

NOVOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS NANOTECNOLÓGICOS

Inês Marques

Aluna da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
10825@ufp.edu.pt

Carla Martins Lopes

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia – UTAD
cmlopes@ufp.edu.pt

Eliana B. Souto

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia – UTAD
eliana@ufp.edu.pt

RESUMO

A Nanotecnologia é uma nova ciência que emergiu nos últimos anos em várias áreas de aplicação, incluindo a da actividade farmacêutica, em particular na concepção de novas formas farmacêuticas. Com efeito, a produção de novas formas farmacêuticas constituídas por nanocristais de fármacos tem vindo a adquirir cada vez mais interesse por parte da comunidade científica. A principal vantagem da utilização de nanocristais de fármacos está directamente relacionada com a facilidade inerente ao processo de produção. O objectivo final consiste na produção de uma suspensão de partículas de fármaco com dimensões inferiores a 1 μm , que seja física e quimicamente estável, garantindo a viabilidade tecnológica e terapêutica para um determinado fármaco.

PALAVRAS-CHAVE

Nanotecnologia, nanocristais de fármacos, processos de produção

ABSTRACT

Nanotechnology is a novel science which has emerged in the latest years in several fields, including the pharmaceutical sciences in particular in the development of novel drug delivery systems. Among the scientific community, the production of drug nanocrystals as novel delivery systems has been gathering attention. The main advantage of drug nanocrystals includes production facilities available. The final aim of this technology is to produce a physicochemically stable suspension to warrantee technological and therapeutic feasibility for a particular drug.

KEYWORDS

Nanotechnology, drug nanocrystals, production processes

1. INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia foi criada no Japão e apresenta como filosofia subjacente a procura de invenções, aprimorando-as e proporcionando uma melhor qualidade de vida ao ser humano. No âmbito dos sistemas nanotecnológicos, o presente trabalho foca essencialmente o desenvolvimento, caracterização e utilização de nanocristais de fármacos como um novo sistema farmacêutico. Um nanocristal é uma partícula cristalina de dimensões coloidais (escala nanométrica - diâmetro médio inferior a 1 μm) (Müller e Böhm, 1998). Os nanocristais apresentam grandes vantagens tecnológicas, uma vez que muitas das propriedades eléctricas e termodinâmicas destes materiais dependem do tamanho podendo, por isso, ser controladas através de cuidadosos processos de produção. Os nanocristais também fornecem informações relativamente aos sistemas cristalinos de domínio único, permitindo explicar o comportamento de muitas amostras macroscópicas de outras substâncias de composição química semelhante. Desta forma, é possível inferir que os nanocristais podem funcionar como uma ponte entre sistemas macroscópicos e sistemas de estruturas atómicas ou moleculares. No entanto, é importante ter em atenção que as propriedades dos materiais mudam dependendo do tamanho, não esquecendo que, no domínio da nanoescala, a percentagem dos átomos na superfície do material é mais significativa (Müller et al., 2001).

Por definição, os nanocristais de fármacos são suspensões aquosas de cristais nanométricos, os quais se encontram estabilizados por um filme de agente tensoactivo. Os fármacos cuja solubilidade aquosa é menor são aqueles que apresentam melhores propriedades para ser processados em nanocristais (Möschwitzer e Müller, 2006 a)). A literatura científica descreve dois principais métodos para a obtenção de nanocristais (Müller e Keck, 2004 a); Müller e Keck, 2004 b)): (i) tecnologia *bottom up* ou de precipitação e (ii) tecnologia *top down* ou de redução particular.

A produção pela tecnologia *bottom up* ou de precipitação realiza-se através da dissolução prévia das moléculas de fármaco num solvente orgânico, e que serão posteriormente precipitadas adicionando um não solvente (Müller e Keck, 2004 a)). A adição do não solvente à solução orgânica de fármaco é necessária para produzir um produto de dimensões muito reduzidas. Os nanocristais de fármacos amorfos são produzidos para melhorar a velocidade de dissolução e aumentar a solubilidade nos fluidos biológicos. A vantagem desta técnica reside na utilização de equipamentos relativamente simples e de baixo preço, facilmente acessíveis em qualquer laboratório de produção.

