

Maria Inês de Azevedo Freitas Teixeira

Vetores lipídicos contendo ácidos gordos naturais

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016



Maria Inês de Azevedo Freitas Teixeira

Vetores lipídicos contendo ácidos gordos naturais

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Maria Inês de Azevedo Freitas Teixeira

Vetores lipídicos contendo ácidos gordos naturais

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

## Resumo

---

A psoríase é das doenças cutâneas inflamatórias mais comuns. Esta patologia, apesar de não ser fatal, está associada a diversas comorbilidades, como as doenças cardiovasculares, e apresenta um impacto considerável na qualidade de vida e na autoimagem dos doentes.

Vários são os fármacos disponíveis como opção terapêutica para o tratamento da psoríase, mas o seu uso prolongado demonstra benefícios limitados, podendo conduzir a fenómenos de toxicidade severa. Os ómega-3 são compostos bioativos naturais com ação anti-inflamatória comprovada, pelo que a utilização destes ácidos gordos polinsaturados no tratamento da patologia pode ser benéfica.

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para aplicação dermatológica tem vindo a ganhar um relevo cada vez maior junto da comunidade científica. Este tipo de vetores, compostos por uma matriz lipídica sólida, permitem modular a libertação das substâncias ativas encapsuladas, protegendo-as eficazmente da degradação e prolongando o efeito e a eficácia terapêuticos. Deve salientar-se ainda a referida inocuidade destes sistemas, uma vez que são constituídos por lípidos semelhantes aos fisiológicos, diminuindo a possibilidade de irritação da pele e minimizando o risco toxicológico, ao mesmo tempo que promovem a hidratação cutânea.

A presente dissertação apresenta inicialmente uma revisão bibliográfica dos vetores lipídicos usados para veicular ácidos gordos naturais e respetivo estado da arte, com especial destaque para as nanopartículas lipídicas. Adicionalmente, o trabalho apresenta os benefícios dos ómega-3 em várias patologias e os mecanismos imunológicos subjacentes à psoríase. A pesquisa bibliográfica foi efectuada em várias bases de dados, como PubMed, ScienceDirect, Wiley Online Library ou Google Scholar, utilizando-se como critério de seleção trabalhos publicados na área. Na segunda parte, é abordado o trabalho de desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas contendo ómega-3 e a sua incorporação em bases semissólidas.

Pela técnica da sonicação, obtiveram-se partículas com tamanhos nanométricos (entre 163,0 e 176,3 nm), com um bom índice de polidispersão (entre 0,246 e 0,262) e um elevado potencial zeta (entre 30,0 e 43,1 mV), prevendo-se uma boa estabilidade das nanopartículas lipídicas ao longo do tempo de armazenamento. Foram ainda utilizadas três bases semissólidas (pomada hidrófila de polietilenoglicóis, PEGs; gel de metilcelulose e creme óleo em água, O/A) para a incorporação dos vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC).

A análise das características reológicas, bem como o estudo de estabilidade acelerada, foram limitados por problemas inerentes às formulações desenvolvidas. No entanto, dos resultados obtidos, a pomada de PEGs parece ser a alternativa mais promissora para incorporar as dispersões de NLC, apresentando esta um comportamento pseudoplástico e com tixotropia.

Do anexo consta o Abstract da comunicação submetida e aceite para apresentação no 4<sup>th</sup> Congress on Innovation in Drug Delivery, que contém parte dos resultados obtidos neste trabalho.

**Palavras-Chave:** ácidos gordos; ómega-3; psoríase; vetores lipídicos; nanopartículas lipídicas; nanopartículas de lípidos sólidos; vetores lipídicos nanoestruturados.

## Abstract

---

Psoriasis is one of the most common inflammatory skin diseases. This pathology, though not usually life-threatening, is associated with various co-morbidities, such as cardiovascular disease, and presents a significant impact on the quality of life and the patients' self-image.

There are several drugs available as therapeutic options for the treatment of psoriasis, but their prolonged use offers limited benefits and can lead to severe toxicity. Omega-3 are natural bioactive compounds with proven anti-inflammatory activity. Hence, the use of these polyunsaturated fatty acids in the treatment of the disease might be beneficial.

The development of lipid nanoparticles for dermal application is an area of increasing interest for the scientific community. This type of vectors, with a solid lipid core matrix, allow for the sustained release of the encapsulated active substance, protecting it from degradation, prolonging the therapeutic effectiveness. Moreover, the safety of these systems should be noted, since they are composed of lipids similar to the physiological ones, thus minimizing skin irritation and associated toxicity risk, while promoting skin moisture and hydration.

This dissertation presents, initially, a literature review of the lipid vectors used as carriers for natural fatty acids and respective state of the art, with a special emphasis on lipid nanoparticles. Additionally, the benefits of omega-3 in various pathologies are also discussed, as well as the immunological mechanisms underlying psoriasis. The bibliographical research was done in several databases, including PubMed, ScienceDirect, Wiley Online Library or Google Scholar, using as a criterion selection papers published in the area. In the second part of the dissertation, experimental work on development and characterization of lipid nanoparticles containing omega-3 and its incorporation in semisolid bases, is addressed.

Using the sonication technique, it was possible to obtain particles with nanometric sizes (between 163,0 and 176,3 nm), a good polydispersity index (between 0,246 and 0,262) and zeta potential (between 30,0 and 43,1 mV), foreseeing a good stability of the lipid nanoparticles throughout the storage time. Three different semisolid bases (hydrophilic ointment of polyethylene glycols, PEGs; methycellulose hydrogel and water-in-oil cream, O/W) were used, in order to allow the incorporation of nanostructured lipid carriers (NLC).

Analysis of the rheological characteristics, as well as the accelerated stability study of semisolid bases, were limited by problems inherent to the formulations developed. However, the results obtained, seem to indicate that the hydrophilic ointment of PEGs is the most promising alternative to incorporate the NLC dispersions. This semisolid base presents pseudoplastic behavior and thixotropy.

The appendix comprises the Abstract of the communication submitted and accepted for the 4<sup>th</sup> Congress on Innovation in Drug Delivery, which contains part of the results that were obtained in the experimental work.

**Keywords:** fatty acids; omega-3; psoriasis; lipid vectors; lipid nanoparticles; nanostructured lipid carriers; solid lipid nanoparticles.

## Agradecimentos

---

É de bom grado que dedico o seguinte espaço para expressar os meus agradecimentos a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para o culminar desta etapa.

Em primeiro lugar, uma palavra de profundo apreço à Professora Doutora Carla Martins Lopes, sempre incansável nas suas críticas e auxílio. Agradeço a sua orientação científica e a partilha de conhecimentos. Por toda a disponibilidade no decorrer da elaboração da dissertação, bem como pelo apoio, carinho, simpatia, incentivo e preocupação demonstrados não só nos últimos meses, como também durante todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Ana Catarina Silva, pela coorientação exímia e por todo o contributo e auxílio prestados ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Catita e à Paralab, pela ajuda na medição e interpretação dos resultados do trabalho experimental.

Aos técnicos do Cerlab, Miguel, Pedro e Ricardo, pela acessibilidade de utilização do material de laboratório necessário para o desenvolvimento do trabalho experimental e por toda a ajuda concedida.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por facultar a utilização do Mastersizer.

Às minhas colegas e amigas, Joana Godinho e Cátia Ramos, por toda a amizade, companheirismo e bons momentos vivenciados durante estes 5 anos.

Agradeço ainda aos restantes professores e colegas de curso com quem privei, por terem contribuído para a minha formação académica e pessoal.

Por fim, aos meus pais, as pessoas mais importantes, por todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim e por terem estado sempre presentes em cada etapa da minha

vida. Obrigada pelo vosso apoio incondicional, por sempre me motivarem a acreditar nas minhas capacidades e a seguir os meus sonhos.

## Índice

---

INTRODUÇÃO .....	1
I. ÁCIDOS GORDOS NATURAIS .....	3
1. Classificação dos ácidos gordos .....	3
1.1. Comprimento da cadeia carbonada.....	4
1.2. Nível de saturação .....	4
1.3. Tipo de configuração ( <i>cis</i> ou <i>trans</i> ).....	6
1.4. Capacidade de o organismo sintetizar ou não o ácido gordo .....	7
2. Funções e benefícios gerais dos ácidos gordos .....	8
2.1. Mecanismos de ação anti-inflamatória dos ómega-3 .....	8
2.2. Doenças cardiovasculares.....	11
2.3. Doenças inflamatórias e autoimunes .....	12
2.4. Neoplasias e caquexia.....	12
2.5. Transtornos neurológicos e psiquiátricos .....	13
II. PSORÍASE.....	14
1. Fisiopatologia da psoríase .....	15
1.1. Papel do sistema imune inato e adquirido .....	15
1.2. Metabolismo do ácido araquidónico.....	17
2. Ácidos gordos naturais no tratamento da psoríase .....	18
III. VETORES LIPÍDICOS .....	20
1. Microemulsões .....	21
2. Nanoemulsões.....	22
3. Lipossomas .....	23
3.1. Marinossomas.....	25
4. Nanopartículas lipídicas .....	26
4.1. Nanopartículas de lípidos sólidos ( <i>Solid Lipid Nanoparticles</i> , SLN) .....	26
4.2. Vetores lipídicos nanoestruturados ( <i>Nanostructured Lipid Carriers</i> , NLC)...	27
4.3. Vantagens e desvantagens das nanopartículas lipídicas.....	28

4.4. Métodos de produção .....	29
4.4.1. Homogeneização a alta pressão .....	29
4.4.2. Sonicação.....	31
4.5. Ácidos gordos naturais veiculados em nanopartículas lipídicas .....	32
<b>IV. SISTEMAS SEMISSÓLIDOS À BASE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA USO CUTÂNEO .....</b>	<b>35</b>
1. Oclusão e hidratação cutânea .....	35
2. Incorporação de nanopartículas lipídicas em formulações semissólidas.....	36
<b>V. TRABALHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>38</b>
1. Matérias-primas .....	38
2. Estudos de pré-formulação .....	39
2.1. Análise da miscibilidade lípido sólido/lípido líquido.....	39
2.1.1. Metodologia.....	39
2.1.2. Resultados e discussão.....	40
2.2. Calorimetria de varrimento diferencial ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> , DSC).....	40
2.2.1. Metodologia.....	41
2.2.2. Resultados e discussão.....	42
3. Preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas.....	44
3.1. Metodologia.....	44
4. Caracterização das dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas .....	45
4.1. Tamanho das partículas e índice de polidispersão ( <i>Polidispersity Index</i> , PI) .	45
4.2. Potencial zeta ( <i>Zeta Potential</i> , ZP).....	47
4.3. Metodologia.....	48
4.4. Resultados e discussão.....	49
5. Incorporação das dispersões de NLC nas bases semissólidas .....	50
5.1. Metodologia.....	52
5.2. Resultados e discussão.....	52

6. Caracterização dos sistemas semissólidos .....	53
6.1. Análise da reologia das formulações semissólidas.....	53
6.2. Estudo de estabilidade acelerada .....	54
6.3. Metodologia.....	55
6.3.1. Estudo do comportamento reológico .....	55
6.3.2. Estudo de estabilidade acelerada .....	55
6.4. Resultados e discussão.....	55
6.4.1. Reologia das formulações semissólidas .....	55
6.4.2. Estabilidade acelerada por centrifugação .....	58
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
ANEXO .....	80

## Índice de Figuras

---

Figura 1: Estrutura básica de um ácido gordo .....	3
Figura 2: Representação da classificação do ácido $\alpha$ -linolénico nos sistemas delta e ómega .....	5
Figura 3: Tipos de eicosanóides derivados do AA e do EPA.....	9
Figura 4: Mecanismo de ação anti-inflamatória dos ómega-3 .....	10
Figura 5: Aparência das lesões da psoríase em placas .....	14
Figura 6: Evolução de uma lesão psoriática .....	16
Figura 7: Comparação entre a estrutura interna da matriz das SLN e NLC.....	28
Figura 8: Representação esquemática da produção de nanopartículas lipídicas por HPH a quente.....	30
Figura 9: Representação esquemática da produção de nanopartículas lipídicas por sonicação .....	31
Figura 10: Termogramas dos lípidos.....	42
Figura 11: Termogramas das misturas lipídicas.....	43
Figura 12: Tipos de comportamento reológico dos sistemas farmacêuticos: a) perfis dos sistemas Newtonianos e não-Newtonianos; b) fenómeno de tixotropia.....	54
Figura 13: Reogramas do hidrogel placebo e do hidrogel contendo NLC incorporados, 7 dias após a preparação. ....	56
Figura 14: Reogramas da pomada hidrófila de PEGs com NLC, 7 e 30 dias após a preparação.....	57
Figura 15: Aspeto da pomada hidrófila de PEGs com NLC: a) após um ciclo de centrifugação; b) após dois ciclos de centrifugação. ....	58

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1: Principais ácidos gordos n-3, n-6 e n-9 .....	6
Tabela 2: Composição da dispersão aquosa de NLC .....	44
Tabela 3: Tamanhos médios de partícula (Z-ave e LD), PI e ZP das dispersões aquosas de NLC, preparadas pela técnica de HPH a quente e pela técnica da sonicação ou dos ultrassons .....	49
Tabela 4: Composição (% , m/m) das bases semissólidas utilizadas para incorporação da dispersão de NLC .....	51
Tabela 5: Avaliação do aspeto da formulação quanto à proporção adequada de base semissólida: dispersão aquosa de NLC para aplicação tópica.....	52

## Abreviaturas

---

<b>AA</b>	Ácido araquidónico, do inglês <i>Arachidonic Acid</i>
<b>AG</b>	Ácidos gordos
<b>ALA</b>	Ácido $\alpha$ -linolénico, do inglês <i><math>\alpha</math>-Linolenic Acid</i>
<b>AMPs</b>	Péptidos antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Peptides</i>
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>COX</b>	Cicloxygenase
<b>CYP450</b>	Citocromo P450, do inglês <i>Cytochrome P450</i>
<b>DCs</b>	Células dendríticas, do inglês <i>Dendritic cells</i>
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenóico, do inglês <i>Docosahexaenoic Acid</i>
<b>DLQI</b>	Índice Dermatológico de Qualidade de Vida, do inglês <i>Dermatology Life Quality Index</i>
<b>DLS</b>	Dispersão dinâmica de luz, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
<b>DPPC</b>	Dipalmitoilfosfocolina, do inglês <i>Dipalmitoylphosphocholine</i>
<b>DSC</b>	Calorimetria de varrimento diferencial, do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
<b>EHL</b>	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenóico, do inglês <i>Eicosapentaenoic Acid</i>
<b>GRAS</b>	Seguro para utilização em humanos, do inglês <i>Generally Regarded as Safe</i>
<b>HETE</b>	Ácidos hidroxieicosatetraenóicos, do inglês <i>Hydroxyeicosatetraenoic Acids</i>
<b>IFN</b>	Interferão
<b>IL</b>	Interleucina

<b>LCFAs</b>	Ácidos gordos de cadeia longa, do inglês <i>Long-Chain Fatty Acids</i>
<b>LD</b>	Difratometria de laser, do inglês <i>Laser Diffractometry</i>
<b>LOX</b>	Lipoxigenase
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>LUV</b>	Vesículas unilamelares, do inglês <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
<b>MCFAs</b>	Ácidos gordos de cadeia média, do inglês <i>Medium-Chain Fatty Acids</i>
<b>MLV</b>	Vesículas multilamelares, do inglês <i>Multilamellar Vesicles</i>
<b>MUFA</b>	Ácido gordo monoinsaturado, do inglês <i>Monounsaturated Fatty Acid</i>
<b>NAPSI</b>	Índice de Severidade da Psoríase Ungueal, do inglês <i>Nail Psoriasis Severity Index</i>
<b>NLC</b>	Vetores lipídicos nanoestruturados, do inglês <i>Nanostructured Lipid Carriers</i>
<b>NMF</b>	Fatores naturais de hidratação, do inglês <i>Natural Moisturizing Factors</i>
<b>O/A</b>	Óleo em água
<b>PASI</b>	Índice de Gravidade e Extensão da Psoríase, do inglês <i>Psoriasis Area Severity Index</i>
<b>PCS</b>	Espectroscopia de correlação de fótons, do inglês <i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
<b>pDC</b>	Célula dendrítica plasmocitóide, do inglês <i>Plasmacytoid cell</i>
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PEGs</b>	Polietilenoglicóis
<b>PI</b>	Índice de polidispersão, do inglês <i>Polydispersity Index</i>
<b>PUFA</b>	Ácido(s) gordo(s) polinsaturado(s), do inglês <i>Polyunsaturated Fatty Acid(s)</i>

<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona, do inglês <i>Polyvinylpyrrolidone</i>
<b>SCFAs</b>	Ácidos gordos de cadeia curta, do inglês <i>Short-Chain Fatty Acids</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Dodecyl Sulfate Sodium</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SLN</b>	Nanopartículas de lípidos sólidos, do inglês <i>Solid Lipid Nanoparticles</i>
<b>SUV</b>	Vesículas unilamelares pequenas, do inglês <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TPGS</b>	Succinato de d- $\alpha$ -tocoferol polietilenoglicol 1000, do inglês <i>D-<math>\alpha</math>-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate</i>
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muito baixa densidade, do inglês <i>Very Low-Density Lipoprotein</i>
<b>ZP</b>	Potencial zeta, do inglês <i>Zeta Potential</i>

## Introdução

---

Os ácidos gordos são compostos orgânicos simples, formados por carbono, hidrogénio e oxigénio. No contexto de uma alimentação saudável, as gorduras provenientes de diferentes alimentos são essenciais ao bom funcionamento do organismo e, quando consumidas nas proporções recomendadas, não excedendo os 30% do valor energético diário, são bem toleradas e têm diversos efeitos benéficos, sendo de destacar os ácidos gordos polinsaturados da série ómega-3 (AG n-3), nomeadamente o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) (Direcção-Geral da Saúde, 2016).

