depositadas, e as condições empregues durante o processo de automontagem (Wang *et al.*, 2007, Wohl and Engbersen, 2012).

2. Materiais de revestimento e substratos

Vários polieletrólitos e nanopartículas podem ser utilizados para formar as estruturas de camadas múltiplas ultrafinas, utilizando a técnica LbL (Ariga *et al.*, 2007). Além disso, vários substratos podem ser revestidos por essas multicamadas (De Villiers *et al.*, 2011).

i. Polieletrólitos

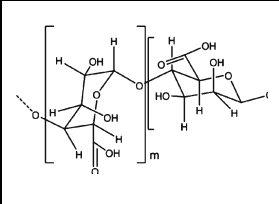
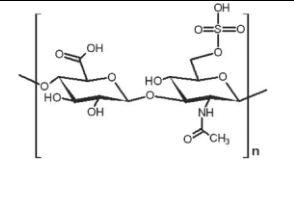
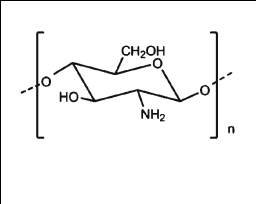
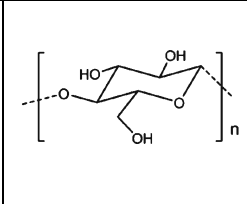
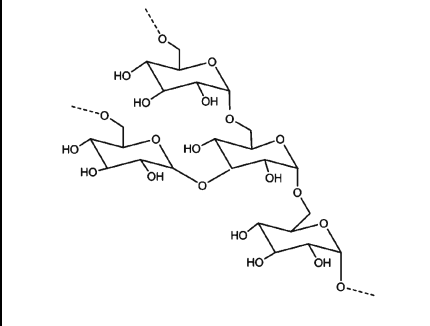
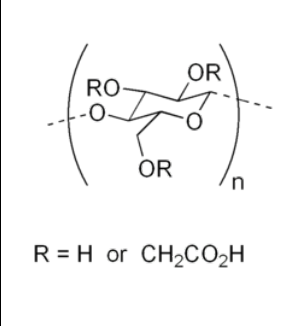
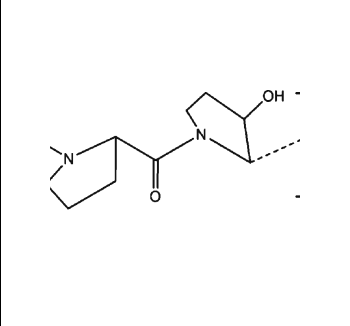
Quadro 1 - Estrutura molecular de alguns dos polieletrólitos sintéticos mais utilizados na produção de PEM's.

			
Poli (estirenosulfonato) (PSS)	Poli (dimetildialilamónio) (PDMA)	Poli (etilenimina) (PEI)	Poli (N-isopropil acrilamida) (PNIPAM)
			
Poli (ácido acrílico) (PAA)	Poli (ácido metacrílico) (PMA)	Poli (vinil sulfato) (PVS)	Poli (cloridrato de alilamina) (PAH)

A produção de filmes finos por automontagem LbL tem por base o uso de polieletrólitos sintéticos e naturais. Os polieletrólitos sintéticos mais usados incluem poli (estirenosulfonato) (PSS), poli (cloreto de dimetildialilamônio) (PDDA), poli (etilenimina) (PEI), poli (N-isopropil acrilamida) (PNIPAM), poli (ácido acrílico) (PAA), poli (ácido metacrílico) (PMA), poli (vinil sulfato) (PVS), e poli (cloridrato de alilamina) (PAH) e vários poliaminoácidos, nomeadamente a poli (L-lisina) (PLL) (Ariga *et al.*, 2007, De Villiers *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2006).

Entre os polieletrólitos naturais já utilizados, os ácidos nucleicos, proteínas e polissacáridos, dos quais o ácido algínico, ácido hialurónico (HA), sulfato de condroitina, heparina, ADN, quitosano (CS), celulose, dextrano, carboximetil-celulose e colagénio são os mais comuns (Ariga *et al.*, 2007, De Villiers *et al.*, 2011, Labouta and Schneider, 2010).

Quadro 2 - Estrutura molecular de alguns dos polieletrólitos naturais mais utilizados na produção de PEM's.

			
Ácido algínico	Sulfato de condroitina	Quitosano	Celulose
	 R = H or CH ₂ CO ₂ H		
Dextrano	Carboximetil-celulose	Colagénio	

Para além de polieletrólitos já foram utilizados outros materiais na construção de PEM's como nanopartículas, aluminossilicatos ou dendrímeros (De Villiers *et al.*, 2011, Tang

et al., 2006). As nanopartículas utilizadas para construções LbL são derivados de dispersões coloidais estabilizadas de sílica com carga, esferas de poliestireno (PS) com carga, óxidos metálicos, polioxometalatos e polímeros condutores cristalinos líquidos. As plaquetas positivamente e negativamente carregadas utilizadas em LbL derivam de ocorrência natural, tais como argilas de hectorite, montemorilonite e saponite. Por exemplo, polímeros cristalinos líquidos com carga foram montados com êxito com a argila (De Villiers *et al.*, 2011).

ii. Substratos

Um pré-requisito importante para que o revestimento LbL seja bem-sucedido, é a presença de uma carga de superfície mínima no substrato, sendo esta uma das poucas desvantagens da técnica. No entanto, a carga pode ser induzida para facilitar o processo (De Villiers *et al.*, 2011). A técnica LbL é versátil no que diz respeito aos substratos que podem ser utilizados, que incluem vidro hidrófilo e hidrófobo, mica, silício, metais, quartzo e polímeros (Crespilho *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2008), Figura 3.

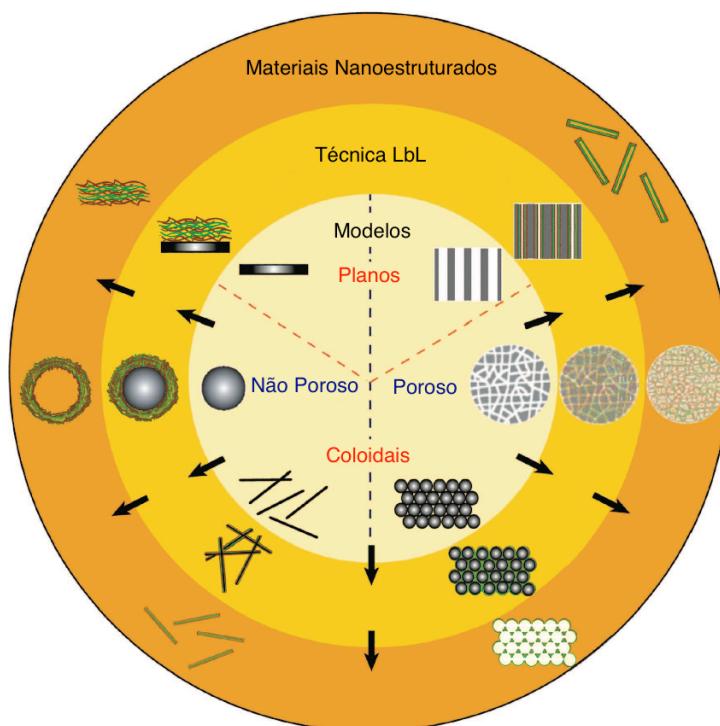


Figura 3 - Ilustração esquemática dos vários modelos que podem ser utilizados como substratos, assim como as nanoestruturas que se podem obter através da técnica LbL (adaptada de Wang *et al.*, 2007).

A carga de superfície não é o único fator que pode afetar a adesão de várias camadas. A textura também desempenha um papel importante. Por exemplo, o pré-tratamento de um substrato com cloreto de sódio (NaCl) resulta num contacto mais íntimo entre o substrato e os colóides de forma a produzir revestimentos de alta qualidade (De Villiers *et al.*, 2011).

A elasticidade do revestimento, pode também afetar a superfície de adesão das camadas de revestimento ao substrato. Este pode, portanto, exigir algum pré-tratamento antes do processo de montagem LbL para que se garanta o seu sucesso (De Villiers *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2008).

Os polímeros/colóides usados em LbL também podem ser alterados para modificar as suas propriedades antes da montagem LbL (De Villiers *et al.*, 2011).

3. Propriedades mecânicas estruturais dos filmes obtidos por LbL

Como se referiu anteriormente, um dos aspetos mais apelativos da técnica LbL é o controlo das propriedades dos filmes produzidos a nível molecular.

Um primeiro meio de modulação consiste em modificar a estrutura interna do filme usando polieletrólitos com conformações diferentes, tais como os carragenanos (Boudou *et al.*, 2010).

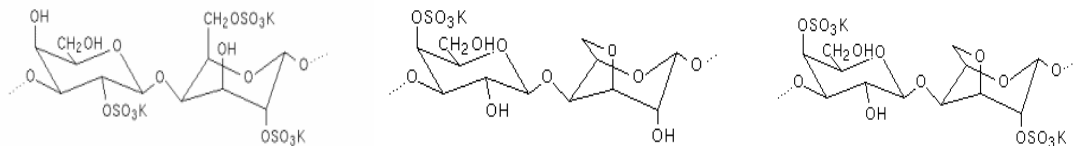


Figura 4 - Fórmulas da estrutura dos carragenanos (Lambda, Kappa e Jota).

Schoeler *et al.* (2006) e Schönhoff *et al.* (2007) mediram a rigidez das PEM's contendo PAH como policação e dois diferentes polissacarídeos aniônicos sulfatados, ι -carragenano, que forma estruturas helicoidais, e λ -carragenano, que tem uma conformação helicoidal aleatória. Utilizando microscopia de força atômica (MFA),

constataram que os filmes preparados com ι -carragenano eram cerca de três vezes mais rígidos do que aqueles com λ -carragenano, destacando a forte influência das estruturas de polieletrólitos na rigidez do filme (Schoeler *et al.*, 2006, Schönhoff *et al.*, 2007). De um modo semelhante, a inserção ou “enxertia” de fosfolípidos, ou moléculas de açúcares, tais como lactose ou manose, num dos polieletrólitos pode influenciar significativamente a rigidez do filme (Boudou *et al.*, 2010).

Uma segunda estratégia para ajustar as propriedades mecânicas dos filmes PEM é a incorporação de nanopartículas. Kotov, Tsukruk e Hammond (*cit. in* Boudou *et al.*, 2010) estudaram a formação de películas de camadas múltiplas compostas, contendo polieletrólitos catiónicos e nanopartículas aniónicas, tais como nanotubos de carbono, montemorilonite, ou nanopartículas metálicas. Estes filmes compostos apresentaram um módulo de Young (parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de um material sólido) até duas ordens de grandeza superior, em relação ao do filme contendo polieletrólito puro (*cit. in* Boudou *et al.*, 2010).

Outra maneira de endurecer filmes PEM consiste em utilizar na construção do mesmo, misturas de polieletrólitos. Os grupos de Caruso e Schaaf (*cit. in* Boudou *et al.*, 2010) conseguiram rigidificar PEM's misturando polianiões, cujo comportamento normalmente difere consideravelmente quando individualizados dos filmes. Por exemplo, através da inserção de camadas rígidas de PSS/PAH no topo de uma película mole de PLL/HA, ou entre camadas de CS/HA. Observaram ainda que o regime de crescimento pode alternar de exponencial para linear, através de uma mistura adequada, havendo grande probabilidade das propriedades mecânicas também mudarem (*cit. in* Boudou *et al.*, 2010).

i. Influência do pH

Uma das muitas características atrativas dos PEM's é a possibilidade das suas propriedades mecânicas poderem ser modificadas por variação das condições utilizadas na montagem dos filmes, nomeadamente pH, força iónica e temperatura. Devido à dissociação dependente do pH dos grupos ácido fraco/base fraca nas cadeias, os filmes

preparados a partir de polieletrólitos cujo grupo ionizável seja do tipo ácido/base fracos são fortemente modulados pelo pH (Boudou *et al.*, 2010).

Mermut *et al.* (2003) mostraram que o módulo de Young ou módulo de elasticidade de filmes feitos de PAH e azobenzeno foi reduzido de 6,5 a cerca de 0,1 MPa, quando o pH aumentou de 5 para 9 (Mermut *et al.*, 2003). Vários outros grupos, em especial o grupo de Rubner (2005), investigaram o controlo em nanoescala que pode ser exercido sobre as propriedades dos filmes de PAH/PAA (por exemplo, rigidez, espessura), através da variação das condições de pH usadas para montar os filmes, tendo concluído que filmes de PAH/PAA montados a um pH relativamente neutro são significativamente mais finos, e cerca de duas ordens de magnitude mais rígidos do que aqueles montados em condições ácidas (Figura 5) (Thompson *et al.*, 2005).

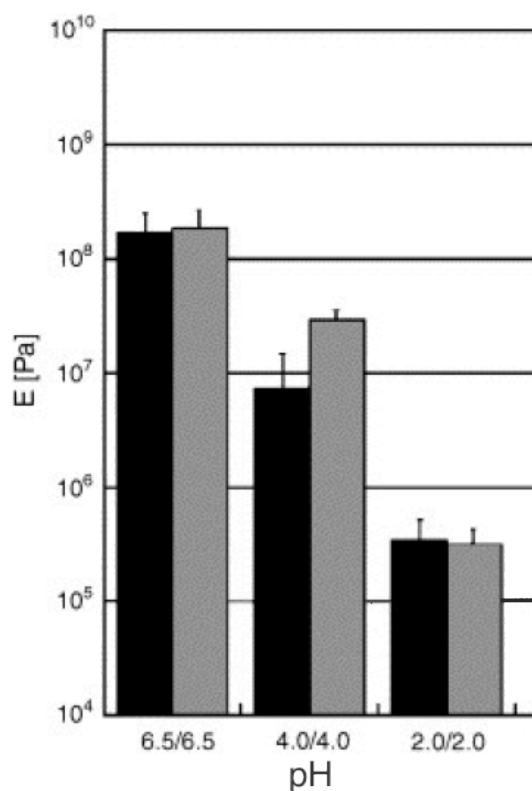


Figura 5 - Representação dos resultados do módulo de elasticidade E em função do pH das soluções de montagem com polianião PAA (preto) e policatião PAH (cinza) (adaptada de Thompson *et al.*, 2005).

ii. Influência da força iônica

Além do pH, a força iônica é outro parâmetro eficaz para controlar as propriedades dos PEM's, em particular a sua permeabilidade e rigidez. Assim, a força iônica pode atenuar as interações intermoleculares num filme contendo polieletrólitos, por blindagem das cargas eletrostáticas (Boudou *et al.*, 2010). Por exemplo, Heuvingh *et al.* (2005) examinaram a formação de nanoporos em filmes de multicamadas PAH/PAA, através de mudanças estruturais induzidas por sais e mostraram que ocorre um amolecimento considerável de cápsulas de PAH/PSS, quando a concentração de sal (e conseqüentemente a força iônica) aumenta (Figura 6) (Heuvingh *et al.*, 2005).

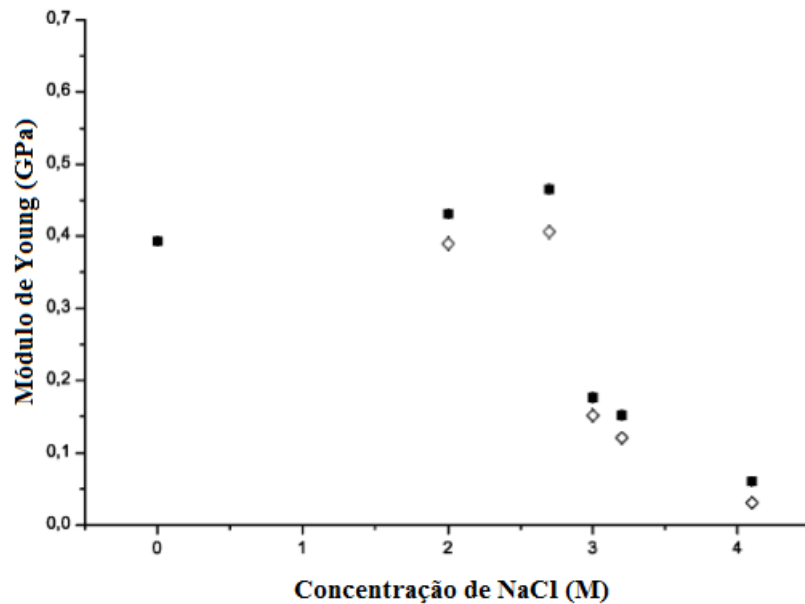


Figura 6 - Variação do Módulo de Young de cápsulas de polieletrólito em função do aumento da concentração de sal, onde os quadrados indicam uma espessura constante, e os losangos a conservação do volume do material na parede (adaptada de Heuvingh *et al.*, 2005).

O grupo de Schlenoff (2006) observou comportamentos semelhantes utilizando PEM's contendo PSS e PDDA, através da turgescência, suavização e amolecimento dos filmes à medida que o sal era adicionado (Jaber and Schlenoff, 2006).

Mas no caso de PEM's obtidos a partir de PAH e ADN, foi observado um endurecimento interessante das multicamadas através da adição de sal, o que prova que

sistemas de pontes de hidrogénio podem associar-se mais fortemente à medida que a força iónica aumenta (*cit. in* Jaber and Schlenoff, 2006).