A produção pela tecnologia *top down* ou de redução particular baseia-se na homogeneização por alta pressão, preferencialmente em meio aquoso (Müller e Keck, 2004 a)). A homogeneização por alta pressão envolve um fenómeno de cavitação do líquido do meio de suspensão para reduzir as dimensões de partículas suspensas. Müller e colaboradores avaliaram o efeito da tecnologia *top down*, aplicando a homogeneização por alta pressão, na estabilidade de determinados fármacos, tais como, ciclosporina (Müller et al., 2006), omeprazol (Möschwitzer et al., 2004), buparvacona (Müller e Jacobs, 2002), acetato de hidrocortisona (Möschwitzer e Müller, 2006 b)), na redução da sua cristalinidade e, por conseguinte, na biodisponibilidade dos mesmos. De acordo com os resultados obtidos, o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo nanocristais parece ser uma alternativa promissora ao aumento da biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade aquosa.

2. CONCEITO DE NANOTECNOLOGIA NA CIÊNCIA FARMACÊUTICA

A Nanotecnologia Farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas que está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica (no caso de não ultrapassar os poucos micrómetros, em regra, inferior a 3 µm). O estudo destes sistemas tem sido realizado com o objectivo de direccionar e controlar a libertação de fármacos (Sakata et al., 2007).

A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, diagnóstico, monitorização e controlo de sistemas biológicos foi recentemente denominada “Nanomedicina” pelo National Institute of Health, nos Estados Unidos (Moguimi et al., 2005). Esta tecnologia surgiu nos anos 60 com o desenvolvimento inicial da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos (polímeros e outras substâncias) em pós com tamanho de partículas micrométricas. A microencapsulação apresenta uma ampla aplicação em diversas indústrias, como, por exemplo, na área alimentar, têxtil, farmacêutica e dermocosmética, pela protecção que auferê às substâncias lábeis e voláteis.

A libertação controlada do fármaco tem contribuído para a melhoria da sua biodisponibilidade, para a redução da dose terapêutica e da toxicidade. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, actualmente em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas.

Actualmente, para alcançar este objectivo têm sido desenvolvidos diversos sistemas farmacêuticos quer na escala nanométrica (como, por exemplo, lipossomas e nanopartículas), quer na escala micrométrica (como, por exemplo, micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões) (Silva, 2004). O desenvolvimento dos lipossomas aumentou a variedade de ferramentas disponíveis no âmbito da nanotecnologia, em particular na utilização de sistemas lipídicos para vectorização de fármacos (Lasic, 2005). Os lipossomas são vesículas aquosas revestidas por uma bicamada fosfolipídica e podem servir como veículo de fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis encapsulados na cavidade aquosa da vesícula ou na bicamada lipídica, respectivamente (Lasic, 2005).

Nos anos 90 surgiram sistemas nanométricos mais sofisticados revestidos por polímeros hidrófilos, denominados por tecnologia Stealth, que permitem um tempo de circulação maior no organismo. Além dos sistemas Stealth, existem outros que contêm moléculas sinalizadoras na superfície, denominados sítios específicos com a finalidade do direccionamento específico de fármacos para células alvo (Barrat, 2000). Entre as vantagens que os nanosistemas podem oferecer destacam-se: (i) a protecção do fármaco no sistema contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo a manutenção de níveis plasmáticos numa concentração constante; (ii) o aumento da eficácia terapêutica; (iii) a libertação progressiva e controlada do fármaco mediante a resposta a estímulos do meio exterior (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); (iv) a diminuição da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; (v) o direccionamento de fármacos a alvos específicos (local, especificidade); (vi) a possibilidade de incorporar tanto substâncias hidrófilas como lipófilas; (vii) a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações com consequente aumento da adesão do doente à terapêutica.

O termo “nanopartícula” inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem na composição e na organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro po-

limérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, pelo que o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, não apresentam óleo na sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, no qual o fármaco pode encontrar-se retido na matriz, solubilizado ou adsorvido à superfície da nanoesfera.

