

Joana Filipa Peixoto Fangueiro

**Desenvolvimento e
formulação de
nanopartículas lipídicas
mucoadesivas**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2012

Joana Filipa Peixoto Fangueiro

**Desenvolvimento e
formulação de
nanopartículas lipídicas
mucoadesivas**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2012

Autora:

Joana Filipa Peixoto Figueiro

**Desenvolvimento e formulação de nanopartículas
lipídicas mucoadesivas**

(assinatura)

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

Resumo da Monografia

As nanopartículas lipídicas como as nanopartículas de lipídeos sólidos (SLN, *Solid lipid nanoparticles*) baseadas em emulsões múltiplas são novos sistemas terapêuticos versáteis e inovadores para a incorporação de fármacos hidrófilos. O presente estudo reporta um desenho fatorial 3^3 com o objetivo de desenvolver uma formulação de SLN ótima. As variáveis independentes analisadas foram as concentrações de lipídeo sólido, agente tensioativo hidrófilo e lipófilo. O tamanho hidrodinâmico de partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram as variáveis dependentes. O estudo através do desenho fatorial aplicado, permitiu otimizar uma formulação de SLN que é composta por 1.0%(m/m) de lipídeo sólido, 0.25%(m/m) de agente tensioativo lipófilo e 1.5%(m/m) de agente tensioativo hidrófilo.

Com o objetivo de aumentar o potencial zeta das partículas, e conseqüentemente a sua estabilidade, recorreu-se ao uso do alginato de sódio como polímero de revestimento. Para o efeito foram testadas 4 concentrações diferentes (0.25%, 0.5%, 0.75% e 1.0% (m/m), sugerindo que a concentração ideal testada foi 0.75% (m/m).

A influência do pH na fase aquosa interna das SLN também foi testada e os resultados sugerem que pH baixos (i.e., 2-3) influenciam fortemente o tamanho hidrodinâmico das partículas produzidas, aumentando da região nano para micro. Contudo, as SLN podem revelar-se úteis na incorporação de fármacos hidrófilos que requerem pH entre 4-10.

As SLN baseadas em múltiplas emulsões são uma abordagem promissora para a incorporação de fármacos hidrófilos, e também para proteínas e péptidos.

Palavras-chave: Nanopartículas lipídicas; nanopartículas lipídicas sólidas; emulsão múltipla; fármacos hidrófilos; desenho fatorial; mucoadesividade.

Abstract

Lipid nanoparticles, namely solid lipid nanoparticles (SLN) based on multiple emulsions are versatile and innovative carriers for hydrophilic biomolecules. This work reports a 3^3 full factorial design study to optimize SLN formulations enclosing hydrophilic biomolecules in an inner aqueous phase. The concentrations of solid lipid, lipophilic and hydrophilic emulsifiers were set as the 3 independent variables. Mean particle size, polydispersity index and zeta potential were set as the dependent variables. The selected optimized parameters were set as 1.0%wt of solid lipid, 0.25%wt of lipophilic emulsifier and 1.5%wt of hydrophilic emulsifier.

The coating of SLN with sodium alginate was found to improve the PZ of the lipid particles and four different concentrations were evaluated (0.25; 0.5; 0.75 and 1.0% wt). The results suggested that the ideal concentration was 0.75%wt.

The influence of low pH (i.e. about 2-3) in the inner aqueous phase was stronger than the higher pH values, contributing for the production of larger droplet sizes. Nevertheless, these systems can be useful for the incorporation of biomolecules requiring a pH ranging between 4 and 10.

SLN based on multiple emulsions technology were found to be a promising approach for the incorporation of several hydrophilic drugs, such as proteins and peptides.

Keywords: Solid Lipid Nanoparticles; multiple emulsion; hydrophilic drugs; factorial design; mucoadhesivity.

Agradecimentos

Reservo esta página para agradecer a várias pessoas que me auxiliaram na elaboração deste trabalho e sem as quais não seria possível realizar várias etapas ao longo deste último percurso para concluir o mestrado integrado.

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, a Prof. Dra. Eliana Souto por toda a dedicação, carinho e empenho que demonstrou comigo. O seu otimismo, as suas críticas construtivas e toda a sua disponibilidade tornaram sem dúvida mais fácil a elaboração deste trabalho. A ela, devo muito da minha formação profissional e motivação pessoal.

Aos meus colegas de laboratório pela companhia, carinho, amizade e apoio que sempre me dedicaram. Obrigada pela boa disposição e alegria que torna o nosso trabalho sempre melhor.

Finalmente, quero também agradecer à minha família, aos meus pais, irmão e namorado, que são o pilar fundamental da minha vida, que sem eles não seria possível a elaboração e conclusão deste mestrado. Obrigada por todo o vosso apoio, amor e por sempre acreditarem em mim.

Índice geral

Resumo da Monografia	5
Abstract.....	6
Agradecimentos	7
Índice geral	8
Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas	13
Lista de Abreviaturas.....	14
Objetivos do trabalho	15
Capítulo I	16
Introdução.....	17
1.1. Definições de nanotecnologia e nanomedicina aplicadas à vetorização de fármacos.....	17
1.2. Nanopartículas de lipídeos sólidos	19
1.3. Métodos de produção de SLN	24
1.3.1. Homogeneização a alta pressão a quente e a frio	24
1.3.2. Sonicação ou homogeneização a alta velocidade	25
1.3.3. Método da microemulsão	26
1.3.4. Método da dupla emulsão.....	26
1.3.5. Método de emulsificação-evaporação do solvente.....	26
1.3.6. Método de deslocamento do solvente ou nanoprecipitação.....	27
1.3.7. Método da emulsificação-difusão do solvente	27
1.3.8. Método de inversão de fases.....	28
1.3.9. Método de coacervação	28
1.4. Aplicação das SLN na vetorização de fármacos.....	28

Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas

1.4.1.	Via oral	29
1.4.2.	Via Nasal	32
1.4.3.	Via Ocular.....	34
1.4.4.	Outras vias	36
1.5.	Revestimento das SLN com polímeros mucoadesivos	38
1.5.1.	Alginato de sódio.....	39
1.5.2.	Quitossano.....	41
1.5.3.	Mecanismo de adesão das nanopartículas com propriedades mucoadesivas 42	
Capítulo II	44
Descrição dos materiais e métodos.....		45
2.1.	Materiais e Reagentes	45
2.2.	Preparação das nanopartículas de lipídeos sólidos	47
2.3.	Otimização de uma formulação de SLN através de um desenho factorial 3^3	48
2.4.	Caracterização físico-química.....	48
2.5.	Revestimento com o alginato de sódio	49
2.6.	Análise da morfologia das nanopartículas de lipídeos sólidos	49
2.7.	Análise da influência do pH da fase aquosa interna	50
Capítulo III	51
Resultados e Discussão dos Resultados		52
3.1.	Desenvolvimento e otimização de uma formulação de SLN através do desenho fatorial.....	52
3.2.	Revestimento das SLN com o alginato de sódio	57
3.3.	Análise da morfologia das SLN e verificação da existência de múltipla emulsão	58
3.4.	Avaliação da influência do pH da fase aquosa interna	59
Capítulo IV	61

Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas

Conclusão geral	62
Capítulo V	63
Bibliografia Geral	64

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Ilustração esquemática de uma SLN como a matriz lipídica sólida (a) SLN baseada em emulsões simples e (b) SLN baseada em emulsão múltipla A/O/A.

Figura 2. Transporte das nanopartículas através das células epiteliais. As partículas podem ser transportadas por (1) enterócitos, (2) por difusão passiva, (3) por transporte paracelular ou (4) pelas células M (placas de Peyer).

Figura 3. Mecanismos de absorção das SLN pela via oral. As partículas aderem à mucosa da parede do intestino e as moléculas de fármaco são libertadas exatamente no local de absorção.

Figura 4. Ilustração esquemática da estrutura anatômica do olho humano.

Figura 5. Ilustração esquemática do revestimento de SLN com polímeros. Após polimerização do polímero com soluções de pH controlado, procede-se ao revestimento das partículas, ficando o polímero localizado à sua superfície.

Figura 6. Estrutura química do alginato. O polímero é constituído por duas cadeias com dois monómeros de ácido gulurónico e dois monómeros de ácido manurónico.

Figura 7. Estrutura química do quitosano.

Figura 8. Ilustração esquemática das propriedades mucoadesivas das nanopartículas lipídicas revestidas com polímeros de revestimento na parede intestinal. A mucoadesividade das nanopartículas à mucosa intestinal permite prolongar o tempo de residência do fármaco diretamente no local de absorção.

Capítulo II

Figura 9. Ilustração esquemática do método da emulsão múltipla.

Capítulo III

Figura 10. Gráfico de Pareto dos parâmetros analisados para o THP (A) e para o IDP (B).

Figura 11. Gráfico de superfície de resposta do THP: (A) efeito da concentração de D114 vs concentração de S PC-3 e (B) efeito da concentração de D114 vs concentração de LF127.

Figura 12. Gráfico de superfície de resposta do IDP: (A) efeito da concentração de D114 vs concentração de S PC-3 e (B) efeito da concentração de D114 vs concentração de LF127.

Figura 13. Resultados dos parâmetros físico-químicos avaliados após revestimento com as 4 concentrações de alginato de sódio testadas e sem revestimento: (A) THP e IDP e (B) PZ.

Figura 14. Imagem das SLN revestidas com alginato de sódio através de microscopia de fluorescência (100x). Na imagem é possível verificar que o interior das gotículas é azulado, indicando que o corante azul de metileno foi eficazmente encapsulado.

Índice de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Exemplos de lipídeos sólidos vulgarmente aplicados na produção de SLN.

Tabela 2. Exemplos de fármacos veiculados em SLN e a sua propriedade terapêutica, lipídeo usado, agente tensioativo e respetiva via de administração.

Capítulo II

Tabela 3. Descrição dos materiais utilizados no protocolo experimental para a preparação das SLN.

Tabela 4. Descrição dos reagentes utilizados no protocolo experimental para a preparação das SLN.

Tabela 5. Descrição dos níveis de cada variável independente do desenho fatorial. Os três níveis são descritos como mínimo (-1), médio (0) e máximo (+1).

Capítulo III

Tabela 6. Resultados obtidos dos parâmetros físico-químicos analisados para as 11 formulações de SLN.

Tabela 7. Análise estatística pelo teste ANOVA para o THP e IDP com os respetivos valores de F e p.

Tabela 8. Avaliação da influência da variação do pH da fase aquosa interna nos parâmetros físico-químicos, i.e., THP (nm), IDP e PZ (mV).

Lista de Abreviaturas

BHE	Barreira hemato-encefálica
DP	Desvio padrão
D114	Dynasan® 114, trimiristina
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
GRAS	Generally regarded as safe
LF127	Lutrol®F127
NLC	Vetores lipídicos nanoestruturados (<i>Nanostructured lipid carriers</i>)
PER	Pigmento epitelial da retina
IDP	Índice de polidispersão
i.e.	id est, isto é
PZ	Potencial zeta
p.e.	por exemplo
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas (<i>Solid lipid nanoparticles</i>)
S PC-3	Lecitina de soja, Lipoid® S PC-3
THP	Tamanho hidrodinâmico de partícula
TGI	Trato gastrointestinal

Objetivos do trabalho

Durante a última década, o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas ganhou bastante interesse devido à inovadora forma de vetorizar fármacos com propriedades físico-químicas complexas e baixa biodisponibilidade.

O presente trabalho foca o desenvolvimento e formulação de SLN baseadas em emulsões múltiplas com o objetivo de vetorizar fármacos hidrófilos.

O revestimento com um polímero com propriedades mucoadesivas permite aumentar o seu potencial para as vias oral, nasal ou ocular e a análise da influência do pH permite prever a utilidade destes sistemas na vetorização de péptidos e proteínas com requisitos de pH específicos para exercer a sua ação terapêutica.

Desta forma, os principais objetivos do presente trabalho são:

I. Estudo da influência quantitativa do lipídeo sólido e agente tensioativo nas propriedades físico-químicas de uma formulação de nanopartículas lipídicas elaborando um desenho fatorial 3^3 .

II. Caracterização físico-química da formulação otimizada.

III. Estudo da concentração de alginato de sódio como polímero de revestimento e avaliação da sua influência nas propriedades físico-químicas das nanopartículas obtidas.

IV. Avaliação da influência do pH da fase aquosa interna nas propriedades físico-químicas das nanopartículas produzidas.

Introdução

1.1. Definições de nanotecnologia e nanomedicina aplicadas à vetorização de fármacos

A nanotecnologia é uma ciência que oferece potenciais e promissores progressos no domínio da saúde e medicina. A nanomedicina aplicada à vetorização de fármacos surgiu na última década como uma ciência de alta tecnologia e cada vez mais surgem estudos na tentativa de otimizar a biodisponibilidade de inúmeros fármacos que não possuem características ideais para exercer a sua ação terapêutica (Etheridge et al., 2012).

A nanotecnologia é definida segundo a *Royal Society and Royal Academy of Engineering* "como o estudo dos fenômenos e manipulação dos materiais a nível atômico, molecular e macromolecular, e o design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlando a sua morfologia e tamanho nanométrico" (Ann, 2004).

A nanomedicina segundo o *The European Technology Platform on Nanomedicine* (ETPN, 2012) define-se como a aplicação da nanotecnologia na área da saúde. Envolve a exploração de novas propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais a uma escala nanométrica. A nanomedicina tem um impacto potencial na terapêutica, prevenção e diagnóstico de diversas patologias.

A nanomedicina ainda permanece num conceito acadêmico, pois apesar de os esforços da sua introdução na indústria farmacêutica, requer longos estudos para comprovar a sua eficácia, segurança e utilidade na vetorização de fármacos.

A nanomedicina é uma ciência que interseja com outras áreas como a engenharia, biotecnologia, medicina, ciências físicas e tecnologia da informação. Todas elas devem cooperar para a estimulação de novos rumos na pesquisa, patentes,

comercialização, desenvolvimento e transferência de tecnologia. As grandes áreas que abrangem a nanomedicina incluem (i) a vetorização de fármacos, (ii) diagnóstico e imagem *in vivo* e *in vitro*, (iii) medicina regenerativa e (iv) implantes (Boisseau and Loubaton, 2011).