Por seu lado, Nolte *et al.* e Tang *et al.* demonstraram que os PEM's sofriam turgescência e amolecimento considerável, na presença de água (*cit. in* Boudou *et al.*, 2010).

iii. Indução da formação de ligações covalentes

Também é possível ajustar as propriedades mecânicas de PEM's através de meios químicos, por exemplo, através da criação de ligações cruzadas covalentes entre as camadas dos filmes, o que tem consequências importantes ao nível da estrutura do filme e suas propriedades mecânicas (Figura 7) (Boudou *et al.*, 2010).

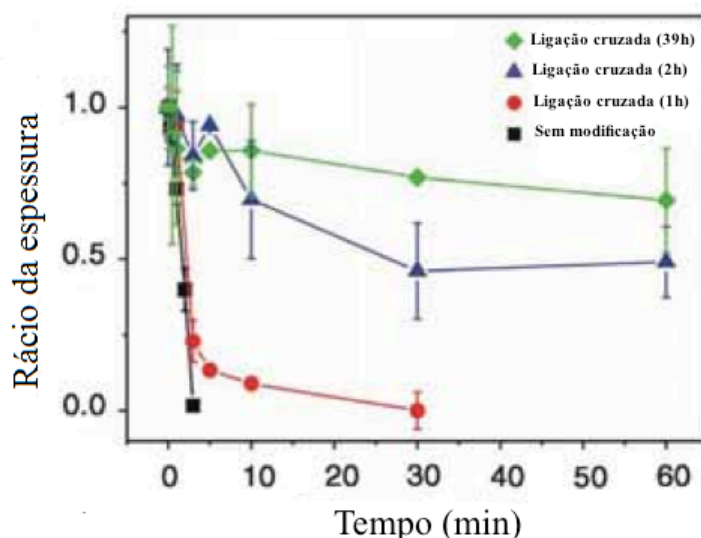


Figura 7 - Medição por perfilometria da mudança de espessura de filmes conforme a intensidade de ligação cruzada. A espessura do filme sem modificação diminui rapidamente após a introdução em tampão fosfato salino, enquanto os filmes com ligações cruzadas sofrem uma diminuição mais lenta (adaptada de Kim *et al.*, 2009a).

Nesse sentido Richert *et al.* (2004), e Schuetz e Caruso (2003) propuseram um protocolo baseado em reações entre grupos carboxilo e grupos amina em condições moderadas (temperatura ambiente e concentração de sal média), mediada por uma

carboimida, e da qual resulta a formação de ligações covalentes do tipo amida. Assim parte das ligações iónicas podem ser convertidas em ligações covalentes. Este processo pode ser aplicado a muitos tipos diferentes de filmes de polieletrólitos, desde que possuam grupos carboxílicos e aminas (Richert *et al.*, 2004, Schuetz and Caruso, 2003).

Através de nanoindentação com MFA (ideal para caracterizar mecanicamente filmes finos, revestimentos e camadas de superfície), foi possível demonstrar o endurecimento considerável de filmes de PLL/HA e CS/HA tendo-se medido módulos de Young muito superiores aos dos filmes sem ligações covalentes. Além disso, uma outra consequência das ligações cruzadas, é o facto de melhorar significativamente a resistência à biodegradação de filmes CS/HA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Foi também possível concluir que ajustando-se a concentração de ligação da EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida] é possível variar o módulo de Young dos filmes de PLL/HA em mais de duas ordens de grandeza (Figura 8) (*cit. in* Boudou *et al.*, 2010).

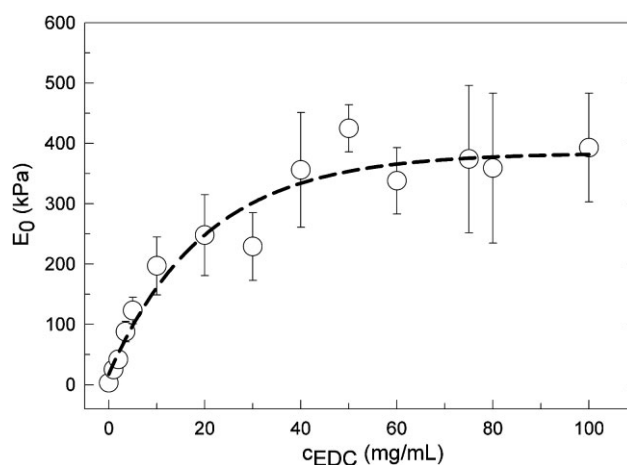


Figura 8 - Módulo de Young E_0 determinado pela técnica nanoindentação MFA para várias concentrações de EDC até 100 mg mL^{-1} (adaptada de Boudou *et al.*, 2010).

Usando uma estratégia diferente, Li e Haynie (2004) investigaram as ligações e estabilização de PEM's polipeptídicos por formação de pontes dissulfureto, que são reversíveis, e do mesmo tipo das que estão envolvidas na estabilização estrutural de proteínas. A introdução de cisteína num polipéptido adequado permite a criação de ligações dissulfureto em condições suaves, e aumenta a estabilidade das PEM's de polipéptido em condições oxidantes. Estas ligações podem ser particularmente úteis

para diminuir a taxa de desintegração do filme ou modular as suas propriedades mecânicas (Li and Haynie, 2004).

Algumas abordagens recentes para ajustar as propriedades mecânicas de PEM's são baseadas na criação de ligações cruzadas submetendo os filmes a luz UV (Boudou *et al.*, 2010). Rubner e os seus colaboradores sintetizaram um polianião fraco poli (ácido acrílico-ran-vinilbenzilacrilato) (PAArVBA) através de foto-reticulação de PAA com grupos vinil benzílicos, e associaram-no com PAH para produzir PEM's. Verificaram que os filmes foto-reticulados apresentavam aproximadamente metade da espessura dos filmes naturais ou nativos, mantendo no entanto as mesmas características (Olugebefola *et al.*, 2008, Olugebefola *et al.*, 2006).

Park *et al.* (2005) usaram a mesma abordagem para foto-reticular benzofenona uma molécula fotossensível (Figura 9) modificando PAH ou PAA em associação com PSS, tendo mostrado que a libertação de rodamina B a partir destes filmes pode ser controlada pelo grau de ligação cruzada induzida (Park *et al.*, 2005).

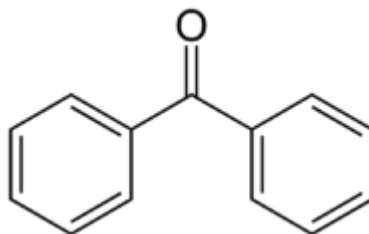


Figura 9 - Estrutura química da benzofenona

Pozos-Vásquez *et al.* (2009) também relataram a preparação de filmes de polieletrólitos baseados em derivados de PLL e HA modificados por grupos vinilbenzil (VB) fotorreactivos. O VB modificado e HA incorporados nos filmes foram reticulados por irradiação UV, e as medidas de força obtidas por microscopia de força atômica revelaram que a rigidez dos filmes reticulados foi aumentada até quatro vezes (Figura 10) (Pozos Vázquez *et al.*, 2009).

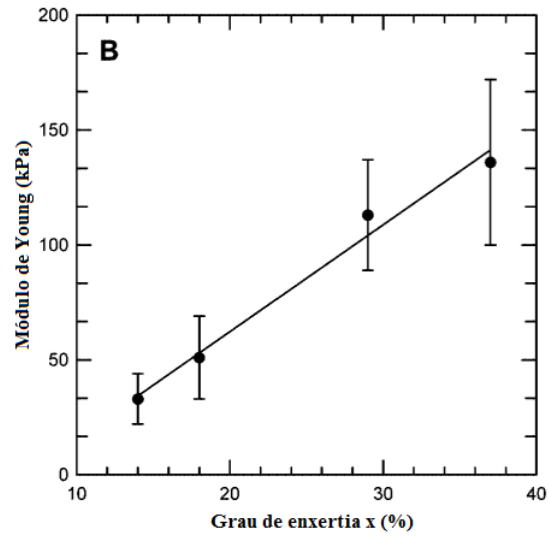


Figura 10 - Variação do módulo de elasticidade em relação ao grau de enxertia x dos derivados de HA-xVB utilizados na construção dos filmes (adaptada de Pozos Vázquez *et al.*, 2009).

III. A adsorção em superfícies esféricas com vista à produção de nanocápsulas por automontagem com base em interações eletrostáticas

As cápsulas micro e nanométricas têm encontrado aplicação em diversas áreas, desde a biotecnologia às ciências farmacêuticas e medicina. Nano e micropartículas, feitas a partir de uma infinidade de materiais, são atualmente também amplamente estudadas com vista a serem utilizadas para veicular fármacos.

Os grandes inconvenientes nas formas farmacêuticas convencionais incluem baixa biodisponibilidade, estabilidade *in vivo*, solubilidade e absorção intestinal, dificuldades na entrega sustentada e direcionada para o local de ação, fraca eficácia terapêutica, efeitos laterais, e flutuações plasmáticas da concentração da substância ativa que, ou fica abaixo da concentração mínima eficaz, ou excede a concentração terapêutica segura (Ochekpe *et al.*, 2009a). Assim, a nanotecnologia surge como uma abordagem alternativa para superar estes desafios, através do desenvolvimento e fabrico de estruturas de tamanho reduzido.

Estas nanoestruturas têm como propósito proteger os fármacos encapsulados, no seu interior, da degradação hidrolítica e enzimática no trato gastrointestinal. Possuem aptidão para a entrega de uma ampla gama de moléculas para diversas áreas do corpo através de liberação controlada (Ai, 2011, Johnston *et al.*, 2006, Ochekpe *et al.*, 2009a). Têm ainda a capacidade de melhorar a solubilidade dos compostos lipofílicos, pouco ou mesmo insolúveis em água, e proteger as moléculas do ambiente biológico (Mu *et al.*, 2011). Aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos e serem capazes de permanecer em circulação no sangue durante um longo período de tempo, libertando o fármaco incorporado de uma forma sustentada e contínua, evitando menos flutuações no plasma, minimizando assim os efeitos secundários causados pelos fármacos (Deshmukh *et al.*, 2013, Ochekpe *et al.*, 2009a, Shu *et al.*, 2010a). O seu tamanho reduzido deverá permitir-lhes penetrar nos tecidos e serem absorvidas pelas células, permitindo a entrega eficiente nos locais de ação (Ochekpe *et al.*, 2009a).

Desde há alguns anos, vários grupos investigam cápsulas transportadoras obtidas por automontagem de polieletrólitos. Essas cápsulas são fabricadas pela técnica LbL com

base na adsorção consecutiva de polímeros de cargas opostas, em núcleos coloidais usados como moldes (De Temmerman *et al.*, 2011).

O trabalho pioneiro nesta área foi desenvolvido por Möhwald, Caruso, e colaboradores. Nesta estratégia, os filmes foram automontados em sequência, à semelhança das montagens convencionais sobre substratos planos mas desta feita usando um núcleo coloidal. Usaram partículas de látex poliestireno (PS), de 640 nm de diâmetro como moldes, e partículas de SiO₂ de aproximadamente 25 nm de diâmetro como nanopartículas de revestimento automontadas num polímero catiónico linear de poli (cloreto de dialildimetilamônio) (PDADMAC). A versatilidade do processo em formar compósitos multicamadas é demonstrada pelo controlo que pode ser exercido sobre o número de ciclos de deposição, permitindo formar multicamadas uniformes regulares. Tanto a espessura da parede das cápsulas, como a sua forma e estabilidade, são dependentes do número de ciclos de deposição de camadas de SiO₂-PDADMAC. Por fim, Möhwald e colaboradores demonstraram que o núcleo podia ser removido, e opcionalmente, também o polímero, originando cápsulas ocas híbridas inorgânicas, como se pode ver na Figura 11 (Caruso *et al.*, 1998).

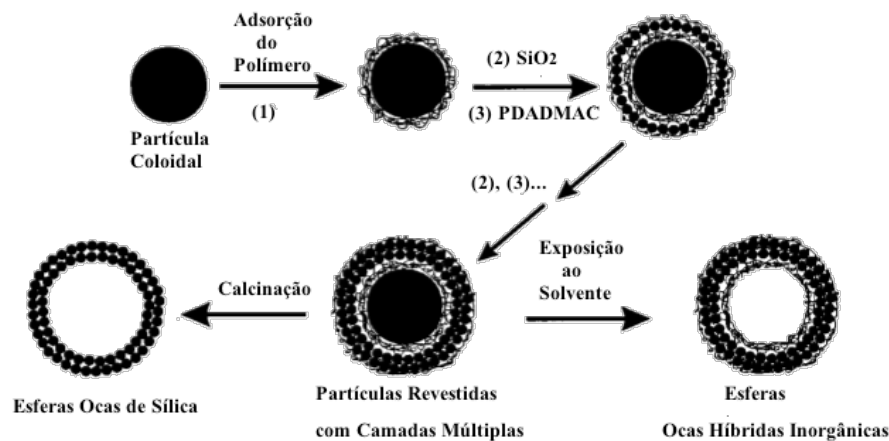


Figura 11 - Ilustração de procedimentos para a preparação de esferas ocas inorgânicas e híbridas para as partículas de látex PS (adaptada de Caruso *et al.*, 1998).

Segundo os autores do trabalho, estas cápsulas poderiam ser utilizadas para diversos fins, incluindo a encapsulação de várias substâncias e liberação controlada das mesmas, uma vez que a permeabilidade através da membrana da cápsula é controlável através da manipulação de vários fatores. A ideia que resultou deste trabalho pioneiro foi que

sistemas funcionais à escala nano poderiam ser construídos usando substratos e revestimentos de uma grande variedade de materiais (Caruso *et al.*, 1998).

1. Fabrico de micro e nanocápsulas usando LbL

Depois do trabalho pioneiro referido atrás, a investigação na área da produção de nanocápsulas através de LbL atraiu grupos de investigadores em todo o mundo. Na Figura 12 ilustram-se as etapas necessárias para produzir cápsulas através de automontagem camada-a-camada com base em interações eletrostáticas. Como se pode verificar, as grandes diferenças relativamente à produção de filmes reside na utilização de um substrato esférico que pode ser removido.

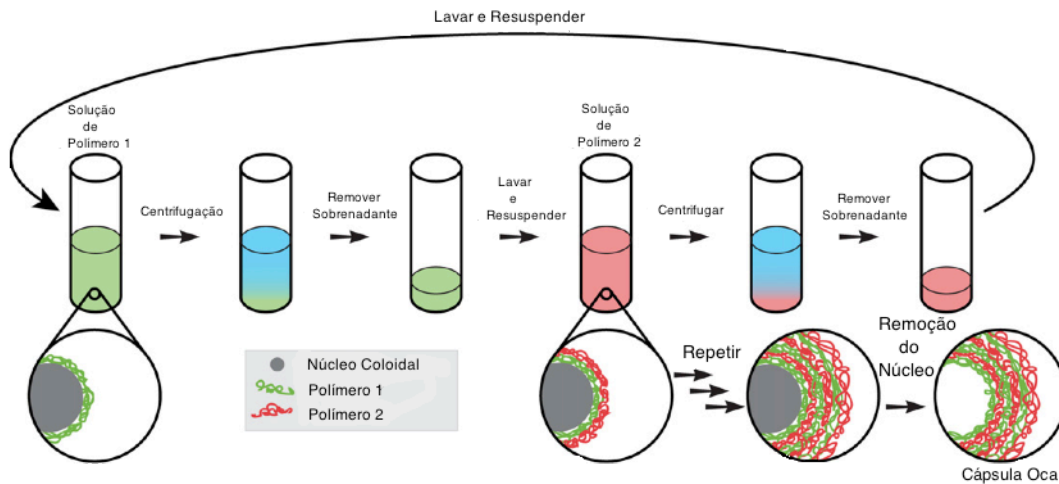


Figura 12 - Obtenção de cápsulas pelo método LbL (adaptada de Wohl and Engbersen, 2012).

Vários moldes inorgânicos e orgânicos (por vezes também designados como núcleos) podem ser usados para obter cápsulas. Os mais usados são núcleos de melamina formaldeído fracamente reticulada (MF) e PS, nanopartículas de ouro (NP), partículas de poli (ácido láctico) (PLA), núcleos de carbonato, partículas de sílica, e até mesmo células (Delcea *et al.*, 2011). Mas também uma gama de partículas coloidais, com tamanhos que variam de nanómetros a micrómetros, e composição abrangendo partículas inorgânicas e polímeros compostos de biomacromoléculas ou espécies de baixa massa molecular. Na Figura 13 apresentam-se, a título de exemplo, imagens de Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV) e Microscópio Confocal de Varrimento a

Laser (MCVL) de cápsulas obtidas através de LbL sobre substratos de MF sobre os quais se depositaram camadas de gelatina e PDDA.