3. NANOCRISTAIS DE FÁRMACOS

Cerca de 40% dos novos fármacos desenvolvidos nos laboratórios de investigação científica a nível mundial não são imediatamente aprovados nos ensaios clínicos, por não serem absorvidos adequadamente pelo organismo. Para ultrapassar esta limitação, uma alternativa constitui o desenvolvimento de nanocristais para uso farmacêutico. Os nanocristais de fármacos possuem propriedades especiais no que concerne à absorção oral, melhorando a sua biodisponibilidade.

O passo limitante da absorção oral é a velocidade de dissolução. No caso de fármacos micronizados, esta característica é otimizada pela elevada área de superfície específica que as partículas apresentam. Contudo, no caso de fármacos à escala nanométrica este efeito é mais pronunciado, pois a superfície específica aumenta e, conseqüentemente, a velocidade de dissolução é também superior. Contrariamente aos pós micronizados, os nanocristais de fármacos podem ser utilizados para diferentes via de administração. A administração oral é possível na forma de suspensão aquosa. Em alternativa, podem ser concebidas formas farmacêuticas mais facilmente aceitáveis pelos doentes, como, por exemplo, comprimidos, granulados ou cápsulas. Com efeito, a suspensão aquosa pode facilmente ser usada como líquido de granulação ou transformada em pó por liofilização ou atomização em leito fluido (Souto e Müller, 2007).

Do ponto de vista físico-químico, a produção de suspensões de nanocristais em meio aquoso é possível porque a interação entre a superfície do nanocrystal e o solvente é suficientemente forte, superando as diferenças de densidade, que resultam geralmente num material que se afunda ou flutua num líquido. As nanopartículas apresentam, frequentemente, propriedades visíveis inesperadas porque são bastante pequenas, contudo possuem uma superfície específica muito elevada proporcional ao volume dos átomos.

4. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

Os métodos de preparação de nanocristais são muito semelhantes aos utilizados para a produção das nanoemulsões. Actualmente, existem vários métodos de produção de nanoemulsões, dos quais os mais utilizados são a homogeneização por alta pressão e a microfluidização. Nestes métodos, a preparação de nanoemulsões ocorre geralmente em duas etapas. Numa primeira etapa, as fases aquosa e oleosa são aquecidas separadamente (aproximadamente a 70°C) e emulsificadas através do uso de homogeneizadores de alta velocidade (Ultraturrax®, Politron®), ou outro equipamento semelhante. Desta forma, uma é obtida emulsão primária, apresentando partículas de tamanho micrométrico dependendo, essencialmente, do equipamento utilizado e das condições operacionais (pressão, temperatura, tempo de homogeneização). Após arrefecimento, numa segunda etapa, o diâmetro de partícula é progressivamente reduzido até valores submicrométricos, compreendidos entre 100 e 300 nm, através da utilização de homogeneizadores de alta pressão ou outros equipamentos, como o microfluidizador ou a sonda de ultra-sons (Benita e Levy, 1993).

4.1. MICROFLUIDIZAÇÃO

A microfluidização é uma tecnologia relatada em diversos estudos (Cook e Lagace, 1985; Forster et al., 1988; Kuo et al. 2008), tendo sido patenteada em 1985 (Cook e Lagace, 1985). Este método utiliza alta pressão para direccionar o fluxo de uma pré-emulsão para uma área de impacto. A câmara de impacto consiste num sistema de canais em bloco de cerâmica que divide a pré-mistura em dois fluxos, posteriormente recombinados, ocorrendo cavitação, sonicação e impacto, o que provoca redução do tamanho de gotícula da emulsão. A eficiência de emulsificação por este método é determinada pelo desenho dos micro-canais no interior da câmara, pela pressão libertada e pelo tempo de processamento (número de ciclos de passagem pela câmara). De forma semelhante à homogeneização por alta pressão, quanto maior o número de ciclos aos quais a emulsão é submetida, maior o impacto na redução do tamanho de gotícula, até um determinado limite. Além disso, o aumento da pressão de operação do equipamento, assim como o aumento de temperatura, proveniente da energia dissipada na forma de calor (e que pode ser observado durante a microfluidização), também contribuem para uma redução no tamanho de gotícula da nanoemulsão (Washington e Davis, 1988). A Microfluidics Corporation (Microfluids, <http://www.microfluidicscorp.com>) produz equipamentos com diferentes capacidades de produção e que operam sob diferentes pressões. Num estudo elaborado por Washington e Davis (1988), os autores observaram que o microfluidizador possui vantagens significativas relativamente à sonda de ultra-sons para produzir pequenos volumes de nanoemulsões. Durante o processo, o aumento de temperatura foi muito baixo, nenhuma partícula de óleo não emulsificada pode ser observada na superfície da amostra e o processamento das amostras foi rápido.