Os ácidos gordos polinsaturados atuam benéficamente em várias doenças, incluindo a psoríase. A psoríase é uma doença de etiologia multifatorial, com predisposição genética, sendo classificada como inflamatória, recorrente e de evolução crónica (Solis *et al.*, 2014).

A base imunológica subjacente a esta patologia prende-se com uma desregulação dos linfócitos T (Rahman *et al.*, 2013). A ativação destas células produz grandes quantidades de ácido araquidónico (AA), o que por sua vez, conduz à formação de diversos mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e moléculas de adesão, contribuindo para a hiperproliferação anormal de queratinócitos característica da doença. A administração de ómega-3 resulta na inibição dos mediadores pró-inflamatórios e, a sua metabolização, permite uma diminuição do processo inflamatório, bem como uma melhor resolução das lesões da pele (Rahman *et al.*, 2013).

A absorção oral e tópica dos AG n-3 representa um desafio, motivando os investigadores para o desenvolvimento de novas abordagens tecnológicas em alternativa aos sistemas terapêuticos convencionais. Os vetores lipídicos, como os lipossomas, as micro e nanoemulsões ou as nanopartículas lipídicas, são exemplos dessas novas abordagens, permitindo aumentar a estabilidade e a eficácia dos compostos (Rahman *et al.*, 2013).

A presente dissertação teve como objetivo conhecer o estado da arte relativo ao uso de vetores lipídicos na veiculação de ácidos gordos naturais, assim como proceder à preparação laboratorial e caracterização de uma formulação contendo nanopartículas lipídicas com ómega-3 e sua posterior veiculação em bases semissólidas, com o intuito de aplicação tópica para potencial tratamento da psoríase.

O sucesso de uma formulação depende da seleção criteriosa dos excipientes. As incompatibilidades entre a substância ativa e os excipientes podem modificar a sua estabilidade e biodisponibilidade. Neste contexto, recorreu-se à análise da miscibilidade lípido sólido/lípido líquido e ao método da calorimetria de varrimento diferencial (DSC) para detetar possíveis interações, bem como para escolher o lípido sólido e respetiva concentração. As nanopartículas lipídicas foram posteriormente produzidas recorrendo-se às técnicas da homogeneização a alta pressão (HPH) e dos ultrassons.

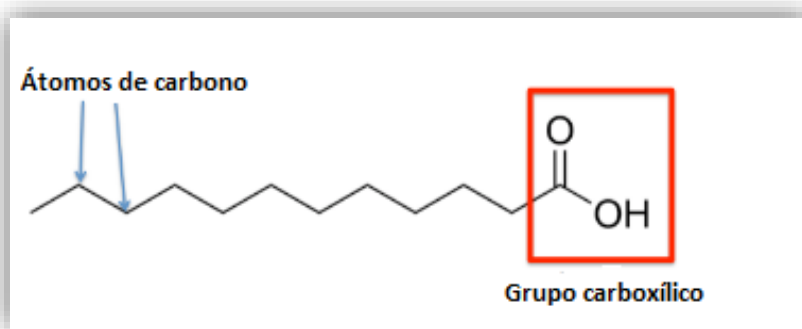
O estado da arte baseou-se na pesquisa e análise de artigos científicos publicados em diferentes bases de dados, como Pubmed, Science Direct, Wiley Online Library e Google Scholar, e de livros específicos da área. As palavras-chave utilizadas durante a pesquisa foram: “fatty acids”, “omega-3”, “psoriasis”, “lipid vectors”, “lipid nanoparticles”, “nanostructured lipid carriers”, “solid lipid nanoparticles”. A pesquisa realizou-se no espaço temporal compreendido entre 1980 e 2016, sendo este reduzido aos últimos 10 anos para apresentar os resultados dos estudos experimentais.

## I. Ácidos gordos naturais

---

### 1. Classificação dos ácidos gordos

Os ácidos gordos (Figura 1) representam um amplo grupo de compostos orgânicos formados por uma estrutura básica de átomos de carbono, dispostos em cadeia, aos quais se ligam átomos de hidrogénio. Num dos extremos da cadeia hidrogenocarbonada alifática encontra-se um grupo ácido ou carboxílico ( $\text{HO-C=O}$ ) e, no outro, localiza-se um grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) (Fink e Mikesky, 2015).



**Figura 1:** Estrutura básica de um ácido gordo (adaptado de Garcia, 2016).

Estes compostos orgânicos podem ocorrer na natureza como substâncias livres ou esterificadas. Contudo, raramente são encontrados na sua forma livre, verificando-se que, na maioria das vezes, tendem a ser parte integrante de estruturas moleculares lipídicas mais complexas. Com efeito, grande percentagem dos ácidos gordos naturais encontra-se esterificada com o glicerol, dando origem aos triglicerídeos, os quais representam cerca de 95% dos lípidos existentes no organismo humano (Vianni e Braz-Filho, 1996; Stoker, 2012).

Os ácidos gordos podem ser classificados de diferentes maneiras, de acordo com os seguintes parâmetros: comprimento da cadeia hidrogenocarbonada, nível de saturação, tipo de configuração (*cis* ou *trans*) e, ainda, mediante a capacidade de o corpo sintetizar ou não determinado ácido gordo (Manore *et al.*, 2009; Roth, 2011).

### **1.1. Comprimento da cadeia carbonada**

Quanto ao comprimento da cadeia carbonada, geralmente considera-se que, se os ácidos gordos contêm menos de 6 carbonos, são designados de ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs). Os ácidos gordos de cadeia média (MCFAs) possuem entre 6 a 12 átomos de carbono e os de cadeia longa (LCFAs) são constituídos por 14 ou mais carbonos.

O comprimento da cadeia carbonada influencia o modo como os ácidos gordos são digeridos, transportados, metabolizados e usados pelo corpo, sendo que nos SCFAs e nos MCFAs, os processos de digestão e transporte ocorrem mais rapidamente comparativamente aos LCFAs (Manore *et al.*, 2009).

Com muito pouca frequência verifica-se a presença de SCFAs nas várias fontes alimentares, sendo a exceção o ácido butírico, o qual pode ser encontrado na gordura do leite (Fink e Mikesky, 2015).

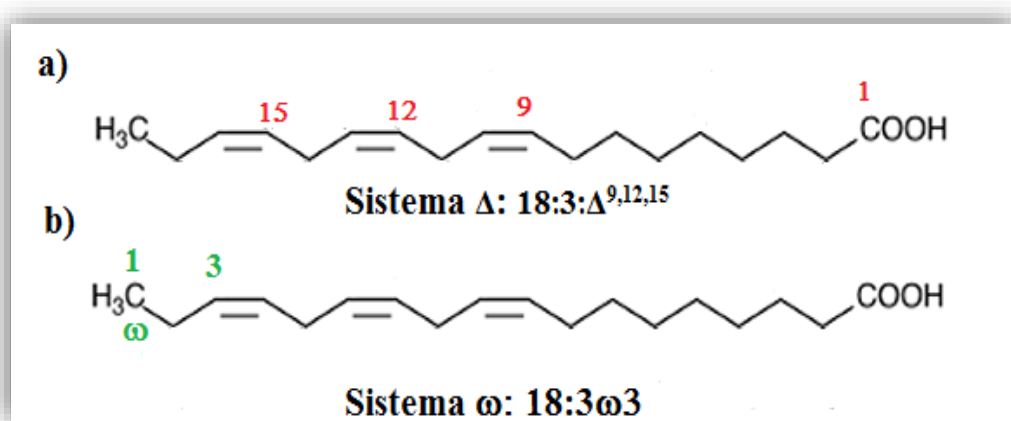
### **1.2. Nível de saturação**

Relativamente ao nível de saturação, se todas as ligações entre os átomos de carbono que constituem a cadeia hidrogenocarbonada são ligações simples (C-C), o ácido gordo é classificado como saturado.

Por outro lado, se existir entre os átomos de carbono uma ou mais ligações duplas (C=C), a cadeia não se encontra saturada com os átomos de hidrogénio, sendo designados por ácidos gordos insaturados. Um ácido gordo insaturado com uma única ligação dupla é classificado como ácido gordo monoinsaturado (MUFA), ao passo que se tiver duas ou mais ligações duplas é designado como ácido gordo polinsaturado (PUFA).

Os ácidos gordos são incorporados no organismo de acordo com o grau de insaturação. Os MUFAs, mais solúveis na fase aquosa do meio intestinal, são absorvidos mais facilmente na forma livre; os PUFAs são incorporados preferencialmente nos fosfolípidos e os AG saturados são incluídos nos triglicerídeos (Nelson e Cox, 2005).

Existem dois sistemas numéricos para denotar a posição relativa das ligações duplas nos ácidos gordos insaturados: o sistema delta e o sistema ômega. O sistema delta ( $\Delta$ ) é definido por três critérios – o número de carbonos, o número de ligações duplas e a posição dessas ligações. O carbono do grupo carboxílico é marcado como o carbono número 1, sendo o número e a posição das ligações duplas contadas a partir deste extremo. Por exemplo, o ácido  $\alpha$ -linolénico tem, neste sistema, a seguinte notação: 18:3: $\Delta^{9,12,15}$  (Figura 2a) (Small, 2000; Pelley, 2011; Stoker, 2012).



**Figura 2:** Representação da classificação do ácido  $\alpha$ -linolénico nos sistemas delta e ômega (adaptado de Micronutrient Information Center da Oregon State University, 2016).

No sistema ômega ( $\omega$ ), especifica-se o número de carbonos, o número de ligações duplas e a posição da primeira ligação dupla relativamente ao carbono do extremo metilo da cadeia, sendo este designado por carbono  $\omega$  e assinalado como o carbono número 1 (Pelley, 2011). Convencionalmente, o símbolo  $\omega$  pode ser substituído pela letra “n-“ (Zacharias, 2012). O mesmo exemplo do ácido gordo supracitado, o ácido  $\alpha$ -linolénico, no sistema ômega pode ser representado como: 18:3 $\omega$ 3 (Figura 2b) (Small, 2000).

É de realçar três famílias de ácidos gordos denominadas de acordo com esta classificação: os ômega-3, os ômega-6 e os ômega-9 (Fink e Mikesky, 2015). A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais ácidos gordos n-3, n-6 e n-9.

**Tabela 1:** Principais ácidos gordos n-3, n-6 e n-9 (adaptado de Institute of Medicine, 2005).

Ácidos gordos n-3	Ácidos gordos n-6	Ácidos gordos n-9
18:3 Ácido $\alpha$ -linolénico (ALA)	18:2 Ácido linoleico	18:1 Ácido oleico
20:5 Ácido eicosapentaenóico (EPA)	18:3 Ácido $\gamma$ -linolénico	22:1 Ácido erúcico
22:5 Ácido docosapentaenóico	20:3 Ácido dihomo- $\gamma$ - linolénico (DGLA)	
22:6 Ácido docosahexaenóico (DHA)	20:4 Ácido araquidónico (AA)	
	22:5 Ácido docosapentaenóico	

### 1.3. Tipo de configuração (*cis* ou *trans*)

Os ácidos gordos, mais especificamente, os insaturados, podem ainda ser classificados como *cis* ou *trans*. Esta terminologia refere-se ao posicionamento dos átomos de hidrogénio dispostos em redor da ligação dupla do ácido gordo, determinando, conseqüentemente, o tipo de configuração.

Na configuração *cis*, os hidrogénios em redor da ligação dupla encontram-se do mesmo lado da cadeia carbonada, resultando numa repulsão eletrostática entre os átomos e, conseqüentemente, uma torção na cadeia. Na configuração *trans*, os átomos de hidrogénio em torno da ligação dupla situam-se em lados opostos da cadeia e, como tal, o ácido gordo assume uma conformação mais linear.

A maior parte dos ácidos gordos encontrados na natureza estão na configuração *cis*. Contudo, hoje em dia, verifica-se que a presença de ácidos gordos *trans* na dieta é muito prevalente, devido a um processo designado de hidrogenação. A hidrogenação consiste na adição de átomos de hidrogénio a algumas das ligações duplas de um ácido gordo insaturado, tornando-o mais saturado e fazendo com que este assumira uma conformação mais linear do tipo *trans*. Os ácidos gordos *trans* acarretam conseqüências para a saúde, visto que estão associados, entre outros aspetos, a um aumento dos níveis de colesterol

LDL e a uma diminuição do colesterol HDL, aumentando o risco de doença coronária (Fink e Mikesky, 2015).

#### **1.4. Capacidade de o organismo sintetizar ou não o ácido gordo**

Os ácidos gordos podem também ser classificados mediante a capacidade de o organismo ser ou não capaz de sintetizá-los. Se um ácido gordo é capaz de ser sintetizado em quantidades adequadas e, como tal, não necessita de ser obtido através de fontes alimentares, é considerado como não essencial. São exemplos os ácidos gordos saturados ou os ómega-9 (Fink e Mikesky, 2015).

Se determinado ácido gordo não pode ser produzido pelo organismo a partir de outras substâncias, este tem de ser obtido através da dieta ou por suplementação, sendo designado de ácido gordo essencial. Exemplos destes ácidos incluem o ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) da família dos ómega-3, e o ácido linoleico, dos ómega-6 (Fink e Mikesky, 2015).

Os vegetais de folha, a linhaça, as nozes e seus óleos estão entre as fontes alimentares mais ricas de ALA, sendo o óleo de canola também um excelente recurso para se obter este ácido gordo. Já o ácido linoleico encontra-se presente, sobretudo, em óleos vegetais, como o óleo de milho, soja, girassol, amendoim ou cártamo. Certos tipos de nozes e sementes, como os pinhões e a castanha-do-brasil, contêm, igualmente, um elevado teor de ácido linoleico (Manore *et al.*, 2009; USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2014).

Apesar de, teoricamente, os humanos serem capazes de sintetizar a partir dos ácidos gordos  $\alpha$ -linolénico e linoleico, por via de uma série de reações de insaturação e alongação, ácidos gordos n-3 e n-6 de cadeia mais longa (tais como, o DHA e o EPA), ou o ácido araquidónico (AA), respetivamente, algumas evidências sugerem que esta conversão é extremamente limitada, pelo que estes ácidos gordos podem ser classificados como condicionalmente essenciais (Tvrzicka *et al.*, 2011). A dose mínima diária recomendada de EPA e DHA varia entre 250 e 450 mg/dia, especialmente em mulheres grávidas ou em idade reprodutiva (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergens (NDA), 2010). Podem ser obtidos através do consumo dos denominados

peixes gordos, como o salmão ou atum, bem como a partir de óleos de peixe (Tvrzicka *et al.*, 2011).

## **2. Funções e benefícios gerais dos ácidos gordos**

Em termos gerais, os ácidos gordos essenciais desempenham várias funções de extrema importância, tais como (Rustan e Drevon, 2005): fornecem energia às células e funcionam como fonte de reserva energética, sob a forma de tecido adiposo e músculo-esquelético; são componentes estruturais das membranas celulares; providenciam isolamento térmico e elétrico e proteção mecânica; funcionam como precursores de várias moléculas de sinalização celular, como por exemplo, os eicosanóides; intervêm na regulação genética.

O interesse pelos ácidos gordos, especialmente os n-3, procede da descoberta, por parte de investigadores na década de 80, de que, certas populações, como os esquimós da Gronelândia (ou inuítes), apresentavam uma menor incidência de doenças cardiovasculares, apesar de terem uma dieta rica em gorduras. Este facto contrasta marcadamente com aquilo que se verifica nas populações ocidentais, as quais demonstram uma correlação entre uma dieta rica em gorduras e a ocorrência de eventos cardíacos (Stoker, 2012). A prevalência de outras patologias de cariz inflamatório e autoimune era, igualmente, muito baixa nos inuítes (Kromann e Green, 1980).

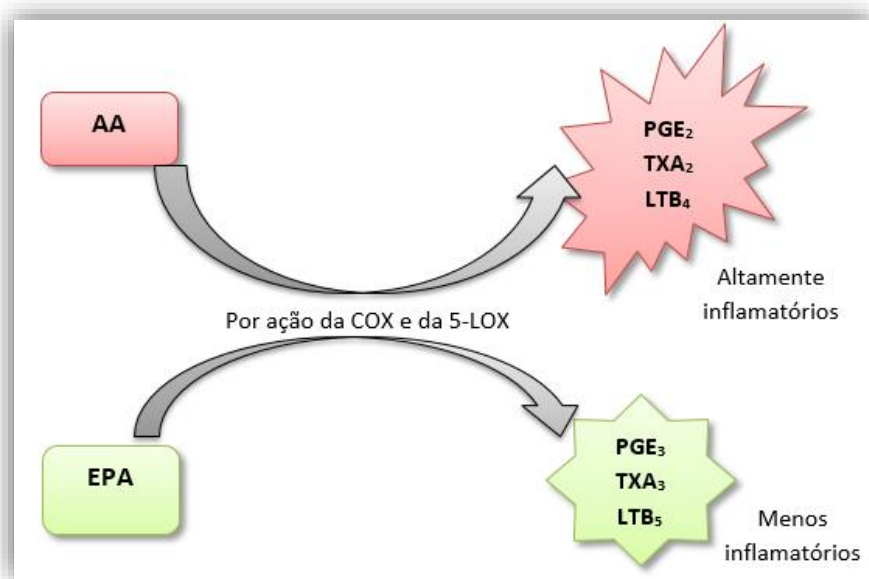
### **2.1. Mecanismos de ação anti-inflamatória dos ómega-3**

Na base da relação entre os ácidos gordos polinsaturados e a inflamação encontram-se os eicosanóides. Os eicosanóides podem ser considerados como mediadores bioativos, com um papel crucial na sinalização celular, influenciando as respostas imunes e inflamatórias. São moléculas produzidas a partir de ácidos gordos polinsaturados de 20 carbonos, provenientes dos fosfolípidos das membranas celulares ou da corrente sanguínea. O processo de síntese ocorre no fígado, após estimulação por hormonas, citocinas ou outros elementos, e depende, principalmente, de três famílias de enzimas: as cicloxigenases (COX), as lipoxigenases (LOX) e o citocromo P450 (CYP450) (Insel, 2013; Micronutrient Information Center da Oregon State University, 2016).