A vetorização de fármacos é uma área de investigação que atraiu o interesse devido à possibilidade de ultrapassar as principais limitações das indústrias farmacêuticas, que é a libertação do fármaco no órgão-alvo, aumentando consideravelmente a sua biodisponibilidade. Os avanços na biotecnologia e áreas relacionadas na descoberta e design racional de novos sistemas terapêuticos são importantes para melhorar a eficácia de fármacos já existentes. Muitos dos fármacos atualmente comercializados apresentam diversas limitações, tais como, (i) baixa solubilidade em diversos solventes, (ii) elevada toxicidade, (iii) necessidade de doses elevadas para exercer ação terapêutica, (iv) agregação consequente da baixa solubilidade, (v) degradação enzimática e/ou química *in vivo*, (vi) reduzido tempo de semivida e (vii) vetorização não específica (Parveen et al., 2012).

Deste modo, o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos com fármacos clássicos, oferece uma nova competitividade para as indústrias farmacêuticas devido à expiração das patentes e introdução de cada vez mais genéricos no mercado. Estes novos sistemas podem veicular fármacos de um modo mais eficaz e conveniente aumentando a adesão do paciente à terapêutica, aumentando o tempo de vida do fármaco providenciando uma terapêutica mais arrojada, eficiente e com menor custo (Kayser et al., 2005, Parveen et al., 2012).

Adicionalmente, estes novos sistemas terapêuticos oferecem uma maior proteção *in vivo* aos fármacos, como já foi anteriormente referido, sendo especialmente atrativo para péptidos e proteínas com o objetivo de aumentar a sua farmacocinética.

A emergência da nanotecnologia na área de vetorização de fármacos atinge um impacto significativo, sendo as nanopartículas o sistema de eleição, com potenciais aplicações na área da nanomedicina.

Existe uma diversidade de sistemas nanométricos para vetorizar fármacos. Contudo, este trabalho apenas vai realçar o uso de vetores lipídicos, nomeadamente as nanopartículas de lipídeos sólidos (“*Solid lipid nanoparticles*”, *SLN*).

1.2. Nanopartículas de lipídeos sólidos

O universo das nanopartículas lipídicas é abrangente podendo incluir-se lipossomas, micelas, vetores lipídicos nanoestruturados (“*Nanostructured lipid carriers*”, *NLC*) e *SLN*.

As *SLN* foram desenvolvidas no início dos anos 90 (Gasco, 2003, zur Muhlen et al., 1998) e atualmente representam uma boa ferramenta no tratamento de diversas patologias através da vetorização de fármacos. As *SLN* são vetores coloidais de natureza lipídica, sendo compostas por lipídeos no estado sólido (Müller et al., 2011). São equiparadas a emulsões com a substituição de lipídeos líquidos por sólidos (Uner and Yener, 2007). Além disso, são denominadas de dispersões coloidais por apresentarem partículas de tamanho nanométrico (100-400nm) dispersas numa solução aquosa de agente tensioativo. A sua propriedade característica reside na sua constituição, pois são apenas compostas por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e à temperatura corporal estabilizadas por agente tensioativo (Souto and Müller, 2007).

Relativamente à natureza dos lipídeos que podem constituir estes sistemas, incluem-se os acilgliceróis, ceramidas, ácidos e álcoois gordos, que são fisiologicamente compatíveis e participam no metabolismo natural dos lipídeos no organismo (Tabela 1). Desta forma, a natureza lipídica destes sistemas é uma vantagem relativamente à baixa toxicidade que apresentam, mesmo usados em concentrações de 5 a 30% (Severino et al., 2012, Souto and Müller, 2005). Contudo, para além dos lipídeos também é necessário o uso de agentes tensioativos para reduzir a tensão interfacial e evitar a deposição e agregação das nanopartículas dispersas na fase aquosa. Geralmente, as *SLN* são compostas por 0.1 a 30% (m/m) de lipídeo sólido e estabilizadas por 0.5 a 5% (m/m) (Pardeike et al., 2009).

Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas

Os agentes tensioativos são geralmente escolhidos de acordo com a sua compatibilidade química com o lipídeo em questão e também de acordo com o seu valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). Os agentes tensioativos mais vulgarmente aplicados são os não-iônicos, i.e., que não contêm carga iónica como os polisorbatos (Tween® 20, 40, 60, 80), os sorbitanos (Span®20, 40, 60, 80), ésteres de sorbitol (Mirj® 45, 52, 53, 59), álcoois (Tyloxapol) e os poloxâmeros (Pluronic ou Lutrol®F68, F127). Os ésteres de açúcares também podem ser empregues como os ésteres do ácido esteárico, palmítico, oleico e láurico. De uma forma geral, todos os materiais que constituem as SLN devem ser considerados GRAS (*Generally regarded as safe*) (Wiechers and Souto, 2010, Souto et al., 2011).

Tabela 1. Exemplos de lipídeos sólidos vulgarmente aplicados na produção de SLN.

	Nome Comercial	Nome químico	Referências
ACILGLICERÓIS	Precirol®ATO5	Palmitoestearato de glicerilo	(Das et al., 2011, Sivaramakrishnan et al., 2004)
	Compritol®888ATO	Dibenehato de glicerilo	(Blasi et al., 2007, Kuo and Chung, 2011)
	Dynasan®114	Trimiristato de glicerilo	(Aditya et al., 2010, Martins et al., 2012, Fangueiro et al., 2012b)
	Dynasan®116	Tripalmitato de glicerilo	(Kuo and Chung, 2011, Kuo and Lin, 2009)

Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas

	Dynasan®118	Triestereato de glicerilo	(Noack et al., 2012)
	Imwitor®900K	Monoestearato de glicerilo	(Doktorovova et al., 2011, Sivaramakrishnan et al., 2004)
ÁCIDOS GORDOS	Ácido esteárico		(Ghadiri et al., 2012, Zhang et al., 2000)
ÁLCOOIS GORDOS	Álcool cetílico		(Sanna et al., 2010)
	Álcool estearílico		(Sanna et al., 2010, Souto et al., 2004)
CERAMIDAS	Manteiga de cacau		(Kuo and Lin, 2009, Kim et al., 2005)
	Cera de carnaúba		(Kheradmandnia et al., 2010)
	Cera de abelhas		(Kheradmandnia et al., 2010, Attama and Müller-Goymann, 2008)
	Palmitato de cetila		(Martins et al., 2012, Figueiro et al., 2012a)

Os fármacos lipófilos são veiculados na matriz lipídica, caso estejamos a falar de emulsões simples. Habitualmente, são incorporados alternativamente entre as cadeias dos ácidos gordos e entre as camadas de lipídeos ou na estrutura amorfa do cristal. Contudo, lipídeos mais puros resultam numa matriz mais cristalina e perfeita, resultando em menor capacidade de incorporar fármaco, sendo uma das maiores limitações desta nanopartículas (Souto et al., 2006). Existem diversos fatores que podem influenciar a capacidade de incorporação de fármacos nas SLN tais como (i) solubilidade do fármaco no lipídeo, (ii) miscibilidade do fármaco e lipídeo, (iii) estrutura química e física da matriz lipídica sólida e (iv) o estado polimórfico do lipídeo (Uner and Yener, 2007).

Existem essencialmente três formas polimórficas que as partículas podem adquirir: α , β' e β . De acordo com a recristalização e tipo de lipídeo e agente tensioativo usados nas nanopartículas elas podem adquirir qualquer uma destas formas. Diferem na sua estabilidade e na cristalinidade do cristal formado, e conseqüentemente na capacidade de veicular fármacos na matriz. Desta forma, a ordem crescente de cristalinidade é $\alpha < \beta' < \beta$. Para além disso, ao longo do tempo de armazenamento, a estrutura cristalina que adota inicialmente pode mudar para outras formas polimórficas mais estáveis, levando à expulsão do fármaco da matriz lipídica, pois forma um cristal mais perfeito (Souto et al., 2006). As SLN conseguem incorporar eficientemente moléculas lipófilas, e quanto a moléculas hidrófilas, estas podem ser incorporadas numa fase aquosa interna em emulsões múltiplas (Figura 1).

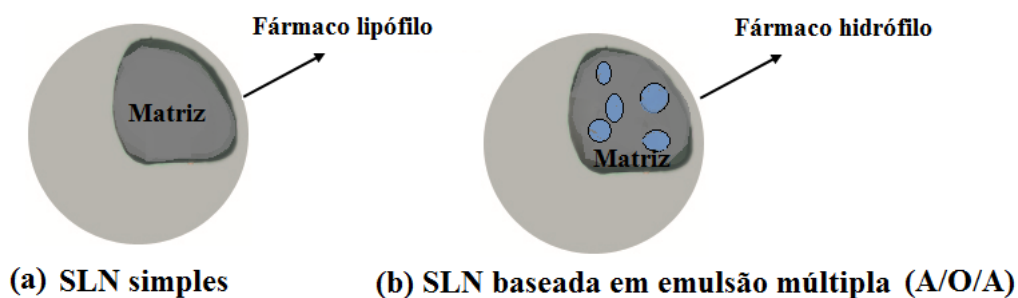


Figura 1. Ilustração esquemática de uma SLN como a matriz lipídica sólida (a) SLN baseada em emulsões simples e (b) SLN baseada em emulsão múltipla A/O/A

A grande diferença entre estes dois sistemas reside no facto das emulsões múltiplas apresentarem uma viscosidade menor devido à fase aquosa externa e à quantidade limitada de lipídeo que pode usar-se. Como foi anteriormente referido, as SLN são geralmente compostas por 0.1 a 30% de lipídeo sólido, contudo a partir de 5% revela-se uma quantidade excessiva para desenvolver SLN baseada em emulsão múltipla, uma vez que diminui a estabilidade termodinâmica destas emulsões mais complexas (Fangueiro et al., 2012b). Quando se usa elevadas concentrações de lipídeo, poderá ocorrer rutura do sistema, e conseqüentemente ocorrer uma difusão da fase aquosa interna onde usualmente encontram-se os fármacos hidrófilos a veicular, para a fase aquosa externa (Morais et al., 2008, Fangueiro et al., 2012b).

Desta forma, as SLN baseadas em emulsões múltiplas requerem necessariamente dois agentes tensioativos, um com elevado valor de EHL e outro com valor menor. O agente tensioativo com menor valor de EHL deverá estabilizar a emulsão primária A/O e deverá ser adicionado à fase lipídica e o outro com maior valor de EHL deverá estabilizar a interface O/A e deverá ser adicionado à fase aquosa externa (Carlotti et al., 2005, Jiao et al., 2003, Fangueiro et al., 2012b). Na realidade, ambos os agentes tensioativos estarão presentes na interface secundária, i.e., entre as gotículas e a fase aquosa externa.

O desenvolvimento e formulação de SLN baseadas em emulsões múltiplas envolvem aspectos importantes, tais como (i) escolha do tipo de agente tensioativo, (ii) composição da fase lipídica, (iii) ratio das três fases e o (iv) ratio das concentrações dos agentes tensioativos hidrófilo e lipófilo (Morais et al., 2008).

Em suma, as principais vantagens das SLN para vetorização de fármacos incluem (i) a baixa toxicidade devido à composição de lipídeos fisiológicos, (ii) permitiram uma libertação prolongada dos fármacos por erosão/degradação dos lipídeos da matriz, (iii) possibilidade de produção de suspensões/emulsões lipídicas altamente concentradas, (iv) fácil produção sendo bastante transponível a produção da escala laboratorial para industrial, (v) possibilidade de associação com excipientes (promotores da absorção, inibidor de proteases) que potenciam a biodisponibilidade dos fármacos, (vi) proteção química e enzimática dos fármacos *in vivo* e (vii) vetorização dos fármacos diretamente no seu local de absorção, aumentando conseqüentemente a sua

biodisponibilidade e reduzindo a dose necessária administrada (Müller et al., 2000, Souto and Müller, 2005, Pardeike et al., 2009, Martins et al., 2007).

Contudo e apesar de todas as vantagens acima mencionadas, existem também certas limitações associadas tais como (i) baixa capacidade de incorporação de fármacos, devido às transições das formas polimórficas e estrutura cristalina destas partículas, (ii) possibilidade de toxicidade devido ao uso de agente tensioativo e conservantes, (iii) complexidade do estado físico do lipídeo que pode originar diferentes formas polimórficas, possibilidade de sobreaquecimento causando problemas aquando da sua administração (por exemplo, gelificação, aumento do tamanho da partícula, expulsão da fármaco) e (iv) possibilidade de serem reconhecidas pelo sistema imunitário e posteriormente fagocitadas pelos macrófagos, provocando uma degradação intracelular com efeitos tóxicos (Souto and Müller, 2007, Martins et al., 2007, Battaglia and Gallarate, 2012).

1.3.Métodos de produção de SLN

As SLN podem ser produzidas através de vários métodos que estão bem descritos na literatura (Souto et al., 2011, Müller et al., 2000, Souto and Müller, 2011). A seleção do método mais adequado depende das propriedades do fármaco como a sua estabilidade a temperaturas elevadas, volatilidade, solubilidade e peso molecular (Müller et al., 2000, Souto and Müller, 2011).

1.3.1. Homogeneização a alta pressão a quente e a frio

O método mais simples e mais aplicado é o método da homogeneização a alta pressão (HAP), que pode ser a quente ou a frio (Müller et al., 2000). Em ambos os métodos, o fármaco é solubilizado ou disperso nos lipídeos previamente fundidos (5-10°C acima do ponto de fusão do lipídeo). Na HAP a quente, uma solução aquosa de agente tensioativo quente è adicionada à fase lipídica e homogeneizada e alta velocidade

(normalmente 1 minuto a 8.000rpm é suficiente). De seguida, esta pré-emulsão é processada por HAP que através de forças de cavitação, gera partículas de tamanhos reduzidos. Normalmente, são necessários 3 a 5 ciclos de homogeneização a uma pressão de 500 bar. Após este processo, obtém-se uma nanoemulsão que por arrefecimento originará recristalização do lipídeo sólido e conseqüentemente à formação das SLN. A HAP a frio é ligeiramente diferente. Após a dispersão ou solubilização do fármaco no lipídeo fundido, esta mistura é arrefecida através de gelo seco ou nitrogénio líquido obtendo-se micropartículas, que são suspensas por uma solução fria de agente tensioativo. Neste caso, a suspensão é sujeita ao HAP, para que as micropartículas lipídicas sejam reduzidas a nanopartículas lipídicas no estado sólido, através da homogeneização a temperaturas reduzidas. As forças de cavitação aplicadas quebram as micropartículas em nanopartículas (Mishra et al., 2010).