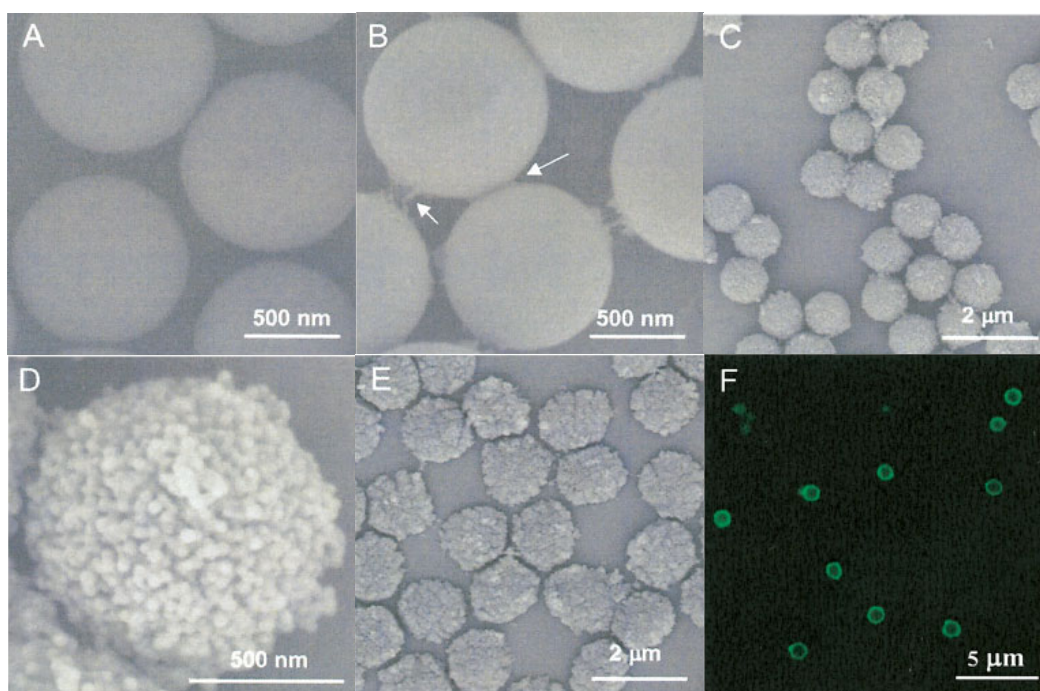


Figura 13 - Caracterização das cápsulas de polieletrólito através de MEV e MCVL. (A) imagem MEV de partículas MF originais, sem revestimentos de polieletrólito. (B) partículas de MF cobertas (gelatina / PDDA)₅. (C) partículas de MF cobertas com [(gelatina / PDDA)₅ + (nanopartículas-YG/PDDA)]. (D) Imagem ampliada de MEV da cápsula individual da imagem C. (E) Imagem de MEV de cápsulas vazias após decomposição dos núcleos MF. (F) Imagem de MCVL de cápsulas ocas dispersas em tampão PBS (adaptada de Ai *et al.*, 2005).

Tal como no caso dos PEM's as cápsulas preparadas por LbL têm atraído um interesse particular, em grande parte, devido à capacidade de facilmente adaptar as suas propriedades (por exemplo, tamanho, composição, porosidade, estabilidade, funcionalidade de superfície, estabilidade coloidal) (Delcea *et al.*, 2011, Johnston *et al.*, 2006, Tong and Gao, 2008), através da seleção apropriada dos constituintes da matriz e do modelo de núcleo usado na construção das mesmas (De Temmerman *et al.*, 2011). Além disso, a formação camada-a-camada dessas cápsulas, permite a introdução de múltiplas funcionalidades, proporcionando assim possibilidades para a engenharia de uma nova classe de materiais com estrutura e funcionalidade sem precedentes. Como já vimos no caso dos filmes, as cápsulas podem ser “personalizadas” devido a uma grande variedade de polímeros poderem servir como materiais de construção (Johnston *et al.*,

2006), e embora na primeira década de estudos da técnica LbL, a maioria das publicações tenham sido dedicadas à utilização e montagem de polieletrólitos sintéticos, uma tendência atual, particularmente quando se pretende obter nanocápsulas para as áreas dos biomateriais e farmacologia, é a utilização de polieletrólitos naturais biodegradáveis (Ariga *et al.*, 2011), já referidos no capítulo anterior.

Uma das características mais atrativas das cápsulas reside na sua capacidade de armazenar pequenas moléculas e até mesmo macromoléculas, tais como proteínas (De Temmerman *et al.*, 2011, Habibi *et al.*, 2011). A literatura está repleta de inúmeros trabalhos sobre o carregamento das cápsulas com moléculas muito diversas, como fármacos de baixo peso molecular, polímeros, enzimas, ADN e antigénios (Balabushevich *et al.*, 2003, De Koker *et al.*, 2011, Itoh *et al.*, 2006, Shchukin *et al.*, 2004, Tripathy and Raichur, 2012).

Por exemplo, Antipov *et al.* (2001) relataram que sistemas de multicamadas feitos de PSS e PAH prolongaram a permeação de partículas de fluoresceína de 4-9 μm , quando encapsuladas, e mergulhadas numa solução tampão de pH 8,0 (Antipov *et al.*, 2001).

Lvov *et al.* (2004) relataram uma abordagem para encapsulamento ADN dentro de microcápsulas de poli [β -ácido glucurónico-(1-3)-N-acetil- β -galactosamina-6-sulfato (1-4)] (PG) /poli (L-arginina) (PA), onde utilizaram como molde partículas de MnCO_3 , e uma solução de espermidina, para formar um complexo ADN/espermidina. A estrutura de dupla hélice do ADN manteve-se (Shchukin *et al.*, 2004) (Figura 14).

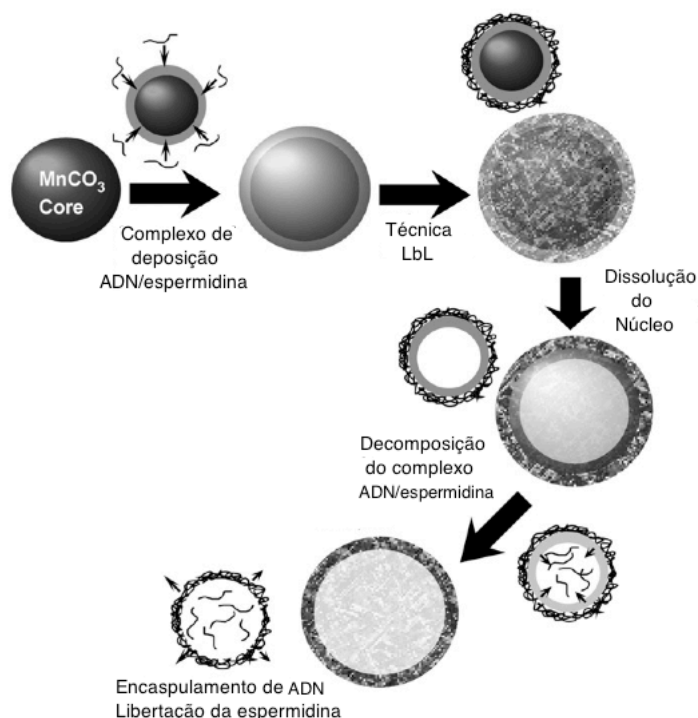


Figura 14 - Encapsulamento de ADN em microcápsulas LbL (adaptada de Ariga *et al.*, 2011).

Numa outra abordagem, Shu *et al.* (2010) encapsularam uma proteína, neste caso, albumina de soro bovino, em nanocápsulas de cisteína (SH) conjugada com quitosano e sulfato de dextrano (DS), pela adsorção sobre esferas de sílica de β -ciclodextrina, sensíveis a pH e redução. Os resultados sugeriram que as nanocápsulas tinham boa biocompatibilidade, e protegiam a proteína da destruição pelo ácido gástrico. Além disso podiam penetrar no interior das células Caco-2, onde a glutatona presente nas células reduzia as ligações de dissulfureto, e promovia a consequente libertação da albumina (Shu *et al.*, 2010b).

Fan e seus colaboradores encapsularam com sucesso partículas de insulina com os polieletrólitos poli (ácido alfa- β -L-málico) (PMLA) e quitosano solúvel em água (WSC), onde a libertação de insulina a partir das multicamadas PMLA/WSC era feita através de alterações do pH (Fan *et al.*, 2006). No mesmo ano, Ye e o seu grupo também encapsularam insulina em cápsulas de quitosano e alginato de sódio (ALG), pré-formadas sobre nanopartículas MF. Aqui também se verificou que a libertação da insulina era dependente do pH (Ye *et al.*, 2006). Em ambos os casos houve a libertação prolongada do conteúdo, o que, segundo os autores do trabalho, poderia tornar estas

nanocápsulas veículos promissores para administrações parenterais de insulina em diabéticos.

A superfície das cápsulas pode ser modificada para alterar a funcionalidade e/ou melhorar a sua estabilidade coloidal, e vários materiais podem ser introduzidos no interior da cápsula de forma a serem entregues em locais específicos (Gil *et al.*, 2008, Johnston *et al.*, 2006), Figura 15.

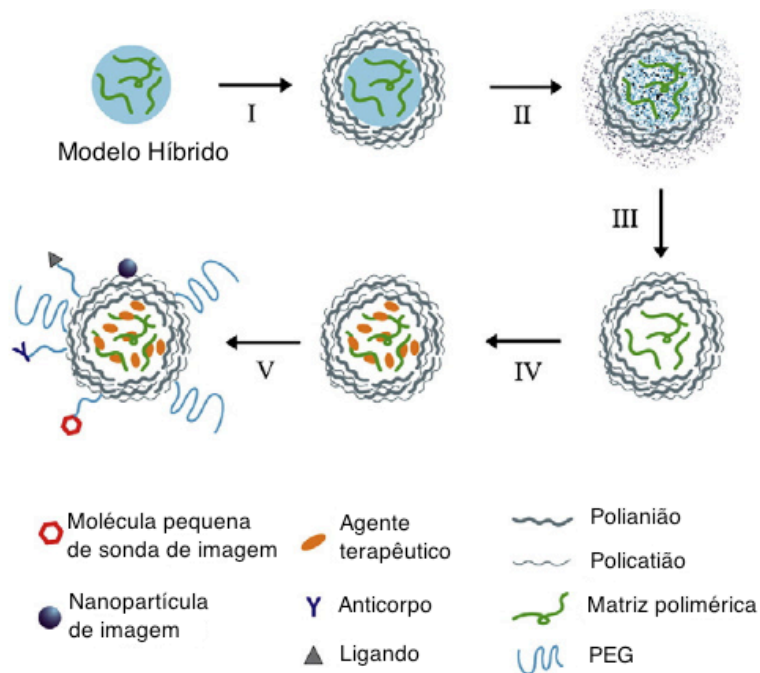


Figura 15 - Ilustração esquemática da automontagem de cápsulas de polieletrólito com várias funcionalidades: I) automontagem LbL de polieletrólitos em modelos híbridos; II) decomposição molde; III) purificação da matriz polimérica contida nas cápsulas de polieletrólitos; IV) carregamento dos agentes terapêuticos nas cápsulas; V) adição de várias funções conforme o desejado (adaptada de Ai, 2011).

Além disso, através da incorporação de nanopartículas magnéticas em cápsulas fluorescentes (pela funcionalização com moléculas de corantes orgânicos ou pontos quânticos emissores de luz), elas podem adquirir outras funcionalidades, como agentes de contraste de imagem para aplicações de diagnóstico na ressonância magnética (RM), e podem produzir propriedades luminescentes para serem usadas como biomarcadores *in vitro* e *in vivo* (Ai, 2011, Loretta *et al.*, 2010).

Donath e colaboradores (*cit. in* Tong and Gao, 2008) demonstraram recentemente que cápsulas LbL revestidas por fosfatidilserina e fundidas com partículas do tipo rubéola (*rubella-like particles* (RPL's)) podem facilitar a passagem da membrana (Figura 16). Através da incubação dos colóides revestidos com lípidos e as RPL's a pH baixo, as partículas ligadas à camada lipídica por forças eletrostáticas e subsequentemente fusão com a membrana, exibiam as proteínas do envelope do vírus na superfície da partícula. A superfície do vírus têm como função a ligação à superfície das células hospedeiras, a indução de endocitose e subsequente fusão com as membranas dos endossomos formados. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que as partículas integradas com RPL's podem manter a sua atividade biológica e facilitar a passagem pelas membranas celulares (*cit. in* Tong and Gao, 2008).

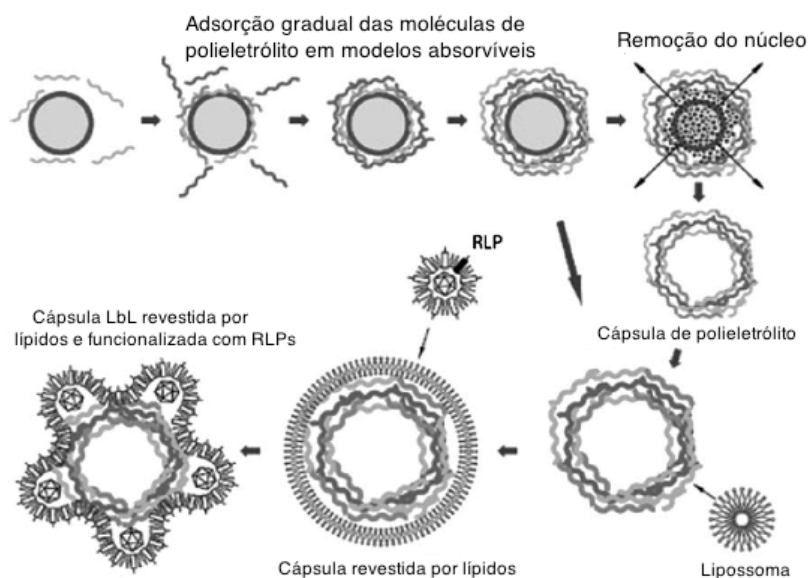


Figura 16 - Esquema para a obtenção de cápsulas de polieletrólitos revestidas por lípidos e adição de partículas com função de vírus (adaptada de Tong and Gao, 2008).

Num trabalho desenvolvido por Caruso e colaboradores, prepararam-se cápsulas pela adsorção consecutiva de camadas de poli (N-vinilpirrolidona) (PVPON) funcionalizado com 1% de fragmentos de alcino ou alquinos (PVPONAlk) e PMA em modelos de sílica. Estas cápsulas foram então funcionalizadas com um anticorpo monoclonal A33 (mAb huA33), e um agente quelante para prevenir a agregação dos anticorpos na presença de Cu (I) (Figura 17). Estas cápsulas funcionalizadas mostraram uma ligação altamente específica para as células cancerígenas que expressam o antígeno alvo e

ligação não específica mínima, mesmo quando a proporção de células era baixa (Kamphuis *et al.*, 2010).

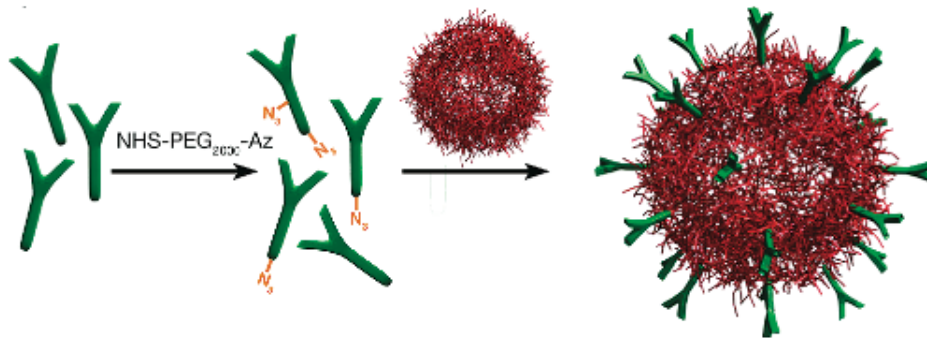


Figura 17 - Funcionalização do anticorpo monoclonal A33 e uma azida com um ligante NHS-PEG2000-Az e posterior funcionalização da cápsula (adaptada de Kamphuis *et al.*, 2010).

2. Métodos de Encapsulamento

Existem três métodos principais para efetuar o carregamento dos filmes e cápsulas obtidos por LbL:

- ✓ O primeiro método consiste na incorporação da molécula de interesse com uma ou mais camadas dos PEM's (Figura 18a). Este é o método mais simples, e é muito popular uma vez que é adequado para utilização em superfícies planas, tais como dispositivos macroscópicos implantáveis, e também em partículas para entrega sistêmica. O carregamento é feito de forma uniforme e a quantidade de carga carregada poder ser variada ao alterar o número de camadas depositadas, o que se torna importante no caso de formulações farmacêuticas para a entrega de uma dose precisa e consistente na terapêutica. A deposição dos filmes finos facilita a incorporação de múltiplos fármacos dentro de camadas diferentes de um mesmo filme, e pode permitir que a sua liberação seja temporalmente controlada. A grande desvantagem deste método é que a montagem LbL é tipicamente realizada com um excesso de polímero que é descartado após a adsorção alcançar o equilíbrio, o que resulta em desperdício de carga. Além disso, a carga é encapsulada na forma complexada, o que pode afectar as propriedades da carga (por exemplo, atividade, ou processamento intracelular) (Becker *et al.*, 2010, Gil *et al.*, 2008).