Em resposta a um processo inflamatório, o AA é libertado das membranas celulares, através da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, atuando como substrato da COX e da 5-LOX para a produção de eicosanóides. O AA origina eicosanóides altamente pró-inflamatórios e pró-agregantes, tais como a prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>, o tromboxano (TX) A<sub>2</sub> ou o leucotrieno (LT) B<sub>4</sub> (Fetterman Jr. e Zdanowicz, 2009).

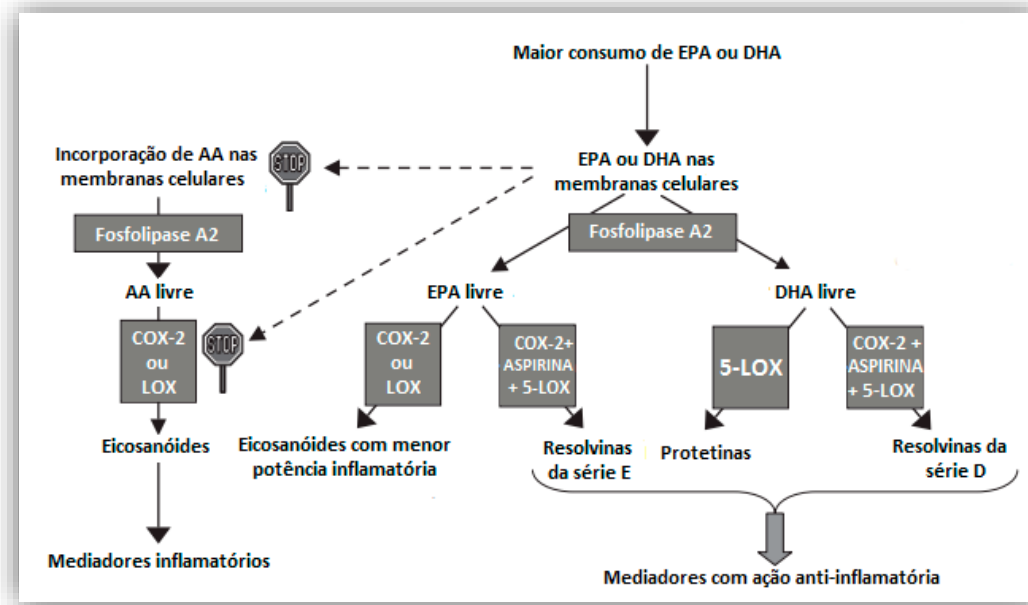
Um consumo elevado de DHA e EPA conduz a uma substituição de AA por ácidos gordos n-3 na camada fosfolipídica das células, reduzindo a quantidade de AA disponível para ser incorporado e libertado da membrana celular e ser usado como substrato para a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios (Calder, 2012; Solis *et al.*, 2014).

Por outro lado, sendo o EPA estruturalmente similar ao AA, atua como um competidor inibitório do ácido araquidónico no processo de conversão pelas enzimas, tornando-se o substrato preferencial da COX e 5-LOX e bloqueando o metabolismo do AA. Os produtos de conversão do EPA, como o TXA<sub>3</sub>, as PG I<sub>3</sub> e E<sub>3</sub> e o LTB<sub>5</sub> são, quando comparados com os eicosanóides resultantes da conversão do AA, muito menos potentes na estimulação da inflamação (Figura 3). O DHA tem igualmente a capacidade de interferir no metabolismo do AA (Fetterman Jr. e Zdanowicz, 2009; Siriwardhana *et al.*, 2012; Calder, 2012).



**Figura 3:** Tipos de eicosanóides derivados do AA e do EPA (adaptado de Siriwardhana *et al.*, 2012).

A metabolização do DHA e do EPA conduz ainda à formação de mediadores que apresentam significativas propriedades anti-inflamatórias, nomeadamente as resolvinas e as protetinas (Figura 4) (Calder; 2006; Calder, 2012).



**Figura 4:** Mecanismos de ação anti-inflamatória dos ômega-3 (adaptado de Calder, 2006).

De acordo com a informação anteriormente mencionada, os eicosanóides podem ter efeitos fisiológicos contrários, dependendo se são provenientes de ácidos gordos n-3 ou n-6 (Insel, 2013). Os eicosanóides derivados dos ômega-3 têm, geralmente, ação anti-inflamatória, antitrombótica, antiarrítmica e vasodilatadora e, os eicosanóides derivados dos ômega-6, tendem a ser pró-inflamatórios e pró-trombóticos. Os dois tipos competem pelas mesmas vias metabólicas (Brayfield, 2014).

As diferenças nos processos de conversão permitem ainda explicar a maior incidência de doenças cardiovasculares, inflamatórias, autoimunes ou oncológicas nas populações ocidentais em comparação com os inuítes, dado que, enquanto a dieta dos esquimós é rica em ácidos gordos ômega-3 (menor razão ômega-6/ômega-3), originando derivados com efeitos supressivos, a dieta das populações ocidentais é excessiva em ácidos gordos ômega-6 e deficiente em ômega-3 (elevada proporção ômega-6/ômega-3), o que promove a patogénese de muitas das patologias referidas (Stoker, 2012; Simopoulos, 2012).

## 2.2. Doenças cardiovasculares

Os ácidos gordos n-3, sobretudo os de cadeia longa EPA e DHA, parecem ter efeitos benéficos na diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Apesar do mecanismo dos efeitos protetores potenciados pelos PUFA n-3 não estar ainda completamente esclarecido, parece compreender uma melhoria do perfil lipídico, bem como uma redução da inflamação vascular e da agregação plaquetária (Fetterman Jr. e Zdanowicz, 2009; Calder, 2012).

A diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos resulta, por exemplo, do aumento da *clearance* de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) na circulação sanguínea ou da redução da atividade das enzimas hepáticas intervenientes na síntese de triglicerídeos (Backes *et al.*, 2016). A diminuição de triglicerídeos é linearmente dependente da dose. Contudo, verificam-se variações interindividuais importantes, havendo uma redução mais proeminente em indivíduos com níveis iniciais de triglicerídeos mais elevados (Mozaffarian e Wu, 2011).

Através da inibição da síntese do TXA<sub>2</sub> nas plaquetas, os ácidos gordos n-3 têm ação antitrombótica, diminuindo o risco de formação de trombos, os quais podem resultar em episódio de enfarte do miocárdio (Mason, 2011; Mozaffarian e Wu, 2011).

A nível da vasculatura endotelial, está reportado uma melhoria da sua função, resultante da inibição dos canais de cálcio e da diminuição da proliferação de células musculares lisas (Hirafuji *et al.*, 2003; Kromhout, 2012). Adicionalmente, está documentada uma modesta diminuição na pressão arterial, devida, sobretudo, à produção de óxido nítrico, um potente vasodilatador (Mozaffarian e Wu, 2011; Kromhout, 2012). Para além destes principais efeitos, os ómega-3 parecem promover, igualmente, a redução de arritmias e da formação de placa aterosclerótica (Mozaffarian e Wu, 2011).

Vários estudos demonstraram a eficácia dos PUFA na redução de eventos cardiovasculares (Barrett, 2013; Brayfield, 2014). A ingestão de ácidos gordos ómega-3, procedente de peixe ou de suplementos, parece estar associada a uma redução da mortalidade por doença coronária, incluindo o enfarte agudo do miocárdio e a morte súbita cardíaca (Mozaffarian e Wu, 2011; Kromhout, 2012; Greene *et al.*, 2016).

Contudo, é importante sublinhar que, apesar dos resultados, existem ainda discrepâncias sobre os efeitos destes ácidos gordos na prevenção do risco cardiovascular, com várias publicações a questionar os benefícios anteriormente constatados (Enns *et al.*, 2014; Mohebi-Nejad e Bikdeli, 2014). A inconsistência nos resultados dos estudos pode ser influenciada por aspetos como a etnia, o uso de medicação, a presença de contaminantes ou a origem dos ácidos gordos (Barrett, 2013).

### **2.3. Doenças inflamatórias e autoimunes**

Foram relatados efeitos benéficos na sintomatologia da artrite reumatóide e, em alguns estudos, os ómega-3 ajudaram mesmo a diminuir a dose de anti-inflamatórios (Fetterman Jr. e Zdanowicz, 2009; Lee *et al.*, 2012). Uma revisão sistémica de 23 ensaios clínicos, nos quais se pretendia averiguar a suplementação de ómega-3 em doentes com artrite reumatóide, permitiu concluir que, uma suplementação diária de aproximadamente 3g/dia de PUFAs n-3, conduziu a melhorias, ainda que modestas, em alguns dos sintomas clínicos da doença, tais como dores articulares, inflamação e rigidez matinal (Miles e Calder, 2012).

Outras patologias inflamatórias e autoimunes que podem beneficiar do uso de ómega-3 incluem a psoríase, a asma, a colite ulcerosa e a doença de Crohn (Insel *et al.*, 2013).

### **2.4. Neoplasias e caquexia**

Uma das áreas de maior interesse para o uso potencial de ácidos gordos n-3 é a do cancro e a caquexia (Fetterman Jr. e Zdanowicz, 2009). Em culturas celulares de tumores humanos do cólon (linhas HT-29, HCT116 e SW480) e do esófago (linha TE-1), a suplementação com PUFAs n-3 permitiu a indução da apoptose e a inibição da proliferação (Sun *et al.*, 2013; Kubota *et al.*, 2013). Adicionalmente, está demonstrado que o DHA e o EPA permitem aumentar a eficácia de agentes quimioterápicos comumente usados nas neoplasias, tal como o docetaxel no caso do cancro da mama (Chauvin *et al.*, 2016).

A caquexia pode ser caracterizada como uma síndrome complexa e multifatorial, acompanhada de anorexia, atrofia muscular e perda de peso, acometendo frequentemente indivíduos com cancro ou com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A presença desta síndrome é indicativa de um prognóstico desfavorável, complicando o esquema terapêutico e aumentando a sua eventual toxicidade (Fetterman Jr. e Zdanowicz, 2009).

Em alguns estudos, a suplementação com AG ómega-3 permitiu restabelecer o apetite, moderou a perda de peso, aumentou a massa muscular e melhorou a qualidade de vida (Sánchez-Lara *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Noutros estudos não foram encontrados benefícios significativos (Mazzotta e Jeney, 2009; Ries *et al.*, 2012).

## **2.5. Transtornos neurológicos e psiquiátricos**

Alguns estudos têm associado um elevado consumo de peixe a um menor risco de diminuição da função cognitiva e da doença de Alzheimer (Raji *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2016). Nesta área, a pesquisa tem-se centrado nos potenciais efeitos neuroprotetores dos ómega-3 de cadeia longa, uma vez que doentes com Alzheimer apresentam baixos níveis de DHA no soro e nas membranas celulares neuronais. Os mecanismos neuroprotetores dos ómega-3 são provavelmente multifatoriais, e podem estar relacionados com uma variedade de efeitos moleculares e celulares ao nível do sistema nervoso central (Lim *et al.*, 2005).

Os mecanismos propostos para o efeito protetor no cérebro e sistema vascular incluem a mitigação da inflamação, a melhoria do fluxo sanguíneo cerebral e uma redução da agregação de placas amilóides (Fotuhi *et al.*, 2009). Os PUFA n-3 conseguem igualmente prevenir acumulações neuronais de cálcio, as quais podem desencadear uma cascata que, eventualmente, conduz a lesão e morte neuronal (Lim *et al.*, 2005).

A literatura também sugere existir uma relação entre deficiência em ómega-3 e problemas de humor. Associados à terapêutica, este tipo de ácidos gordos parece melhorar alguns sintomas da depressão e aumentar a duração da regressão da doença (Pharmacist's Letter, 2012; Brayfield, 2014).

## II. Psoríase

---

A psoríase é uma doença crônica inflamatória autoimune que afeta aproximadamente 2 a 3% da população mundial, sendo caracterizada por uma queratinização e multiplicação de células epidérmicas exagerada e desordenada (Solis *et al.*, 2014). De um modo geral, a renovação celular da pele demora cerca de um mês mas, na psoríase, ocorre um aumento no ritmo deste processo, conduzindo a uma hiperqueratose e a uma diferenciação celular incompleta, acompanhadas do espessamento da pele (acantose), projeção e alongamento das papilas dérmicas (papilomatose) e acumulação de células com núcleo no estrato córneo (paraqueratose). Para além disso, os vasos sanguíneos dérmicos encontram-se dilatados e em número superior (Chu *et al.*, 2011; National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, 2013; Meffert, 2015).

Na sua forma típica, designada de psoríase em placas, a doença manifesta-se com lesões espessas e inflamadas, recobertas por escamas prateadas (Figura 5). Estas lesões, denominadas de placas, costumam ser acompanhadas de prurido, dor e descamação, estando geralmente localizadas na zona inferior das costas, cotovelos e couro cabeludo, embora possam aparecer em qualquer região do corpo (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, 2013).

A psoríase pode estar associada ao desenvolvimento de outras patologias, tais como a obesidade, a hipertensão, a dislipidemia ou a doença cardiovascular (Solis *et al.*, 2014).



**Figura 5:** Aparência das lesões da psoríase em placas (adaptado de Nestle *et al.*, 2009a).

## 1. Fisiopatologia da psoríase

A patogénese da psoríase não está totalmente esclarecida. Porém, a teoria mais aceite é a de que é uma patologia dermatológica que parece resultar da interação complexa entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Entre os fatores ambientais incluem-se o álcool e o tabaco, o *stress*, as lesões cutâneas, as infeções como a faringite estreptocócica  $\beta$ -hemolítica ou, ainda, certos medicamentos como os  $\beta$ -bloqueadores ou o lítio (Chu *et al.*, 2011; Torres e Filipe, 2014; Meffert, 2015).

### 1.1. Papel do sistema imune inato e adquirido

A fisiopatogenia da psoríase engloba múltiplos fenómenos imunitários complexos e relacionados, envolvendo, como tal, diferentes vias do sistema imune inato e adquirido (Torres e Filipe, 2014). Células como os linfócitos T, os queratinócitos e as células dendríticas, desempenham um papel crucial na resposta imune desregulada que é responsável pelas características histológicas típicas da psoríase (Chu *et al.*, 2011).

Apesar dos mecanismos exatos para a indução da doença não estarem ainda totalmente elucidados no que respeita aos fatores ambientais anteriormente referidos, é aceite que, geralmente, estes são importantes para o despoletar da patologia. Tais fatores têm a capacidade de iniciar uma cascata de eventos que inclui a formação de complexos DNA-LL37, a ativação de células plasmocitóides dendríticas (pDC) e a secreção de interferão  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) (Nestle *et al.*, 2009a; Mahil *et al.*, 2016).

O LL37 é uma catelidicina pertencente ao grupo dos péptidos antimicrobianos (AMPs). Estes péptidos, moléculas geralmente pequenas constituídas por 12 a 50 aminoácidos, desempenham um papel integral na defesa contra microrganismos patogénicos (Morizane e Gallo, 2012). Em peles saudáveis, a expressão de catelidicinas ocorre em níveis baixos (Braff *et al.*, 2005). Contudo, em resposta a uma lesão ou infeção microbiana, como pode ocorrer na psoríase, a produção de catelidicinas por queratinócitos, nomeadamente de LL37, é fortemente induzida, pelo que este AMP se encontra sobreexpresso na pele psoriática (Mahil *et al.*, 2016).



Após ativação, as DCs migram para os nódulos linfáticos e apresentam o autoantígeno aos linfócitos T *naive*, com subsequente libertação de interleucina 12 e 23 (IL-12 e IL-23), as quais promovem a diferenciação das células T *naive* em células efetoras do tipo T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17, respetivamente (Nestle *et al.*, 2009a; Lande *et al.*, 2014). A indução do fenótipo T<sub>H</sub>1 é ainda regulada pela IL-18, enquanto a maturação e proliferação das T<sub>H</sub>17 depende de outras citocinas, como a IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-21 (Dinarello, 1999; Bettelli *et al.*, 2008; Gaffen *et al.*, 2014).

De seguida, os linfócitos T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17 entram na circulação sanguínea e deslocam-se para a derme. O estabelecimento de interações com moléculas de adesão, como a P-seletina ou a E-seletina, presentes nas células endoteliais dos vasos, facilita este movimento (Mahil *et al.*, 2016).

Várias moléculas secretadas pelos linfócitos T (IL-17A, IL-17F, IL-22, TNF, IFN $\gamma$ ) atuam nos queratinócitos, levando à sua hiperproliferação. Por sua vez, os queratinócitos ativados, produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (e.g. CXCL1, CCL20, IL-1, TNF, IL-8), para além de péptidos antimicrobianos, como as  $\beta$ -defensinas ou as proteínas S100. Estas substâncias são responsáveis por atrair mais células efetoras imunes para a pele, fenómeno denominado de quimiotaxia, conduzindo a um *feedback* positivo que sustenta e amplifica o processo inflamatório (Chu *et al.*, 2011; Mahil *et al.*, 2016).