A maior diferença entre as duas técnicas é a temperatura, e a HAP a frio é mais adequado para fármacos termolábeis, como proteínas e péptidos. A HAP a frio também foi desenvolvida com o objetivo de ultrapassar algumas limitações da HAP a quente, tais como o escape do fármaco para a fase aquosa, levando muitas vezes à sua cristalização fora da matriz lipídica e à formação de fusões super-arrefecidas, onde o lipídeo não se encontra totalmente no estado sólido. Contudo, a HAP a quente é mais utilizada para produção em larga escala (Souto and Muller, 2011).

1.3.2. Sonicação ou homogeneização a alta velocidade

A produção de SLN por sonicação ou por homogeneização a alta velocidade é aplicada menos frequentemente. A fase lipídica e a fase aquosa são aquecidas à mesma temperatura (5-10°C acima do ponto de fusão do lipídeo) e emulsificadas por meio de agitação mecânica (homogeneização a alta velocidade) ou sonicação. Posteriormente procede-se ao arrefecimento da nanoemulsão produzida à temperatura ambiente ou em banho de gelo para formar-se as SLN. A principal desvantagem destas técnicas é a possível presença de outras nanoestruturas, isto é, micro e nanopartículas na dispersão final (Sinha et al., 2011).

1.3.3. Método da microemulsão

A técnica da microemulsão foi desenvolvida por Gasco (Gasco, 1997) e desde então tem sido adaptada por diversos grupos de investigação (Fontana et al., 2005, Ghadiri et al., 2012, Patel and Patravale, 2011, Pedersen et al., 2006). Nesta técnica, as fases aquosa e lipídica são aquecidas à mesma temperatura (5-10°C acima do ponto de fusão do lipídeo). Esta mistura é depois homogeneizada formando uma pré-emulsão. É importante regular a temperatura para que o lipídeo se mantenha sempre no estado fundido durante todo o processo. Seguidamente, dilui-se esta mistura com água gelada, o que leva à quebra da microemulsão em nanoemulsão. Esta nanoemulsão obtida é arrefecida, permitindo a formação das SLN (Sinha et al., 2011).

1.3.4. Método da dupla emulsão

O método da dupla emulsão foi aplicado neste trabalho e é usado como o próprio nome indica, para produzir SLN baseadas em emulsões múltiplas. Este método foi descrito por García-Fuentes e colaboradores (García-Fuentes et al., 2003) e é aplicado quando se pretende incorporar fármacos lábeis e/ou hidrófilos, como proteínas e péptidos, numa fase aquosa interna evitando degradação enzimática e química. Primeiramente, o fármaco é solubilizado na fase aquosa interna, sendo esta fase adicionada a uma fase lipídica sujeita à mesma temperatura. Esta emulsão primária é homogeneizada a alta velocidade e seguidamente dispersa numa fase aquosa externa para formar a emulsão múltipla A/O/A (Fangueiro et al., 2012b).

1.3.5. Método de emulsificação-evaporação do solvente

O método de emulsificação-evaporação do solvente foi descrito por Sjöström e Bergensåhl (Sjöström and Bergenstahl, 1992) e é usualmente aplicado quando o fármaco não é solúvel no lipídeo. Nesta técnica, um solvente orgânico não miscível com

a água (p.e. ciclohexano, clorofórmio) que solubilize o lipídeo é disperso numa fase aquosa de agente tensioativo para produzir uma emulsão O/A. Durante a homogeneização a alta velocidade, o solvente é evaporado devido ao aquecimento que é a emulsão é sujeita. Este método é útil para fármacos hidrófilos e proteínas e/ou péptidos.

1.3.6. Método de deslocamento do solvente ou nanoprecipitação

O método de deslocamento do solvente (também denominado de método de nanoprecipitação) foi inicialmente proposto para nanopartículas poliméricas (Quintanar-Guerrero et al., 1999) e posteriormente adaptado para nanopartículas lipídicas (Dong et al., 2012, Hu et al., 2002, Videira et al., 2002). Esta técnica utiliza solventes orgânicos semi-polares miscíveis em água (p.e. acetona, etanol ou metanol) que solubilizem o lipídeo. O fármaco é adicionado a esta mistura e depois adicionado a uma fase aquosa de agente tensioativo por injeção sob agitação magnética. As nanopartículas lipídicas são formadas após remoção total do solvente por difusão ou por destilação levando à precipitação das nanopartículas (Souto and Müller, 2007).

1.3.7. Método da emulsificação-difusão do solvente

O método da emulsificação-difusão do solvente utiliza solventes orgânicos semi-polares que são previamente saturados com água para assegurar o equilíbrio termodinâmico. Este solvente serve para solubilizar o lipídeo, e procede-se à adição do fármaco. Esta mistura é adicionada a uma solução aquosa de agente tensioativo para formar-se uma emulsão O/A. A solução saturada evita a difusão do solvente das gotículas para a fase aquosa. As SLN são formadas por adição de um excesso de água à emulsão, facilitando o deslocamento do solvente das gotículas e provocando a precipitação das nanopartículas (Sinha et al., 2011, Wissing et al., 2004).

1.3.8. Método de inversão de fases

O método de inversão de fases foi desenvolvido por Heurtault e colaboradores (Heurtault et al., 2002). Este método envolve duas etapas. Na primeira etapa todos os componentes são fundidos e emulsificados por agitação magnética usando um ciclo de temperaturas (p.e. 25-85°C) e seguidamente arrefecido para uma temperatura intermédia (p.e. 60°C). Estes três ciclos de temperatura (85-60-85-60-85°C) são aplicados para inverter a fase inicial. Na segunda etapa, a mistura é sujeita a um choque de temperatura irreversível pela adição de água gelada. Esta etapa leva à formação das nanopartículas.

1.3.9. Método de coacervação

Um método recente foi descrito para produzir SLN. Este método denominado de coacervação foi desenvolvido por Battaglia e colaboradores (Battaglia et al., 2010). O método baseia-se na interação de uma solução micelar de sais alcalinos de ácidos gordos (p.e. estearato de sódio, palmitato de sódio, miristato de sódio) e uma solução de ácido (solução de coacervação) na presença de um polímero anfipático como agente estabilizante (Battaglia et al., 2010, Corrias and Lai, 2011). Com a descida do pH devido à solução de ácido, as SLN precipitam. É um método bastante simples, de baixo custo e termossensível que permite a incorporação de variados fármacos (Battaglia and Gallarate, 2012).

1.4. Aplicação das SLN na vetorização de fármacos

A aplicação de SLN na vetorização de fármacos têm sido bastante investigada e estas usufruem de uma característica própria, são fisiologicamente compatíveis devido à sua composição lipídica. Desta forma, as vias de transporte e metabolismo já existem no organismo e podem promover uma maior performance das SLN *in vivo*, aumentando a

eficácia terapêutica dos fármacos. Apesar das SLN serem vastamente investigadas para diversas vias de administração, tais como oral, peroral, tópica, dérmica e transdérmica, intravenosa, ocular, intraduodenal e pulmonar, neste trabalho apenas vamos focar as vias oral, nasal e ocular devido à potencialidade das SLN mucoadesivas para estas vias.

1.4.1. Via oral

A via oral é sem dúvida a via de eleição devido ao conforto e facilidade de tratamento, promovendo uma maior adesão à terapêutica por parte dos pacientes devido à sua natureza não-invasiva. Esta via é muito atrativa para SLN mucoadesivas, uma vez que aderidas às paredes do trato gastrointestinal (TGI), estas partículas são capazes de libertar o fármaco exatamente no seu local de absorção. Adicionalmente, a sua constituição baseada em lipídeos aumenta essa mucoadesividade, já que estes são também promotores de absorção. Quando ocorre a etapa de absorção, o organismo irá absorver conjuntamente o lipídeo e o fármaco solubilizado (efeito de Trojan ou mecanismo de absorção de promoção de efeito) (Souto and Müller, 2007). Para estas vias, podem ser usados todos os lipídeos e agente tensioativos que são empregues em formas farmacêuticas convencionais (comprimidos, cápsulas). Algumas vantagens relacionadas com esta via incluem a proteção do fármaco de hidrólise, o aumento da sua biodisponibilidade e prolongamento dos níveis plasmáticos (Souto and Müller, 2007).

As SLN não devem ser diretamente aplicadas como dispersões coloidais nestas vias, pois o ambiente ácido do estômago e a variação da força iónica podem resultar numa agregação das partículas, comprometendo a sua eficácia como nanopartículas. Deste modo, após a sua produção devem ser veiculadas em comprimidos, cápsulas ou pós para administração oral. Este processo pode ser efetuado por granulação, sendo as SLN o líquido de granulação ou então por liofilização, sendo o pó comprimido (comprimidos) ou usado para preencher cápsulas (Battaglia and Gallarate, 2012).

A absorção das SLN através da mucosa intestinal pode ocorrer por diversos mecanismos, nomeadamente pelas placas de Peyer, por uptake intracelular, por difusão passiva ou por transporte paracelular (Figura 2). Em condições fisiológicas, o transporte

paracelular é limitado devido sobretudo à pouca área de superfície entre os espaços intercelulares e também devido à pequena espessura das junções epiteliais (des Rieux et al., 2006). Algumas estratégias estão a ser usadas com o objetivo de aumentar a absorção de fármacos fracamente absorvidos através do uso de agente tensoativos ou polímeros mucoadesivos. Contudo, o uso destas substâncias em concentrações elevadas e o seu uso contínuo pode danificar o TGI e também podem ser tóxicas quando absorvidas para a circulação sistémica (Salamat-Miller and Johnston, 2005).

O transporte paracelular de nanopartículas depende de diversos fatores, tais como as propriedades físico-químicas das partículas, como o tamanho, potencial zeta, hidrofobicidade à superfície da partícula ou a presença de ligandos, e também da fisiologia do TGI (Florence, 2004).

O transporte transcelular das nanopartículas ocorre por transcitose, um processo pelo qual as partículas são captadas pelas células. O processo é iniciado por endocitose na membrana das células apicais, na qual a partícula é transportada através das células (Figura 2). Dois tipos de células estão envolvidos neste processo: os enterócitos e as células M (localizadas nas placas de Peyer). Apesar de a literatura conter muita controvérsia, deduz-se que a absorção de partículas pode ocorrer através dos enterócitos, nomeadamente através das vilosidades no intestino (Jani et al., 1992). Contudo, devido à baixa atividade endocítica existente nos enterócitos, a quantidade de partículas que é absorvida por esta via é muito reduzida. As células M representam também uma fração significativa na absorção de diversos materiais, nomeadamente de nanopartículas (Florence, 2004).

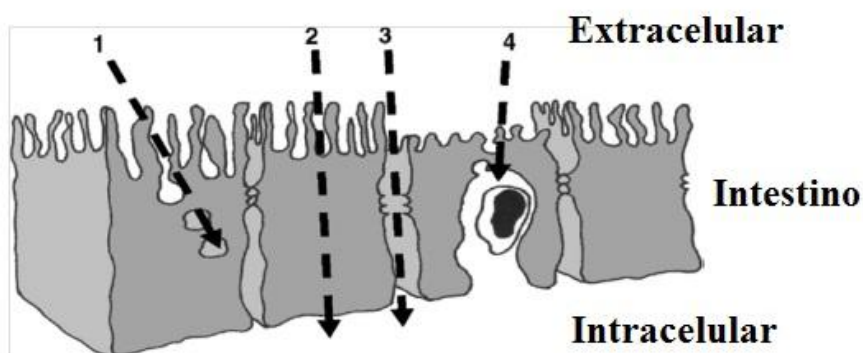


Figura 2. Transporte das nanopartículas através das células epiteliais. As partículas podem ser transportadas por (1) enterócitos, (2) por difusão passiva, (3) por transporte paracelular ou (4) pelas células M (placas de Peyer) [adaptada de des Rieux et al., 2006].

O mecanismo pela qual as SLN são absorvidas após administração oral encontra-se esquematicamente representado na Figura 3. No intestino, após administração das SLN, estas podem ser absorvidas através de dois processos. O primeiro pode ocorrer consequente da degradação dos lipídeos que constituem as SLN por enzimas (p.e. lípases), quebrando as ligações dos lipídeos formando-se mono e diacilgliceróis que podem solubilizar um fármaco pouco solúvel. A degradação é relativamente rápida devido à grande área de superfície das partículas. Os lipídeos são absorvidos conjuntamente com o fármaco solubilizado por um “mecanismo de absorção de promoção de efeito”. Para uma biodisponibilidade máxima, é necessário que o fármaco se encontre molecularmente disperso na matriz lipídica sólida durante a formação *in situ* dos mono e diacilgliceróis, para que o fármaco seja transportado através de micelas de acilgliceróis e diretamente absorvido através da parede intestinal (Figura 3) (Müller, Runge et al., 2006).

O outro processo envolve a interação dos lipídeos com os sais biliares, levando à formação de micelas constituídas por fármacos e lipídeos. Estas micelas promovem a absorção do fármaco. Os movimentos do TGI em associação com a presença de moléculas bioativas na superfície, tais como os sais biliares, transferem os óleos e gorduras para uma emulsão, sendo as gotículas da emulsão degradadas. A degradação, e subsequente solubilização dos fármacos são mais rápidas se as gotículas forem mais pequenas, preferencialmente de tamanho nanométrico em vez de micrométrico. Este processo leva à formação de micelas mistas antes da absorção por interação com os sais biliares. Ambos os princípios, a associação íntima do fármaco com o lipídeo e formação de uma dispersão ultrafina de tamanho nanométrico caracterizam a particularidade das SLN. O fármaco é assim libertado exatamente no local de absorção, levando a uma maior concentração entre o sangue e a parede intestinal (Müller, Runge et al., 2006).