- ✓ Um outro método para o carregamento da carga, e ideal para sistemas coloidais, envolve o pré-carregamento da partícula do molde com a carga antes da montagem LbL (Figura 18b), fazendo com que a carga fique protegida por uma película fina. O tamanho e forma do veículo de entrega final é dependente do tipo e qualidade do molde formado. Alternativamente, em vez do modelo ser feito a partir da carga, pode ser uma partícula (muitas vezes porosa) em que a carga é carregada. Após a montagem LbL, o molde é dissolvido de forma a deixar a cápsula com o interior da carga. Esta técnica tem sido utilizada para o encapsulamento de proteínas e ADN. Os moldes são normalmente formados a partir de sílica ou carbonato de cálcio. As partículas de sílica têm a vantagem de se ter um alto grau de controlo sobre a porosidade e tamanho, no entanto, requerem a utilização de ácido fluorídrico (HF) para remoção do núcleo. Embora nocivo para os organismos vivos, foi já descrito que o uso de HF para dissolver as partículas de sílica parece não afectar a função do ADN ou de certas proteínas. O carbonato de cálcio pode ser dissolvido em condições muito moderadas com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), no entanto, oferece menos controlo sobre o tamanho de partícula e sua porosidade (Becker *et al.*, 2010, Gil *et al.*, 2008).

- ✓ O último método para carregamento consiste na pós-carga de uma cápsula já formada, permitindo a difusão da carga no interior da cápsula e seu consequente “aprisionamento” (Figura 18c). Isto pode ser alcançado através da alteração da permeabilidade da parede da cápsula para o estado "aberta", e em seguida para um estado "fechado", em resposta ao pH, força iónica ou temperatura. Alternativamente, pode ser utilizado um reagente de sequestro para promover a difusão para dentro da cápsula e a retenção da carga no seu interior. A eficiência da encapsulação de pós-carga é geralmente baixa, e sem o uso de um reagente de aprisionamento, é difícil aumentar significativamente a concentração de carga no interior da cápsula, além disso, os materiais sensíveis a alterações de pH não são adequados para o carregamento sob estas condições. No entanto, moléculas que sejam grandes demais para se difundir através das paredes em estado fechado podem ser carregadas através deste método. (Becker *et al.*, 2010, Gil *et al.*, 2008).

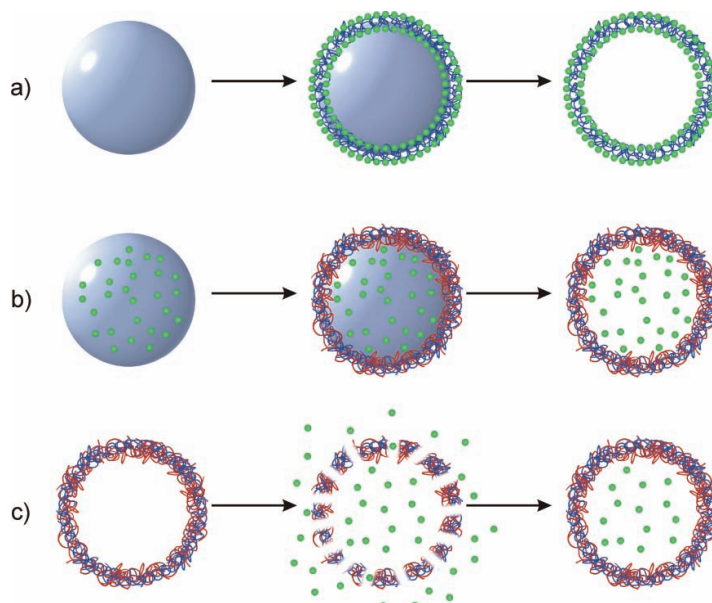


Figura 18 - Métodos de encapsulação da carga dentro de cápsulas LbL. a) Utilização da carga como um constituinte da parede da cápsula. b) Pré-carregamento com a carga antes da formação da cápsula. c) Pós-carregamento por alteração da permeabilidade da cápsula e aprisionando da carga no seu interior (adaptada de Becker *et al.*, 2010).

3. Processo de Liberação da cápsula

A fim de desempenhar um papel como um sistema de entrega de fármacos, torna-se evidente que as cápsulas poliméricas de multicamadas devem não só ser capazes de encapsular e transportar moléculas, mas também de libertar a sua carga útil, e de preferência de forma controlada. Portanto, vários mecanismos de libertação têm sido estudados com vista a serem implementados com estas cápsulas (De Koker *et al.*, 2011).

Há duas maneiras distintas de libertar a carga assim que a cápsula atinge o local pretendido: instantaneamente (libertação imediata do conteúdo) ou lentamente durante um período prolongado (libertação prolongada). A libertação brusca é apropriada quando as cápsulas estiverem sujeitas a captação intracelular (como é o caso, por exemplo, na quimioterapia e transfecção de genes), ao passo que a libertação sustentada é desejável quando as cápsulas se mantêm no espaço extracelular, e doses muito altas de fármaco podem ser tóxicas, o que requer níveis constantes de fármaco (por exemplo, no tratamento da esquizofrenia) (Johnston *et al.*, 2006, Tong and Gao, 2008).

i. Estímulos que afetam a permeabilidade das cápsulas

Estímulos externos permitem modificar parâmetros que podem afetar a permeabilidade das microcápsulas. Existem três tipos de estímulos: químicos, físicos e biológicos (Figura 19), que podem estar relacionados com diversos fatores nomeadamente:

a) As propriedades dos polieletrólitos que constituem a parede da cápsula, por exemplo, a dissolução do polímero num solvente, a força iónica da ligação entre polímeros, protonação devido ao pH dos grupos das cadeias laterais dos polieletrólitos, as temperaturas de fusão (T_f) e transição vítrea (T_g) e complexos entre polieletrólitos (Delcea *et al.*, 2011);

b) A interação com campos externos ou outros estímulos físicos, como por exemplo, interações magnéticas, elétricas e com a luz, interações mecânicas e temperatura (Delcea *et al.*, 2011);

c) Funções de moléculas como enzimas precursoras de reações químicas, e recetores de reconhecimento das moléculas (Delcea *et al.*, 2011);

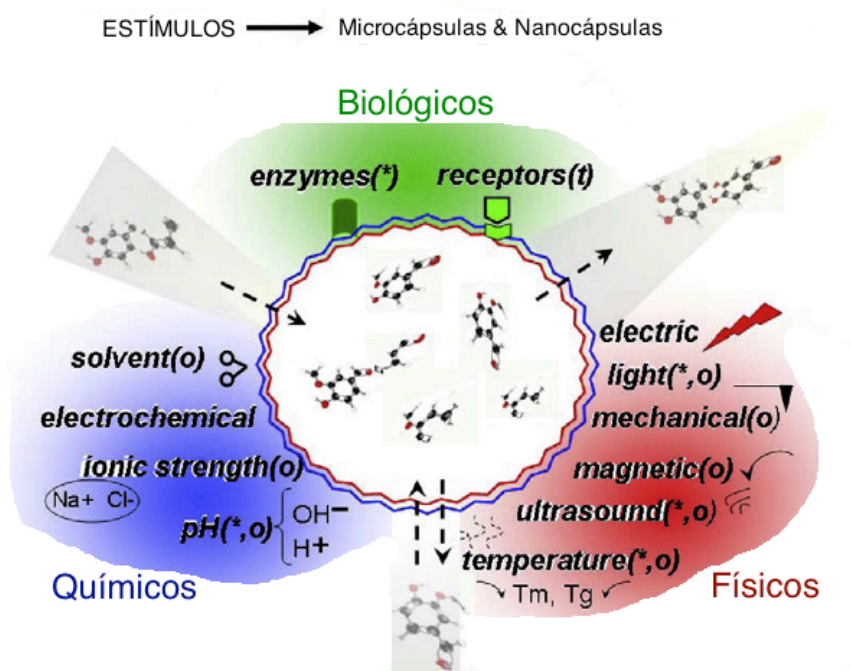


Figura 19 - Ilustração esquemática de estímulos que podem afetar a permeabilidade das cápsulas (adaptada de Delcea *et al.*, 2011).

Como já foi atrás referido a natureza poliiônica das cápsulas de polieletrólitos torna-as sensíveis à força iônica e pH. Assim, quando se altera o pH do meio, a densidade de carga dos polieletrólitos individuais é também alterada. Ao alterar o equilíbrio de carga entre as forças atrativas e repulsivas nos polieletrólitos, induz-se um rearranjo da estrutura da membrana, conduzindo muitas vezes a permeabilidade aumentada ou diminuída da mesma. No entanto as alterações no pH e da força iônica são muito comuns em tecidos vivos, o que pode frequentemente não ser suficiente para promover grandes alterações na estrutura da cápsula, a fim de induzir a liberação de compostos encapsulados (De Koker *et al.*, 2011).

A blindagem eletrostática com cloreto de sódio tem sido estudada como possível impulso para a desmontagem imediata de cápsulas de multicamadas. As concentrações de sal necessárias para levar à desmontagem são muitas vezes elevadas e resultam numa imediata, e por vezes indesejável liberação do conteúdo (De Villiers *et al.*, 2011). Mas também a presença de metabolitos, como a glucose, pode ser usada para a liberação de insulina no tratamento de pacientes com diabetes mellitus (De Koker *et al.*, 2011).

No entanto, através da incorporação de polieletrólitos biodegradáveis, e não biodegradáveis na estrutura de camadas múltiplas, a desmontagem lenta e controlada sob condições fisiológicas é alcançável (De Villiers *et al.*, 2011).

Além de se utilizar mecanismos naturais, vários sistemas estão sob investigação onde fontes físicas de estímulos externos, tais como a luz de laser, ultrassons e o campo magnético têm sido utilizados para desencadear liberação a partir de cápsulas de polieletrólitos. A liberação intracelular desencadeada pelo uso de laser demonstrou ser exequível em células cultivadas *in vitro*, mas até agora nenhuma aplicação terapêutica foi relatada (De Koker *et al.*, 2011).

Por exemplo, utilizando cápsulas de partículas modificadas com Fe_3O_4 foi observada *in vitro* uma acumulação específica, e elevada concentração local, das cápsulas ao longo de um gradiente de campo magnético e a sua internalização pelas células do cancro da mama. Adicionalmente, através da incorporação de ouro, prata ou nanopartículas magnéticas nas paredes da cápsula, a liberação de moléculas de fármaco encapsuladas

pode ser conseguida por exposição a um gatilho físico externo, tal como ondas sonoras ou estímulo electromagnético (Figura 20) (Loretta *et al.*, 2010).

Koo e colaboradores prepararam cápsulas LbL com paredes contendo geradores de foto ácidos, que as tornam opticamente disponíveis. A exposição à luz UV induz a ativação dos geradores fotoácidos e a liberação de protões das cápsulas. A diminuição do pH da solução das cápsulas provocou um aumento das mesmas. A abertura e fecho destas pode ser realizada por repetição alternada de exposição à luz UV e lavagem com água neutra. Além disso, a exposição UV prolongada levou à decomposição das cápsulas, e consequente libertação rápida do seu interior (Koo *et al.*, 2010).

Vancso *et al.* (*cit. in* Ariga *et al.*, 2011) desenvolveram cápsulas de polieletrólitos organometálicos, compostos de polianiões e policatiões de poli (ferrocenilsilano), o que torna possível o controlo da permeabilidade da parede variando o estado redox, e isto deve-se essencialmente à incorporação de poli (ferrocenilsilano) nas paredes (*cit. in* Ariga *et al.*, 2011).

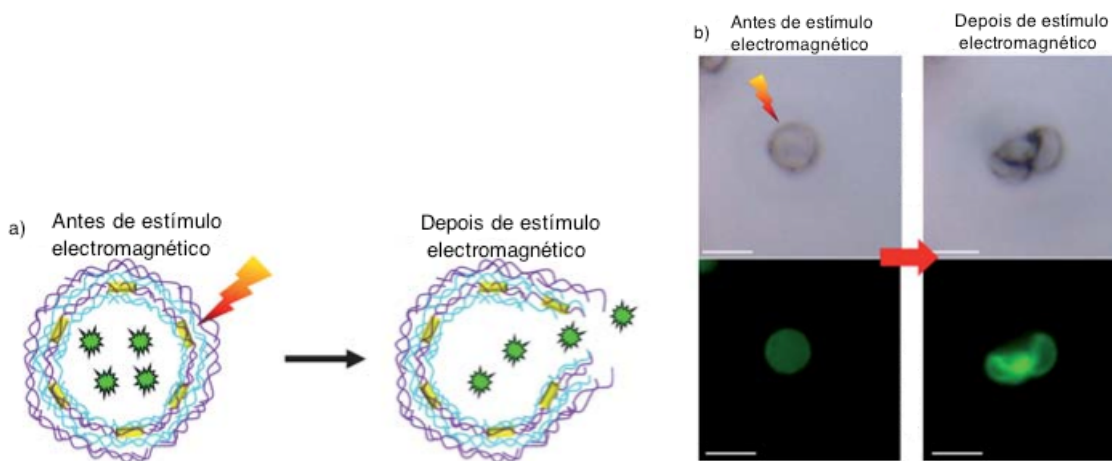


Figura 20 - Abertura através de um estímulo eletromagnético de cápsulas carregadas com FITC (Isotiocianato de fluoresceína)-dextrano e multicamadas de $(PSS/PAH)_3(PSS/AuNRs)(PAH/PSS)_2$. a) Representação esquemática; b) efeito de irradiação com laser infravermelho (830 nm); (adaptada de Loretta *et al.*, 2010).

IV. Utilização das nanocápsulas para a liberação controlada de fármacos

Nos dias que correm, existe um grande número de compostos ativos comercializados que servem para prevenção e tratamento de doenças, mas cuja ação terapêutica tem curta duração, o que obriga a uma toma repetida da dose pelo paciente, fazendo com que haja grandes variações das concentrações plasmáticas dos fármacos, e assim a concentração pretendida de fármaco seja apenas alcançada durante um curto período de tempo (Figura 21). Pelo método de liberação controlada, a concentração terapêutica eficaz pode ser alcançada na circulação sistêmica durante um período prolongado de tempo, conseguindo assim uma melhor adesão do paciente (Modi *et al.*, 2011, Rajput *et al.*, 2012). Além disso, grande parte destes compostos causam efeitos secundários, ou têm que ser administrados num ambiente clínico. Desta forma, e com o objetivo de obter concentrações plasmáticas desejáveis, têm-se procurado desenvolver sistemas de liberação modificada para novos compostos mas também melhorar os já existentes.

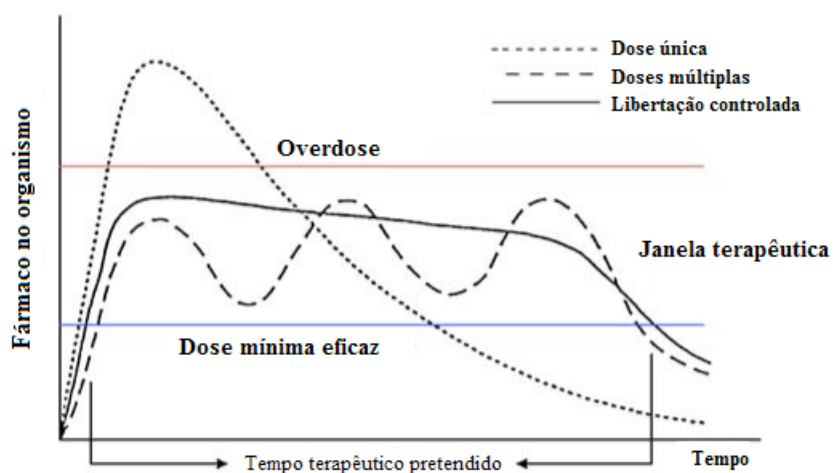


Figura 21 - Esquema do efeito da concentração dos fármacos no organismo quando utilizam diferentes métodos de administração (adaptada de Coelho *et al.*, 2010).

O grande objetivo na conceção destes sistemas de entrega controlada ou sustentada é reduzir a frequência de dosagem, e aumentar a eficácia do princípio ativo, através da entrega uniforme de fármaco no local específico de ação (Gil *et al.*, 2008). Um sistema de entrega ideal seria a administração de uma única dose, que tivesse uma duração de dias ou semanas, no tratamento de uma infeção por exemplo, ou para toda a vida do paciente, na hipertensão ou diabetes. Além disso, a entrega deve ser feita diretamente

para o local de ação, minimizando, ou eliminando por completo, os efeitos secundários, o que pode necessitar que o veículo faça o reconhecimento de receptores específicos, ou a localização de células e/ou áreas específicas do corpo. Como é evidente, este sistema de entrega ideal terá requisitos variáveis para os diferentes estados de doença e diferentes fármacos. Em suma, o objetivo será entregar o agente terapêutico num local específico durante um período de tempo também específico. Atualmente é possível alcançar apenas parcialmente esses dois objetivos com a maioria dos sistemas de entrega de fármacos (Modi *et al.*, 2011, Rajput *et al.*, 2012).

Qualquer veículo de entrega deve ser concebido tendo em conta dois aspetos: em primeiro lugar, deve iludir o sistema imunitário e atingir o tecido ou órgão desejado, e depois ele deve vencer barreiras celulares internas de modo que atinja o local de ação. Todos os componentes devem, eventualmente, ser aprovados pelos organismos reguladores para uso em seres humanos. Assim, os polímeros devem ter uma toxicidade mínima, e serem eficientemente removidos do corpo sem acumulação. Além disso, o dispositivo deve conter um mecanismo para a liberação dos fármacos encapsulados (Ariga *et al.*, 2011).

Os sistemas de liberação controlada têm como grande objetivo melhorar a eficácia da terapia medicamentosa, e como tal, modificam certos parâmetros dos medicamentos, como por exemplo o perfil de liberação, a sua distribuição no organismo, clearance e estabilidade, entre outros, o que leva a que tanto a farmacocinética e a farmacodinâmica do fármaco possam ser modificadas por estas formulações (Vilar *et al.*, 2012).