Outros eventos paralelos contribuem para a formação da lesão psoriática, tal como a interação entre os queratinócitos e os fibroblastos, resultando na reorganização tecidular e deposição de matriz extracelular ou, ainda, a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo a angiogénese (Nestle *et al.*, 2009b; Mahil *et al.*, 2016).

## **1.2. Metabolismo do ácido araquidónico**

Como parte de um processo multifatorial, em lesões psoriáticas verifica-se um aumento das concentrações de AA livre e dos seus metabolitos pró-inflamatórios, incluindo prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, etc.), leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, etc.) ou ácidos hidroxiéicosatetraenóicos (HETE). Estes derivados têm um efeito quimiotático sobre os

leucócitos, em particular nos neutrófilos, podendo contribuir para a proliferação dos queratinócitos (Christophers e Sterry, 1993; Grimminger e Mayser, 1995; Mayser *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2012).

Para além de modularem a duração e a intensidade da resposta inflamatória, os metabolitos do AA induzem igualmente a produção de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e IL-1, as quais estão envolvidas na patogénese da psoríase. Desta forma, é possível afirmar que o metabolismo do ácido araquidónico é outro aspeto relevante a ter em consideração na fisiopatologia da psoríase (Harbig, 2003).

## **2. Ácidos gordos naturais no tratamento da psoríase**

O tratamento da psoríase é específico para cada caso, tendo em consideração o estado clínico do doente, o histórico da doença e a severidade das placas (Solis *et al.*, 2014). A medicação tópica é a primeira abordagem no tratamento de doentes com psoríase ligeira a moderada, passando pelo uso de substâncias como o ditranol, coaltar, corticosteroides, análogos da vitamina D, retinoides ou os inibidores da calcineurina (Feldman, 2016). Contudo, estes fármacos antipsoriáticos apresentam certas limitações, podendo resultar em efeitos adversos como hipercalcemia, irritação e ardência da pele ou teratogenicidade (Rahman *et al.*, 2015).

Vários estudos apontam para a existência de benefícios na psoríase quando ácidos gordos n-3 são adicionados ao tratamento tópico (Zulfakar *et al.*, 2007; Balbás *et al.*, 2011).

Puglia *et al.* (2005) observaram uma redução significativa do eritema das lesões psoriáticas em 10 indivíduos com a doença, mediante aplicação tópica prévia de extratos de óleo de peixe. Por outro lado, Balbás *et al.* (2011) demonstraram que a suplementação com ácidos gordos n-3 (cápsulas Oravex®, contendo 280 mg de EPA e 40 mg de DHA) complementa o tratamento tópico, contribuindo claramente para uma melhoria transversal dos *endpoints* escolhidos para a avaliação da eficácia, nomeadamente os índices PASI (Índice de Gravidade e Extensão da Psoríase), NAPSÍ (Índice de Severidade da Psoríase Ungueal) e DLQI (Índice Dermatológico de Qualidade de Vida).

A administração de ácidos gordos n-3 permite uma diminuição do processo inflamatório, bem como uma maior resolução das lesões da pele (Rahman *et al.*, 2013). Como já tinha sido referido, o EPA e o DHA são capazes de bloquear o metabolismo do AA, limitando a síntese de prostaglandinas e leucotrienos com papel pró-inflamatório. Por outro lado, as resolvinas e protetinas, metabolitos destes ácidos gordos, apresentam propriedades anti-inflamatórias, pelo que, similarmente, contribuem para a resolução do processo inflamatório típico da psoríase.

Estes mediadores exercem outras ações imunoreguladoras, as quais, no seu cômputo geral, ajudam a reduzir a hiperplasia e a hiperproliferação de queratinócitos, tais como (Serhan *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2007; Vassiliou *et al.*, 2008; Serhan *et al.*, 2008): inibição da secreção de várias citocinas, incluindo IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ; fagocitose de células polimorfonucleares apoptóticas; diminuição do processo de quimiotaxia e inibição da migração transendotelial de neutrófilos.

### III. Vetores lipídicos

---

A encapsulação, proteção e libertação de compostos lipófilos bioativos (e.g. nutracêuticos, antimicrobianos, vitaminas, antioxidantes, etc.) tem vastas aplicações no sector farmacêutico, na área da cosmética e cuidado pessoal e na indústria alimentar (Schwendener e Schott, 2010; Singh, 2016). Contudo, a utilização efetiva destes bioativos é muitas vezes limitada pela sua baixa biodisponibilidade e solubilidade (Shrestha *et al.*, 2014).

O recurso a vetores lipídicos é uma das estratégias usadas para fazer face aos desafios anteriormente mencionados (Shrestha *et al.*, 2014). Encapsular um composto lipófilo nestes vetores conduz a um aumento da sua capacidade de permeação nas membranas biológicas e, conseqüentemente, a uma maior eficácia (Kalepu *et al.*, 2013). Apesar do uso de matrizes lipídicas não ser um conceito novo, encontrando-se descrito na literatura científica há várias décadas, nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários transportadores desta natureza (Shrestha *et al.*, 2014). A crescente disponibilidade de excipientes lipídicos com perfis de segurança reconhecidos e características que permitem uma certa flexibilidade no que respeita à libertação dos fármacos, contribuiu substancialmente para o surgimento desses novos sistemas (Kalepu *et al.*, 2013).

Os sistemas lipídicos podem ser manipulados de forma a atender a uma série de requisitos específicos, sendo como tal uma estratégia comercialmente apetecível para a administração de fármacos por várias vias (Shrestha *et al.*, 2014). Entre as suas inúmeras vantagens citam-se (Shrestha *et al.*, 2014): (i) a capacidade de controlar e direcionar a libertação das moléculas encapsuladas; (ii) uma melhoria da capacidade de carga e da estabilidade dos compostos encapsulados; (iii) o recurso a excipientes que são biodegradáveis e, como tal, biocompatíveis e com baixo/sem risco de toxicidade; (iv) a viabilidade de aplicação em várias vias de administração, incluindo a oral, tópica (e.g. cutânea, oftálmica e nasal), parenteral e pulmonar.

Uma das grandes limitações do uso de ácidos gordos ómega-3 é a sua suscetibilidade para sofrer fenómenos de peroxidação lipídica, devido às ligações insaturadas. A peroxidação lipídica resulta, muitas vezes, na perda de ação terapêutica (Taneja e Singh,

2012). Outro problema relaciona-se com uma baixa disponibilidade, decorrente de uma penetração e absorção limitadas através da pele (Rahman *et al.*, 2012).

Devido às vantagens que oferecem, e com o objetivo de ultrapassar estas limitações, os vetores lipídicos têm despertado grande interesse por parte dos investigadores. Assim, este capítulo, apresenta uma breve referência aos vários tipos de vetores lipídicos usados na veiculação de ácidos gordos, bem como o respetivo estado da arte. As nanopartículas lipídicas, nomeadamente os vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), são abordadas com mais pormenor, uma vez que foi o sistema desenvolvido na parte experimental do trabalho.

## **1. Microemulsões**

As micremulsões são definidas como sistemas coloidais contendo gotículas de diâmetro geralmente inferior a 0,15  $\mu\text{m}$ , sendo constituídos por uma fase oleosa, uma fase aquosa, um agente tensioativo e um cotensioativo. Formam-se espontaneamente por agitação ligeira, quando os componentes se misturam nas proporções corretas, possuindo propriedades físico-químicas específicas, tais como transparência ou opalescência, estabilidade termodinâmica e, geralmente, baixa viscosidade, independente da relação de volume de fases (Simões *et al.*, 2011).

As microemulsões podem assumir uma estrutura interna complexa, a qual determina as propriedades físico-químicas do sistema. Assim, podem ser formadas microemulsões simples do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), ou microemulsões múltiplas (O/A/O ou A/O/A). As microemulsões múltiplas formam-se quando os volumes das fases são muito diferentes, predominando uma delas (Simões *et al.*, 2011).

Baboota *et al.* (2012) formularam uma microemulsão contendo óleo de linhaça, o qual é rico em ácido  $\alpha$ -linolénico. Usou-se água destilada para a fase aquosa, e o Unitop 100 e o PEG 400 foram selecionados como agentes tensioativo e cotensioativo, respetivamente. Obteve-se um tamanho médio de gotícula de 186 nm. Também o índice de polidispersão (*Polidispersity Index*, PI), valor não especificado pelos autores, demonstrou uma distribuição uniforme do tamanho. Os resultados alcançados no estudo de permeação *in vitro*, realizado em células de Franz usando como membrana um

enxerto de pele de rato da região abdominal, demonstraram que as microemulsões permitiram uma permeação e retenção de óleo de linhaça na pele 4,2 a 5,7 vezes superior quando comparado com o controlo (óleo de linhaça). Por outro lado, determinou-se que o pH da formulação, medido com um potenciómetro, se encontrava num intervalo compreendido entre 5,0 e 5,5, o que é próximo do valor do pH fisiológico da pele (entre 4,5 e 5,5), prevendo um baixo risco de irritação cutânea. Deste modo, os autores sugeriram que a formulação desenvolvida apresentou características que lhe permite ser usada na terapia tópica da psoríase.

## 2. Nanoemulsões

As nanoemulsões constituem sistemas coloidais apresentando gotículas uniformes e de tamanhos reduzidos, geralmente compreendidos entre 20 e 200 nm. Para preparar uma nanoemulsão é necessária uma fase aquosa, uma fase oleosa, pelo menos um agente tensioativo e elevada energia para obter gotículas de tamanhos nanométricos (e.g. através da homogeneização a elevada pressão). Contrariamente às microemulsões, as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis e a sua formação não é espontânea, dependendo da temperatura, da pressão, da composição e dos procedimentos experimentais usados na sua preparação (Simões *et al.*, 2011).

Ahmad e Kumar (2014) desenvolveram uma nanoemulsão para a aplicação tópica do dipropionato de betametasona, um corticosteroide com atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e antiproliferativa, utilizado no tratamento da psoríase. Para a fase lipídica utilizou-se o óleo de peixe contendo ómega-3, sendo também intenção dos autores explorar o seu efeito anti-inflamatório em combinação com o dipropionato de betametasona. Usou-se água destilada para a fase aquosa, e o Tween<sup>®</sup> 80 e o Transcutol<sup>®</sup> P foram seleccionados como agentes tensioativo e cotensioativo, respetivamente. O Tween<sup>®</sup> 80 tem um equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) elevado, o que contribui para uma melhor emulsificação do óleo de peixe. Por outro lado, o Transcutol<sup>®</sup> P é um bom agente solubilizante, propiciando uma melhor penetração de fármacos lipófilos, como é o caso do dipropionato de betametasona, uma vez que aumenta a solubilidade da substância ativa no domínio lipófilo do estrato córneo.

De modo a aumentar a sua consistência e potenciar a permeação através da pele, a nanoemulsão foi incorporada num hidrogel de Carbopol® 971. O hidrogel foi preparado pela adição de Carbopol® 971 e de ácido salicílico a água, tendo sido a mistura posteriormente agitada com um agitador magnético, até se obter a consistência desejada. A formulação otimizada apresentou um tamanho médio de gotícula de  $128,89 \pm 2,12$  nm e um PI de  $0,201 \pm 0,03$ , o que indica uma distribuição de tamanhos homogénea. O potencial zeta (*Zeta Potential*, ZP) foi de  $-36,09 \pm 1,03$  mV. De acordo com a literatura, valores absolutos elevados de ZP, nomeadamente, +30 mV ou -30 mV, são indicadores de uma boa estabilidade a longo prazo (Malvern, 2012a). Foi ainda possível comparar a ação anti-inflamatória entre a formulação desenvolvida e uma formulação placebo contendo apenas óleo de peixe. Para tal, recorreu-se a um modelo clássico de inflamação, que é o da inflamação aguda na pata de ratos induzida por carragenanas. O hidrogel contendo dipropionato de betametasona e óleo de peixe e o hidrogel placebo foram aplicados 30 minutos antes da administração das carragenanas, tendo-se de seguida calculado a percentagem de inibição (% inibição) de edema para cada uma das formulações. Os resultados obtidos revelaram que o hidrogel com dipropionato de betametasona e óleo de peixe demonstrou uma percentagem de inibição mais significativa (85,22%) quando comparado com a formulação placebo (33,31%) e, como tal, a associação do óleo de peixe e do dipropionato de betametasona pode, de facto, ser útil no tratamento da psoríase.

### **3. Lipossomas**

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas de lípidos anfifílicos (geralmente fosfolípidos) dispostas concentricamente, aprisionando no seu interior um ou mais compartimentos aquosos. Esta estrutura resulta da organização espontânea motivada por fatores entrópicos dos fosfolípidos em meio aquoso, dotando os lipossomas da capacidade de incorporarem quer fármacos lipossolúveis, quer hidrossolúveis, de uma forma eficaz (Matos e Moutinho, 2011).

De acordo com o seu tamanho e número de bicamadas, os lipossomas podem ser classificados em três subtipos principais, nomeadamente: vesículas unilamelares pequenas (*Small Unilamellar Vesicles*, SUV), vesículas unilamelares (*Large Unilamellar Vesicles*, LUV) e vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles*, MLV).

Relativamente aos lipossomas, há que sublinhar as preparações desenvolvidas por Ghorbandaze *et al.* (2016), Sahari *et al.* (2016) e Skibinski *et al.* (2016). Ghorbandaze e colaboradores (2016) desenvolveram nanolipossomas com óleo de peixe com o objetivo de poderem ser incorporados em iogurtes, aumentando como tal o valor nutricional destes alimentos. As características físico-químicas dos iogurtes produzidos, como a acidez ou o índice de peróxidos, foram avaliadas após três semanas de armazenamento a 4 °C. Os testes demonstraram que a encapsulação conduziu a uma redução significativa da acidez e do índice de peróxidos, protegendo eficazmente os ácidos gordos polinsaturados da degradação por fenómenos oxidativos e aumentando a sua estabilidade. Estes resultados estão de acordo com o perfil de ácidos gordos obtidos por cromatografia gasosa, na medida em que, após 21 dias de armazenamento, os iogurtes enriquecidos com óleo de peixe nanoencapsulado apresentaram teores mais elevados de DHA e EPA quando comparados com iogurtes contendo óleo de peixe não encapsulado. Os iogurtes enriquecidos com DHA e EPA encapsulado apresentavam ainda a vantagem de oferecerem melhores propriedades sensoriais, nomeadamente em termos de sabor, aroma, cor e textura. Num painel de avaliadores constituído por 30 pessoas, estes iogurtes tiveram uma aceitação global superior quando comparados com iogurtes fortificados com óleo de peixe na sua forma livre.

O estudo conduzido por Sahari *et al.* (2016) sobre a estabilidade de diferentes formulações de nanolipossomas contendo DHA e EPA e preparados com dipalmitoilfosfolina (DPPC) como lípido sólido, revelou que a adição de  $\alpha$ -tocoferol à formulação, um composto com reconhecida atividade antioxidante, pode ser benéfica. Este composto protege os ácidos gordos contra a oxidação e contribui para a estabilidade física dos vetores lipídicos. Os nanolipossomas com  $\alpha$ -tocoferol apresentaram uma maior eficiência de encapsulação de DHA e EPA e tamanhos de partícula mais homogêneos quando comparados com as restantes formulações, uma formulação contendo DPPC, DHA e EPA, e a outra contendo DPPC, DHA, EPA e metil e propilparabeno, o que reforça a vantagem deste composto nos nanolipossomas com DHA e EPA.

O risco de cancro da mama pode ser influenciado por fatores dietéticos, tais como o tipo e a quantidade de ácidos gordos ingeridos. O DHA é capaz de suprimir a carcinogénese mamária em ratos, reduzir o crescimento celular e induzir apoptose. De acordo com esta premissa, Skibinski *et al.* (2016) desenvolveram uma formulação lipossómica contendo DHA para ser testada em linhas celulares humanas de cancro da mama, usando lípidos com estrutura semelhantes àqueles que são encontrados nas bactérias do domínio *Archea*, capazes de proteger eficazmente o DHA da oxidação e de flutuações de pH. Os testes realizados em duas linhas celulares, MCF-7 e MDA-MB-23, demonstraram que os lipossomas com DHA foram mais eficazes na redução da proliferação, na indução da apoptose e na regulação de algumas proteínas envolvidas no ciclo celular quando comparados com o DHA na sua forma livre. De acordo com estes resultados, os autores sugeriram a potencial utilidade da formulação desenvolvida na prevenção do cancro da mama.

### **3.1. Marinossomas**

Outra alternativa interessante para veicular ácidos gordos é a utilização dos marinossomas. Os marinossomas são um tipo especial de lipossomas formados por lípidos anfifílicos de origem marinha.

Cansell *et al.* (2007) desenvolveram marinossomas contendo ácidos gordos polinsaturados n-3 para administração tópica. O trabalho experimental consistiu no estudo da influência da aplicação direta de uma dispersão de marinossomas nas concentrações de PGE<sub>2</sub> e IL-8, mediadores produzidos por queratinócitos de epiderme humana, após exposição a um agente de contacto irritante, o óleo de croton (extraído das sementes do *Croton tiglium*).

Demonstrou-se que os marinossomas com ácidos gordos n-3 apresentavam atividade anti-inflamatória, sendo capazes de diminuir e modular os níveis de PGE<sub>2</sub> e IL-8, dois mediadores envolvidos na psoríase. Estes resultados e o facto de os marinossomas apresentarem boa estabilidade em condições que mimetizam a fisiologia da pele em termos de pH ou temperatura, sugerem que este tipo de veículo lipídico pode ser usado com vista à prevenção e tratamento de patologias tópicas (Cansell *et al.*, 2007).