4.2. HOMOGENEIZAÇÃO POR ALTA PRESSÃO

A utilização deste método tem sido descrita por diversos autores (Floury et al., 2004; Brösel e Schubert, 1999; Tadros et al., 2004; Bock et al., 1998, Souto et al. 2006). Conforme mencionado, uma emulsão submicrométrica pode ser preparada através de um homogeneizador de alta pressão, no qual uma pré-emulsão é forçada a passar, sob alta pressão, através de um espaço entre uma válvula de ajuste (móvel) e o suporte da válvula (fixo), denominado por fenda homogeneizadora.

Quando o produto atinge a área entre a válvula e o suporte, há um rápido aumento na velocidade e uma correspondente diminuição na pressão. A energia libertada causa turbulência e as diferenças de pressão localizadas causam rompimento das partículas. O produto homogeneizado choca com o anel de impacto e há uma pressão suficiente para se mover até à próxima etapa do processamento. Com o aumento da área superficial da emulsão, pela deformação e rompimento das partículas, torna-se importante utilizar sistemas emulsificantes adequados, que estabilizam a nova interface formada (Brösel e Schubert, 1999). Geralmente, o diâmetro das partículas produzidas por este método é afectado pela pressão, temperatura e número de ciclos de homogeneização (Bock et al., 1998). Tem-se publicado que um aumento no número de ciclos produz uma redução do tamanho de partícula, sendo que após o segundo ciclo de passagem, ocorre uma redução significativa deste. Passagens repetidas podem ocasionar reduções progressivas, porém não tão acentuadas, até um limite no qual essa diminuição não se torna mais relevante (Bock et al., 1998; Jahnke, 1998). O aumento da pressão de homogeneização, assim como da temperatura de homogeneização, leva igualmente a uma diminuição do tamanho de gotícula (Jahnke, 1998). Por outro lado, uma alta

pressão conduz a um gasto de energia elevado, sendo mais vantajosa a realização de mais ciclos de homogeneização a uma pressão moderada (Jahnke, 1998).

As linhas da homogeneização por alta pressão actualmente existentes são aceites pelas autoridades reguladoras para a produção de emulsões destinadas à nutrição parentérica (e.g. Intralipid, Lipofudin). Com efeito, esta metodologia torna-se favorável para começar a estabelecer uma nova tecnologia. Em particular, as técnicas de produção de nanocristais por homogeneização podem ser realizadas em meio totalmente aquoso, originando sistemas designados por DissoCubes®, ou em meio semi-aquoso originando sistemas denominados por NanoEdge® (Möschwitzer e Müller, 2006 b)). Tanto para os DissoCubes® (produzidos em água) e para os nanocristais NanoEdge® (produzidos noutros meios de dispersão), pode ser usado o mesmo equipamento. O princípio deste método aplica-se em diferentes áreas, desde os alimentos até aos fármacos.

Durante muitos anos, a cavitação foi considerada como o efeito mais importante para diminuir partículas num homogeneizador de alta pressão. Como referido anteriormente, neste tipo de homogeneizador, a dispersão (emulsão ou suspensão) passa por uma junção muito estreita, com uma velocidade extremamente elevada. Antes de entrar nesta junção, a suspensão está contida num cilindro com um diâmetro relativamente grande, em comparação com a largura da fenda seguinte. A vantagem desta técnica reside na utilização de equipamento relativamente simples e de baixo preço. A produção em grande escala é fácil de se conseguir usando misturadores estáticos ou micro-misturadores. O uso de um misturador estático mantém praticamente as condições de precipitação numa proveta em escala laboratorial, agitando e misturando, para evitar os problemas que ocorrem, potencialmente, quando passamos de uma escala laboratorial para grande escala. No entanto, existem alguns problemas associados, designadamente, o crescimento dos cristais e a instabilidade do estado cristalino/amorfo que podem ser eliminados através da combinação da precipitação e da adição de um passo de alta energia.