Antevê-se que as nanoestruturas para liberação controlada possam oferecer inúmeras vantagens em relação às formas de dosagem convencionais, uma vez que podem aumentar a atividade terapêutica dos fármacos, e ao mesmo tempo, reduzir os seus efeitos secundários, reduzindo assim o número de doses necessárias durante o tratamento, além disso têm a capacidade de fazer a entrega em locais específicos e durante períodos de tempo desejáveis, o que pode ser benéfico quando a composição natural do fármaco causa graves efeitos laterais, devido à sua interação com outros tecidos, e quando por distribuição natural o fármaco não atinge o seu local de ação por sofrer degradação (Modi *et al.*, 2011, Vilar *et al.*, 2012).

Para além das vantagens já descritas como transportadores de substâncias ativas, as nanocápsulas têm também a vantagem de possuir alta eficiência de encapsulação do fármaco, devido à solubilidade do fármaco no núcleo otimizado, baixo teor de excipiente em comparação com outras formas farmacêuticas, proteção da substância incorporada através do invólucro polimérico contra fatores de degradação tais como pH e luz, e a redução da irritação do tecido, também devido ao invólucro polimérico (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Outra grande vantagem das nanocápsulas é poderem ser injetadas diretamente para a circulação sistémica ou de um determinado compartimento do corpo, devido ao seu tamanho relativamente pequeno, o que permite uma elevada concentração local de fármaco (Coelho *et al.*, 2010). Mas podem também ser adaptadas para vias de administração alternativas, tais como a inalação, administração tópica, intra-ocular, oral, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea e cutânea (Coelho *et al.*, 2010, Gelperina *et al.*, 2005, Guterres *et al.*, 2007).

Os primeiros estudos com vista à utilização de cápsulas obtidas por LbL para veicular fármacos foram realizados por Qiu *et al.* (2001) que encapsularam com sucesso microcristais de ibuprofeno com 5-45 μm usando polieletrólitos sintéticos e polissacarídeos, no entanto, o prolongamento da liberação foi mínimo (Qiu *et al.*, 2001).

Ai *et al.* (2003) descobriram que a taxa de liberação de microcristais de furosemida de 5 μm revestidos com poli (cloreto de dialildimetilamónio) (PDADMAC), PSS e gelatina foi reduzida entre 50-300 vezes, em comparação com furosemida livre, quando o número de camadas atingiu as 16 camadas, e com uma espessura de 115 nm (Ai *et al.*, 2003).

Balabushevich e colaboradores encapsularam uma peroxidase que foi libertada de cápsulas de sulfato de dextrano e protamina, durante 1 hora por alteração do pH (Balabushevich *et al.*, 2003), e mais tarde, Caruso e colaboradores reportaram a liberação de uma catalase a partir de cápsulas de PLL e poli (ácido L-glutâmico) (PGA), no intervalo de 30 minutos por alterações do pH e da força iónica (Yu *et al.*, 2005).

No ano seguinte Itoh e colaboradores relataram um novo sistema de liberação controlada, em que as proteínas encapsuladas foram libertadas durante um longo período de tempo, por degradação enzimática das membranas da cápsula (Figura 17). Usaram isotiocianato-albumina marcado com fluoresceína (FITC-albumina) como proteína modelo, em cápsulas LbL de CS/DS, e sílica mesoporosa (MS) como modelo para incorporar as proteínas nas cápsulas (Itoh *et al.*, 2006) (Figura 22).

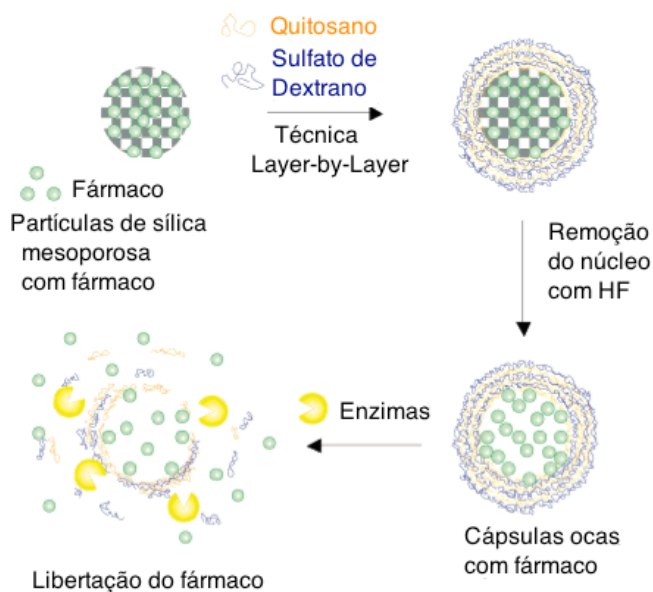


Figura 22 - Ilustração esquemática descrevendo a preparação de cápsulas ocas biodegradáveis e do sistema de liberação do fármaco encapsulado através de degradação enzimática (adaptada de Itoh *et al.*, 2006).

Bhadra *et al.* (2004) desenvolveram um sistema bioadesivo para entrega controlada de cloridrato de ciprofloxacina no “cul-de-sac” dos olhos de coelhos durante um período prolongado. Para isso, tanto fosfato de cálcio coloidal, como glóbulos vermelhos imobilizados com gluteraldeído foram usados como núcleo das nanocápsulas, onde camadas sucessivas de alginato e cloridrato de polialilamina foram depositadas alternadamente, até às 10 camadas. Posteriormente as cápsulas foram carregadas com a ciprofloxacina e os núcleos removidos. Após uma série de testes, verificaram que o processo de remoção do núcleo teve efeitos mínimos sobre a carga de fármaco das cápsulas, mas obtiveram maior taxa de carregamento com as cápsulas de glóbulos vermelhos e conseqüente menor taxa de liberação em comparação com as cápsulas de fosfato de cálcio. Testes revelaram que as cápsulas assim obtidas não eram irritantes

para a córnea. Concluíram então que as cápsulas eram passíveis de fazer a entrega da ciprofloxacina no local específico, e por um período prolongado de tempo, mas também com base em estudos de retenção na córnea e da concentração do fármaco nas lágrimas, as cápsulas podiam ser consideradas para uso seguro e adequado na entrega controlada ocular, apesar de mais estudos em animais e ensaios clínicos serem necessários para comprovar a eficácia em humanos (Bhadra *et al.*, 2004).

Raichur e seus colaboradores investigaram o encapsulamento e a liberação do fármaco antituberculoso, rifampicina (Figura 23) utilizando microcápsulas LbL formadas por pontes de hidrogénio de poli (vinilpirrolidona) (PVP) e PMA. Os estudos de liberação revelaram que a liberação máxima ocorreu acima de pH 7 e consequente desintegração das cápsulas. A rifampicina libertada pelas cápsulas manifestou a mesma eficácia que o fármaco utilizado na forma livre, o que indica que as propriedades do fármaco não foram alteradas pelo processo de encapsulamento e liberação (Kumar *et al.*, 2009).

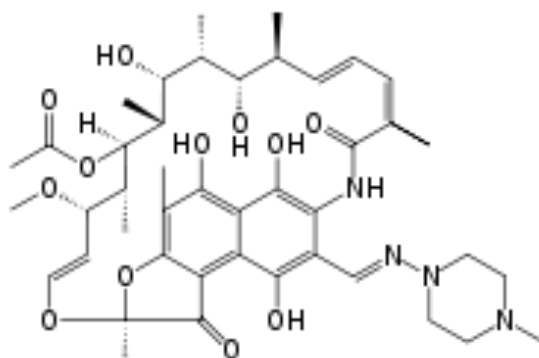


Figura 23 - Fórmula de estrutura da rifampicina.

Chen *et al.* (2009) encapsularam cristais do fármaco antimalárico artemisinina (Figuras 24), e que está ser estudado também para o tratamento do cancro, com CS, gelatina, e ALG através da técnica LbL. A velocidade de liberação da artemisinina foi ajustada pela variação de certos parâmetros, tais como o tipo de polieletrólito, número de camadas de polieletrólitos, a concentração de NaCl e a concentração de etanol na solução de polieletrólito (Chen *et al.*, 2009).

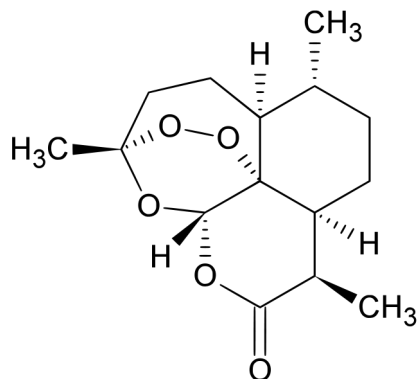


Figura 24 - Fórmula de estrutura da artemisinina.

Zhao *et al.* (2007) relataram o carregamento do fármaco antibacteriano doxorrubicina (Figura 25), amplamente utilizado no tratamento cancro, em microcápsulas LbL pré-formadas, e a sua aplicação no tratamento do tumor numa cultura celular *in vitro*, e em experiências com animais *in vivo*. As cápsulas LbL continham carboximetilcelulose (CMC) carregada negativamente e exibiram uma forte tendência para acumular a doxorrubicina carregada positivamente. O fármaco encapsulado de forma eficaz induziu a apoptose das células tumorais HepG2 durante as experiências *in vitro*, e confirmou a aplicabilidade das microcápsulas na entrega de fármacos e o tratamento do cancro em animais (Zhao *et al.*, 2007).

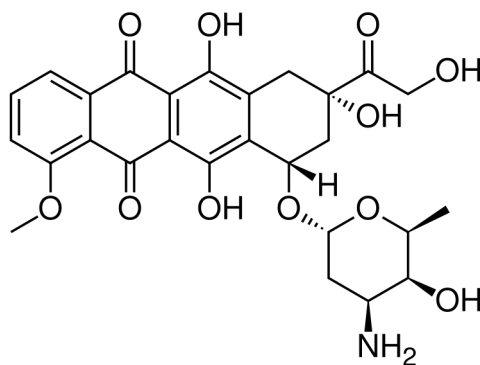


Figura 25 - Fórmula de estrutura da doxorrubicina.

Liu e colaboradores também sintetizaram microcápsulas LbL de PAH/PSS utilizando como modelo microesferas de alginato magnético, onde, depois da dissolução parcial do núcleo, foi introduzida doxorrubicina (Figura 26). A aplicação de um campo magnético de alta frequência acelerou significativamente a liberação do princípio ativo a partir das cápsulas, e estas exibiram citotoxicidade significativamente menor em concentrações

elevadas de fármaco, quando comparado com a doxorrubicina na forma livre (Liu *et al.*, 2010).

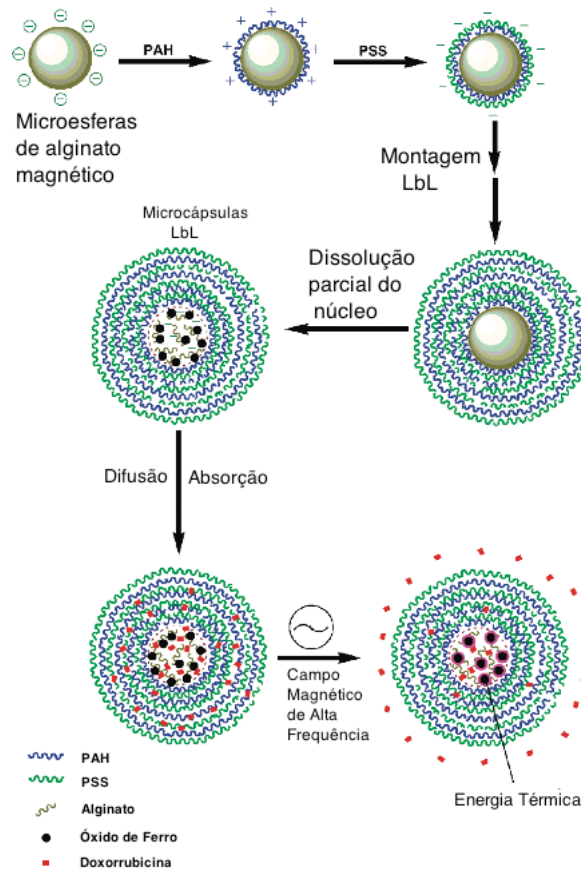


Figura 26 - Ilustração esquemática do processo LbL de cápsulas multicamadas de polieletrólitos PAH/PSS, carregamento com doxorrubicina e liberação *in vitro* com aplicação de um campo magnético de alta frequência (adaptada de Liu *et al.*, 2010).

Mais recentemente, Raichur e o seu grupo propuseram um novo sistema de nanocápsulas de polieletrólito composto por CS e heparina (HP), através da técnica camada-a-camada em nanopartículas de sílica, seguido da dissolução do núcleo de sílica, e conseqüente carregamento com doxorrubicina obtendo uma eficiência de 89% (Figura 27). As cápsulas foram caracterizadas por várias técnicas, que provaram conclusivamente a biocompatibilidade do sistema. Além disso observou-se que as cápsulas carregadas com doxorrubicina tiveram biodistribuição muito melhorada em oposição a doxorrubicina livre (Figura 28). Esta propriedade irá desempenhar um papel significativo na redução drástica dos efeitos adversos que estão atualmente associados ao uso dos fármacos na sua forma livre (Thomas *et al.*, 2013).

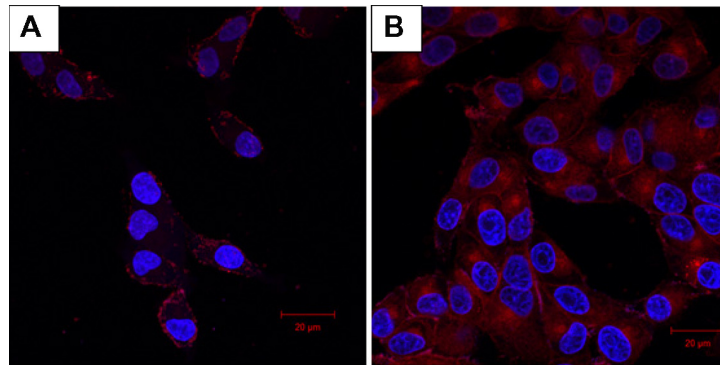


Figura 27 - (A) Imagem confocal de nanocápsulas CS-HP carregadas com doxorubicina mostra as nanocápsulas localizados na membrana celular como pontos após 1 hora. (B) imagem confocal de doxorubicina livre 1 hora depois mostra que ela foi distribuída uniformemente (adaptada de Thomas *et al.*, 2013).

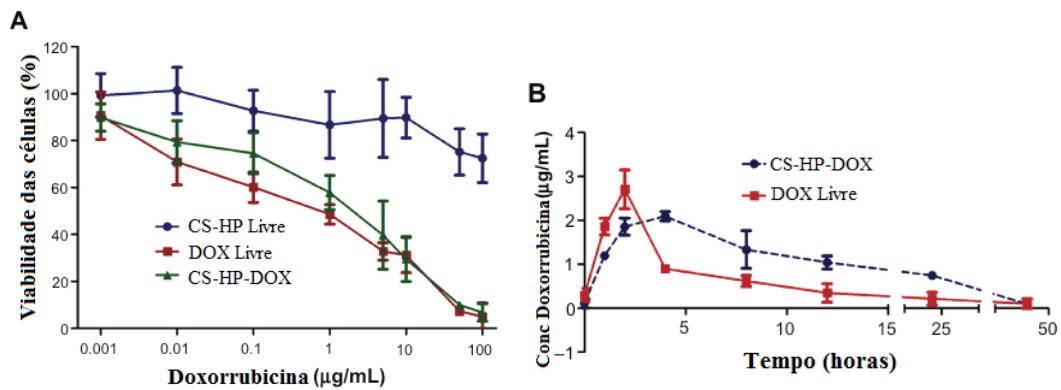


Figura 28 - (A) Ensaio de MTT para avaliação citotóxica em células MCF-7, onde o efeito de citotoxicidade de diferentes concentrações de cápsulas vazias (CS-HP livre), carregadas com doxorubicina (CS-HP-DOX) e doxorubicina na forma livre foram medidas. (B) Estudos de biodistribuição feitos por injeção de uma dose única de 10 mg/kg de doxorubicina sob a forma livre (DOX) e encapsulada (CS-HP-DOX), onde o soro foi coletado em diferentes períodos de tempo e medida a concentração de doxorubicina (adaptada de Thomas *et al.*, 2013).

De Geest e colaboradores encapsularam um pró-fármaco inativo com fluorescência marcada em cápsulas biodegradáveis LbL PSS/PAH e DS/poli (L-arginina) (PA). Após a absorção da cápsula por células vivas, as suas paredes foram ativamente degradadas e digeridas por proteases intracelulares. A degradação das paredes inibe as proteases intracelulares de atingirem o conteúdo das cápsulas. A fragmentação enzimática das proteínas com fluorescência marcada originou péptidos com fluorescência individuais. Neste caso, apenas o pró-fármaco que atingiu as células foi ativado, aquele que ficou no ambiente extracelular não (Rivera-Gil *et al.*, 2009).