## 4. Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas são vetores compostos por uma matriz lipídica sólida, na qual os compostos podem ser incorporados (Müller *et al.*, 2011). Apresentam um tamanho de partícula normalmente compreendido entre os 40 e os 1000 nm (Guimarães e Ré, 2011). Os sistemas de nanopartículas lipídicas dividem-se em dois subtipos, as nanopartículas de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e os vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) (Müller *et al.*, 2011).

### 4.1. Nanopartículas de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN)

Na década de 90, vários grupos de investigação concentraram-se no desenvolvimento de nanopartículas alternativas às até então existentes, tendo produzido SLN (Müller *et al.*, 2002a; Wissing *et al.*, 2004). As primeiras patentes foram submetidas por Gasco em 1993 e por Müller e Lucks em 1996 (Gasco, 1993; Müller e Lucks, 1996).

A composição destas nanopartículas é semelhante à das nanoemulsões do tipo O/A, em que o lípido líquido (óleo) é substituído por um lípido sólido (Müller *et al.*, 2007). As dispersões aquosas de SLN são sistemas constituídos por 0,1-30,0 (% m/m) de fase lipídica sólida às temperaturas ambiente e corporal (i.e., com ponto de fusão  $\geq 40$  °C), dispersa num meio aquoso, e estabilizadas com 0,5-5,0 (% m/m) de agente(s) tensoativo(s) (Pardeike *et al.*, 2009).

Alguns exemplos de lípidos sólidos usados na preparação das SLN incluem (Wu e Guy, 2009): triglicerídeos puros (e.g. triestearina, tripalmitina, trilaurina, trimistina), misturas de triglicerídeos, ácidos gordos (e.g. ácido esteárico, ácido palmítico), esteroides (e.g. colesterol), ceras (e.g. palmitato de cetilo, cera de carnaúba) e monoésteres de álcoois hidroxilados (e.g. behanato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, palmitato estearato de glicerilo).

As SLN apresentam alguns inconvenientes, tais como uma baixa capacidade de carga das moléculas na matriz lipídica sólida ou a possibilidade de expulsão das mesmas durante o período de armazenamento (Wissing *et al.*, 2004). Após a preparação das SLN, parte das nanopartículas adquirem estados cristalinos instáveis de alta energia, as

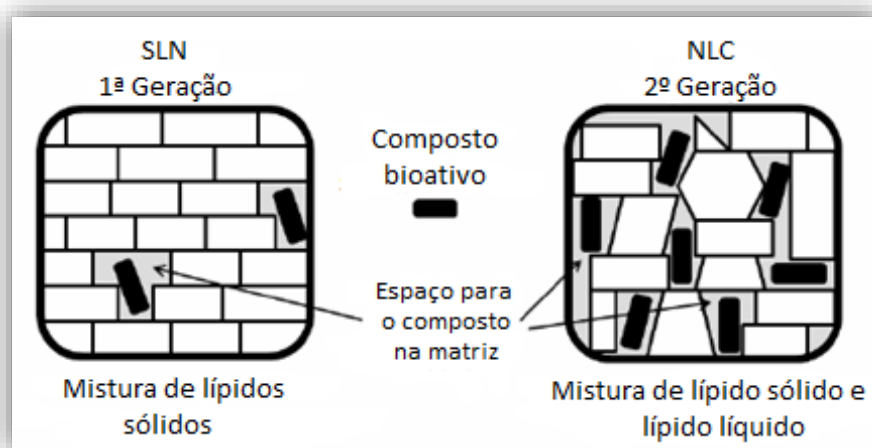
conformações  $\alpha$  ou  $\beta'$ . Durante o armazenamento, pode ocorrer uma transição deste tipo de conformações para outra menos energética e, como tal, mais estável, a conformação  $\beta$ . Contudo, esta origina uma matriz cristalina altamente ordenada e com menor número de imperfeições, o que pode conduzir à expulsão, ao longo do tempo, das moléculas encapsuladas e, conseqüentemente, a problemas de estabilidade das formulações (Pardeike *et al.*, 2009).

#### **4.2. Vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC)**

Os NLC representam a segunda geração de nanopartículas lipídicas, tendo surgido no início do novo milénio, com o intuito de contornar potenciais limitações associadas às SLN, sobretudo as que se relacionam com a baixa estabilidade durante o armazenamento (Pardeike *et al.*, 2009).

A matriz lipídica dos NLC corresponde a uma mistura de lípido sólido com um lípido líquido, que se encontra dispersa numa fase aquosa contendo um ou mais agentes tensioativos. A proporção do lípido sólido e do lípido líquido na mistura pode variar entre os 70:30 até os 99,9:0,1, sendo que a quantidade máxima de lípidos na dispersão final deve ser de 30%. O teor de agente tensioativo varia entre 1,5 e 5,0 (% m/v) (Pardeike *et al.*, 2009). A matriz resultante dos NLC apresenta um ponto de fusão mais baixo, quando comparado com o lípido sólido, mas permanece sólida às temperaturas ambiente e corporal (Müller *et al.*, 2002b).

A principal diferença entre as SLN e os NLC reside na composição e organização dos lípidos da matriz, o que ocasiona estruturas morfológicas diferentes (Figura 7). Desta forma, a estrutura cristalina perfeita das SLN pode ser comparada a um muro de tijolos, enquanto a estrutura dos NLC, originada pela mistura espacial de várias moléculas distintas, é imperfeita e comparada a um muro de pedras. Teoricamente, esta diferença permite aumentar a capacidade de encapsulação de moléculas e prevenir a sua expulsão durante o armazenamento (Souto *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011a).



**Figura 7:** Comparação entre a estrutura interna da matriz das SLN e NLC (adaptado de Guimarães e Ré, 2011).

### 4.3. Vantagens e desvantagens das nanopartículas lipídicas

Alguns dos benefícios das nanopartículas lipídicas, e que fundamentam o seu interesse e adequação para uso cutâneo, prendem-se com o facto de a matriz destes vetores ser constituída por substâncias reconhecidas como seguras para a utilização em humanas, i.e., apresentam estatuto GRAS (*Generally Regarded as Safe*), biocompatíveis e biodegradáveis, o que conduz a uma redução do risco de toxicidade aguda ou crónica (Das e Chaudhury, 2011).

As nanopartículas lipídicas reúnem, num só sistema, as vantagens dos sistemas convencionais, ao mesmo tempo que minimizam algumas das suas desvantagens. Comparativamente aos sistemas convencionais, as nanopartículas lipídicas apresentam as seguintes vantagens (Pardeike *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2011; Das e Chaudhury, 2011; Berton *et al.*, 2011): (i) elevada estabilidade físico-química; (ii) permitem não só a libertação modificada, como também a proteção química dos compostos encapsulados; (iii) possibilitam a veiculação de moléculas hidrófobas e hidrófilas, embora a eficácia de encapsulação diminua significativamente nas últimas; (iv) possibilitam o direcionamento das moléculas para locais-alvo específicos; (v) ausência de necessidade da utilização de solventes orgânicos durante a sua produção, o que reduz ainda mais o risco toxicológico; (vi) facilidade de transposição dos métodos de produção para a escala industrial; (vii) baixos custos de produção.

Uma desvantagem das dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas é a sua baixa viscosidade. Desta forma, para se obter uma preparação com consistência apropriada para aplicação cutânea, as nanopartículas podem ser incorporadas em bases semissólidas (e.g. cremes ou hidrogéis). Contudo, pode verificar-se incompatibilidade(s) com os constituintes da base semissólida, particularmente quando são usados certos agentes tensioativos ou agentes gelificantes (Lippacher *et al.*, 2001). Adicionalmente, outro inconveniente é o facto de, por vezes, o composto encapsulado nas nanopartículas necessitar de ter uma natureza suficientemente lipófila, para se obter uma eficiência de encapsulação considerável (Berton *et al.*, 2011).

#### **4.4. Métodos de produção**

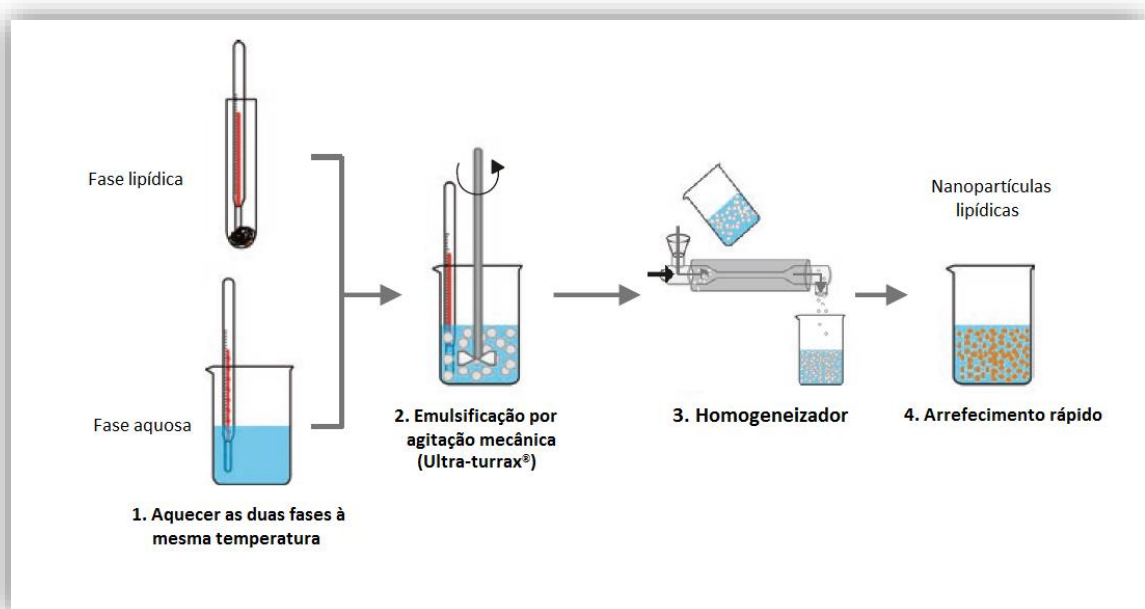
A literatura científica descreve diversos métodos de produção das nanopartículas lipídicas, como a homogeneização a alta pressão, desenvolvida por Müller e Lucks (Müller *et al.*, 1995); a técnica da microemulsão, desenvolvida por Gasco (Gasco, 1993); a sonicação (Das e Chaudhury, 2011); a emulsificação-evaporação do solvente (Sjöström e Bergenstahl, 1992); o método da substituição do solvente (Olbrich *et al.*, 2002); o método da emulsificação-difusão do solvente (Ehrler *et al.*, 2007); a inversão de fases (Heurtault *et al.*, 2002); os fluidos supercríticos (Chattopadhyay *et al.*, 2007); a extrusão por membrana (Joseph e Bunjes, 2011)

Na presente dissertação apenas estão descritos os métodos de homogeneização a alta pressão a quente e de sonicação, uma vez que foram estas as técnicas utilizadas no trabalho experimental.

##### **4.4.1. Homogeneização a alta pressão**

A homogeneização a alta pressão (*High-Pressure Homogenization*, HPH) permite obter dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas estáveis e com reduzido PI (i.e., as nanopartículas apresentam uma distribuição de tamanhos homogénea).

Na HPH a quente (Figura 8), a fase lipídica contendo o composto dissolvido ou homogeneamente disperso, é fundida a uma temperatura 5 a 10 °C acima do ponto de fusão do lípido sólido. De seguida, uma solução aquosa de tensoativo, aquecida à mesma temperatura, é emulsionada com a fase lipídica a uma velocidade elevada, por agitação mecânica (normalmente, recorrendo a um Ultra-turrax<sup>®</sup>). Deste procedimento obtém-se uma emulsão O/A, a qual é submetida, ainda quente, a um processo de elevada energia através de um homogeneizador de alta pressão (Das e Chaudhury, 2011). A nanoemulsão O/A obtida recristaliza após arrefecimento rápido, levando à solidificação do(s) lípido(s) e conseqüente formação das nanopartículas lipídicas (Wissing *et al.*, 2004).



**Figura 8:** Representação esquemática da produção de nanopartículas lipídicas por HPH a quente (adaptado de Shah *et al.*, 2015a).

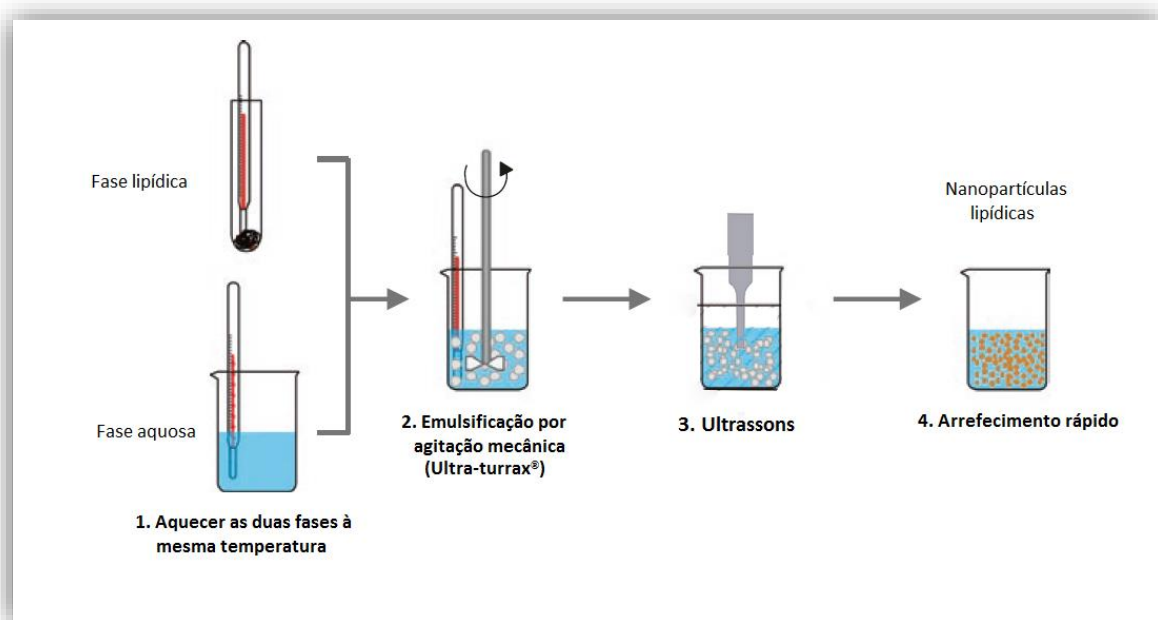
Os tamanhos nanométricos resultam da aplicação de uma tensão de corte elevada e da combinação de forças de cavitação e turbulência, gerados no interior do homogeneizador, aquando da passagem da dispersão aquosa pelo orifício de tamanho reduzido a uma pressão elevada (Shah *et al.*, 2015a). O ciclo de homogeneização pode ser repetido até que a emulsão adquira o tamanho desejado (Das e Chaudhury, 2011). No entanto, a utilização de uma pressão elevada e/ou o aumento do número de ciclos de homogeneização realizados, podem propiciar um incremento do tamanho das nanopartículas, devido à energia cinética elevada que resulta na sua coalescência. Como

tal, geralmente aplicam-se três a cinco ciclos de homogeneização, a uma pressão que varia entre os 500 e os 1500 bar (Mukherjee *et al.*, 2009).

Este método pode ser usado para encapsular compostos lipófilos e insolúveis, bem como substâncias mais sensíveis, uma vez que o tempo de exposição destas a temperaturas elevadas é relativamente curto (Müller *et al.*, 2000). É também um método reprodutível e fácil de adaptar a uma escala industrial (Shah *et al.*, 2015a). Contudo, este não é o melhor processo para encapsular moléculas hidrófilas, já que, durante a homogeneização da fase lipídica, estas deslocam-se para a fase aquosa, originando uma eficácia de encapsulação muito baixa (Müller *et al.*, 2000).

#### 4.4.2. Sonicação

A primeira parte deste método, também designado por método dos ultrassons (Figura 9), é similar à referida na técnica de HPH a quente. Desta forma, a fase lipídica (com o composto disperso ou dissolvido) é fundida e adicionada à fase aquosa contendo o(s) agente(s) tensoativo(s) previamente aquecido(s) à mesma temperatura (i.e., 5 - 10 °C acima do ponto de fusão do lípido sólido).



**Figura 9:** Representação esquemática da produção de nanopartículas lipídicas por sonicação (adaptado de Shah *et al.*, 2015a).

Esta mistura é emulsificada por agitação mecânica, utilizando geralmente um Ultraturrax<sup>®</sup>. A emulsão O/A obtida é, de seguida, submetida à energia dos ultrassons, utilizando uma sonda de sonicação, que origina uma energia de cavitação, com a consequente colisão entre as gotículas e a divisão destas em tamanhos nanométricos. A última etapa consiste no arrefecimento rápido da nanoemulsão O/A em banho de gelo, originando as nanopartículas sólidas (Puglia *et al.*, 2008; Das e Chaudhury, 2011).

Esta é uma técnica versátil, rápida, fácil de executar, com baixos custos de produção e reproduzível, se os parâmetros operacionais foram otimizados, nomeadamente, o tempo e a amplitude de sonicação. Para além disso, Chaturvedi e Kumar (2012) referem ainda que as perdas de amostra verificadas são negligenciáveis.