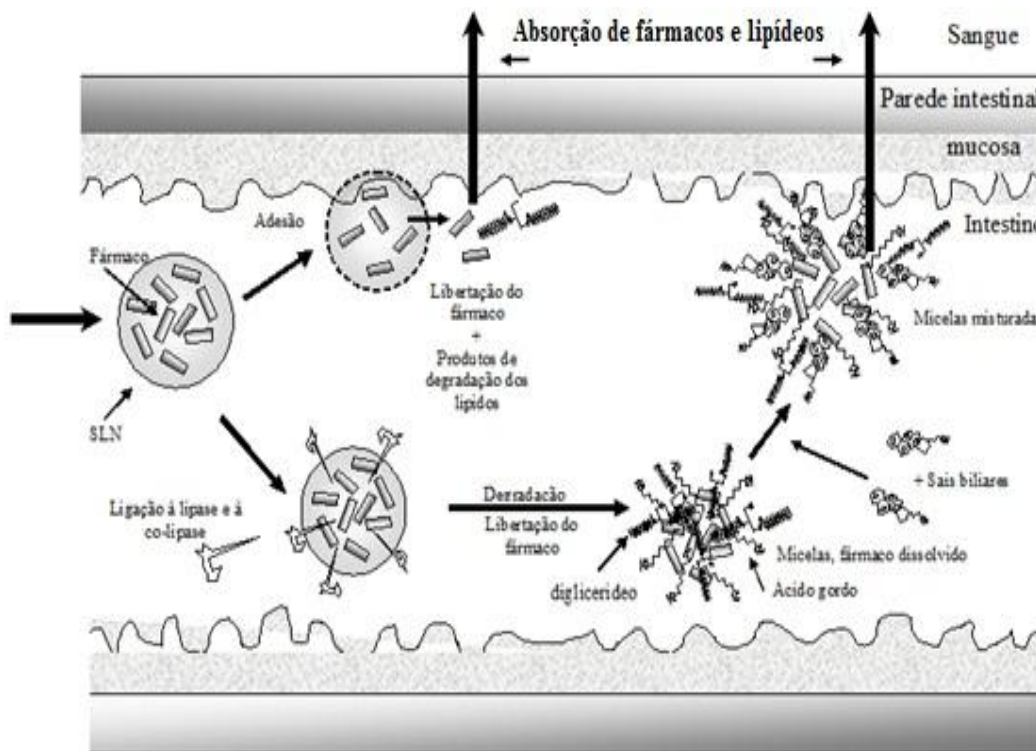


Figura 3. Mecanismos de absorção das SLN pela via oral. As partículas aderem à mucosa da parede do intestino e as moléculas de fármaco são libertadas exatamente no local de absorção [adaptado de Müller, Runge et al., 2006].

1.4.2. Via Nasal

A via nasal é uma via muito atrativa para a administração de um variado grupo de fármacos. Comparativamente a outras vias, é uma das vias mais fiáveis e favoráveis para a terapêutica sistémica crónica.

A cavidade nasal tem relativamente uma grande área de absorção e devido à presença de uma rica vascularização na mucosa nasal permite uma rápida absorção, capaz de evitar o fenómeno de primeira passagem hepática. Para além disso, tem sido bastante investigada para a vetorização de fármacos para o cérebro, com muita potencialidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) (Ugwoke et al., 2005).

Em condições fisiológicas normais, a mucosa nasal é revestida de muco que é composto por duas camadas: a camada externa, que é densa e viscosa e a camada interna, que é mais fluída e serosa. O muco nasal é constituído por 95% de água, 2,5-3% de mucina (uma glicoproteína) e o restante são eletrólitos, lipídeos e enzimas (especialmente enzimas proteolíticas) e anticorpos (Hussain, 1998). Este funciona como uma barreira protetora contra a entrada de moléculas estranhas ao organismo devido à rede polimérica constituída pela mucina e pela presença das enzimas proteolíticas que degradam rapidamente as moléculas à entrada. Desta forma, o muco tem uma função protetora que pode também dificultar a entrada de fármacos. As maiores barreiras apresentadas por esta via são (i) deposição e eliminação de fármacos na cavidade nasal através dos mecanismos mucociliares, que reduz o tempo de permanência destes e consequentemente a sua absorção, (ii) penetração da camada mucosa e transposição da membrana epitelial, é uma barreira física na qual os fármacos podem atravessar por transporte paracelular ou transcelular e (iii) a degradação enzimática que pode ocorrer por enzimas localizadas na cavidade nasal, como as lisossomais (Illum, 2003, Grassin-Delyle et al., 2012).

A absorção nasal de fármacos lipófilos ocorre usualmente pela via transcelular através de uma difusão passiva a favor do gradiente de concentração, por recetores ou por mecanismos de transporte vesicular. As moléculas polares podem atravessar através das junções epiteliais das células. Contudo, estas junções são estruturas dinâmicas que abrem e fecham, sendo o seu tamanho inferior a 10 Å. Desta forma, a via paracelular é menos eficiente para moléculas maiores e é dependente do peso molecular do fármaco (<1000 Da) (Illum, 2002).

É possível aumentar a absorção nasal dos fármacos através do uso de promotores de absorção que auxiliam o seu transporte através da cavidade nasal. Para o efeito podem usar-se substâncias mucoadesivas, como foi o caso deste trabalho. Estas substâncias permitem uma adesão das partículas à superfície do epitélio aumentando o seu tempo de permanência, para que o fármaco seja absorvido através da rica vascularização presente nesta mucosa (Illum, 2002, Illum, 2003). Como o muco nasal é substituído a cada 10-15 minutos e também existe o fenómeno de clearance mucociliar, os fármacos não têm tempo suficiente para serem absorvidos, logo uma solução viável é usar estes promotores de absorção (Hussain, 1998).

Para além das barreiras inerentes a esta via, as características físico-químicas dos fármacos também são responsáveis pelo sucesso associado a esta via. A solubilidade, carga, tamanho e difusão através das membranas biológicas são aspetos muito importantes a reter. Relativamente ao peso molecular dos fármacos, demonstrou-se que quanto maior, menor é a capacidade de absorção pela mucosa nasal. Sendo assim, o peso molecular máximo de uma molécula capaz de atravessar a barreira nasal é de 1000 Da, já na via oral são 300 Da. A nível de solubilidade, os fármacos lipófilos têm maior capacidade de serem permeabilizados (Hussain, 1998, Grassin-Delyle et al., 2012).

1.4.3. Via Ocular

A via ocular tem sido bastante investigada conjuntamente com as demais vias de administração para a vetorização de fármacos através de SLN. A administração por esta via é muito usada para tratamento de patologias locais do olho, contudo também enfrenta vários desafios, podendo ser ultrapassados pelo uso de SLN.

A maioria das limitações das vias de administração estão relacionadas com a fisiologia e anatomia do órgão em questão, e a via ocular não é exceção (Figura 4). O olho é parcialmente isolado do resto do corpo por diversas barreiras que impedem a passagem de certas substâncias, como fármacos. Estas barreiras contribuem para uma menor biodisponibilidade dos fármacos a nível ocular e consistem (i) numa camada mucosa aquosa do filme lacrimal que protege a superfície anterior do olho, (ii) num epitélio corneal com bastantes junções epiteliais e desmossomas, (iii) em vasos sanguíneos na íris que leva a fenestrações, (iv) numa camada não-pigmentada do epitélio ciliar que constitui uma barreira e limita a passagem de substâncias do sangue para a parte interna do olho e (v) no pigmento epitelial da retina (PER) conjuntamente com o endotélio dos vasos retiniais constituem as barreiras retina-sangue interna e externa, barreira que limita a passagem de substâncias do sangue para a retina e para a cavidade ocular (Diebold and Calonge, 2010).

Adicionalmente, alguns processos fisiológicos contribuem para a pobre eficácia dos fármacos administrados convencionalmente. Os fenómenos de pestajenar e a drenagem lacrimal através do sistema de drenagem que o olho possui contribuem para a

redução do tempo de permanência dos fármacos aplicados topicamente. As gotas oculares aplicadas topicamente são removidas em menos de 30 segundos (Xu et al., 2000). Desta forma, os fármacos não residem muito tempo no seu local de absorção, levando a uma necessidade de aplicar gotas várias vezes ao dia e de soluções altamente concentradas podendo traduzir-se em reações adversas tóxicas e dano ocular (Arici et al., 2000).

O epitélio corneal é praticamente impermeável a qualquer molécula com mais de 500 Da. Muitos dos fármacos aplicados localmente são superiores a isso e conseqüentemente não conseguem atravessar a córnea. Usualmente os fármacos lipófilos atravessam o epitélio corneal através das via transcelular, enquanto os fármacos hidrófilos atravessam através da via paracelular (Le Bourlais et al., 1998). Alternativamente, os fármacos são permeados através da conjuntiva e da esclera sendo este processo denominado de “passagem não produtiva”. Desta forma, menos de 5% dos fármacos aplicados localmente atingem os tecidos intraoculares (Sahoo et al., 2008).

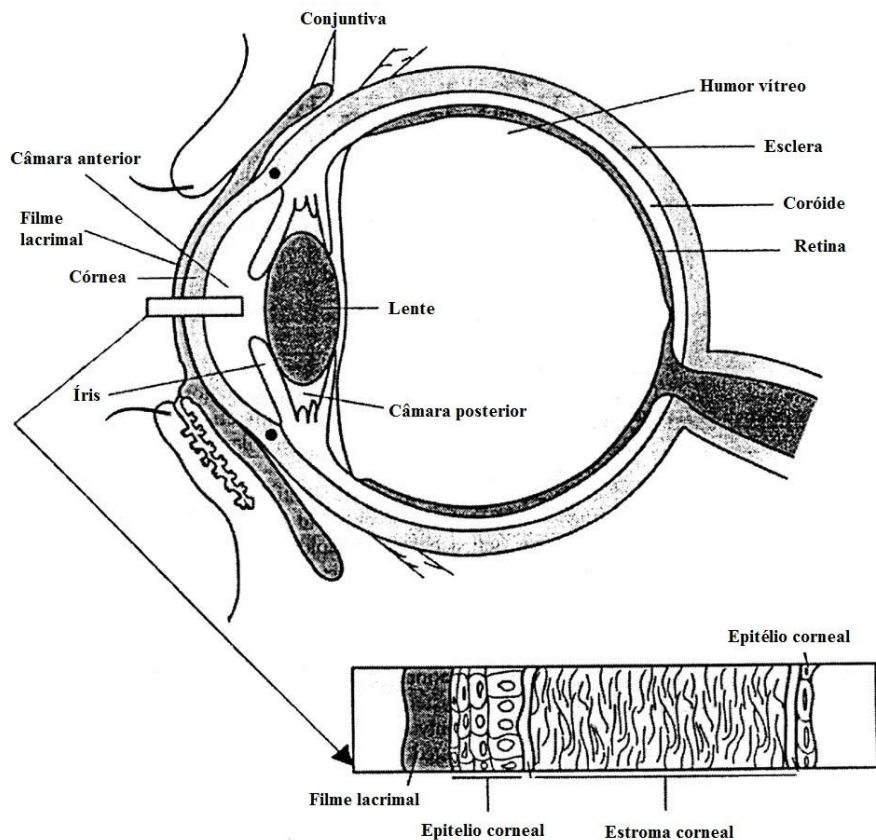


Figura 4. Ilustração esquemática da estrutura anatômica do olho humano [adaptado de Ludwig, 2005].

De acordo com Wood e colaboradores (1985), as nanopartículas são capazes de aderir à mucosa ocular demonstrando uma atividade intrínseca e são capazes também de interagir com o epitélio. Logo, a vetorização de fármacos, principalmente fracamente solúveis em água, que possam atravessar as barreiras oculares e atinjam eficazmente o seu local de absorção pode ser possível através de nanopartículas, entre as quais as lipídicas.

A administração ocular pode ser realizada não só localmente, mas também através de injeções intra-vítreas e implantes. Contudo, as gotas oculares continuam a ser o sistema mais prático, fácil e cómodo para os pacientes aderirem melhor à terapêutica.

As nanopartículas para a administração ocular devem ter um tamanho de partícula pequeno (100-300 nm) e uma distribuição de tamanho pequena para evitar que ocorra irritação ocular e para melhorar a biodisponibilidade dos fármacos. A sua composição deverá também ter compatibilidade com o olho. Os veículos destas nanopartículas são por norma iguais aos convencionais, i.e., soluções tampões com agentes conservantes e devem ser cuidadosamente analisados quanto à sua esterilidade, pH e osmolaridade (Sahoo et al., 2008).

Desta forma, um sistema para administração ocular não deve causar visão turva ou irritabilidade e não deve ser necessária a sua aplicação mais que duas vezes por dia.

1.4.4. Outras vias

As vias acima mencionadas são interessantes para nanopartículas mucoadesivas, como é o caso do presente trabalho e por isso foram abordadas de uma forma mais completa. Contudo as demais vias de administração são bastante abordadas e

investigadas para a vetorização de fármacos com SLN e a Tabela 2 demonstra alguns exemplos com referência aos fármacos, materiais e respetiva via de administração.

Tabela 2. Exemplos de fármacos veiculados em SLN e a sua propriedade terapêutica, lipídeo usado, agente tensioativo e respetiva via de administração.