Caruso e colaboradores relataram uma nova classe de cápsulas de polímeros de hidrogel baseada em ligações de dissulfureto de poli (ácido metacrílico), preparada através da montagem LbL com poli (vinilpirrolidona). As ligações de dissulfureto proporcionaram ótima predisposição para a degradação, que foi iniciada pela concentração celular de glutathione. Eles também usaram cápsulas de polímeros biodegradáveis como veículos para a entrega de antígenos oligopéptidos para células com receptores de antígeno. Sequências de oligopéptidos foram primeiro ligadas covalentemente a um transportador de polímero carregado negativamente, que foi adsorvido em partículas de sílica ao qual se adicionou posteriormente um grupo amino. A partícula revestida com os peptídeos foi usada como um modelo para a montagem de PMA e PVP. A remoção do núcleo de sílica e rompimento da ligação de hidrogênio entre os polímeros resultou em cápsulas de dissulfureto. Um redutor natural, glutathione, poderia induzir a clivagem das ligações de dissulfureto, causando a liberação do péptido a partir das microcápsulas (Becker *et al.*, 2009). Na Tabela 1 apresenta-se um resumo dos estudos feitos com nanocápsulas LbL visando a sua utilização na liberação controlada de fármacos.

Tabela 1 - Resumo de fármacos já estudados com vista a serem veiculados através de nanocápsulas obtidas por LbL.

Classe de fármacos	Princípio ativo	Tipo de cápsula	Referência
Anti-inflamatórios	Ibuprofeno	(CS/DS), (CS/CMC) e (CS/ALG) diretamente sobre microcristais de ibuprofeno.	(Qiu <i>et al.</i> , 2001)
Anti-hipertensores	Furosemida	(PDDA/PSS)/(PSS/gelatina) diretamente sobre microcristais de furosemida.	(Ai <i>et al.</i> , 2003)
Antibacterianos	Ciprofloxacina	(ALG/PAH) sobre fosfato de cálcio coloidal e/ou glóbulos vermelhos imobilizados com gluteraldeído e consequente remoção do núcleo.	(Bhadra <i>et al.</i> , 2004)
Anti-inflamatórios	Ibuprofeno	(HSA/DMPA) diretamente sobre microcristais de ibuprofeno.	(An <i>et al.</i> , 2004)

Tabela 1 – Resumo de fármacos já estudados com vista a serem veiculados através de nanocápsulas obtidas por LbL (cont.).

Classe de fármacos	Princípio ativo	Tipo de cápsula	Referência
Corticosteróides	Dexametasona	(PAH/PSS) diretamente sobre nanopartículas de dexametasona.	(Zahr <i>et al.</i> , 2005)
Anti-inflamatórios	Indometacina	(PDADMAC/PSS) diretamente sobre microcristais de indometacina.	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
Anti-inflamatórios	Indometacina	(CS/ALG) diretamente sobre microcristais de indometacina.	(Ye <i>et al.</i> , 2005)
Hormonas sexuais	2-Metoxiestradiol	(DEX/DS) diretamente sobre microcristais de 2-metoxiestradiol.	(Shi <i>et al.</i> , 2006)
Corticosteróides	Dexametasona	(PDDA/PSS)/PDDA, (PDDA/gelatina A)/PDDA, (PDDA/gelatina B)/PDDA e PDDA/(PSS/gelatina A) / (PSS/PDDA) diretamente sobre micropartículas de dexametasona.	(Pargaonkar <i>et al.</i> , 2005)
Antidiabéticos	Insulina	(CS/ALG) sobre micropartículas MF e consequente remoção do núcleo.	(Ye <i>et al.</i> , 2006)
Antibacterianos	Daunorrubicina	(PAH/PSS) sobre partículas de CaCO ₃ -PSS e consequente remoção do CaCO ₃ .	(Zhao <i>et al.</i> , 2006)
Antibacterianos	Doxorrubicina	(PAH/PSS) sobre partículas de CaCO ₃ -PSS e consequente remoção do CaCO ₃ .	(Zhao <i>et al.</i> , 2006)
Antidiabéticos	Insulina	(PMLA/WSC) sobre nanoagregados de insulina.	(Fan <i>et al.</i> , 2006)
Antibacterianos	Doxorrubicina	(CS/ALG) sobre partículas de CaCO ₃ -CMC seguido de ligação cruzada com glutaraldeído e consequente remoção do CaCO ₃ .	(Zhao <i>et al.</i> , 2007)

Tabela 1 – Resumo de fármacos já estudados com vista a serem veiculados através de nanocápsulas obtidas por LbL (cont.).

Classe de fármacos	Princípio ativo	Tipo de cápsula	Referência
Antivíricos	Aciclovir	(PGEDMC/PSS) diretamente sobre microcristais de ACV. PGEDMC com ramificações de galactose, que podiam ser especificamente reconhecidas por recetores de galactose ligados à membrana (ASGPR).	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
Antibacterianos	Rifampicina	(PVP/PMAA) sobre partículas de sílica com consequente remoção da sílica e carregamento com rifampicina.	(Kumar <i>et al.</i> , 2009)
Antiparasitários	Artemisinina	(gelatina/ALG) e (CHI/ALG) diretamente sobre microcristais de artemisinina.	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
Antibacterianos	Doxorrubicina	(PAH/PSS) sobre microesferas de alginato magnético com consequente dissolução parcial do núcleo e carregamento com doxorrubicina.	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Corticosteróides	Hidrocortisona	(Insulina/ALG) diretamente sobre cristais de hidrocortisona.	(Zhao <i>et al.</i> , 2010)
Antibacterianos	Ciprofloxacina	(PAH/PMA) sobre CaCO ₃ -PSS com consequente remoção do CaCO ₃ e carregamento com ciprofloxacina.	(Anandhakumar <i>et al.</i> , 2011)
Antineoplásicos	Lapatinib e Paclitaxel	(CHI/ALG) sobre partículas de PTX e consequente adição de Lapatinib/ALG formando cápsulas PTX/(CHI/ALG)/Lapatinib/ALG.	(Vergara <i>et al.</i> , 2012)
Antineoplásicos	Cisplatina	(PLL-Pt(IV)/PGA) sobre esferas de sílica com consequente remoção da sílica.	(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
Antibacterianos	Doxorrubicina	(CS/HP) sobre partículas de sílica com consequente remoção da sílica e carregamento com doxorrubicina.	(Thomas <i>et al.</i> , 2013)

V. Comparação das nanocápsulas obtidas por automontagem eletrostática com nanocápsulas produzidas por outros métodos

Para além do método camada-por-camada com base em interações eletrostáticas, objeto deste trabalho, existem mais métodos clássicos com grande relevância na preparação de nanocápsulas nomeadamente a nanoprecipitação, a emulsão-difusão, a dupla emulsão, a emulsão-coacervação e o revestimento de polímeros. Outros métodos menos relevantes são a emulsão-evaporação, e algumas metodologias na preparação de lipossomas à base de polímeros. Na Tabela 2 apresenta-se uma breve análise comparativa destes métodos.

Tabela 2 - Análise comparativa de alguns métodos utilizados para produção de nanocápsulas para utilização na liberação controlada de fármacos tendo em conta estudos feitos e informações sobre nanoencapsulação disponíveis em bases de dados. A maior parte destas pesquisas foram feitas em escala laboratorial (adaptada de Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Critérios	Nanoprecipitação	Emulsão -Difusão	Dupla Emulsão	Emulsão- Coacervação	Revesti- mento de polímeros	Layer-by- Layer
Natureza da substância ativa	Núcleo oleoso: lipofílico	Núcleo oleoso: lipofílico	Núcleo aquoso: hidrofílico	Núcleo oleoso: lipofílico	Núcleo oleoso: lipofílico	Núcleo oleoso: lipofílico Núcleo sólido: sólido
Estabilidade da substância ativa	Elevada	Elevada	Desnaturação das proteínas por alta taxa de cisalhamento	Elevada	Elevada	Elevada
Natureza do solvente	Class 3	Class 3	Class 3/Class 2	Class 3	Class 3	Não necessário
Volume de água consumido	Moderado	Elevado	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Viabilidade do método	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada

Tabela 2 - Análise comparativa de alguns métodos utilizados para produção de nanocápsulas para utilização na liberação controlada de fármacos tendo em conta estudos feitos e informações sobre nanoencapsulação disponíveis em bases de dados. A maior parte destas pesquisas foram feitas em escala laboratorial. (adaptada de Mora-Huertas *et al.*, 2010) (cont.)

Critérios	Nanoprecipitação	Emulsão -Difusão	Dupla Emulsão	Emulsão- Coacer- vação	Revesti- mento de polímeros	Layer-by- Layer
Formação de contami- nantes	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado	Baixo	Baixo
Passos de purificação	Baixo	Baixo	Baixo	Elevado	Moderado	Moderado
Consumo de tempo	Elevado	Moderado	Baixo	Moderado	Referências não disponíveis	Referências não disponíveis

Como se pode observar, não há nenhum método ideal porque cada um tem as suas vantagens e limitações. Em termos gerais, por exemplo, todos os métodos permitem o encapsulamento de substâncias ativas lipofílicas, excluindo o método de emulsão dupla, uma vez que foi desenvolvido para substâncias ativas hidrófilas, tais como proteínas. Na sua maioria, todos os procedimentos podem ser usados com solventes de baixo potencial tóxico e sem a adição de outras substâncias químicas de forma a permitir uma purificação fácil. Em termos de consumo de água, o método emulsão-difusão, é o mais desvantajoso, mas no entanto, esta condição representa uma vantagem em relação aos passos de purificação. Quanto à viabilidade e consumo de tempo, só é possível fazer uma aproximação experimental, tendo em conta as escalas laboratorial e piloto. Em princípio, todos os métodos são praticáveis em grande escala, e como é lógico, algumas dificuldades são previsíveis na sua implementação à escala industrial. No entanto, uma vez que o tempo para a preparação de montagem é aproximadamente a mesma para todos os métodos, a nanoprecipitação, uma vez que requer a adição lenta da fase orgânica, é menos favorável em termos de tempo despendido (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Mas apesar das desvantagens do método e as limitações mencionadas acima, e tendo em conta a revisão geral das informações disponíveis na literatura científica, o método da nanoprecipitação de Fessi *et al.* (1988) é o mais utilizado devido à simplicidade do seu procedimento, baixo custo, tamanho de suporte reprodutível, e alta eficiência de encapsulação. Aproximadamente 50% das pesquisas foram desenvolvidas em consonância com este método, seguido por emulsão-difusão e dupla emulsão. No entanto, é importante ter em conta que, se o objetivo da investigação é o encapsulamento de moléculas hidrossolúveis, o método preferido é o dupla emulsão (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

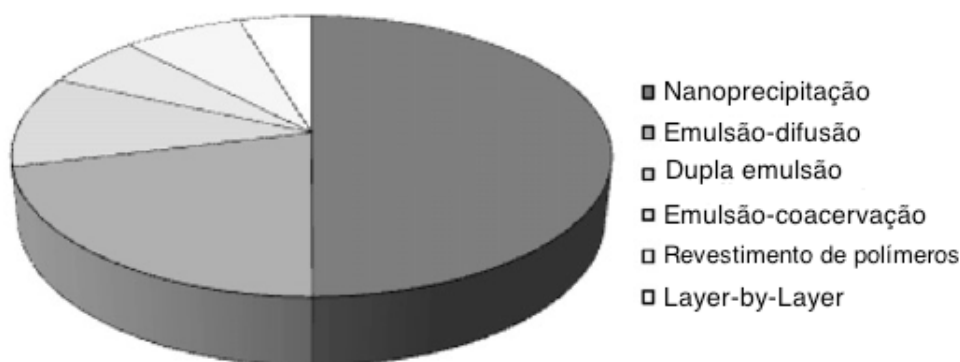


Figura 29 - Tendências de seleção do método de produção das nanocápsulas (adaptada de Mora-Huertas *et al.*, 2010).

A emulsão-coacervação foi historicamente a primeira aproximação metodológica para a preparação de nanocápsulas através da pesquisa feita por Krause e Rohdewald (1985), na nanoencapsulação de acetonido de triancinolona utilizando gelatina como polímero. No entanto, este método requer um processo de purificação exaustivo, devido à sua inerente geração de contaminantes na dispersão de nanocápsulas, que é uma grande desvantagem em comparação com outras alternativas (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Quanto as estratégias de nanoencapsulação tais como revestimento de polímeros e a técnica de camada-por-camada, têm mostrado resultados interessantes particularmente em relação ao comportamento das nanocápsulas *in vivo* (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

VI. Outros tipos de nanoestruturas estudadas com vista a servirem de veículo para fármacos

Este trabalho não poderia dar-se como concluído se não fosse feita referência, ainda que breve, aos outros tipos de nanoestruturas têm sido investigadas para utilização na libertação controlada de princípios ativos. Para além das nanocápsulas a libertação controlada de princípios ativos tem sido estudada utilizando nanopartículas poliméricas, os lipossomas, os dendrímeros, as nanopartículas lipídicas sólidas, as micelas, nanoemulsões, nanopartículas cerâmicas, nanopartículas metálicas e os nanomateriais de carbono (Figura 30). Far-se-á de seguida uma breve descrição de cada um destes tipos de sistemas.

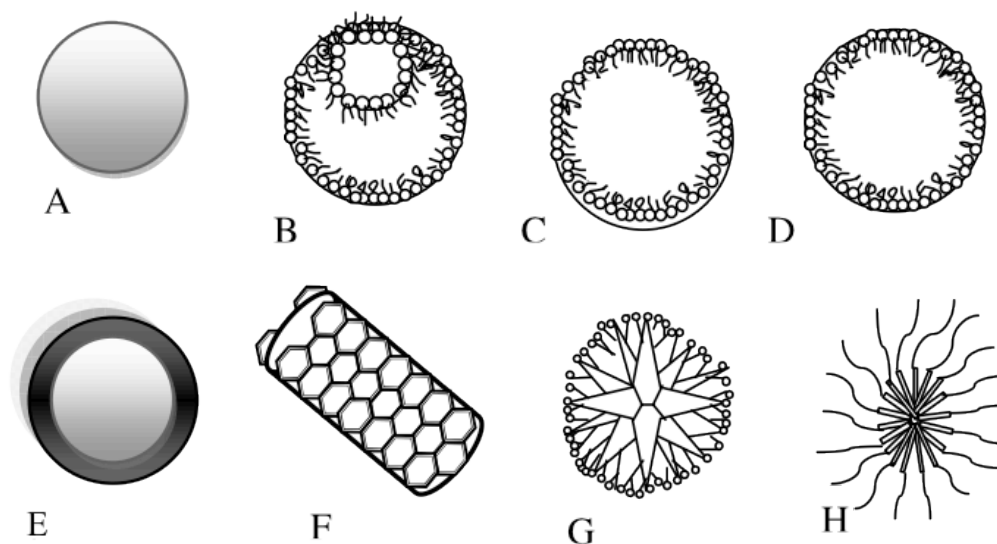


Figura 30 - Ilustração esquemática de algumas nanoestruturas A) nanopartículas poliméricas esféricas; B) lipossomas; C) nanopartículas lipídicas sólidas; D) nanoemulsões; E) nanocápsulas; F) nanotubos de carbono; G) dendrímero; H) micela polimérica; (adaptada de Ocheke *et al.*, 2009b).