Têm sido apontados alguns problemas relativos à aplicação deste método, nomeadamente no que diz respeito à dispersão obtida poder apresentar uma elevada distribuição do tamanho das partículas (i.e., valores elevados de PI), havendo a possibilidade da presença de micropartículas ou, ainda, a potencial contaminação por metais provenientes da erosão da sonda de sonicação (Pardeshi *et al.*, 2012). No entanto, é de sublinhar que alguns estudos contrariam estas desvantagens, tendo-se obtido sistemas com estabilidade semelhante aos preparados por outras técnicas, e com ausência de toxicidade (Silva *et al.*, 2011b; Mendes *et al.*, 2013).

#### **4.5. Ácidos gordos naturais veiculados em nanopartículas lipídicas**

Um grupo de investigadores formulou dispersões de NLC contendo diferentes tipos de lípidos naturais provenientes da região de Baical (Sibéria, Rússia), incluindo o óleo de peixe puro ou frações de ácidos gordos poli e monoinsaturados, frações estas isoladas de óleo de peixe e de óleo de sementes de pinho (Averina *et al.*, 2011). As dispersões aquosas de NLC foram produzidas pela técnica da HPH a quente, usando como lípido sólido o Dynasan<sup>®</sup> 118 (triestearato de glicerilo) e como agentes tensioativos o Tween<sup>®</sup> 80 e o Poloxamer 188. Os NLC foram armazenados a diferentes temperaturas, nomeadamente a 4 °C, 20 °C e 40 °C. De modo geral, os resultados da medição do tamanho de partícula, do ZP e do PI, permitiram demonstrar que os NLC apresentavam boa estabilidade física, independentemente das condições de temperatura. Após 28 dias de armazenamento, a única diferença estatisticamente significativa, foi um aumento do

PI de 0,25 para 0,40 da formulação contendo Tween<sup>®</sup> 80 e frações de ácidos gordos monoinsaturados isolados de óleo de peixe. Esta diferença de valores, sugere uma distribuição mais ampla do tamanho de partícula. As medições foram feitas recorrendo-se às técnicas de espectroscopia de correlação de fotões e difratometria de laser, as quais serão descritas de forma mais detalhada no Capítulo V. Também se constatou que o tamanho de partícula depende do tipo de tensoativo utilizado, já que as formulações contendo frações de ácidos gordos isolados de óleo de peixe e óleo de sementes de pinho e estabilizadas com Poloxamer 188, apresentaram um tamanho de partícula menor quando comparadas com as mesmas dispersões contendo Tween<sup>®</sup> 80. Para os NLC estabilizados com Poloxamer 188, o D95 (95% das partículas com tamanho inferior ao determinado) foi de cerca de 300 nm durante todo o tempo de armazenamento e às várias temperaturas. Os NLC contendo Tween<sup>®</sup> 80, apresentavam, após 28 dias, valores de D95 que variavam entre 3,2 e 39,5 µm, podendo-se mesmo detetar a presença de agregados um dia após a produção, a 4,0 °C e 20,0 °C. Adicionalmente, as nanopartículas lipídicas produzidas demonstraram uma elevada eficácia de encapsulação dos ácidos gordos polinsaturados durante o tempo de armazenamento, tendo-se constatado apenas, após 3 meses, um ligeiro decréscimo de cerca de 7% (de 88% para 81%) dos níveis daqueles compostos nos NLC contendo frações de PUFA isolados de óleo de peixe.

Muchow *et al.* (2009) desenvolveram uma formulação com consistência semissólida, composta por uma dispersão altamente concentrada 70 (% m/m) de NLC com ómega-3, destinada à administração oral, com o intuito de melhorar a sua biodisponibilidade e minimizar o odor e sabor desagradáveis. Segundo os autores, a formulação desenvolvida pode representar uma opção viável para pessoas com problemas em deglutir formas farmacêuticas sólidas, especialmente indivíduos com cancro, uma vez que pode facilmente ser dispersa em água ou outros tipos de bebida e administrada desta forma. Para a produção dos NLC por HPH foi usado como lípido sólido o Dynasan<sup>®</sup> 118. O dodecilsulfato de sódio (SDS) foi escolhido como agente tensoativo e estabilizador por repulsão eletrostática. Adicionalmente, usou-se o succinato de d- $\alpha$ -tocoferol polietileno glicol 1000 (TPGS) e a polivinilpirrolidona (PVP) como agentes estabilizadores estéricos. As nanopartículas lipídicas apresentaram um tamanho de partícula de 243 nm, o que favorece a absorção a nível do trato gastrointestinal, e um PI de cerca de 0,064, indicando uma distribuição estreita do tamanho de partícula.

Adicionalmente, o ZP foi relativamente baixo (-15 mV). Porém, os autores salientam que a elevada viscosidade do sistema, bem como os vários agentes estabilizadores usados, contribuem para a sua estabilidade.

## **IV. Sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas para uso cutâneo**

---

A aplicação tópica é uma via de administração de bioativos usada para obter efeitos a vários níveis (estrato córneo, epiderme e derme). No entanto, alguns problemas têm sido relatados quando se utilizam preparações convencionais, tal como uma baixa penetração dos constituintes ativos, devido à função barreira do estrato córneo (Hommos, 2009).

Vários investigadores têm centrado a sua pesquisa no uso tópico, ao nível da pele, de SLN e NLC. As nanopartículas lipídicas apresentam certas características que as tornam vantajosas para a aplicação cutânea quer de fármacos, quer de cosméticos. Como já mencionado, estes sistemas coloidais são compostos por lípidos biodegradáveis semelhantes aos fisiológicos, não irritantes nem tóxicos e, como tal, são adequados para uso em peles inflamadas ou danificadas, como ocorre na psoríase. Por outro lado, o seu pequeno tamanho assegura um contacto próximo com o estrato córneo, aumentando a quantidade de composto ativo que pode permear a pele (Wissing e Müller, 2003; Pardeike *et al.*, 2009).

### **1. Oclusão e hidratação cutânea**

O fenómeno de acantose (engrossamento) da pele psoriática tem sido atribuído a um aumento nos níveis de colesterol e a uma diminuição dos níveis de ceramidas. Além disso, os fatores naturais de hidratação (*Natural Moisturizing Factors*, NMF), encontram-se praticamente ausentes. Como resultado, o tratamento desta doença pela via tópica representa um grande desafio (Wertz *et al.*, 1989).

Para ultrapassar as complexidades inerentes ao tratamento tópico da psoríase, várias estratégias têm sido propostas, entre as quais o uso de sistemas coloidais lipídicos. Este tipo de sistemas permite, em parte, resolver o problema do desequilíbrio lipídico característico da psoríase, na medida em que a sua matriz é constituída por componentes fisiológicos, possibilitando o fornecimento dos lípidos em falta e restaurando as condições fisiológicas normais da pele (Morganti *et al.*, 2001).

Quando uma formulação semissólida contendo nanopartículas lipídicas é aplicada na pele, origina-se um filme muito fino, constituído por nanopartículas dispostas em monocamada. Devido ao seu carácter hidrófobo, o filme formado apresenta ação oclusiva, retardando a perda transepidérmica de água, promovendo assim a hidratação cutânea. Este mecanismo de ação é muito vantajoso no tratamento da psoríase, já que as peles psoriáticas são peles extremamente secas e desidratadas (Souto e Müller, 2008).

De facto, a oclusão proporcionada pelas formulações tópicas convencionais não permite assegurar uma rápida hidratação, especialmente se o estrato córneo for excessivamente seco. As dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas são adequadas para o efeito pretendido, uma vez que quando aplicadas na pele, formam um filme lipídico denso e oclusivo (Souto e Müller, 2008).

O grau de hidratação conferido depende do tipo de lípidos e agentes tensioativos usados, bem como do tamanho das nanopartículas lipídicas. Quanto menor o tamanho das nanopartículas que formam o filme, menor é a evaporação de água, uma vez que os poros de ar existentes entre as nanopartículas são também inferiores. Assim, limita-se a perda transepidérmica de água e potencia-se a hidratação cutânea. De forma contrária, tamanhos maiores (e.g. micropartículas), facilitam a evaporação de água (Souto *et al.*, 2008).

## **2. Incorporação de nanopartículas lipídicas em formulações semissólidas**

Similarmente ao que acontece com os lipossomas ou com as nanopartículas poliméricas, as dispersões de nanopartículas lipídicas podem ser incorporadas em bases semissólidas convencionais, tais como cremes O/A ou hidrogéis, com o intuito de adquirir uma consistência adequada para a aplicação na pele (Souto e Müller, 2007).

Para produzir cremes O/A contendo nanopartículas lipídicas, podem ser usadas dispersões concentradas, isto é, com cerca de 50% de conteúdo lipídico sólido. A incorporação pode ser realizada durante ou após a produção do creme. No primeiro caso, uma parte da água que constitui o creme, é substituída pela dispersão aquosa de SLN ou NLC altamente concentrada, decorrendo posteriormente o processo clássico de

produção. As nanopartículas lipídicas são estáveis o suficiente para evitar a sua coalescência com a fase lipídica do creme (Souto e Müller, 2007).

No segundo caso, o creme é produzido de forma usual, mas com um teor de água reduzido, com o intuito de compensar a água que é acrescentada posteriormente com a dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas. Após a preparação da formulação, a dispersão de nanopartículas é incorporada na base semissólida por agitação, à temperatura ambiente. Este procedimento evita a fusão das nanopartículas, prevenindo uma alteração da sua estrutura interna (Souto e Müller, 2007).

A incorporação de nanopartículas lipídicas em hidrogéis é um processo simples. O hidrogel é previamente preparado e, posteriormente, a dispersão de SLN ou NLC é diluída na base semissólida (Silva *et al.*, 2012). Alternativamente, pode adicionar-se o agente gelificante diretamente à dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas, ocorrendo a gelificação da água e a formação de um sistema do tipo nanoemulgel. Este procedimento apresenta como vantagem a obtenção de uma formulação mais concentrada em nanopartículas lipídicas (Tichota *et al.*, 2014).

A adição de certos eletrólitos, como o hidróxido de sódio ou de potássio, reduzem a carga elétrica superficial das partículas (i.e., o ZP), conduzindo à sua destabilização e agregação. Como tal, nos processos de gelificação dependentes do pH, é aconselhável utilizar outro tipo de agentes neutralizantes, dos quais são exemplo o Tristan<sup>®</sup> ou o Neutrol<sup>®</sup> TE. Após a formação do hidrogel, a agregação das nanopartículas deixa de constituir um problema, uma vez que as partículas estão integradas na rede tridimensional e tornam-se fisicamente estáveis (Souto e Müller, 2007).

## V. Trabalho Experimental

---

No presente capítulo são descritos os materiais e os métodos usados no desenvolvimento e caracterização de NLC contendo ácidos gordos ómega-3 e na sua incorporação em bases semissólidas.

Como objetivos específicos do trabalho experimental podem ser descritos os seguintes:

- i. Estudo da compatibilidade do lípido líquido (ómega-3) com diferentes lípidos sólidos e seleção da mistura de lípidos.
- ii. Desenvolvimento e caracterização física das dispersões aquosas de NLC com ómega-3.
- iii. Incorporação dos NLC em diferentes bases semissólidas para administração tópica: hidrogel, creme O/A e pomada hidrófila.
- iv. Avaliação da reologia e da estabilidade acelerada das preparações semissólidas.

### 1. Matérias-primas

O ómega-3, o lípido líquido, foi gentilmente cedido pela Paneural (Espanha). Os lípidos sólidos Precirol<sup>®</sup> ATO 5 (palmito estearato de glicerilo), Gelucire<sup>®</sup> 43/01 (ésteres de glicerol de ácidos gordos saturados) e Inwitor<sup>®</sup> 900K (monoestearato de glicerilo) foram fornecidos pela Gattefossé (França). O Tween<sup>®</sup> 80 (polissorbato 80), o PEG 4000 (polietilenoglicol 4000), o PEG 400 (polietilenoglicol 400), a metilcelulose, o propilenoglicol, a glicerina e a trietanolamina foram adquiridos à Acofarma (Espanha). O cloreto de benzalcónio foi obtido à Merck Schudart (Alemanha), o Span 40 (monopalmitato de sorbitano) à Fluka (Alemanha), o ácido esteárico à VWR Chemicals (Bélgica) e o Nipagin (metilparabeno) à J. M. Vaz Pereira (Portugal).

A água ultrapura foi purificada pelo sistema Milli<sup>®</sup>Q Plus (Millipore<sup>®</sup>, Alemanha).

## 2. Estudos de pré-formulação

Com o objetivo de determinar a compatibilidade e a composição da mistura lipídica (i.e., proporção entre lípido sólido e lípido líquido) para preparar os NLC, procedeu-se à análise da miscibilidade de cada um dos lípidos sólidos com o lípido líquido e ao estudo de calorimetria de varrimento diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) das respetivas misturas.

### 2.1. Análise da miscibilidade lípido sólido/lípido líquido

No desenvolvimento de formulações de NLC, um dos pré-requisitos essenciais é que exista miscibilidade entre o lípido sólido e o lípido líquido (Kasongo *et al.*, 2011). Inicialmente foram escolhidos três possíveis lípidos sólidos para testar a miscibilidade com o ómega-3: o Precirol<sup>®</sup> ATO 5, o Gelucire<sup>®</sup> 43/01 e o Imwitor<sup>®</sup> 900K.

Hu *et al.* (2006) mencionam que as nanopartículas lipídicas devem permanecer no estado sólido à temperatura ambiente e corporal. Como tal, a seleção do lípido sólido para preparar as dispersões de NLC deve ter em atenção o ponto de fusão do mesmo. Tem sido referido que para preparar as dispersões de NLC, a combinação de lípido sólido e lípido líquido deve apresentar um ponto de fusão superior a 40 °C (Silva *et al.*, 2009; Kasongo *et al.*, 2011). Deste modo, a escolha dos três lípidos sólidos justifica-se pelo seu ponto ou intervalo de fusão. O ponto de fusão do Gelucire<sup>®</sup> 43/01 é de 43 °C, enquanto os intervalos de fusão do Precirol<sup>®</sup> ATO 5 e do Imwitor<sup>®</sup> 900K variam entre 53 °C e 57 °C, e entre 54 °C e 64 °C, respetivamente (Ash e Ash, 2008; Jain e Gupta, 2009; Cremer Health, 2013).

#### 2.1.1. Metodologia

A miscibilidade do ómega-3 com o Precirol<sup>®</sup> ATO 5, o Gelucire<sup>®</sup> 43/01 e com o Imwitor<sup>®</sup> 900K foi avaliada em duas proporções (% , m/m), 50:50 e 60:40 (lípido sólido: lípido líquido). Para tal, diferentes quantidades de ómega-3 (0,2 g e 0,25 g) foram adicionadas a cada lípido sólido (0,25 g e 0,3 g), diretamente para viais de vidro. As pesagens efetuaram-se em balança analítica (Acculab Sartorius Group).

Posteriormente, as misturas foram agitadas com recurso a um agitador orbital (Unimax 1010, Heidolph, Alemanha), utilizando uma velocidade de aproximadamente 200 rpm e durante 1 hora, a uma temperatura 5 - 10 °C acima do ponto de fusão mais elevado do lípido sólido. Dos três lípidos sólidos, o Imwitor<sup>®</sup> 900K é o que apresenta um intervalo de fusão superior (54 - 64 °C) (Cremer Health, 2013). De seguida, as misturas lipídicas foram arrefecidas à temperatura ambiente (25,0 ± 1,0 °C).

Após a solidificação, a miscibilidade entre os diferentes lípidos foi analisada, colocando-se para tal uma porção de cada mistura num papel de filtro, seguida de observação visual. Este procedimento permite verificar a eventual existência de gotas de óleo no papel de filtro, o que é indicativo da falta de miscibilidade entre o lípido sólido e o lípido líquido (Kasongo *et al.*, 2011).

### **2.1.2. Resultados e discussão**

Para as três misturas lipídicas, e nas diferentes proporções testadas, não foram observadas quaisquer gotas de óleo no papel de filtro. Estes resultados são indicativos de que existe miscibilidade entre o ómega-3 e cada um dos lípidos analisados.

Apesar de normalmente, e como previamente mencionado, os lípidos sólidos serem misturados com os lípidos líquidos numa proporção que pode variar entre 70:30 até 99,9:0,1 (Pardeike *et al.*, 2009), neste trabalho experimental, o ómega-3 funciona não só como lípido líquido, como também é o composto bioativo que se pretende veicular. Atendendo a estas considerações, a concentração deste constituinte deve ser a mais elevada possível. Desta forma, optou-se por desenvolver uma formulação de NLC na qual a fase lipídica continha uma proporção lípido sólido:lípido líquido de 60:40.

## **2.2. Calorimetria de varrimento diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC)**

As misturas lipídicas foram submetidas à análise térmica por DSC.

A DSC consiste em submeter a substância que se pretende testar e um material de referência inerte a um mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado, medindo e comparando-se a diferença no fornecimento de

energia calorífica em função da temperatura, isto é, a variação entálpica ( $\Delta H$ ) (Giron, 2013).

Nesta técnica, quando a amostra é sujeita a uma transformação física, tal como acontece num processo de transição de fase, é necessário que uma maior ou menor quantidade de energia seja transferida para a amostra, com o objetivo de mantê-la à mesma temperatura que o material de referência. A quantidade exata de energia calorífica varia, dependendo se a transição requer o consumo de energia, o que se verifica em fenómenos endotérmicos como a fusão, ou, se a transição propicia a libertação de energia, processo característico de fenómenos exotérmicos como a cristalização (Martucci, 2014).