Fármaco	Aplicação terapêutica	Via de administração	Referências
Clotrimazol	Antifúngico	Tópica	(Souto and Müller, 2005)
Clozapina	Antipsicótico	Intravenosa Intraduodenal	(Manjunath and Venkateswarlu, 2005)
Cyclosporina A	Imunosupressor	Oral	(Müller et al., 2008)
Diazepam	Sedativo, anticonvulsivante	Ocular	(Gokce et al., 2008)
Diazepam	Sedativo, anticonvulsivante	Rectal	(Sznitowska et al., 2001)
Insulina	Diabetes mellitus	Oral	(Fangueiro et al., 2011)
Insulina	Diabetes mellitus	Pulmonar	(Liu et al., 2008)
Cetoconazol	Antifúngico	Tópico	(Souto and Müller, 2005)

Timolol	Bloqueador beta-adrenérgico não-selectivo	Ocular	(Attama et al., 2009)
Vitamina E	Anti-rugas Antioxidante	Tópica	(Fangueiro et al., 2012a)

1.5. Revestimento das SLN com polímeros mucoadesivos

Os polímeros mucoadesivos são macromoléculas naturais ou sintéticas capazes de aderirem às mucosas biológicas. A introdução de polímeros mucoadesivos na literatura farmacêutica ocorreu há mais de 40 anos e atualmente é uma estratégia promissora para prolongar o tempo de permanência dos fármacos no local de absorção e de forma a direcionar especificamente o fármaco para diversas membranas (Grabovac et al., 2005).

Os polímeros mais vulgarmente aplicados para o efeito são os poliácridatos e derivados, o quitosano e derivados, o alginato de sódio e os derivados da celulose. Os polímeros devem possuir uma das seguintes características para promoverem a mucoadesividade: (i) grupos hidroxilos ou carboxílicos suficientes para a formação de pontes de hidrogénio, (ii) carga iónica (aniónica ou catiónica), (iii) elevado peso molecular, (iv) grande flexibilidade das suas cadeias poliméricas e (v) tensão superficial para distribuir-se na camada mucosa (Szucs et al., 2008).

Desta forma, reveste-se as SLN com estes polímeros para aumentar a absorção de fármacos nas mucosas. O revestimento antecede usualmente uma fase de polimerização, em que através da solubilização com soluções de pH controlado torna-se o polímero ativo. De seguida, procede-se ao revestimento das SLN com esta solução polimérica, fazendo com que o polímero se concentre na superfície das partículas (Figura 4).

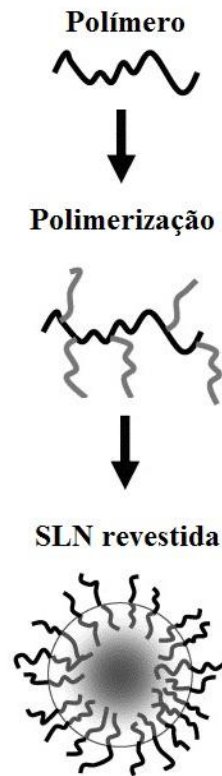


Figura 5. Ilustração esquemática do revestimento de SLN com polímeros. Após polimerização do polímero com soluções de pH controlado, procede-se ao revestimento das partículas, ficando o polímero localizado à sua superfície [adaptado de Lemarchand et al., 2004].

1.5.1. Alginato de sódio

O alginato de sódio é o sal do ácido algínico e é um polissacárido solúvel em água extraído de algas marinhas. É constituído por cadeias alternativas de ácido α -L-gulurónico e ácido β -D-manurónico. A Figura 6 demonstra a estrutura química deste polissacárido com os resíduos dos ácidos gulurónico e manurónico e as ligações destes para formar a estrutura do alginato (George and Abraham, 2006).

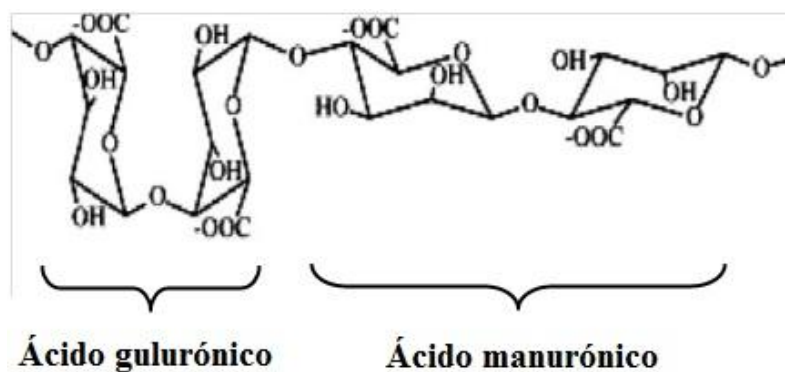


Figura 6. Estrutura química do alginato. O polímero é constituído por duas cadeias com dois monómeros de ácido gulurónico e dois monómeros de ácido manurónico [adaptado de George and Abraham, 2006].

A sua utilidade na indústria farmacêutica é reportada como agente viscosificante, estabilizante e agente tensioativo. Pode ser usado para a via oral, nasal ou ocular pelo seu estatuto GRAS, sendo biodegradável e isento de toxicidade. A sua administração oral não parece provocar respostas imunes, ao contrário do que é observado para a via intravenosa. Apesar da sua biocompatibilidade estar bastante investigada, para uma administração intravenosa reportou-se o desencadeamento da resposta imune e o desenvolvimento de fibrose (Cole et al., 1992, De Vos et al., 1996).

O uso do alginato de sódio para a via oral é de grande valor devido às suas propriedades mucoadesivas. Alguns estudos demonstraram que os polímeros com carga iónica são aplicados como agentes mucoadesivos (Chickering and Mathiowitz, 1995, Chang et al., 1985). Uma maior carga iónica resultará numa maior adesão e polímeros aniónicos parecem ser mais eficazes que os polímeros catiónicos (Chang et al., 1985).

O alginato é um polímero aniónico com grupos carboxílicos, sendo por isso um bom agente mucoadesivo. As suas propriedades mucoadesivas no estado hidratado podem dever-se à formação de pontes de hidrogénio ou interações iónicas. Existem estudos onde reportam que o alginato apresenta maior mucoadesividade que outros polímeros bastante usados, tais como o quitosano, a carboximetilcelulose, o poliestireno e o ácido poli-láctico (George and Abraham, 2006). Devido a esta propriedade

mucoadesiva, as partículas aderem mais facilmente às mucosas e o tempo de permanência do fármaco no local de absorção é retardado, possibilitando que mais fármaco seja absorvido e conseqüentemente haverá uma maior biodisponibilidade e eficácia terapêutica.

1.5.2. Quitosano

O quitosano é um polímero muito abundante na natureza. A quitina é o principal componente estrutural dos crustáceos, sendo também encontrada em outras espécies, como os moluscos, fungos e insetos. A forma mais comum do quitosano é o α -quitosano (Shepherd et al., 1997, George and Abraham, 2006). Os seus sais são solúveis em água, sendo a sua solubilidade dependente do grau de acetilação e do pH do meio (Felt et al., 1998).

A sua vasta utilização deve-se à fácil manipulação e baixo custo deste polímero, sendo também classificado como GRAS (Muzzarelli, 2010).

Devido à sua natureza catiónica, deduz-se que o quitosano interfere com o transporte dos lipídeos no intestino, formando micelas com os sais biliares, ácidos gordos e colesterol, promovendo a sua absorção (Felt et al., 1998). A sua biocompatibilidade já está bastante divulgada e quanto à sua biodegradabilidade, este polímero é metabolizado por certas enzimas, tal como a lisozima (Muzzarelli, 1997).

As suas propriedades mucoadesivas já foram reportadas (Illum, 1998, Felt et al., 1998) e o seu uso como agente mucoadesivo na vetorização de fármacos tem sido bastante estudado. A sua aplicação como agente mucoadesivo para a via oral é equivalente ao alginato, pois permite que as partículas adiram mais facilmente à mucosa intestinal, aumentando o tempo de permanência no seu local de absorção (Portero et al., 2002). Um mecanismo de ação que foi sugerido baseia-se nas interações iónicas entre os grupos amino carregados positivamente no quitosano (Figura 7) e as cargas negativas presentes no muco (camada mucosa). Esta interação é sobretudo eletrostática (Deacon et al., 2000).

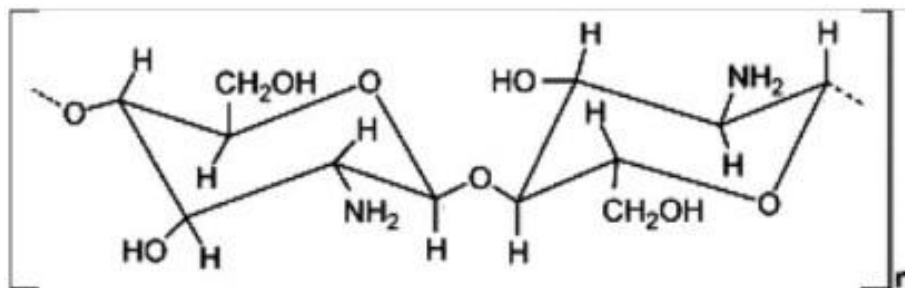


Figura 7. Estrutura química do quitosano [adaptado de George and Abraham, 2006].

A sua utilidade não se limita apenas a agente mucoadesivo, sendo também reportado o seu uso como adjuvante de permeação. Esta propriedade deve-se à capacidade deste polímero abrir as junções epiteliais (Junginger and Verhoef, 1998) e devido à sua natureza catiónica, interage com as membranas resultando numa reorganização estrutural das proteínas das junções epiteliais. O quitosano é capaz de aumentar a absorção pela via paracelular, o que é importante para moléculas hidrófilas como péptidos e proteínas (Schipper et al., 1997).

1.5.3. Mecanismo de adesão das nanopartículas com propriedades mucoadesivas

A figura 8 sumariza o mecanismo de adesão que ocorre às SLN com propriedades mucoadesivas. Ocorre interação eletrostática ou formação de pontes de hidrogénio entre as cadeias da camada mucosa com as cadeias poliméricas que revestem as partículas, o que promove a “fixação” destas partículas na mucosa. Como as SLN permitem uma libertação prolongada, efetua-se a libertação do fármaco a partir das SLN aderidas, fazendo com que maior quantidade de fármaco seja posteriormente absorvido diretamente no seu local de absorção.

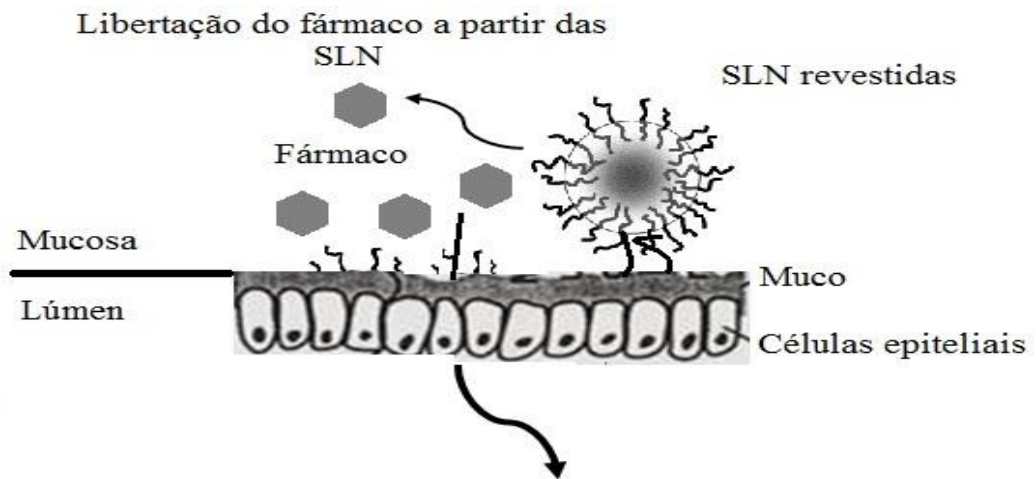


Figura 8. Ilustração esquemática das propriedades mucoadesivas das nanopartículas lipídicas revestidas com polímeros de revestimento na parede intestinal. A mucoadesividade das nanopartículas à mucosa intestinal permite prolongar o tempo de residência do fármaco diretamente no local de absorção.

Descrição dos materiais e métodos

Neste capítulo serão descritos todos os métodos e materiais utilizados para o desenvolvimento e otimização de uma formulação de SLN através de um desenho fatorial 3^3 , a caracterização físico-química das nanopartículas obtidas, o revestimento com o alginato de sódio e a avaliação da influência do pH na fase aquosa interna.

A influência na escolha dos agentes tensioativos e do lipídeo sólido é uma tarefa bastante importante no desenvolvimento e produção de novos sistemas terapêuticos à base de SLN. Todos os constituintes devem ser quimicamente compatíveis e os agentes tensioativos devem ter um EHL ótimo que permita estabilizar as interfaces entre a fase aquosa e lipídica, minimizando a sua tensão superficial. A escolha correta dos dois agentes tensioativos (lipófilo e hidrófilo) afetará diretamente a formação das partículas. Desta forma, a lecitina de soja (Lipoid® SPC-3) foi selecionada como agente tensioativo lipófilo e apresenta um EHL de aproximadamente 7-9, e o poloxâmico 407 (Lutrol® LF127) foi selecionado como o agente tensioativo hidrófilo apresentando um EHL de aproximadamente 29. O lipídeo sólido selecionado foi a trimiristina ou Dynasan® 114 (triglicerídeo microscritalino composto por éster de glicerina e ácido mirístico) com um ponto de fusão de 55-58°C e um EHL de aproximadamente 2.

2.1. Materiais e Reagentes

Tabela 3. Descrição dos materiais utilizados no protocolo experimental para a preparação das SLN.

Material
Gobelés de 50,0 mL
Balança Analítica
Espátula de metal

Ultra Turrax®T25 (IKA-Labortechnik, Alemanha)

Aagitador magnético

Placa de aquecimento

Micropipetas de 5,0 µL; 1000 µL

Microscópio de fluorescência (Eclipse50i Nikon, Japan)

Potenciômetro (*inoLab pH Level 1*)

Tabela 4. Descrição dos reagentes utilizados no protocolo experimental para a preparação das SLN.

Reagente	Fornecedor
Dynasan® 114 (D114)	Sasol GmbH (Witten, Alemanha)
Lipoid® SPC-3 (S PC-3)	Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha)
Lutrol® LF127 (LF127)	BASF (Ludwigshafen, Alemanha)
Colato de sódio	Sigma Aldrich (Madrid, Espanha)
Glicerol	Acopharma (Barcelona, Espanha)

Alginato de sódio	VWR (Oeiras, Portugal)
Hidróxido de sódio (NaOH)	Acopharma (Barcelona, Espanha)
Ácido clorídrico (HCl)	Acopharma (Barcelona, Espanha)

Todos os reagentes descritos na Tabela 4 foram usados sem qualquer tratamento prévio e as soluções de NaOH e HCl obedeceram às normas indicadas na Farmacopeia Portuguesa VIII.