As nanopartículas poliméricas são partículas sólidas coloidais, com uma gama de tamanhos de 10 a 1000 nm, e podem ser estruturas esféricas, ramificadas ou em concha. O tamanho reduzido permite-lhes penetrar capilares para serem absorvidas pelas células, possibilitando a acumulação de fármacos em locais alvo e proporcionando a libertação sustentada do fármaco por longos períodos. Alguns polímeros usados no fabrico das nanopartículas incluem quitosano, alginato, albumina, gelatina, poliacrilatos,

policaprolactonas, poli (D, L-lactido-co-glicólido) e poli (D, L-lactido). Contudo, suscitam alguma preocupação relativamente à citotoxicidade de subprodutos resultantes da sua degradação (embora alguns, tais como polianidridos, se degradem em produtos que são biocompatíveis) e expansibilidade (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

Os lipossomas são pequenas vesículas artificiais (50 - 100 nm) desenvolvidos a partir de fosfolípidos tais como fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. As características dos lipossomas são determinadas conforme a escolha dos lípidos, a sua composição e método de preparação, o tamanho e a carga superficial. Têm sido aplicados como transportadores de fármacos, devido à sua capacidade de prevenir a degradação de fármacos, reduzir os efeitos secundários e os possuem ação localizada. Contudo, também possuem limitações incluindo a baixa eficiência de encapsulação, o vazamento rápido de fármacos solúveis em água na presença de componentes do sangue e baixa estabilidade no armazenamento (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são nanoestruturas feitas a partir de lípidos sólidos, tais como behenato de glicerol (compritol), triglicéridos esteáricos (triestearina), palmitato de cetilo e glicerol de tripalmitato (tripalmitina) com uma gama de tamanhos de 50 e 1000 nm. Utilizam lípidos bem tolerados pelo organismo, e a produção em grande escala é eficaz e simples, utilizando homogeneização a alta pressão. Têm boa tolerabilidade, atuam no local específico, possuem estabilidade (proporcionada por surfatantes e polímeros), proporcionam a liberação controlada de fármacos e proteção dos mesmos contra a degradação. Têm sido estudadas e desenvolvidas para serem administradas por via parenteral, cutânea, ocular, oral, pulmonar e retal. No entanto, caracterizam-se negativamente pelo carregamento e expulsão insuficientes e elevado teor de água nas dispersões. Para superar estas limitações, foram produzidas novas estruturas compostas por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos à temperatura ambiente, as NLC's que são transportadores lipídicos nanoestruturados. Estes sistemas apresentam alta eficiência de encapsulação e capacidade de carga, devido à formação de uma matriz lipídica menos ordenada. Apresentam estabilidade a longo prazo, com liberação controlada e sem efeito de

rebetamento. Estes transportadores coloidais têm emergido como uma alternativa potencial para outros sistemas coloidais como nanopartículas poliméricas recentes. (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

As nanoemulsões são misturas isotrópicas de óleo/água estabilizadas por surfactantes frequentemente em combinação com co-surfactantes. O seu tamanho pode variar entre 20 e 200 nm e apresentam alta solubilização, boas propriedades de dissolução e estabilidade termodinâmica. Por recurso a estabilizadores pode evitar-se a aglomeração de partículas e o vazamento de fármacos. São biodegradáveis, biocompatíveis, fáceis de produzir e utilizadas como veículos para fármacos lipofílicos que são mais propensos a hidrólise. São úteis como sistemas de liberação controlada por formação de um depósito através de injeção subcutânea. Tem sido referido na literatura que aumentam a absorção gastrointestinal, contudo podem provocar alguma irritação cutânea. (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

Os dendrímeros são nanoestruturas entre 1 a 100 nm (embora na sua maioria inferiores a 10 nm), e são altamente ramificados com um núcleo interior, produzidos a partir de macromoléculas como poliamidoamina, polipropilenoimina e poli (éter de arilo). A singularidade destas nanoestruturas deve-se à sua série de ramos, multivalência, peso molecular bem definido e estrutura globular com funcionalidade de superfície controlada, o que aumenta o seu potencial como veículos na entrega de fármacos. As estruturas globulares e a presença de cavidades internas, permitem que os fármacos sejam encapsulados no interior das macromoléculas podendo ser utilizados como agentes de revestimento para os proteger e entregar em locais específicos. Algumas das aplicações de entrega de fármacos incluem a utilização na terapêutica e diagnóstico para no tratamento do cancro, o aumento da solubilidade e permeabilidade, e entrega intracelular. Além disso podem ser utilizados por via oral, transdérmica, ocular e intravenosa, e têm mostrado que podem facilmente cruzar as barreiras celulares tanto pela via paracelular como transcelular. No entanto, estes sistemas não são totalmente seguros na liberação dos fármacos. (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

As micelas são as mais simples dos conjuntos moleculares, com tamanho inferior a 100 nm e possuem um núcleo interior hidrofóbico que permite a incorporação de fármacos fracamente solúveis em água e anfífilicos. O núcleo, por sua vez, está cercado por polímeros hidrofílicos tais como polietilenoglicol. As micelas poliméricas são capazes de alcançar as partes do corpo que são pouco acessíveis a lipossomas, e assim podem ser utilizadas para administração de agentes quimioterapêuticos de uma maneira controlada e orientada com concentração elevada nas células tumorais e efeitos secundários reduzidos. No entanto, a sua capacidade de segmentação é limitada devido à baixa dose de carga e baixa estabilidade na incorporação de fármacos, que causam a sua liberação antes de chegar ao local de ação. Em consequência, a manipulação dos parâmetros de produção e da conceção do núcleo interno podem melhorar a carga e a estabilidade na incorporação da mesma. Porções lipídicas, tais como colesterol e acil carnitinas, podem também ser empregues para conferir uma boa estabilidade às micelas poliméricas (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ocheke *et al.*, 2009b).

As nanopartículas cerâmicas são fabricadas a partir de partículas de compostos inorgânicos com características porosas, tais como sílica, alumina e óxido de titânio e possuem dimensões inferiores a 100 nm. Elas podem ser preparadas com o tamanho, forma e porosidade desejadas. Podem evitar a absorção pelo sistema reticuloendotelial como corpos estranhos, e protegem as moléculas tais como fármacos, proteínas e enzimas contra a desnaturação, pH e temperatura. São eficazes no transporte de proteínas e genes. No entanto, estas partículas não são biodegradáveis, e portanto, há preocupações de que possam acumular-se no corpo e provocar efeitos nocivos (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ocheke *et al.*, 2009b).

Nanopartículas metálicas incluem óxido de ferro, ouro, prata, gadolínio e níquel, que também têm sido estudadas para entrega de fármacos. O ouro apresenta propriedades óticas e químicas favoráveis em nanoescala para imagens biomédicas e aplicações terapêuticas. Além disso pode ser manipulado para obter o tamanho desejado, e a superfície pode também ser modificada com grupos funcionais diferentes para a transfecção de genes e para a entrega de proteínas e péptidos no núcleo da célula. O gadolínio tem sido estudado para a entrega em tecidos tumorais por modificação das nanopartículas com folato, tiamina e polietilenoglicol. As nanopartículas metálicas tem

uma área de superfície grande podendo assim incorporar uma alta dose de fármaco. Contudo, a toxicidade das nanopartículas metálicas traz algumas preocupações (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

Por fim, e mais recentemente começaram a ser estudados os nanomateriais de carbono, como os nanotubos de carbono que possuem elevada condutividade elétrica e excelente resistência, e os fulerenos que podem ser funcionalizados para a entrega de fármacos e biomoléculas através da membrana celular às mitocôndrias. No entanto, a toxicidade dos nanotubos de carbono é motivo de preocupação, uma vez que podem causar reações inflamatórias e fibróticas (Ariga *et al.*, 2011, Martinho *et al.*, 2011, Ochekepe *et al.*, 2009b).

VII. Desafios colocados às nanoestruturas como sistemas de entrega de fármacos

Apesar do sucesso inicial das nanoestruturas como alternativa no transporte e entrega de fármacos, ter sido evidenciado pelas várias investigações e também pelos sistemas de tamanho nano já existentes no mercado (Tabela 3), nem todas as abordagens encontraram o mesmo sucesso. Muitos dos novos nanomateriais que foram desenvolvidos depararam-se com desafios que foram resolvidos, ou estão a tentar ser superados através da modificação das suas características físico-químicas com o objetivo de melhorar as suas propriedades, como tempo de circulação no sangue, aumento da área de superfície funcional, a proteção dos fármacos contra a degradação, o atravessamento de barreiras biológicas e o direcionamento para o local específico de ação. Mas também um outro desafio importante é a produção em grande escala, uma vez que há sempre necessidade de ampliar as tecnologias de laboratório ou piloto para uma eventual comercialização, e alguns dos sistemas de liberação nano podem não ser passíveis de ser produzidos à escala industrial devido ao método que utilizam, processo de produção e elevado custo dos materiais utilizados, assim como manter o tamanho e a composição de nanomateriais em grande escala (Ochekpe *et al.*, 2009b).

Tabela 3 - Sistemas nano de administração de fármacos no mercado (adaptada de Ochekpe *et al.*, 2009b).

Tipo de nanoestrutura	Marca	Substância ativa	Indicação	Empresa
Nanopartículas Poliméricas	Adagen	Adenosina desaminase	Deficiência da enzima adenosina-desaminase (ADA)	Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA
	Onscaspar	L-asparaginase	Leucemia linfoblástica aguda	Enzon Pharmaceuticals Inc., NJ, USA
	Copaxone	Acetato de Glatiramer	Esclerose múltipla	Teva Pharmaceuticals, Tikva, Isreal
	Macugen	Pegaptanib Sódico	Degeneração macular relacionada com a idade neovascular	Nektar Therapeutics, San Carlos, CA, USA; OSI Pharmaceuticals, Melville, NY, USA

Tabela 3 - Sistemas nano de administração de fármacos no mercado (adaptada de Ochekepe *et al.*, 2009b) (cont.).

Tipo de nanoestrutura	Substância			Empresa
	Marca	ativa	Indicação	
	Pegasys	Interferão alfa-2a	Hepatite C	Nektar Therapeutics, CA, USA
	Neulasta	Pegfilgrastim	Neutopenia	Nektar Therapeutics, CA, USA; Amgen Inc, Thousand Oaks, CA, USA
	PEG-INTRON	Peginterferão alfa-2b	Hepatite C	Nektar therapeutics, CA, USA
	Somavert	Pegvisomant	Acromegalia	Nektar therapeutics, CA, USA
Lipossomas	Abelcet	Anfotericina B	Infeções fúngicas	Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA
	Depocyt	Cytarabine	Meningite linfomatosa	Enzon Pharmaceuticals Inc., NJ, USA
	AmBisome	Anfotericina B	Infeções fúngicas	Gilead Sciences Inc., Foster City, CA, USA
	Daunoxome	Daunorubicina	Sarcoma de Kaposi	Gilead Sciences Inc., CA, USA
	Myocet	Doxorrubicina	Cancro de mama avançado	Zeneus/Cephalon, Inc., Frazer, PA, USA
	Epaxal	Vírus inativado da hepatite	Hepatite A	Berna Biotech, Bern, Switzerland

Tabela 3 - Sistemas nano de administração de fármacos no mercado (adaptada de Ochekepe *et al.*, 2009b) (cont.).

Tipo de nanoestrutura	Substância			Empresa
Marca	ativa	Indicação		
Lipossomas	Inflexal V	Antigénio de superfície influenza inactivado	Gripe	Berna Biotech, Bern, Switzerland
	DepoDur	Morfina	Analgesia	EKR Therapeutics, Bedminster, NJ, USA
	Visudyne	Verteporfin	Degeneração macular relacionada à idade	QLT Inc., Vancouver, British Columbia, Canada; Novartis, Basel, Switzerland
	Doxil	Doxorrubicina	Cancro do ovário e sarcoma de Kaposi	Ortho Biotech, Bridgewater, NJ, USA
	Caelyx	Doxorrubicina	Cancro do ovário, sarcoma de Kaposi e cancro da mama	Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA
	Estrasorb	Estradiol	Menopausa	Novavax, Rockville, MD, USA
	Survanta	Beractanto (homogeneizado de pulmão bovino)	Síndrome de dificuldade respiratória	Abbott Laboratories, IL, USA
	Alveofact	Bovactanto (lavagem de pulmão bovino)	Síndrome de dificuldade respiratória	Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Germany
	Curosurf	Poractanto alfa (homogeneizado de pulmão porcino)	Síndrome de dificuldade respiratória	Chiesi Farmaceutici SpA, Parma, Italy

Tabela 3 - Sistemas nano de administração de fármacos no mercado (adaptada de Ocheke *et al.*, 2009b) (cont.).

Tipo de nanoestrutura	Substância			Empresa
	Marca	ativa	Indicação	
Micelas Poliméricas	Genexol-PM	Paclitaxel	Quimioterapia	Samyang Pharmaceutical, Daejeon City, Korea
	Rapamune	Sirolimus (Rapamicina)	Imunossupressor	Elan Corporation, Dublin, Ireland; Wyeth Pharmaceutical, Madison, NJ, USA
Fármacos nanocristalinos	Emend	Aprepitant	Antiemético	Elan Corporation, Dublin, Ireland; Merck and Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA
	Tricor	Fenofibrato	Hiperlipidemia	Elan Corporation, Dublin, Ireland; Abbott Labs, Illinois, USA
	Megace	Acetato de megestrol	Anorexia, Caquexia	Elan Corporation, Dublin, Ireland; Par Pharmaceuticals, Woodcliff Lake, NJ, USA
Nanopartículas proteicas	Abraxane	Paclitaxel	Cancro metastásico da mama	Abraxis BioScience, Los Angeles, CA, USA; Astra Zeneca, London, UK
Dispersão lipídica coloidal	Amphotec	Anfotericina B	Antifúngico	InterMune, Brisbane, CA, USA

Apesar de haver um número considerável de patentes para este tipo de tecnologias, a comercialização ainda está na sua fase inicial, o que se deve principalmente à maioria dos estudos de investigação na entrega de fármacos através de sistemas nano serem

realizados ao nível académico. Portanto, para estas tecnologias chegarem ao mercado tem de haver um aumento na parceria com as empresas farmacêuticas, mas infelizmente, uma série de grandes indústrias farmacêuticas não estão ainda a considerar a nanotecnologia como uma das suas prioridades devido à falta de diretrizes regulatórias e aos desafios de ampliação. No entanto, prevê-se que com o expirar de mais patentes e a perda de mercado, as indústrias farmacêuticas venham a considerar a produção de formas farmacêuticas nano (Ochekpe *et al.*, 2009b).

Os avanços na nanotecnologia dos sistemas de transporte e entrega de fármacos também oferecem novos desafios no que respeita à regulamentação, pois há uma necessidade crescente de ter regulamentos que tenham em conta as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas destas novas formas farmacêuticas, que são diferentes dos medicamentos convencionais. Nesse sentido, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) já tomaram a iniciativa de identificar alguns possíveis desafios científicos e regulamentares. Além disso, a Organização Internacional de Normalização criou em 2005 um comité técnico (ISO/TC 229) para o campo da nanotecnologia a fim de desenvolver normas relativas à terminologia e nomenclatura, medição e caracterização, de saúde, segurança e meio ambiente, entre outras, mas estando estas ainda em desenvolvimento (Ochekpe *et al.*, 2009b).

VIII. Conclusão

A técnica de automontagem com base em interações eletrostáticas é simples e fácil de executar, além disso não envolve grandes custos, uma vez que não necessita de máquinas especializadas nem metodologias muito complicadas. Além disso é muito versátil pois qualquer tipo de espécie carregada, incluindo aglomerados moleculares inorgânicos, nanopartículas, nanotubos e nanofios, nanopratos, corantes orgânicos, dendrímeros, porfirinas, polissacarídeos biológicos, polipeptídeos, ácidos nucleicos e proteínas, ADN, e vírus, podem ser utilizadas com sucesso como componentes para preparar filmes LbL, e as suas propriedades podem ser ajustadas de forma a obter filmes com características desejáveis.

Apesar de ter sido originalmente desenvolvida sobre substratos planos, ela pode ser estendida a substratos não planares, como micro e nanopartículas que após dissolução do substrato originam micro e nanocápsulas. Estas podem ser preparadas através duma variada gama de materiais e têm a capacidade de encapsular no seu interior várias substâncias nomeadamente fármacos, proteínas e genes. A superfície das cápsulas pode ser modificada para alterar a funcionalidade e/ou melhorar a sua estabilidade coloidal permitindo assim a entrega em locais específicos. Estímulos físicos, químicos e biológicos permitem modificar parâmetros que podem afetar a permeabilidade das cápsulas o que vai permitir que tenham uma liberação controlada do seu conteúdo.

Através da encapsulação as cápsulas protegem o conteúdo da degradação hidrolítica e enzimática no trato gastrointestinal, aumentando assim a biodisponibilidade oral. Devido ao seu tamanho reduzido conseguem penetrar nos tecidos e serem absorvidas pelas células, permitindo a entrega eficiente nos locais de ação. Têm ainda capacidade de melhorar a solubilidade dos compostos lipofílicos, pouco ou mesmo insolúveis em água, e proteger as moléculas do ambiente biológico.

Como sistemas de entrega controlada as cápsulas podem reduzir a frequência de dosagem, e aumentar a eficácia do princípio ativo, através da entrega de fármaco uniforme no local específico de forma a melhorar a terapia medicamentosa. São capazes de permanecer em circulação no sangue durante um longo período de tempo, libertando

o fármaco incorporado de uma forma controlada e contínua que conduz a menos flutuações no plasma, minimizando assim os efeitos secundários causados.

Em comparação com outros sistemas de entrega de fármacos as nanocápsulas têm a vantagem de possuir alta eficiência de encapsulação do fármaco, devido à solubilidade do fármaco no núcleo otimizado, baixo teor de excipiente em comparação com outras formas farmacêuticas, proteção da substância incorporada através do invólucro polimérico contra fatores de degradação tais como pH e luz, e a redução da irritação do tecido, também devido ao invólucro polimérico.

Como se pode verificar, as nanocápsulas obtidas pela técnica LbL têm imensas vantagens e são vistas com bons olhos no mundo científico. Apesar dos resultados promissores de vários estudos que indicam a sua competência como sistemas de entrega de vários fármacos de forma controlada e de vários estudos de citotoxicidade comprovarem a viabilidade das células, estes estudos apenas foram feitos *in vitro* e alguns *in vivo* em animais, e por isso ainda suscitam alguma “desconfiança” na sua interação e o destino dos seus constituintes no organismo, o que indica que mais estudos tenham de ser feitos nesse sentido.

Do meu ponto de vista, e depois de ter realizado este trabalho, acredito plenamente que as nanocápsulas poderão ser uma opção extremamente interessante no futuro como sistemas de entrega e liberação controlada de fármacos, uma vez que os bons resultados obtidos pelos testes feitos até a data sugerem que poderão vir a veicular todos as classes de substâncias ativas. Além do mais, estes novos sistemas para formular fármacos trazem vantagens tanto para as pessoas que necessitam de terapia medicamentosa já que vão reduzir as dosagens diárias e os efeitos laterais por ela causados, mas também vão permitir as farmacêuticas reformular medicamentos existentes no mercado, alargando assim a vida dos produtos, melhorando o seu desempenho, aceitabilidade, aumentando a eficácia, bem como a segurança e aderência do paciente e, conseqüentemente reduzir os custos dos cuidados de saúde. Podem ainda ser de grande utilidade no tratamento de doenças crónicas como o cancro, SIDA e a diabetes.