Este método permite fornecer indicações sobre o comportamento de fusão e de cristalização, bem como sobre o polimorfismo dos constituintes sólidos e líquidos das nanopartículas, baseando-se no facto das alterações estruturais dos lípidos possuírem temperaturas e entalpias de fusão diferentes (de Mendoza *et al.*, 2009; Das e Chaudhury, 2011; Averina *et al.*, 2011). Estes parâmetros são extremamente importantes, uma vez que influenciam não só a eficiência de encapsulação, como também o perfil de libertação e a eventual expulsão do composto incorporado nas nanopartículas lipídicas durante o armazenamento (Durán *et al.*, 2011).

### **2.2.1. Metodologia**

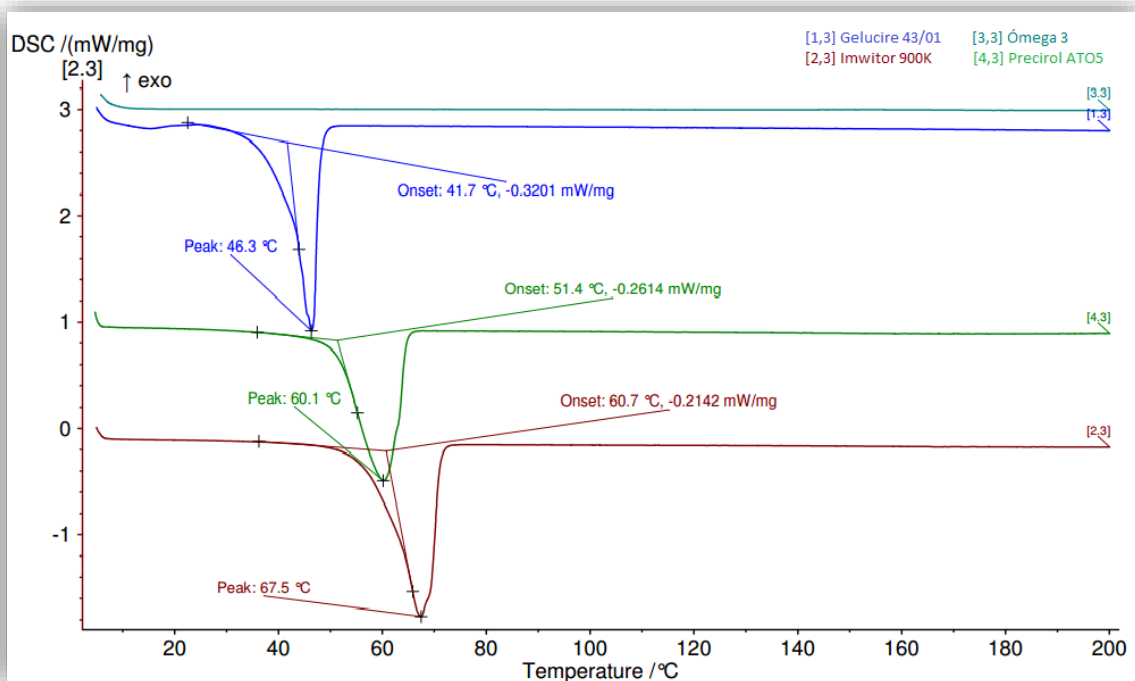
A análise da cristalinidade e do polimorfismo das matérias-primas (lípidos sólidos e lípido líquido) e das misturas lipídicas foi realizada utilizando o DSC 200 F3 Maia® (NETZCH, Alemanha) com trocador automático de amostras. Para cada análise foram pesadas, em balança analítica, massas de amostra compreendidas entre os 30 - 40 mg e colocadas em cadinhos de alumínio selados com tampa perfurada. Como referência usou-se um cadinho e tampa equivalentes, vazio.

Os perfis da análise térmica (termogramas) foram obtidos em atmosfera dinâmica de azoto (20 mL/minuto). O programa térmico contemplou um arrefecimento até aos 5 °C (com uma taxa de 10 °C por minuto), seguida de uma isotérmica durante 8 minutos e,

posteriormente, um aquecimento dos 5 °C aos 200 °C (5 °C/minuto). Os dados foram obtidos com recurso ao *software* Proteus® versão 5.2.1 (NETZCH, Alemanha).

## 2.2.2. Resultados e discussão

Os termogramas dos lípidos encontram-se apresentados na Figura 10.

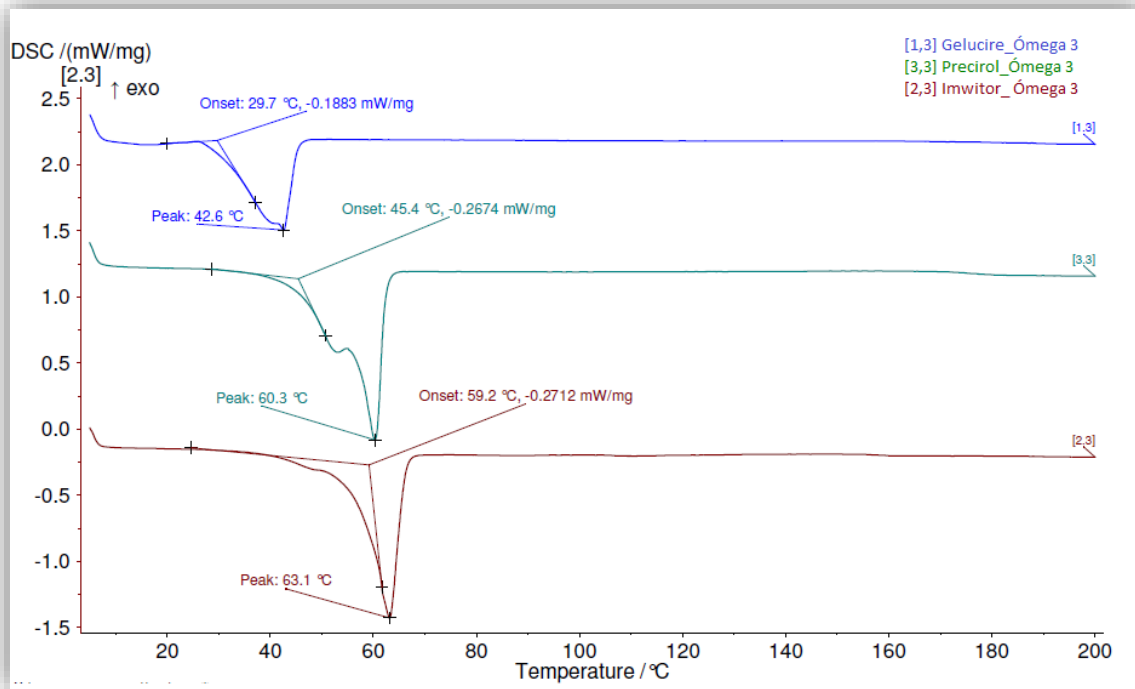


**Figura 10:** Termogramas dos lípidos.

Analisando os termogramas, verifica-se que os três lípidos sólidos apresentam picos endotérmicos a temperaturas próximas às que se encontram descritas na literatura para os respetivos pontos/intervalos de fusão.

O perfil térmico do Gelucire® 43/01 foi idêntico ao obtido por Tiwari *et al.* (2009), o do Imwitor® 900 K ao de Ibrahim *et al.* (2014) e o do Precirol® ATO 5 ao de Avasatthi *et al.* (2016). O ómega-3 não sofreu qualquer fenómeno térmico, o que era de esperar, uma vez que este composto é líquido. Contudo, é importante salientar que o facto de não se verificarem estes fenómenos, permite concluir que o óleo é estável à temperatura de produção dos NLC.

A Figura 11 apresenta os termogramas das misturas lipídicas numa concentração de 60:40 (i.e., lípido sólido:lípido líquido).



**Figura 11:** Termogramas das misturas lipídicas.

As misturas do Gelucire<sup>®</sup> 43/01 e do Imwitor<sup>®</sup> 900K com o lípido líquido apresentam temperaturas de *onset* do processo de fusão de 29,7 °C e de 59,2 °C, respetivamente. Tal indica que a mistura de Gelucire<sup>®</sup> 43/01 e ómega-3 não se apresenta no estado sólido à temperatura ambiente e, desta forma, não se consegue obter nanopartículas sólidas. Por outro lado, a mistura de Imwitor<sup>®</sup> 900K com o ómega-3 demonstra uma temperatura de *onset* de fusão alta de mais para o efeito final pretendido, ou seja, a aplicação na pele. De acordo com estes resultados, seleccionou-se a mistura lipídica ómega-3 e Precirol<sup>®</sup> ATO 5 para o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas, apresentando esta mistura uma temperatura de *onset* de 45,4 °C.

### 3. Preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas

#### 3.1. Metodologia

A dispersão aquosa de NLC foi preparada pela técnica de HPH a quente e pela técnica da sonicação ou dos ultrassons, de acordo com a composição indicada na Tabela 2.

**Tabela 2:** Composição da dispersão aquosa de NLC.

Composição	(%, m/m)
Precirol® ATO 5	6,00
Ómega 3	4,00
Tween® 80	2,50
Cloreto de benzalcónio	0,50
Água ultrapura	87,00

Para ambas as técnicas, a primeira etapa de preparação da dispersão aquosa de NLC consistiu no aquecimento da fase lipídica (mistura do lípido sólido com o lípido líquido) e da fase aquosa, contendo os agentes tensioativos, a uma temperatura 5 - 10 °C acima do intervalo de fusão do lípido sólido (53 - 57 °C). Após a fusão do lípido sólido, adicionou-se a fase aquosa à fase lipídica e homogeneizou-se com recurso ao Ultra-Turrax® T25 (IKA®, Alemanha), a uma velocidade de 9000 rpm durante 5 minutos, obtendo-se uma emulsão O/A.

Na técnica de HPH a quente, a emulsão O/A obtida foi posteriormente transferida para o homogeneizador (Emulsiflex-C3, Avestin, Alemanha), onde foi forçada a passar por um orifício com diâmetro muito reduzido (i.e., 10 - 30 µm) sob elevada pressão que, numa curta distância, atinge uma velocidade elevada (Mukherjee *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2010). Durante a preparação das dispersões, a temperatura deve ser mantida, a fim de evitar que o lípido sólido solidifique. Deste modo, o homogeneizador foi previamente aquecido a  $\pm 70$  °C, fazendo recircular água ultrapura a essa temperatura. Efetuaram-se 10 ciclos de homogeneização, a uma pressão entre 800 e 1000 bar. A tensão de corte elevada e a força de cavitação fragmentaram as gotículas lipídicas em dimensões nanométricas. A última etapa consistiu na transferência da nanoemulsão O/A para viais de vidro, os quais foram devidamente selados e colocados em banho de gelo para

permitir um arrefecimento mais rápido, de modo a que o lípido sólido solidificasse e ocorresse a formação das nanopartículas lipídicas, ou seja, dos NLC.

Por seu turno, na técnica da sonicação, a emulsão O/A foi submetida à ação energética dos ultrassons através de uma sonda de sonicação (Bandelin Sonopuls, Alemanha), com uma amplitude energética de 40%, durante 15 minutos. Este processo de elevada energia permitiu que as gotículas de óleo da emulsão O/A quebrassem e adquirissem tamanhos nanométricos. Por fim, tal como se verificou na técnica de HPH a quente, a nanoemulsão O/A foi imediatamente transferida para viais de vidro e colocada em banho de gelo para permitir um arrefecimento mais rápido e a formação dos NLC.

Após a sua produção, as dispersões de NLC foram armazenadas a duas temperaturas distintas ( $5,0 \pm 1,0$  °C e  $25,0 \pm 5,0$  °C), com o objetivo de avaliar a sua estabilidade ao longo do tempo.

## **4. Caracterização das dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas**

### **4.1. Tamanho das partículas e índice de polidispersão (*Polidispersity Index, PI*)**

O diâmetro e a distribuição do tamanho das partículas (geralmente indicada pelo PI) são parâmetros importantes, influenciando a estabilidade física das dispersões de nanopartículas lipídicas (Vitorino *et al.*, 2011). Estas características estão dependentes, em grande medida, do método de produção e da composição das nanopartículas (Shah *et al.*, 2014).

A espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy, PCS*) ou dispersão dinâmica de luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*), é a técnica mais usada para aferir acerca do tamanho das partículas de uma dispersão (Obeidat *et al.*, 2010). A técnica da DLS é considerada relativamente precisa e sensível, tendo como vantagens o facto de ser rápida e não destrutiva, requerendo apenas uma quantidade muito pequena de amostra sem uma preparação prévia extensa. É capaz de medir tamanhos de partículas com valores entre os 3 - 3.000 nm e, como tal, considerada adequada para

caracterizar dispersões de nanopartículas lipídicas (Das e Chaudhury, 2011; Shah *et al.*, 2015b).

O princípio deste método consiste em relacionar a velocidade de difusão das partículas, provocada pelos seus movimentos, com o tamanho das mesmas (Malvern, 2012a). Para tal, faz-se incidir sob as partículas um feixe laser de determinado comprimento de onda, analisando-se as flutuações da intensidade da luz dispersa em função do tempo (Shah *et al.*, 2015b). A dispersão da luz resulta dos movimentos Brownianos, os seja, os movimentos das partículas resultantes da sua colisão aleatória com as moléculas do líquido que as circunda (Malvern, 2012a). Partículas de menor tamanho movem-se mais depressa (i.e., têm maior velocidade de difusão) e, como tal, causam uma maior flutuação da intensidade da luz. Por outro lado, as partículas de maior tamanho movem-se mais lentamente (i.e., têm menor velocidade de difusão), pelo que a intensidade de luz dispersa varia igualmente de forma mais lenta (Shah *et al.*, 2015b). Deste modo, a intensidade da luz dispersa depende do tamanho e da velocidade dos movimentos Brownianos das partículas (Malvern, 2012a).

O aparelho usado na técnica de DLS possui um processador de sinais, o autocorrelacionador digital, o qual compara a intensidade da dispersão da luz a intervalos de tempo sucessivos, sendo esta informação passada posteriormente a um *software* especializado, capaz de analisar os dados recolhidos e derivar os parâmetros desejados (Malvern, 2012a).

Como técnica complementar à DLS, os tamanhos das partículas podem ser avaliados por difratometria de laser (*Laser Diffractometry*, LD), permitindo uma análise num intervalo entre 0,01 e 3500  $\mu\text{m}$  (Malvern, 2016). É recomendável a utilização da DLS e da LD em simultâneo, uma vez que com esta última técnica é possível detetar a presença de micropartículas não mensuráveis com a técnica de DLS (Mehnert e Mader, 2001; Müller-Goyman, 2004).

O PI também pode ser determinado pela técnica de DLS, sendo este uma indicação da homogeneidade de distribuição do tamanho de partículas em dispersão (Shah *et al.*, 2014). Os valores de PI podem variar entre 0 e 1, em que 0 corresponde a uma amostra completamente monodispersa e 1 indica uma distribuição muito ampla de tamanhos.

Quanto menor o valor de PI, mais monodispersa é a população de partículas. De uma maneira geral, uma amostra com um PI menor que 0,25 é considerada monodispersa. Um valor de PI superior a 0,25 sugere a presença de partículas com tamanhos significativamente diferentes na formulação (Martins, 2012).

#### **4.2. Potencial zeta (*Zeta Potential*, ZP)**

O ZP reflete a carga elétrica total à superfície de uma partícula (Vitorino *et al.*, 2011). A sua magnitude é igualmente um indicador útil da estabilidade física a longo prazo das dispersões coloidais, bem como para prever possíveis interações eletrostáticas entre as nanopartículas e as membranas celulares (de Boer e Gaillard, 2007; Malvern, 2012b).

Existem dois mecanismos principais que contribuem para a estabilidade das dispersões coloidais, a repulsão estérica e a estabilização eletrostática. A repulsão estérica requer a adição de compostos que adsorvem à superfície das partículas e previnem a sua agregação, por impedimento estérico. Na estabilização eletrostática, as partículas têm carga de superfície suficiente para propiciar forças de repulsão entre si, resistindo à floculação ou coagulação. As partículas dispersas num sistema aquoso adquirem carga à superfície principalmente devido à presença de grupos ionizáveis ou pela adsorção de espécies iônicas, afetando a distribuição de íons no meio e aumentando a concentração de íons de carga oposta à da partícula junto à superfície (Malvern, 2012b).

Um valor elevado, em termos absolutos, de ZP, é indicativo de partículas com carga elevada, pelo que estas apresentam menor tendência para a agregação durante o armazenamento, devido à repulsão eletrostática que ocorre entre si. Se, contudo, as partículas tiverem valores de ZP baixos, as forças de atração excedem as forças de repulsão, podendo conduzir à coagulação ou floculação da dispersão (Das e Chaudhury, 2011). As nanopartículas são consideradas estáveis se apresentarem, em termos absolutos, valores de ZP elevados, nomeadamente, superiores a 30 mV (Malvern, 2012b).

### 4.3. Metodologia

No presente trabalho, após a preparação das nanopartículas lipídicas, procedeu-se à medição do tamanho das partículas e do PI, através da técnica de DLS, bem como à determinação do ZP, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern<sup>®</sup> Instruments, Reino Unido), a 25 °C. Antes da medição, as dispersões aquosas de NLC foram diluídas com água ultrapura, de modo a evitar a multidispersão de luz decorrente de uma concentração elevada de partículas. Os resultados apresentados são valores médios (Z-ave)  $\pm$  desvio padrão (SD) de três medições, dois dias após a produção e após 90 dias de armazenamento, no frigorífico ( $5,0 \pm 1,0$  °C) e à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 5,0$  °C). O Z-ave e o PI foram obtidos a partir do correlograma, pelo *software* Zetasizer Nano ZS (Malvern<sup>®</sup>, Reino Unido). No caso das medições realizadas dois dias após a produção, a média apresentada é a média das diluições 1:2, 1:3 e 1:4, uma vez que se obtiveram resultados concordantes. A média dos resultados da medição efectuada após 90 dias foi obtida pela medição, em triplicado, da diluição 1:4.