2.2. Preparação das nanopartículas de lipídeos sólidos

O método utilizado para a obtenção das nanopartículas foi adaptado de um método de dupla emulsão descrito por García-Fuentes (García-Fuentes et al., 2003) e envolve dois passos (Figura 9). O primeiro passo envolve a adição da fase aquosa interna (1.0 mL) a quente ($\approx 60\text{ }^{\circ}\text{C}$), à fase oleosa composta por Dynasan® 114, Lipoid® SPC-3 e glicerol à mesma temperatura ($\approx 60^{\circ}\text{C}$). Homogeneizou-se a emulsão interna A/O no Ultra Turrax®T25 durante 15 minutos. O segundo passo envolve a dispersão da pré-emulsão A/O através de agitação magnética numa fase aquosa externa gelada contendo Lutrol®LF127 e colato de sódio (0.1% m/m) dissolvidos em água ultra pura para permitir a formação das SLN. As formulações obtidas foram usadas nos estudos posteriores.

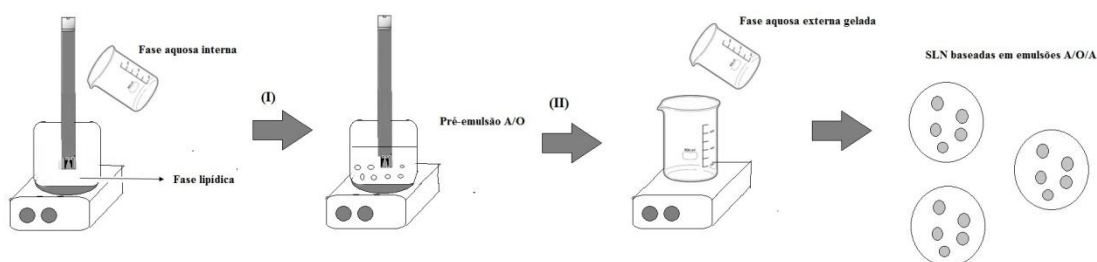


Figura 9. Ilustração esquemática do método da emulsão múltipla.

2.3. Otimização de uma formulação de SLN através de um desenho factorial 3³

No desenvolvimento das SLN foram avaliadas 3 variáveis diferentes e a sua influência nos parâmetros físico-químicos das nanopartículas através de um desenho factorial 3³ composto por 3 variáveis, cada uma avaliada a 3 níveis. As variáveis independentes foram as concentrações de D114, S PC-3 e LF127. As variáveis dependentes estabelecidas foram o tamanho hidrodinâmico das partículas (THP), o índice de polidispersão (IDP) e o potencial zeta (PZ). Foram desenvolvidas 11 formulações através do desenho factorial e designadas de SLN1 a SLN11. Para cada variável independente, estabeleceu-se três níveis descritos como mínimo (-1), médio (0) e máximo (+1) (Tabela 5). Estes valores foram escolhidos com base em estudos de pré-formulação e descrição na literatura. O desenho factorial foi aplicado com o objetivo de maximizar a eficácia experimental através de um número reduzido de experiências. Os dados foram estatisticamente analisados utilizando o programa STATISTICA 7.0 (Stafsoft, Inc.).

Tabela 5. Descrição dos níveis de cada variável independente do desenho factorial. Os três níveis são descritos como mínimo (-1), médio (0) e máximo (+1).

Variáveis independentes	Níveis		
	Nível mínimo (-1)	Nível médio (0)	Nível máximo (+1)
D114 (m/m%)	1.00	1.250	1.50
S PC-3 (m/m %)	0.25	0.375	0.50
LF127 (w m/m %)	0.50	1.000	1.50

2.4. Caracterização físico-química

O THP das partículas e o seu IDP foram analisados por dispersão dinâmica da luz (DLS, *Dynamic Light scattering*) a 25°C (Malvern Zetasizer Nanoseries). O DLS é

uma técnica vulgarmente aplicada para a caracterização físico-química de dispersões coloidais, e baseia-se no movimento browniano das partículas. Uma partícula grande, move-se mais lentamente, logo o sinal recebido traduzirá num tamanho de partícula maior.

As amostras foram diluídas com água ultra-pura para a análise ocorrer em concentrações aceitáveis. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. O PZ também foi analisado com o mesmo aparelho, uma vez que permite determinar a mobilidade eletroforética convertendo em potencial elétrico à superfície das partículas. A medição foi efetuada em água ultra-pura com a condutividade ajustada a $-50 \mu\text{S}/\text{cm}$ com uma solução de cloreto de sódio (0.9% m/v).

2.5. Revestimento com o alginato de sódio

O alginato de sódio foi dissolvido numa solução aquosa ácida com HCl 0.1 M (pH ajustado a 3.5-4.0) durante a noite através de agitação magnética a 350 rpm. As soluções obtidas foram filtradas por uma membrana de nitrocelulose com um poro de $0.45\mu\text{m}$ para remover possíveis impurezas e agregados. Na etapa de preparação, a solução de alginato de sódio substitui a água na fase aquosa externa. Foram preparadas 4 concentrações distintas (0.25; 0.5; 0.75; e 1.0% m/m), para avaliar qual a concentração ideal que não altera abruptamente os parâmetros iniciais otimizados da formulação de SLN determinados no desenho fatorial.

2.6. Análise da morfologia das nanopartículas de lipídeos sólidos

A formulação com os parâmetros otimizados e revestida com o alginato de sódio foi observada por microscopia de fluorescência (Eclipse 50i, Nikon, Japão). Para além de possibilitar observar a morfologia e a ausência de agregados, foi usada para confirmar a presença de emulsão múltipla. Desta forma, recorreu-se às propriedades hidrófilas do corante azul-de-metileno. A fase aquosa interna foi substituída por uma

solução aquosa de azul-de-metileno (5.0 μ L de corante + 995 μ L de água ultra-pura). O corante irá mimetizar um fármaco hidrófilo encapsulado nas SLN e como tal, deverá ficar na fase aquosa interna rodeado pela matriz lipídica.

2.7. Análise da influência do pH da fase aquosa interna

A avaliação do pH na fase aquosa interna é importante quando se pretende incorporar fármacos peptídicos e proteicos, uma vez que cada um tem um pH ótimo para realizar e manter a sua atividade biológica. Também pretende-se avaliar a influência que a variação do pH terá nos parâmetros físico-químicos das nanopartículas, i.e., no THP, IDP e PZ. Desta forma, a fase aquosa interna da SLN otimizada foi substituída por soluções com pH ajustados a 2, 4, 6, 8 e 10 com HCl 0.1M e NaOH 0.1M.

Resultados e Discussão dos Resultados

3.1. Desenvolvimento e otimização de uma formulação de SLN através do desenho fatorial

Um desenho fatorial 3^3 foi realizado para analisar o efeito dos níveis das variáveis independentes nas variáveis dependentes com o objetivo de desenvolver uma formulação ótima e estável de SLN.

Tabela 6. Resultados obtidos dos parâmetros físico-químicos analisados para as 11 formulações de SLN.

Formulação	D114 (m/m%)	S PC-3 (m/m%)	LF127 (m/m%)	THP (nm)±DP	IDP±DP	PZ (mV)
SLN1	1.5	0.25	0.5	690.2±3.56	0.786±0.148	-0.26
SLN2	1.0	0.25	0.5	167.8±7.21	0.333±0.013	-1.51
SLN3	1.5	0.5	0.5	256.5±8.70	0.648±0.004	-1.52
SLN4	1.0	0.5	0.5	158.6±2.05	0.188±0.001	-0.93
SLN5	1.5	0.25	1.5	215.5±3.82	0.486±0.006	-0.88
SLN6	1.0	0.25	1.5	128.9±2.05	0.171±0.019	-0.60
SLN7	1.5	0.5	1.5	233.9±13.65	0.496±0.07	-0.23
SLN8	1.0	0.5	1.5	168.7±4.38	0.348±0.018	-1.68
SLN9	1.25	0.375	1.0	246.1±5.94	0.484±0.002	-1.42
SLN10	1.25	0.375	1.0	177.2±2.97	0.325±0.017	-0.74
SLN11	1.25	0.375	1.0	176.8±0.35	0.310±0.012	-1.13

Os parâmetros analisados, i.e., as variáveis dependentes como o THP, IDP e PZ para as 11 formulações de SLN desenvolvidas estão descritos na Tabela 6. O THP

Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas

variou entre 128.9 ± 2.05 nm (SLN 6) e 690.2 ± 3.56 nm (SLN 1), enquanto o IDP variou entre 0.171 ± 0.019 (SLN 6) e 0.786 ± 0.148 (SLN 1). Como esperado, o PZ não variou muito e manteve-se ligeiramente negativo. Isto deve-se ao facto de os materiais usados serem de natureza não-iónica. Este parâmetro é muito importante para garantir a estabilidade da emulsão múltipla, assim como para as suas propriedades mucoadesivas, levando a um maior tempo de residência do fármaco no local de absorção ou ação. Para uma formulação ótima, os parâmetros avaliados como o THP e IDP devem ser menores quanto possíveis, independentemente da via de administração.

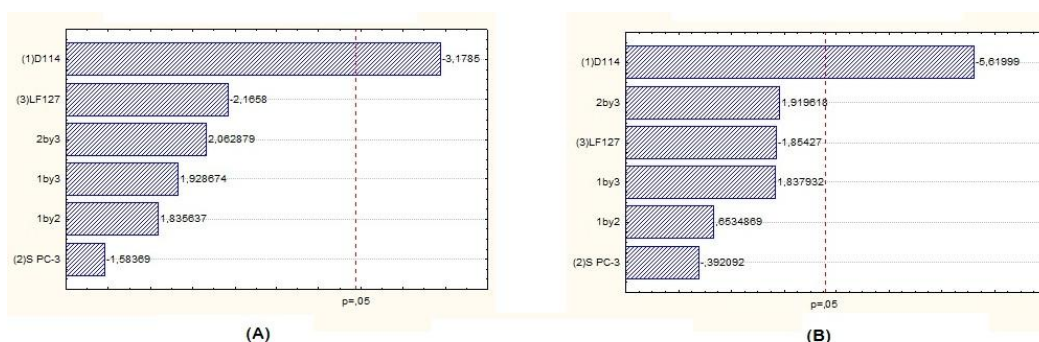


Figura 10. Gráfico de Pareto dos parâmetros analisados para o THP (A) e para o IDP (B).

Tabela 7. Análise estatística pelo teste ANOVA para o THP e IDP com os respectivos valores de F e p.

Variáveis dependentes	THD		IDP	
	Valor de F	Valor de p	Valor de F	Valor de p
(1) D114	10.10289	0.033583	31.58426	0.004928
(2) S PC-3	2.50809	0.188435	0.15374	0.714984
(3) LF127	4.69067	0.096262	3.43831	0.137309
1 por 2	3.36956	0.140307	0.42705	0.549103

Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas

1 por 3	3.71978	0.126007	3.37799	0.139934
2 por 3	4.25547	0.108099	3.68493	0.127328
Total	240795.1	10	31.58426	0.004928

Uma análise da variância através de um teste ANOVA foi realizada para as 3 variáveis. De acordo com a Figura 10A, relativamente ao THP, o único fator que revelou-se estatisticamente significativo foi a concentração de lipídeo sólido (valor de $p < 0.05$; 0.033583, Tabela 7). As restantes variáveis, i.e., as concentrações de S PC-3 e LF127, assim como as interações entre elas não foram estatisticamente significativas (valor de $p > 0.05$). Os mesmos resultados foram encontrados na avaliação das variáveis dependentes no IDP (valor de $p < 0.05$; 0.004928, Tabela 7 e Figura 10B). A concentração de lipídeo sólido foi a única variável independente a afetar o IDP. Estes resultados sugerem que elevadas quantidades de lipídeo sólido afeta a estabilidade da emulsão múltipla, devido a um aumento da viscosidade do sistema que aumenta a tensão à superfície das partículas. Como resultado, poderá ocorrer fenómenos de aglomeração e sedimentação, originando THP mais elevados. De acordo com Schubert and Muller-Goymann (2003), o aumento no THP deve-se à redução do fluxo de difusão de moléculas de soluto através da fase aquosa externa que por sua vez, origina um aumento na viscosidade da fase lipídica. Para além disso, a concentração de lipídeo sólido estabelece uma relação e balanço entre as fases aquosas interna e externa, relevando ser um importante parâmetro a controlar. De acordo com Harms and Muller-Goymann (2011), o comportamento cristalino das matrizes lipídicas depende fortemente na composição qualitativa e quantitativa do lipídeo e agentes tensioativos usados. Por isso, um aumento na concentração de lipídeo requer um aumento do agente tensioativo usado, o que pode levar conseqüentemente a um excesso de agente tensioativo na fase aquosa externa seguido de formação de outras nanoestruturas, como micelas. A presença destas nanoestruturas, afeta diretamente o IDP, uma vez que as micelas por norma têm THP de 10 a 100 nm e o THP das formulações são superiores (> 100 nm). Isto explica também os resultados encontrados nos gráficos de Pareto (Figura 10) e nos gráficos de superfície de resposta (Figuras 11 e 12), demonstrando que a concentração de lipídeo sólido afeta ambos os parâmetros, THD e IDP.