IX. Bibliografia

Ai, H. 2011. Layer-by-layer capsules for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63, 772-788.

Ai, H., Jones, S. A., de Villiers, M. M. & Lvov, Y. M. 2003. Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release. *Journal of controlled release*, 86, 59-68.

Ai, H., Pink, J. J., Shuai, X., Boothman, D. A. & Gao, J. 2005. Interactions between self-assembled polyelectrolyte shells and tumor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 73, 303-312.

An, Z., Lu, G., Möhwald, H. & Li, J. 2004. Self-Assembly of Human Serum Albumin (HSA) and 1- α -Dimyristoylphosphatidic Acid (DMPA) Microcapsules for Controlled Drug Release. *Chemistry-A European Journal*, 10, 5848-5852.

Anandhakumar, S., Debapriya, M., Nagaraja, V. & Raichur, A. M. 2011. Polyelectrolyte microcapsules for sustained delivery of water-soluble drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 31, 342-349.

Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B., Donath, E. & Möhwald, H. 2001. Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105, 2281-2284.

Ariga, K., Hill, J. P. & Ji, Q. 2007. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9, 2319-2340.

Ariga, K., Lvov, Y. M., Kawakami, K., Ji, Q. & Hill, J. P. 2011. Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63, 762-771.

Balabushevich, N. G., Tiourina, O. P., Volodkin, D. V., Larionova, N. I. & Sukhorukov, G. B. 2003. Loading the multilayer dextran sulfate/protamine microsized capsules with peroxidase. *Biomacromolecules*, 4, 1191-1197.

Becker, A. L., Johnston, A. P. & Caruso, F. 2010. Layer-By-Layer-Assembled Capsules and Films for Therapeutic Delivery. *Small*, 6.

Becker, A. L., Zelikin, A. N., Johnston, A. P. & Caruso, F. 2009. Tuning the Formation and Degradation of Layer-by-Layer Assembled Polymer Hydrogel Microcapsules†. *Langmuir*, 25, 14079-14085.

Bhadra, D., Gupta, G., Bhadra, S., Umamaheshwari, R. & Jain, N. 2004. Multicomposite ultrathin capsules for sustained ocular delivery of ciprofloxacin hydrochloride. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 241-251.

Boudou, T., Crouzier, T., Ren, K., Blin, G. & Picart, C. 2010. Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. *Advanced Materials*, 22, 441-467.

Branco, M. C. & Schneider, J. P. 2009. Self-assembling materials for therapeutic delivery. *Acta biomaterialia*, 5, 817-831.

Bruening, M. & Dotzauer, D. 2009. Polymer films: Just spray it. *Nature materials*, 8, 449-450.

Caruso, F., Caruso, R. A. & Möhwald, H. 1998. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*, 282, 1111-1114.

Chen, Y., Lin, X., Park, H. & Greever, R. 2009. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, 316-322.

Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R. & Gil, M. H. 2010. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *The EPMA journal*, 1, 164-209.

Crespilho, F. N., Zucolotto, V., Oliveira Jr, O. N. & Nart, F. C. 2006. Electrochemistry of layer-by-layer films: a review. *Int. J. Electrochem. Sci*, 1, 194-214.

De Koker, S., De Cock, L. J., Rivera-Gil, P., Parak, W. J., Auzély Velty, R., Vervaet, C., Remon, J. P., Grooten, J. & De Geest, B. G. 2011. Polymeric multilayer capsules delivering biotherapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 63, 748-761.

De Temmerman, M.-L., Demeester, J., De Vos, F. & De Smedt, S. C. 2011. Encapsulation performance of layer-by-layer microcapsules for proteins. *Biomacromolecules*, 12, 1283-1289.

De Villiers, M. M., Otto, D. P., Strydom, S. J. & Lvov, Y. M. 2011. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Advanced drug delivery reviews*, 63, 701-715.

Decher, G., Ecker, M., Schmitt, J. & Struth, B. 1998. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Current opinion in colloid & interface science*, 3, 32-39.

Delcea, M., Möhwald, H. & Skirtach, A. G. 2011. Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63, 730-747.

Deshmukh, P. K., Ramani, K. P., Singh, S. S., Tekade, A. R., Chatap, V. K., Patil, G. B. & Bari, S. B. 2013. Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self-assembly systems: Targeting and biosensory applications. *Journal of controlled release*, 166, 294-306.

Fan, Y., Wang, Y., Fan, Y. & Ma, J. 2006. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *International journal of pharmaceuticals*, 324, 158-167.

Fukao, N., Kyung, K.-H., Fujimoto, K. & Shiratori, S. 2011. Automatic Spray-LBL Machine Based on in-Situ QCM Monitoring. *Macromolecules*, 44, 2964-2969.

Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D. & Heifets, L. 2005. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172, 1487-1490.

Gil, P. R., del Mercato, L. L., del_Pino, P., Muñoz_Javier, A. & Parak, W. J. 2008. Nanoparticle-modified polyelectrolyte capsules. *Nano Today*, 3, 12-21.

Glinel, K., Déjugnat, C., Prevot, M., Schöler, B., Schönhoff, M. & Klitzing, R. v. 2007. Responsive polyelectrolyte multilayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 303, 3-13.

Guterres, S. S., Alves, M. P. & Pohlmann, A. R. 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2, 147.

Habibi, N., Pastorino, L., Soumetz, F. C., Sbrana, F., Raiteri, R. & Ruggiero, C. 2011. Nanoengineered polymeric S-layers based capsules with targeting activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 366-372.

Heuvingh, J., Zappa, M. & Fery, A. 2005. Salt softening of polyelectrolyte multilayer capsules. *Langmuir*, 21, 3165-3171.

Iler, R. 1966. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21, 569-594.

Itoh, Y., Matsusaki, M., Kida, T. & Akashi, M. 2006. Enzyme-responsive release of encapsulated proteins from biodegradable hollow capsules. *Biomacromolecules*, 7, 2715-2718.

Jaber, J. A. & Schlenoff, J. B. 2006. Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 2940-2947.

Johnston, A. P., Cortez, C., Angelatos, A. S. & Caruso, F. 2006. Layer-by-layer engineered capsules and their applications. *Current opinion in colloid & interface science*, 11, 203-209.

Kamphuis, M. M., Johnston, A. P., Such, G. K., Dam, H. H., Evans, R. A., Scott, A. M., Nice, E. C., Heath, J. K. & Caruso, F. 2010. Targeting of cancer cells using click-functionalized polymer capsules. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 15881-15883.

Kim, B.-S., Lee, H.-i., Min, Y., Poon, Z. & Hammond, P. T. 2009a. Hydrogen-bonded multilayer of pH-responsive polymeric micelles with tannic acid for surface drug delivery. *Chem. Commun.*, 4194-4196.

Kim, B.-S., Smith, R. e. C., Poon, Z. & Hammond, P. T. 2009b. MAD (Multiagent Delivery) Nanolayer: Delivering Multiple Therapeutics from Hierarchically Assembled Surface Coatings†. *Langmuir*, 25, 14086-14092.

Koo, H. Y., Lee, H.-J., Kim, J. K. & San Choi, W. 2010. UV-triggered encapsulation and release from polyelectrolyte microcapsules decorated with photoacid generators. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 3932-3937.

Krogman, K., Zacharia, N., Schroeder, S. & Hammond, P. 2007. Automated process for improved uniformity and versatility of layer-by-layer deposition. *Langmuir*, 23, 3137-3141.

Kumar, K., Ray, S. B., Nagaraja, V. & Raichur, A. M. 2009. Encapsulation and release of rifampicin using poly (vinyl pyrrolidone)-poly (methacrylic acid) polyelectrolyte capsules. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 2508-2513.

Labouta, H. I. & Schneider, M. 2010. Tailor-made biofunctionalized nanoparticles using layer-by-layer technology. *International journal of pharmaceutics*, 395, 236-242.

Lee, H., Lee, Y., Statz, A. R., Rho, J., Park, T. G. & Messersmith, P. B. 2008. Substrate-independent layer-by-layer assembly by using mussel-adhesive-inspired polymers. *Advanced Materials*, 20, 1619-1623.

Li, B. & Haynie, D. T. 2004. Multilayer biomimetics: Reversible covalent stabilization of a nanostructured biofilm. *Biomacromolecules*, 5, 1667-1670.

Liu, J., Zhang, Y., Wang, C., Xu, R., Chen, Z. & Gu, N. 2010. Magnetically sensitive alginate-templated polyelectrolyte multilayer microcapsules for controlled release of doxorubicin. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 7673-7679.

Loretta, L., Rivera-Gil, P., Abbasi, A. Z., Ochs, M., Ganas, C., Zins, I., Sönnichsen, C. & Parak, W. J. 2010. LbL multilayer capsules: recent progress and future outlook for their use in life sciences. *Nanoscale*, 2, 458-467.

Martinho, N., Damgé, C. & Reis, C. P. 2011. Recent advances in drug delivery systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2, 510-526.

Mermut, O., Lefebvre, J., Gray, D. G. & Barrett, C. J. 2003. Structural and mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films studied by AFM. *Macromolecules*, 36, 8819-8824.

Michel, M., Toniazzo, V., Ruch, D. & Ball, V. 2012. Deposition Mechanisms in Layer-by-Layer or Step-by-Step Deposition Methods: From Elastic and Impermeable Films to Soft Membranes with Ion Exchange Properties. *ISRN Materials Science*, 2012.

Modi, S. A., Gaikwad, P., Bankar, V. & Pawar, S. 2011. Sustained release drug delivery system: a review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Development*, 2, 147-160.

Mora-Huertas, C., Fessi, H. & Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 385, 113-142.

Mu, B., Liu, P., Du, P., Dong, Y. & Lu, C. 2011. Magnetic-targeted pH-responsive drug delivery system via layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes onto drug-containing emulsion droplets and its controlled release. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 49, 1969-1976.

Ochekpe, N. A., Olorunfemi, P. O. & Ngwuluka, N. C. 2009a. Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8.

Ochekpe, N. A., Olorunfemi, P. O. & Ngwuluka, N. C. 2009b. Nanotechnology and drug delivery part 2: nanostructures for drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8.

Olugebefola, S. C., Kuhlman, W. A., Rubner, M. F. & Mayes, A. M. 2008. Photopatterned nanoporosity in polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*, 24, 5172-5178.

Olugebefola, S. C., Ryu, S.-W., Nolte, A. J., Rubner, M. F. & Mayes, A. M. 2006. Photo-cross-linkable Polyelectrolyte Multilayers for 2-D and 3-D Patterning. *Langmuir*, 22, 5958-5962.

Pargaonkar, N., Lvov, Y. M., Li, N., Steenekamp, J. H. & de Villiers, M. M. 2005. Controlled release of dexamethasone from microcapsules produced by polyelectrolyte layer-by-layer nanoassembly. *Pharmaceutical research*, 22, 826-835.

Park, M.-K., Deng, S. & Advincula, R. C. 2005. Sustained release control via photo-cross-linking of polyelectrolyte layer-by-layer hollow capsules. *Langmuir*, 21, 5272-5277.

Pozos Vázquez, C. m., Boudou, T., Dulong, V., Nicolas, C., Picart, C. & Glinel, K. 2009. Variation of polyelectrolyte film stiffness by photo-cross-linking: a new way to control cell adhesion. *Langmuir*, 25, 3556-3563.

Qiu, X., Leporatti, S., Donath, E. & Möhwald, H. 2001. Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir*, 17, 5375-5380.

Radtchenko, I. L., Sukhorukov, G. B. & Möhwald, H. 2002. Incorporation of macromolecules into polyelectrolyte micro- and nanocapsules via surface controlled precipitation on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 202, 127-133.

Rajput, M., Sharma, R., Kumar, S., Jamil, F., Sissodia, N. & Sharma, S. 2012. Pulsatile Drug Delivery System: A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences ISSN*, 2229-3701.

Richert, L., Boulmedais, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C. & Picart, C. 2004. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules*, 5, 284-294.

Rivera-Gil, P., De Koker, S., De Geest, B. G. & Parak, W. J. 2009. Intracellular processing of proteins mediated by biodegradable polyelectrolyte capsules. *Nano letters*, 9, 4398-4402.

Schoeler, B., Delorme, N., Doench, I., Sukhorukov, G. B., Fery, A. & Glinel, K. 2006. Polyelectrolyte films based on polysaccharides of different conformations: Effects on multilayer structure and mechanical properties. *Biomacromolecules*, 7, 2065-2071.

Schönhoff, M., Ball, V., Bausch, A. R., Dejugnat, C., Delorme, N., Glinel, K., Klitzing, R. v. & Steitz, R. 2007. Hydration and internal properties of polyelectrolyte multilayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 303, 14-29.

Schuetz, P. & Caruso, F. 2003. Copper-Assisted Weak Polyelectrolyte Multilayer Formation on Microspheres and Subsequent Film Crosslinking. *Advanced Functional Materials*, 13, 929-937.

Shchukin, D. G., Patel, A. A., Sukhorukov, G. B. & Lvov, Y. M. 2004. Nanoassembly of biodegradable microcapsules for DNA encasing. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 3374-3375.

Shi, X., Wang, S., Chen, X., Meshinchi, S. & Baker, J. R. 2006. Encapsulation of submicrometer-sized 2-methoxyestradiol crystals into polymer multilayer capsules for biological applications. *Molecular pharmaceutics*, 3, 144-151.

Shu, S., Sun, C., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z. & Li, C. 2010a. Hollow and degradable polyelectrolyte nanocapsules for protein drug delivery. *Acta biomaterialia*, 6, 210-217.

Shu, S., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z. & Li, C. 2010b. Gradient cross-linked biodegradable polyelectrolyte nanocapsules for intracellular protein drug delivery. *Biomaterials*, 31, 6039-6049.

Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. 2006. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Advanced Materials*, 18, 3203-3224.

Thomas, M. B., Radhakrishnan, K., Gnanadhas, D. P., Chakravorty, D. & Raichur, A. M. 2013. Intracellular delivery of doxorubicin encapsulated in novel pH-responsive chitosan/heparin nanocapsules. *International journal of nanomedicine*, 8, 267.

Thompson, M. T., Berg, M. C., Tobias, I. S., Rubner, M. F. & Van Vliet, K. J. 2005. Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion. *Biomaterials*, 26, 6836-6845.

Tong, W. & Gao, C. 2008. Multilayer microcapsules with tailored structures for bio-related applications. *Journal of Materials Chemistry*, 18, 3799-3812.

Tripathy, J. & Raichur, A. M. 2012. Designing carboxymethyl cellulose based layer-by-layer capsules as a carrier for protein delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

Vergara, D., Bellomo, C., Zhang, X., Vergaro, V., Tinelli, A., Lorusso, V., Rinaldi, R., Lvov, Y. M., Leporatti, S. & Maffia, M. 2012. Lapatinib/Paclitaxel polyelectrolyte nanocapsules for overcoming multidrug resistance in ovarian cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8, 891-899.

Vilar, G., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. 2012. Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery*, 9, 367.

Wang, Y., Angelatos, A. S. & Caruso, F. 2007. Template Synthesis of Nanostructured Materials via Layer-by-Layer Assembly†. *Chemistry of Materials*, 20, 848-858.

Wohl, B. M. & Engbersen, J. F. 2012. Responsive layer-by-layer materials for drug delivery. *Journal of controlled release*, 158, 2-14.

Ye, S., Wang, C., Liu, X. & Tong, Z. 2005. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. *Journal of controlled release*, 106, 319-328.

Ye, S., Wang, C., Liu, X., Tong, Z., Ren, B. & Zeng, F. 2006. New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly. *Journal of controlled release*, 112, 79-87.

Yu, A., Wang, Y., Barlow, E. & Caruso, F. 2005. Mesoporous Silica Particles as Templates for Preparing Enzyme-Loaded Biocompatible Microcapsules. *Advanced Materials*, 17, 1737-1741.

Zahr, A. S., de Villiers, M. & Pishko, M. V. 2005. Encapsulation of drug nanoparticles in self-assembled macromolecular nanoshells. *Langmuir*, 21, 403-410.

Zhang, F., Wu, Q., Chen, Z.-C., Zhang, M. & Lin, X.-F. 2008. Hepatic-targeting microcapsules construction by self-assembly of bioactive galactose-branched polyelectrolyte for controlled drug release system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317, 477-484.

Zhao, J., Cui, Y., Wang, A., Fei, J., Yang, Y. & Li, J. 2010. Side Effect Reduction of Encapsulated Hydrocortisone Crystals by Insulin/Alginate Shells†. *Langmuir*, 27, 1499-1504.

Zhao, Q., Han, B., Wang, Z., Gao, C., Peng, C. & Shen, J. 2007. Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 63-74.

Zhao, Q., Zhang, S., Tong, W., Gao, C. & Shen, J. 2006. Polyelectrolyte microcapsules templated on poly (styrene sulfonate)-doped CaCO₃ particles for loading and sustained release of daunorubicin and doxorubicin. *European polymer journal*, 42, 3341-3351.

Zhou, D., Xiao, H., Meng, F., Zhou, S., Guo, J., Li, X., Jing, X. & Huang, Y. 2012. Layer-by-Layer Assembled Polypeptide Capsules for Platinum-Based Pro-Drug Delivery. *Bioconjugate chemistry*, 23, 2335-2343.