Em regra, a suspensão de partículas precipitadas é subseqüentemente homogeneizada, podendo preservar o intervalo de tamanhos das partículas obtidas depois da precipitação. Além disso, este processo transforma todas as partículas precipitadas num material cristalino, reduzindo as preocupações inerentes à estabilidade física de material amorfo, obtendo-se, assim, nanocristais de fármacos no estado cristalino definido.

5. CONCLUSÕES

A nanotecnologia pode ser vista como a criação de materiais funcionais, dispositivos e outros sistemas de dimensões submicrométricas, através do controlo das dimensões, desenvolvendo sistemas que apresentam novas propriedades de superfície e, por conseguinte, novas propriedades biológicas dependentes do tamanho.

Neste contexto, a libertação controlada de fármacos enquadra-se e aplica-se perfeitamente a estes novos sistemas (facilitando as etapas de absorção e difusão intermembranar). Intrinsecamente, são também dependentes da funcionalização química, que envolve todos os métodos de preparação e suas modificações. O desenvolvimento de formas farmacêuticas de libertação controlada por micro e nanossistemas poderá permitir um melhor controlo da cinética de libertação do fármaco, dando origem a níveis plasmáticos terapêuticos, com

menores efeitos tóxicos. Assim, considera-se um passo importante no desenvolvimento de uma nova terapêutica, o que pode repercutir na melhoria da qualidade de vida do doente, para além do impulso técnico, científico e financeiro, potencialmente adquiridos.

Nos últimos anos, numerosos estudos demonstraram que a distribuição de um fármaco no organismo pode ser modificada pelo uso de sistemas nanométricos, tais como os lipossomas, e as nanopartículas ou micropartículas. Entre as diversas vantagens das estruturas nanométricas citam-se o direccionamento a alvos específicos, a libertação controlada do fármaco, a menor toxicidade, o menor número de doses, a diminuição dos picos plasmáticos, a protecção da degradação e/ou inactivação do fármaco e economia do fármaco.

Espera-se que, de acordo com o tipo de fármaco a seleccionar, se possam obter nanocristais com ambas as metodologias empregues para a sua produção (Dissocubes® e NanoEdge®).

Devem ser seleccionados solventes de baixa toxicidade para evitar qualquer tipo de problemas regulamentares devido à eventual presença de resíduos de solventes orgânicos no produto final. Em regra, os métodos envolvem a utilização de água como solvente ou, em alternativa, solventes miscíveis em água, tais como, metanol, etanol e isopropanol. Apesar de solventes como o etanol serem tolerados até uma certa extensão em formulações orais ou parentéricas líquidas, é desejável removê-los. Por exemplo, os extractos etanólicos de plantas estão a ser continuamente substituídos por extractos aquosos. A remoção do solvente é relativamente fácil à escala laboratorial, por exemplo, através de um contador do fluxo da corrente, embora seja mais problemática na produção de grandes quantidades.