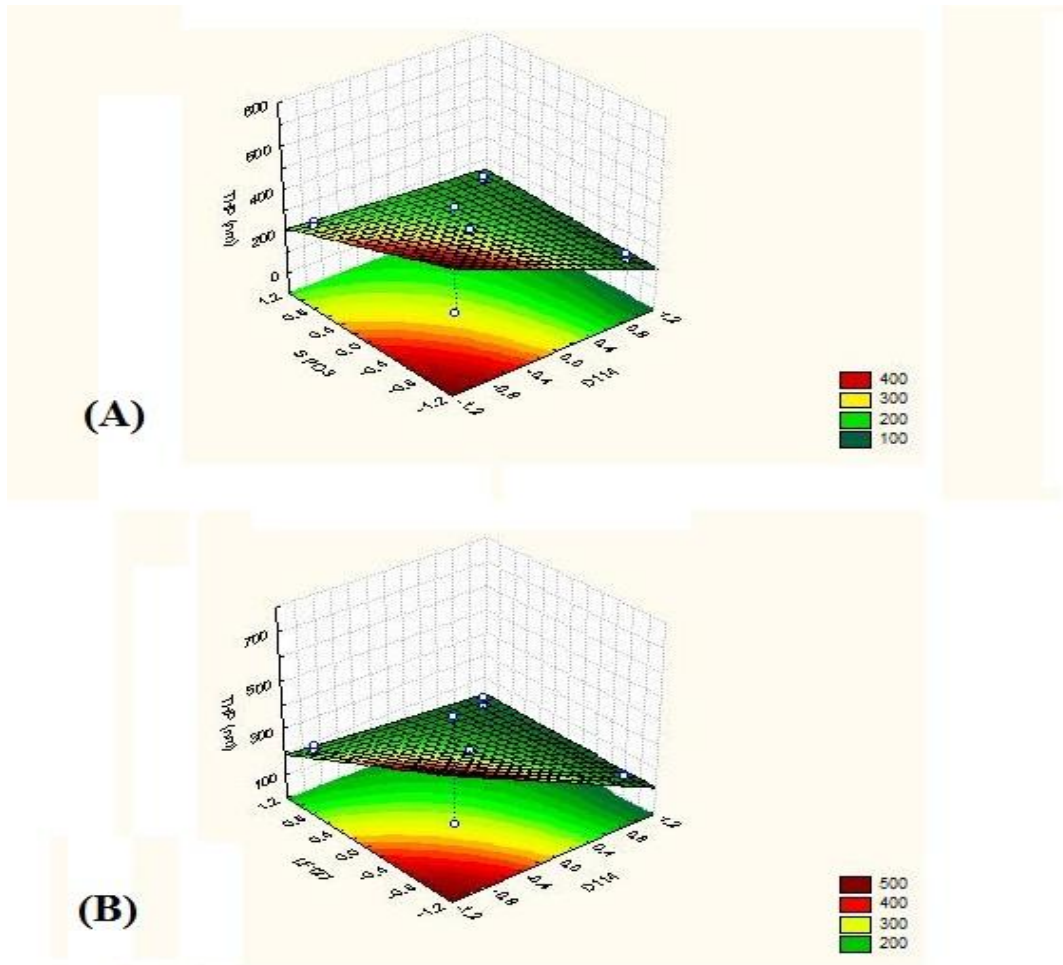


Figura 11. Gráfico de superfície de resposta do THP: (A) efeito da concentração de D114 vs concentração de S PC-3 e (B) efeito da concentração de D114 vs concentração de LF127.

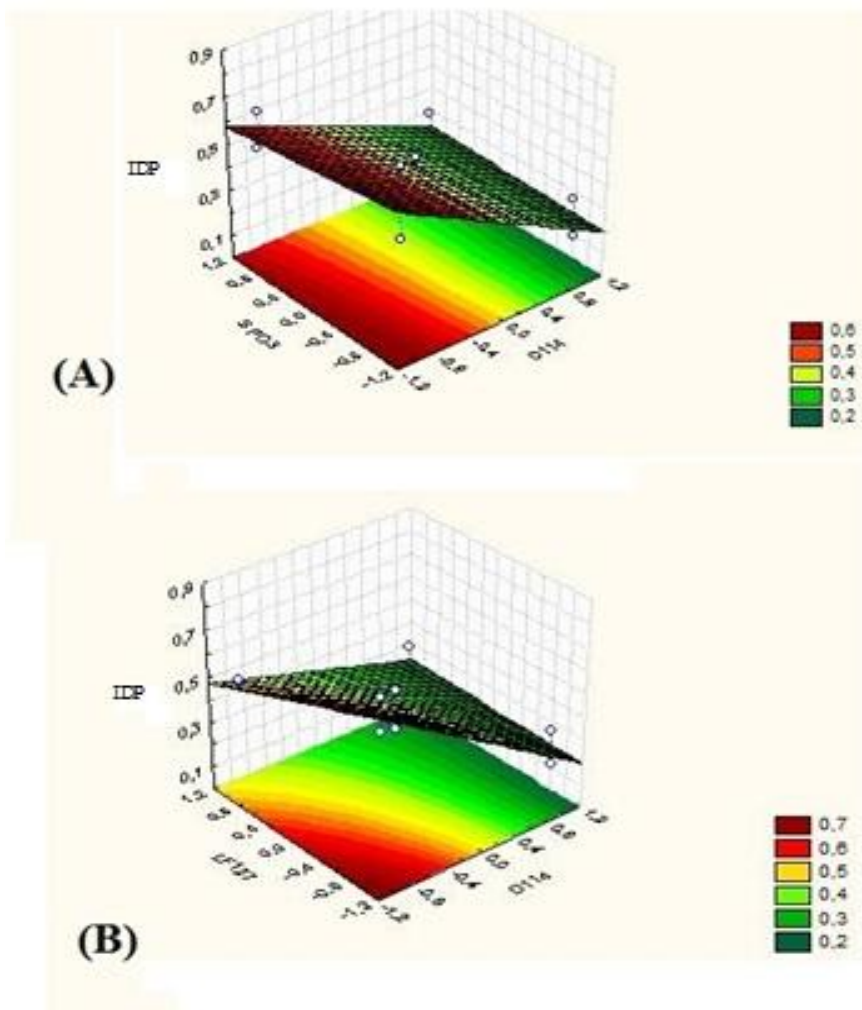


Figura 12. Gráfico de superfície de resposta do IDP: (A) efeito da concentração de D114 vs concentração de S PC-3 e (B) efeito da concentração de D114 vs concentração de LF127.

Uma vez que ambos os parâmetros são limitantes no desenvolvimento e produção de SLN, o objetivo do desenho fatorial foi encontrar uma formulação ótima, i.e., como os parâmetros físico-químicos mais adequados para a incorporação de fármacos hidrófilos.

Desta forma, a formulação considerada ótima é composta por 1%(m/m) de D114, 0.25%(m/m) de S PC-3 e 1.5%(m/m) LF127. Em suma, a formulação designada como SLN 6 foi a selecionada.

3.2. Revestimento das SLN com o alginato de sódio

O uso do alginato de sódio como agente de revestimento é bastante comum para a via oral, uma vez que prolonga o tempo de residência na mucosa TGI, levando conseqüentemente a uma maior capacidade de absorção. Esta propriedade deve-se à capacidade do polímero interagir com o muco e desta forma, aumentar a mucoadesividade das partículas. Este polímero foi usado com o objetivo de aumentar o baixo PZ apresentado pela formulação SLN6 (-0.60 mV). Segundo os resultados apresentados na Figura 13, todas as concentrações de alginato de sódio testadas foram eficazes no aumento do PZ, sendo o aumento mais significativo na concentração de 0.75%(m/m). Desta forma, pode deduzir-se que o polímero foi eficientemente absorvido na superfície das SLN já que aumentou de -1.59 para -7 mV. O aumento do PZ demonstrou não ser dependente da concentração de polímero usado, uma vez que o valor de PZ da concentração de 0.75%(m/m) foi superior ao da concentração de 1.0%(m/m). Este fenómeno pode dever-se ao facto de ocorrer uma saturação de moléculas de alginato de sódio à superfície das partículas, levando a um completo revestimento.

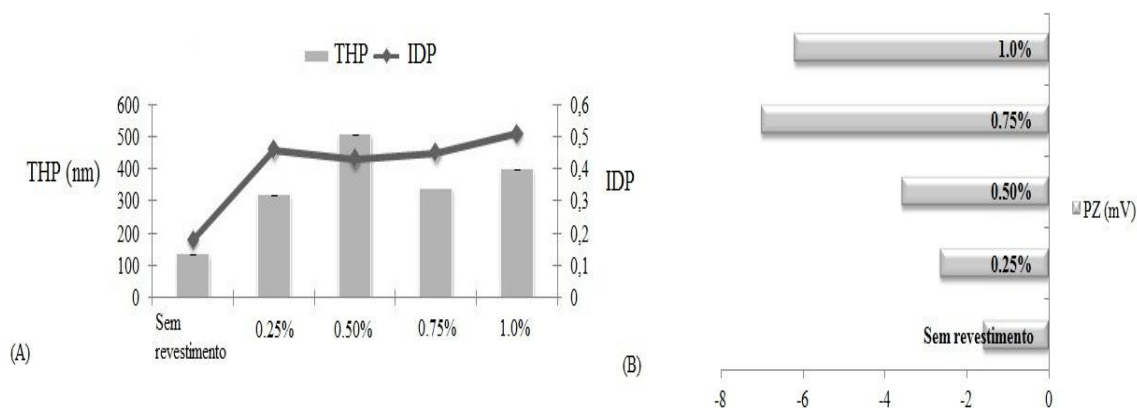


Figura 13. Resultados dos parâmetros físico-químicos avaliados após revestimento com as 4 concentrações de alginato de sódio testadas e sem revestimento: (A) THP e IDP e (B) PZ.

Contudo, os restantes parâmetros físico-químicos de todas as formulações aumentaram, i.e. o THP e o IDP. O aumento mais significativo foi na formulação com a concentração de 0.5%(m/m) de alginato de sódio. Isto pode ser explicado baseado num aumento da viscosidade dos sistemas, que pode levar a difusão da fase aquosa interna para a fase aquosa externa e vice-versa. Com base nos resultados obtidos, a concentração de alginato de sódio escolhida foi a de 0.75%(m/m), uma vez que apresentou o valor mais elevado de PZ, com valores adequados de THP e IDP. Sendo assim, a SLN6 apresenta um THP de 340.40 ± 32.98 nm, um IDP de 0.45 ± 0.01 e um PZ de -7.00 ± 1.90 mV.

3.3. Análise da morfologia das SLN e verificação da existência de emulsão múltipla

Para a análise da presença de emulsão múltipla nas SLN produzidas, recorreu-se ao uso de um corante hidrófilo como o azul-de-metileno. O corante foi adicionado à fase aquosa interna da múltipla emulsão aquando do processo de produção, para que desta forma, mimetize um fármaco com as mesmas características hidrófilas. A Figura 14 permite visualizar uma fase interna azulada rodeada pela matriz lipídica. Isto comprova a existência de uma emulsão A/O/A. Para além disso, esta técnica permitiu visualizar a forma esférica das partículas, assim como a aparente homogeneidade do THD e a ausência de aglomerados. Estes resultados confirmam a presença de uma emulsão A/O/A e também os bons parâmetros físico-químicos já reportados.

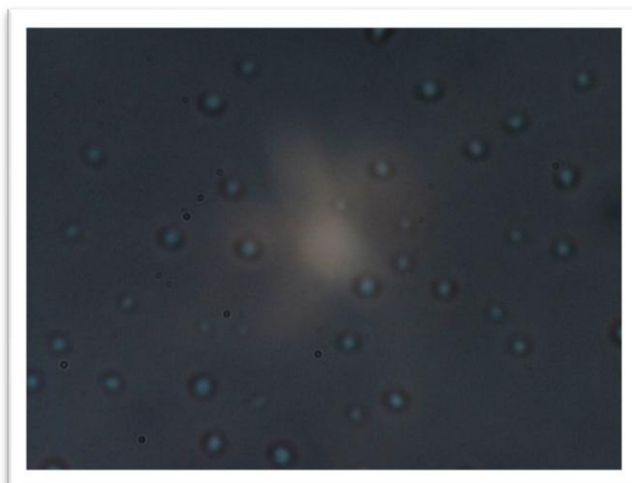


Figura 14. Imagem das SLN revestidas com alginato de sódio através de microscopia de fluorescência (100x). Na imagem é possível verificar que o interior das gotículas é azulado, indicando que o corante azul-de-metileno foi eficazmente encapsulado.

3.4. Avaliação da influência do pH da fase aquosa interna

O pH é um parâmetro bastante importante que influencia a estabilidade e funcionalidade das SLN. Este sistema não só é útil para a incorporação de moléculas hidrófilas, mas como para péptidos e proteínas com essas mesmas propriedades. Como tal, o pH da fase onde estará o fármaco/proteína deverá assegurar a atividade biológica do mesmo, i.e., não deverá desnaturar ou de alguma forma inativar a sua ação fisiológica. Por este motivo, realizou-se o estudo da influência de vários valores de pH na fase aquosa interna, uma vez que a força iónica é fortemente dependente do pH e pode levar à agregação das partículas (Zimmermann and Muller, 2001).

Todas as formulações revelaram-se macroscopicamente estáveis para realizar o estudo. De acordo com os resultados representados na Tabela 8, pode-se verificar que o pH 2 revelou afetar fortemente o THP. O THP passou de alguns nanómetros (340.40 ± 32.98 nm) para micrómetros (1621 ± 217.1 nm). As restantes formulações (pH 4, 6, 8 e 10) apresentaram um ligeiro aumento no THP e no IDP para os valores de pH testados, contudo permaneceram na zona nano. De acordo com o estudo de Schwarz and Mehnert (1999), a diminuição do valor de pH pode levar a um aumento da protonação dos grupos funcionais à superfície da partícula. Também a diminuição do pH pode levar

a um aumento da concentração de eletrólitos, que pode causar uma compressão na camada de difusão das partículas, assim como uma repulsão eletrostática e conseqüentemente destabilização das SLN. Os resultados sugerem que o pH baixo na fase aquosa interna pode destabilizar as SLN. Contudo, o pH entre 4 e 10, pode ser usado para incorporar péptidos ou proteínas sem que as propriedades físico-químicas das SLN sejam significativamente afetadas. O PZ, que é o principal fator afetado pela variação do pH oscilou entre -6.38 to -9.59 mV. O pH final das formulações foi também medido e apresentou um valor em torno dos 6-6.5.

Tabela 8. Avaliação da influência da variação do pH da fase aquosa interna nos parâmetros físico-químicos, i.e., THP (nm), IDP e PZ (mV).

pH (fase aquosa interna)	THP (nm)±DP	IDP±DP	PZ (mV)
2	1621±217.1	0.388±0.260	-9.52
4	709.5±20.73	0.580±0.151	-8.63
6	614.6±126.7	0.799±0.191	-9.59
8	517.9±144.3	0.639±0.041	-6.38
10	491±65.62	0.614±0.061	-7.61

Conclusão geral

O desenho fatorial aplicado permitiu formular e otimizar com sucesso formulações de SLN com parâmetros físico-químicos satisfatórios, recorrendo a um número mínimo de experiências. A influência das variáveis independentes (i.e., concentrações de lipídeo sólido, agente tensioativo hidrófilo e lipófilo) no THP, IDP e PZ foi avaliado por análise estatística. Verificou-se que o THP e o IDP das partículas produzidas são fortemente dependentes da concentração de lipídeo sólido que traduz a tendência da coalescência de fases na presença de elevadas concentrações de lipídeo sólido. A formulação considerada como otimizada para os restantes estudos foi a SLN6, composta por 1.0%(m/m) de D114, 0.25%(m/m) de S PC-3 e 1.5%(m/m) de LF127. Esta análise estatística pode ser usada para desenvolver a mesma tipologia de sistemas, i.e., SLN baseada em emulsão múltipla.

O revestimento das SLN com o alginato de sódio aumentou o valor de PZ e isso pode melhorar as capacidades mucoadesivas das partículas em mucosas, como a mucosa TGI, nasal ou ocular. A concentração ideal de alginato de sódio testada foi 0.75%(m/m).

A influência do pH da fase aquosa interna revelou-se forte para pH baixo, i.e., para valores de pH entre 2-3 o THP resulta em valores micrométricos. Contudo, os parâmetros físico-químicos nos restantes pH testados (4, 6, 8 e 10) apenas mostram um ligeiro aumento do THP e IDP.

Os resultados sugerem que o uso de SLN baseadas em emulsão múltipla pode ser uma abordagem promissora para a incorporação de péptidos e proteínas e fármacos hidrófilos.

Bibliografia Geral

Aditya, N. P. et alii. (2010). Artemether-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics, toxicological and in vivo anti-malarial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40 (5), pp. 448-455.

Ann, P. D. (2004) Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7 (12), pp. 30-35.

Arici, M. K. et alii. (2000). Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol*, 28 (2), pp. 113-7.

Attama, A. A. and Müller-Goymann, C. C. (2008). Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315 (1-3), pp. 189-195.

Attama, A. A., Reichl, S. and Müller-Goymann, C. C. (2009) Sustained Release and Permeation of Timolol from Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles through Bioengineered Human Cornea. *Current Eye Research*, 34, 698-705.

Battaglia, L. and Gallarate, M. (2012). Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 9 (5), pp. 497-508.

Battaglia, L. et alii. (2010) Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. *Journal of Microencapsulation*, 27 (1), pp. 78-85.

Blasi, P. et alii. (2007) Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (6), pp. 454-477.

Boisseau, P. and Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12 (7), pp. 620-636.

Carlotti, M. E. et alii. (2005). W/O/W Multiple Emulsions for Dermatological and Cosmetic Use, Obtained with Ethylene Oxide Free Emulsifiers. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 26, pp. 183-192.

Chang, H. S. et alii. (1985). Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (4), pp. 399-405.

Chickering, D. E. and Mathiowitz, E. (1995). Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. *Journal of Controlled Release*, 34 (3), pp. 251-262.

Cole, D. et alii. (1992). Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia*, 35 (3), pp. 231-237.

Corrias, F. and Lai, F. (2011). New methods for lipid nanoparticles preparation. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, 5 (3), pp. 212-213.

Das, S. et alii. (2011) Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88 (1), pp. 483-489.

De Vos, P. et alii. (1996). Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation*, 62 (7), pp. 893-899.

Deacon, M. P. et alii. (2000). Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. *Biochemistry Journal*, 348, pp. 557-563.

Des Rieux, A. et alii. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116 (1), pp. 1-27.

Diebold, Y. and Calonge, M. (2010). Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res*, 29 (6), pp. 596-609.

Doktorovova, S. et alii. (2011). Cationic solid lipid nanoparticles (cSLN): Structure, stability and DNA binding capacity correlation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 420 (2), pp. 341-349.

Dong, Y. et alii. (2012). Solid lipid nanoparticles: Continuous and potential large-scale nanoprecipitation production in static mixers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, pp. 68-72.

Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. The Royal Society and the Royal Academy of Engineering. Disponível em: www.nanotec.org.uk/finalReport.htm. [Consultado em 20/06/2012].

ETPN- European Technology Platform Nanomedicine. Disponível em: <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.htm>. [Consultado em 20/06/2012].

Etheridge, M. L. et alii. (2012). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, in press.

Fangueiro, J. F. et alii. (2012a). Thermodynamic behavior of lipid nanoparticles upon delivery of Vitamin E derivatives into the skin: in vitro studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 108, pp. 275-282.

Fangueiro, J. F. et alii. (2012b). Experimental Factorial Design Applied to Mucoadhesive Lipid Nanoparticles via Multiple Emulsion Process. *Colloids and*

Surfaces B: Biointerfaces, in press. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777651200207X>. [Consultado em 17/06/2012].

Fangueiro, J. F. et alii. (2011). A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production, characterization and toxicity testing. *Pharm Dev Technol*, in press. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711084>. [Consultado em 17/06/2012].

Felt, O., Buri, P. and Gurny, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 (11), pp. 979-93.

Florence, A. T. (2004). Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting. *Journal of Drug Targeting*, 12 (2), pp. 65-70.

Fontana, G. et alii. (2005). Preparation, characterization and in vitro antitumoral activity of solid lipid nanoparticles (SLN) containing tamoxifen. *Drug Delivery*, 12 (6), pp. 385-392.

García-fuentes, M., Torres, D. and Alonso, M. J. (2003). Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, pp. 159-168.

Gasco, M. R. (1997). Solid lipid nanospheres from warm microemulsion. *Pharmaceutical Technology European*, 9, pp. 52-58.

Gasco, M. R. (2003). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. Patente: US5250236. Estados Unidos da América.

George, M. and Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *Journal of Controlled Release*, 114 (1), pp. 1-14.

Ghadiri, M. et alii. (2012). Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. *International Journal of Pharmaceutics*, 424 (1-2), pp. 128-137.

Gokce, E. H. et alii. (2008). Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (1), pp. 76-86.

Grabovac, V., Guggi, D. and Bernkop-Schnürch, A. (2005). Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), pp. 1713-1723.

Grassin-Delyle, S. et alii. (2012). Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration: Focus on opioids. *Pharmacology & Therapeutics*, 134 (3), pp. 366-379.

Harms, M. and Müller-Goymann, C. C. (2011). Solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21 (1), pp. 89-99.

Heurtault, B. et alii. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research*, 19 (6), pp. 875-880.

Hu, F. Q. et alii. (2002). Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 239 (1-2), pp. 121-128.

Hussain, A. A. (1998). Intranasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29 (1-2), pp. 39-49.

Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15 (9), pp.1326-1331.

Illum, L. (2002). Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discovery Today*, 7 (23), pp. 1184-1189.

Illum, L. (2003). Nasal drug delivery: possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release*, 87 (1-3), pp. 187-198.

Jani, P. U., Florence, A. T. and McCarthy, D. E. (1992). Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, 84 (3), pp. 245-252.

Jiao, J. and Burgess, D. (2003). Rheology and Stability of Water-in-Oil-in-Water Multiple Emulsions Containing Span 83 and Tween 80. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 5, pp. 1-12.

Junginger, H. E. and Verhoef, J. C. (1998). Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs - a fiction? *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1 (9), pp. 370-376.

Kayser, O., Lemke, A. and Hernandez-Trejo, N. (2005). The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6 (1), pp. 3-5.

Kheradmandnia, S. et alii. (2010) Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6 (6), pp. 753-759.

Kim, B.-D., Na, K. and Choi, H.-K. (2005). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24 (2-3), pp. 199-205.

Kuo, Y.-C. and Chung, C.-Y. (2011). Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88 (2), pp. 682-690.

Kuo, Y.-C. and Lin, C.-W. (2009). Effect of electromagnetic field and surface modification on the electrical behavior of novel solid lipid nanoparticles covered with l-arginine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71 (1), pp. 45-51.

Le Boursais, C. L. et alii. (1998). Ophthalmic drug delivery systems: Recent advances. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17 (1), pp. 33-58.

Lemarchand, C., Gref, R. and Couvreur, P. (2004). Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2), pp. 327-341.

Liu, J. et alii. (2008). Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 356 (1-2), pp. 333-344.

Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), pp.1595-1639.

Manjunath, K. and Venkateswarlu, V. (2005). Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *Journal of Controlled Release*, 107 (2), pp.215-228.

Martins, S. et alii. (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2 (4), pp. 595-607.

Martins, S. et alii. (2012). Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(5), pp. 613-623.

Mishra, B., Patel, B. B. and Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*, 6 (1), pp. 9-24.

Morais, J. M. et alii. (2008). W/O/W Multiple Emulsions Obtained by One-Step Emulsification Method and Evaluation of the Involved Variables. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 29, pp. 63-69.

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

Müller, R. H. et alii. (2008). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (3), pp. 535-544.

Müller, R. H., Shegokar, R. and Keck, C. M. (2011). 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Current Drug Discovery Technologies*, 8 (3), pp. 207-227.

Müller, R.H., Runge, R et alii. (2006). Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics* 317(1), pp. 82-89.

Muzzarelli, R. A. (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell and Molecular Life Sciences*, 53 (2), pp. 131-140.

Muzzarelli, R. A. (2010). Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs*, 8 (2), pp. 292-312.

Noack, A., Hause, G. and Mäder, K. (2012). Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), pp. 440-451.

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

Parveen, S., Misra, R. and Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8 (2), pp. 147-166.

Patel, P., A. and Patravale, V., B. (2011). AmbiOnp: solid lipid nanoparticles of amphotericin B for oral administration. *Journal Biomedical Nanotechnology*, 7 (5), pp. 632-639.

Pedersen, N. et alii. (2006). Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62 (2), pp. 155-162.

Portero, A. et alii. (2002). Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of anti-microbial agents to the gastric mucosa. *Journal of Microencapsulation*, 19 (6), pp. 797-809.

Quintanar-Guerrero, D. et alii. (1999). Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *International Journal of Pharmaceutics*, 188 (2), pp. 155-164.

Sahoo, S. K., Dilnawaz, F. and Krishnakumar, S. (2008). Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discovery Today*, 13 (3-4), pp. 144-151.

Salamat-Miller, N. and Johnston, T. P. (2005). Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *International Journal of Pharmaceutics*, 294 (1-2), pp. 201-216.

Sanna, V., Caria, G. and Mariani, A. (2010). Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. *Powder Technology*, 201 (1), pp. 32-36.

Schipper, N. G. et alii. (1997). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical Research*, 14 (7), pp. 923-929.

Schubert, M. A. and Müller-Goymann, C. C. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles-evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55 (1), pp. 125-31.

Schwarz, C. and Mehnert, W. (1999). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *Journal of Microencapsulation*, 2, pp. 205-213.

Severino, P. et alii. (2012) Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, in press. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2012/750891/>. [Consultado em 19/06/2012].

Shepherd, R., Reader, S. and Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 14 (4), pp. 535-542.

Sinha, V. R. et alii. (2011). Solid Lipid Nanoparticles (SLN's) - Trends and Implications in Drug Targeting. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1, pp. 212-238.

Sivaramakrishnan, R. et alii. (2004). Glucocorticoid entrapment into lipid carriers — characterisation by paretic spectroscopy and influence on dermal uptake. *Journal of Controlled Release*, 97 (3), pp. 493-502.

Sjöström, B. and Bergenstahl, B. (1992). Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *International Journal of Pharmaceutics*, 88 (1-3), pp. 53-62.

Souto, E. B., Mehnert, W. and Müller, R. H. (2006). Polymorphic behaviour of Compritol 888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *Journal of Microencapsulation*, 23 (4), pp. 417-433.

Souto, E. B. and Müller, R. H. (2011). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructures Lipid Carriers - Lipid Nanoparticles for Medicals and Pharmaceuticals. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 23, pp. 313-328.

Souto, E. B. and Müller, R. H. (2005). The use of SLN® and NLC® as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. *Die Pharmazie*, 61 (5), pp. 431-437.

Souto, E. B. and Müller, R. H. (2007) Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Drug Delivery. In Domb, J., Tabata, Y., Kumar, M. N. V. R. and Farber, S. (Eds.) *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*. American Scientific Publishers, pp. 103-122.

Souto, E. B. et alii. (2011). Lipid-Based Nanocarriers for Cutaneous Administration of Pharmaceuticals. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 15, pp. 479-491.

Souto, E. B. et alii. (2004). Comparative study between the viscoelastic behaviors of different lipid nanoparticle formulations. *Journal of Cosmetic Science*, 55, pp. 463-471.

Sznitowska, M. et alii. (2001). Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52 (2), pp. 159-163.

Szucs, M. et alii. (2008). Mucoadhesive behaviour of emulsions containing polymeric emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 34 (4-5), pp. 226-35.

Ugwoke, M. I. et alii. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), pp. 1640-1665.

Uner, M. and Yener, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 2 (3), pp. 289-300.

Videira, M. A. et alii. (2002). Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 10 (8), pp. 607-613.

Wiechers, J. and Souto, E. B. (2010). Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Novel Delivery Systems for Cosmetic Actives. Part I. *Cosmetics and Toiletries* 10, pp. 22-30.

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

Wood, R. W. et alii. (1985). Ocular disposition of poly-hexyl-2-cyano[3-14C]acrylate nanoparticles in the albino rabbit. *International Journal of Pharmaceutics*, 23 (2), pp. 175-183.

Xu, J. et alii. (2000). Permeability and diffusion in vitreous humor: implications for drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 17 (6), pp. 664-669.

Zhang, Q. et alii. (2000). Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 200 (2), pp. 153-159.

Zimmermann, E. and Müller, R. H. (2001). Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions in artificial gastrointestinal media. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52 (2), pp. 203-210.

zur Muhlen, A., Schwarz, C. and Mehnert, W. (1998) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45 (2), pp. 149-55.