BIBLIOGRAFIA

- BARRAT, G.M.** (2000). Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *In: Pharmaceutical Science and Technol. Today*, 3 (5), pp. 163-171.
- BENITA, S. E LEVY, M.Y.** (1993). Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization. *In: Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82 (11), pp. 1069-1079.
- BOCK, T., KLEINEBUDDE, P. E MÜLLER, B.W.** (1998). Manufacture of emulsions by means of high-pressure homogenization parameters, oils and surfactants. *In: Müller, R.H., Benita, S. e Böhm, B.H.L. (Ed.). Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs.* Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, pp. 201-236.
- BRÖSEL, S. E SCHUBERT, H.** (1999). Corrigendum to 'Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve. *In: Chemical Engineering and Processing*, 38 (4-6), pp. 533-540.
- COOK, E.J. E LAGACE, A.P.** (1985). Apparatus for Forming Emulsions. US Patent 4533254.
- FLOURY, J., LEGRAND, J. E DESRUMAUX, A.** (2004). Analysis of a new type of high pressure homogenizer. A study of the flow pattern. *In: Chemical Engineering Science*, 59 (4), pp. 843-853.
- FORSTER, D., WASHINGTON, C. E DAVIS, S.S.** (1988). Toxicity of solubilized colloidal amphotericin B formulations to human erythrocytes. *In: The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40 (5), pp. 325-328.
- JAHNKE, D.I.S.** (1998). The theory of high-pressure homogenization, *In: Müller, R.H., Benita, S. e Böhm, B.H.L. (Ed.). Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs.* Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, pp. 177-200.

- KUO, F., SUBRAMANIAN, B., KOTYLA, T., WILSON, T.A., YOGANATHAN, S., NICOLOSI, R.J. (2008) Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. *International Journal of Pharmaceutics* 363(1-2), pp. 206-213.
- LASIC, D.D. (2005). Novel application of liposomes. In: *Trends in Biotechnology*, 16 (7), pp. 307-321.
- MICROFLUIDICS. [EM LINHA]. DISPONÍVEL EM [HTTP://WWW.MICROFLUIDICSCORP.COM/](http://www.microfluidicscorp.com/). [ACESSO EM 16/04/09].
- MOGUIMI, S.M., HUNTER, A.C. E MURRAY, J.C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. In: *The FASEB Journal*, 19 (3), pp. 311-330.
- MÖSCHWITZER, J., ACHLEITNER, G., POMPER, H. E MÜLLER, R.H. (2004). Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (3), pp. 615-619.
- MÖSCHWITZER, J. E MÜLLER, R.H. (2006). Spray coated pellets as carrier system for mucoadhesive drug nanocrystals. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62 (3), pp. 282-287. a)
- MÖSCHWITZER, J. E MÜLLER, R.H. (2006). New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (9-10), pp. 3145-3153. b)
- MÜLLER, R.H. E BÖHM, B.H.L. (1998). Nanosuspensions. In: Müller, R.H., Benita, S. e Böhm, B.H.L. (Ed.). *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, pp. 149-174.
- MÜLLER, R.H., JACOBS, C. (2002). Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. In: *International Journal of Pharmaceutics*, 237 (1-2), pp. 151-161.
- MÜLLER, R.H., JACOBS, C. E KAYSER, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1), pp. 3-19.
- MÜLLER, R.H. E KECK, C.M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. In: *Journal of Biotechnology*, 113 (1-3), pp. 151-170. a)
- MÜLLER, R.H. E KECK, C.M. (2004). Drug delivery to the brain--realization by novel drug carriers. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4 (5), pp. 471-483. b)
- MÜLLER, R.H., RUNGE, S., RAVELLI, V., MEHNERT, W., THUNEMANN, A.F. E SOUTO, E.B. (2006). Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. In: *International Journal of Pharmaceutics*, 317 (1), pp. 82-89.
- SAKATA, S., UCHIDA, K., KAETSU, I. E KITA, Y. (2007). Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. In: *Radiation Physics and Chemistry*, 76 (4), pp. 733-737.
- SILVA, G.A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. In: *Surgical Neurology*, 61 (3), pp. 216-220.
- SOUTO, E.B., MÜLLER, R.H. (2006). Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole-loaded lipid nanoparticles prepared by hot high-pressure homogenization, *Journal of Microencapsulation* 23 (4), pp. 377-388.
- SOUTO, E.B., MÜLLER, R.H. (2007). Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery, In: *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*, Domb, A.J., Tabata, Y., Ravi Kumar, M.N.V., Farber, S. (Eds.), American Scientific Publishers, Chapter 5, pp. 03-122.
- TADROS, T., IZQUIERDO, P. ESQUENA, J. E SOLANS, C. (2004). Formation and stability of nanoemulsions. In: *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, pp. 303-318.