De forma a executar-se uma análise mais detalhada e verificar a ausência ou presença de partículas com tamanhos micrométricos, as dispersões de NLC foram também avaliadas pela técnica de LD, utilizando um Mastersizer 3000 (Malvern<sup>®</sup>, Reino Unido). Mediram-se os valores D50 e D90, traduzindo estes a percentagem de partículas com volume igual ou inferior ao valor apresentado (i.e., 50 e 90%). As medições foram efetuadas em triplicado, mediante as seguintes condições de análise: índice de refração = 1,6; índice de absorção = 0,01; densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) = 1,0. Os resultados apresentados são os valores médios (LD)  $\pm$  desvio padrão (SD) de cada medição.

#### 4.4. Resultados e discussão

Os resultados do tamanho médio (Z-ave e LD), PI e ZP das dispersões aquosas de NLC armazenadas a  $5,0 \pm 1,0$  °C e a  $25,0 \pm 5,0$  °C são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Tamanhos médios de partícula (Z-ave e LD), PI e ZP das dispersões aquosas de NLC, preparadas pela técnica de HPH a quente e pela técnica da sonicação ou dos ultrassons.

	LD $\pm$ SD (nm)		Z-ave $\pm$ SD (nm)	PI $\pm$ SD	ZP $\pm$ SD (mV)
	D50	D90			
<b>NLC HPH dia 2</b>	480 $\pm$ 0,047	808 $\pm$ 0,073	202 $\pm$ 3,000	0,283 $\pm$ 0,011	1,2 $\pm$ 0,000
<b>NLC US dia 2</b>	225 $\pm$ 0,117	433 $\pm$ 0,178	163 $\pm$ 12,000	0,246 $\pm$ 0,012	30 $\pm$ 0,000
<b>NLC US dia 90 (25°C)</b>	-	-	170,3 $\pm$ 1,385	0,262 $\pm$ 0,005	43,1 $\pm$ 1,560
<b>NLC US dia 90 (5°C)</b>	-	-	176,3 $\pm$ 0,000	0,259 $\pm$ 0,007	42,3 $\pm$ 0,283

Pardeike *et al.* (2009) referem que as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas devem apresentar um tamanho compreendido entre os 40 e os 1000 nm. Analisando os resultados, verifica-se que, para ambas as técnicas, e durante todo o período de armazenamento, os NLC mostraram valores de tamanho de partícula inferiores a 1000 nm, o que está de acordo com o postulado por Pardeike *et al.*

Por outro lado, o valor de D90 para as dispersões aquosas obtidas por HPH é bastante superior quando comparado com o mesmo valor para as dispersões originadas por ultrassons. De facto, 90% da população de NLC produzidos por HPH, apresentam um tamanho igual ou inferior a 808 nm (i.e.,  $D90 = 808 \pm 0,073$  nm), enquanto para os NLC obtidos por sonicação, este valor é bastante menor ( $433 \pm 0,178$  nm). O mesmo se verifica no caso do D50. Deste modo, é possível afirmar que a sonicação permite obter, quando comparada com a HPH a quente, nanopartículas com tamanhos menores, o que justifica o uso desta técnica para a produção de nanopartículas lipídicas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, a dispersão aquosa de NLC apresentou a ambas as temperaturas de armazenamento ( $5,0 \pm 1,0$  °C e  $25,0 \pm 5,0$  °C) partículas com diâmetro médio idêntico e dentro da escala nanométrica, facto reforçado pelos valores de PI obtidos, os quais são indicativos de uma distribuição homogénea de tamanho na população de nanopartículas presentes na dispersão. De notar que, na medição efectuada dois dias após a preparação, os NLC demonstraram um valor de PI inferior a 0,25, pelo que, de acordo com a informação anteriormente referida, é possível definir a população como monodispersa.

Relativamente ao ZP, conseguiram-se igualmente resultados bastantes satisfatórios, de acordo com os valores de referência presentes na literatura. Em todas as medições, as dispersões apresentaram valores absolutos de ZP iguais ou superiores a 30 mV, prevenindo-se uma boa estabilidade das dispersões ao longo do tempo. A presença de dois agentes tensioativos, o Tween 80<sup>®</sup> e o cloreto de benzalcónio, pode justificar os resultados obtidos. De facto, o Tween<sup>®</sup> 80 e o cloreto de benzalcónio são capazes de estabilizar eficazmente a dispersão e prevenir a agregação das nanopartículas, por estabilização estérica e eletrostática, respetivamente (Tabatt *et al.*, 2004; Kheradmandnia *et al.*, 2010; Bikkad *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013).

A dispersão de NLC obtida pelo método dos ultrassons e armazenada a diferentes temperaturas foi analisada e caracterizada após um período de armazenamento de 90 dias. A análise visual confirmou a ausência de alterações macroscópicas nas dispersões aquosas. Porém, denotou-se o desenvolvimento de uma ligeira coloração amarela. A medição dos parâmetros avaliados, i.e., tamanhos, PI e ZP, permitiram verificar apenas ligeiras variações dos valores relativamente aos valores obtidos na dispersão dois dias após a produção. Perante os resultados, considera-se que a dispersão apresenta estabilidade a ambas as temperaturas de armazenamento.

## **5. Incorporação das dispersões de NLC nas bases semissólidas**

Dada a reduzida viscosidade das dispersões de nanopartículas lipídicas para aplicação tópica (Silva *et al.*, 2012), as dispersões aquosas de NLC preparadas foram incorporadas em diferentes bases semissólidas, designadamente: pomada hidrófila de polietilenoglicóis (PEGs), gel de metilcelulose (hidrogel) e creme O/A.

Na Tabela 4 encontra-se descrita a composição das bases semissólidas utilizadas para incorporar a dispersão de NLC.

**Tabela 4:** Composição (% , m/m) das bases semissólidas utilizadas para incorporação da dispersão de NLC (adaptado de Oliveira, 2014).

	(% , m/m)		
	Pomada hidrófila	Hidrogel	Creme O/A
<b>Polietilenoglicol 4000</b>	40,0	-	-
<b>Polietilenoglicol 400</b>	50,0	-	-
<b>Span 40</b>	1,0	-	-
<b>Metilcelulose 1000</b>	-	2,0	-
<b>Propilenoglicol</b>	-	10,0	-
<b>Ácido esteárico</b>	-	-	24,0
<b>Trietanolamina</b>	-	-	1,2
<b>Glicerina</b>	-	-	13,5
<b>p-hidroxibenzoato de metilo</b>	-	-	0,1
<b>Água</b>	-	q.b.p. 60,0	61,3

As funções dos constituintes de cada uma das bases semissólidas detalhadas na Tabela 4 são as seguintes (Oliveira, 2014):

- Pomada hidrófila de PEGs:
  - Polietilenoglicol 4000 e Polietilenoglicol 400: Excipientes hidrófilos.
  - Span 40: Excipiente A/O.
  
- Hidrogel:
  - Metilcelulose 1000: Agente gelificante.
  - Propilenoglicol: Excipiente hidrófilo humectante.
  - Água: Líquido gelificado.

- Creme O/A:
  - Ácido esteárico: Excipiente hidrófobo.
  - Trietanolamina: Forma, *in situ*, juntamente com o ácido esteárico, o agente emulsivo O/A estearato de trietanolamina.
  - Glicerina: Excipiente hidrófilo humectante.
  - p-hidroxibenzoato de metilo: Conservante.
  - Água: Fase aquosa.

## 5.1. Metodologia

As dispersões de NLC foram incorporadas em bases semissólidas previamente preparadas, utilizando um almofariz de porcelana. Testaram-se diferentes proporções de base semissólida:NLC, nomeadamente, 60:40, 50:50 e 40:60, com o objetivo de determinar qual a proporção mais adequada para aplicação tópica. Após a incorporação, as misturas foram armazenadas à temperatura ambiente, tendo sido avaliado o aspeto e a consistência de cada formulação, por análise visual e sensorial.

## 5.2. Resultados e discussão

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Avaliação do aspeto da formulação quanto à proporção adequada de base semissólida:dispersão aquosa de NLC para aplicação tópica.

Base semi-sólida	Proporção base semi-sólida:NLC		
	60:40	50:50	40:60
Pomada hidrófila de PEGs	+++	+	+
Hidrogel	++	++	++
Creme O/A	++	+	+

Legenda: +++, consistência adequada para aplicação tópica; ++, consistência suficiente para aplicação tópica; +, fraca consistência para aplicação tópica.

Tal como reportado por alguns autores, a incorporação da dispersão aquosa de NLC resultou numa diminuição da consistência inicial em todas as bases semissólidas testadas. A elevada quantidade de água das dispersões de nanopartículas lipídicas pode justificar este comportamento (Gonzalez-Mira *et al.*, 2012; Tichota *et al.*, 2014). Mediante a análise dos resultados, verifica-se que a proporção de 60:40 é a que oferece, para todas as bases semissólidas preparadas, a consistência mais apropriada para aplicação tópica.

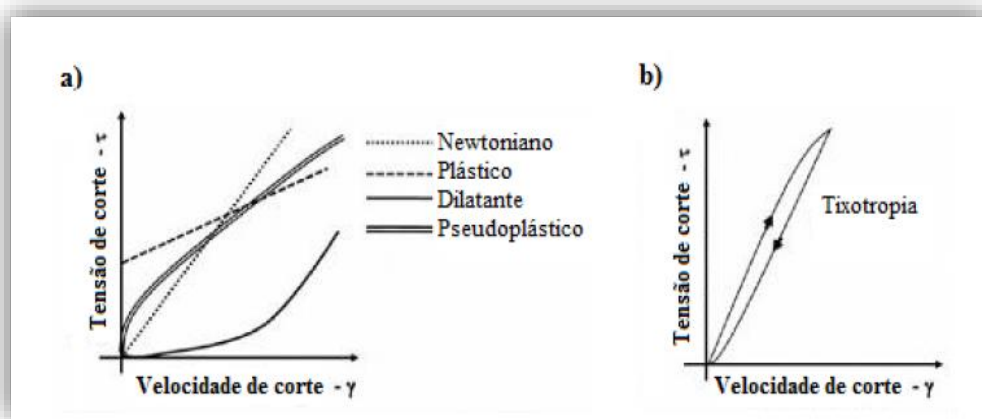
## **6. Caracterização dos sistemas semissólidos**

### **6.1. Análise da reologia das formulações semissólidas**

A reologia pode ser definida como o estudo das propriedades de fluidez e deformação da matéria (Lee *et al.*, 2009). Dado que a aceitabilidade por parte do doente e a eficácia e qualidade das formulações semissólidas estão condicionadas pelas suas propriedades de fluxo, é indispensável proceder-se à análise destas características (Mastropietro *et al.*, 2013).

Dependendo da relação entre a viscosidade e a tensão de corte, os sistemas farmacêuticos podem apresentar um comportamento Newtoniano ou não-Newtoniano. Os gráficos que representam as propriedades de fluxo são denominados de reogramas. Os sistemas Newtonianos são caracterizados como sistemas em que a tensão de corte ( $\tau$ ) é diretamente proporcional à velocidade de corte ( $\dot{\gamma}$ ), sendo a viscosidade constante. Nos sistemas não-Newtonianos, a tensão e a velocidade de corte são independentes, pelo que a viscosidade não é constante (Lee *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011).

Os sistemas não-Newtonianos podem ser subdivididos em vulgarmente plásticos ou pseudoplásticos com valor de cedência, pseudoplásticos ou reofluidificantes, ou dilatantes ou reoespessantes (Figura 12a). Os materiais vulgarmente plásticos requerem uma tensão mínima de corte para que o sistema flua. Se a viscosidade diminuir com o aumento da velocidade de corte, o sistema é classificado como pseudoplástico. Por fim, se se verificar um aumento da viscosidade com o aumento da velocidade de corte, o sistema apresenta um comportamento dilatante (Alves *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009).



**Figura 12:** Tipos de comportamento reológico dos sistemas farmacêuticos: a) perfis dos sistemas Newtonianos e não-Newtonianos; b) fenômeno de tixotropia (adaptado de Alves *et al.*, 2011).

Adicionalmente, os sistemas não-Newtonianos podem apresentar tixotropia, representada por uma área de histerese (i.e., área entre as curvas ascendente e descendente) no reograma (Figura 12b). Este fenômeno ocorre quando a preparação é submetida a uma força de cisalhamento e a sua estrutura de rede quebra, conduzindo a uma diminuição gradual da viscosidade que facilita o escoamento da preparação a partir do recipiente de acondicionamento e auxilia o seu espalhamento sobre a pele. Quando a força é removida, a viscosidade recupera lentamente, auxiliando a manter a preparação na pele. De acordo com estas considerações, é desejável que as formulações semissólidas para aplicação tópica, ao nível da pele, apresentem tixotropia (Lee *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011).

## 6.2. Estudo de estabilidade acelerada

Os estudos de estabilidade permitem avaliar e assegurar a manutenção da qualidade, eficácia e segurança das formulações a longo prazo, sendo como tal considerados um requisito para a aceitação e aprovação de qualquer produto farmacêutico. A estabilidade de um sistema farmacêutico depende, por um lado, de fatores ambientais, como a temperatura, humidade e luz e, por outro, de fatores que são intrínsecos à própria formulação, tais como, as propriedades físicas e químicas da(s) substância(s) ativa(s) e excipientes, a dosagem ou o processo de produção (Punam *et al.*, 2014).

## 6.3. Metodologia

### 6.3.1. Estudo do comportamento reológico

O estudo do comportamento reológico das formulações semissólidas (i.e., bases semissólidas placebo e bases semissólidas contendo a dispersão aquosa de NLC) foi realizado através da determinação das viscosidades aparentes ( $\eta$ , cPo), mediante a aplicação de diferentes velocidades de corte (rpm), utilizando-se um viscosímetro rotacional ST-2001 (J.P. Selecta<sup>®</sup>, Espanha). Cada ensaio teve a duração de 1 minuto, com igual tempo de descanso, e realizou-se a uma temperatura constante de  $20 \pm 1$  °C. Posteriormente, traçaram-se os gráficos de tensão de corte ( $\tau = \eta \times G$ , cPo.rpm) *versus* velocidade de corte (G, rpm). As medições foram efetuadas 7 dias e 30 dias após a preparação, tendo sido as formulações armazenadas à temperatura ambiente.

### 6.3.2. Estudo de estabilidade acelerada

As formulações semissólidas preparadas foram submetidas a um estudo de estabilidade acelerada por centrifugação (Heraeus Labofuge<sup>TM</sup> 200, Alemanha), após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Para tal, colocou-se 10 mL de cada formulação em tubos de Falcon<sup>®</sup> e aplicou-se dois ciclos de centrifugação de 30 minutos cada, a uma velocidade de 3000 rpm. Posteriormente, verificou-se se houve ou não a ocorrência de separação de fases. Durante a centrifugação, a amostra está sujeita a *stress*, havendo uma simulação do aumento da força de gravidade. Consequentemente, a mobilidade das partículas é maior, o que pode conduzir a fenômenos de instabilidade, observáveis através da separação de fases (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004).

## 6.4. Resultados e discussão

### 6.4.1. Reologia das formulações semissólidas

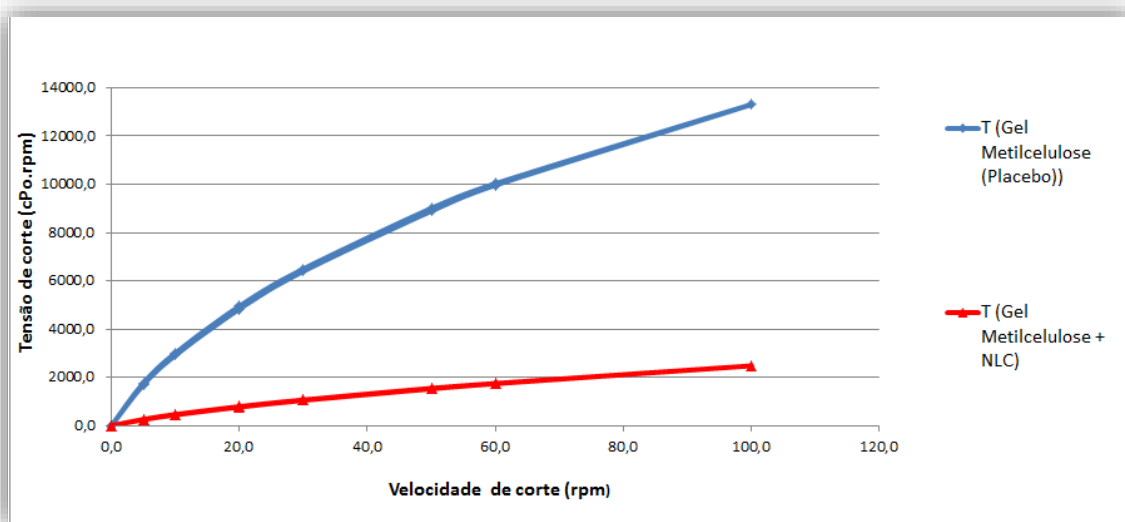
Os resultados da caracterização reológica das diferentes bases semissólidas preparadas encontram-se representados nas Figuras 13 e 14.

Para ambas as formulações creme O/A (i.e., creme O/A placebo e creme O/A contendo a dispersão de NLC), não foi possível avaliar a viscosidade aparente, uma vez que as

preparações eram demasiado fluidas e, como tal, nenhuma das agulhas do viscosímetro permitiu obter percentagens de torque (% torque) consideradas aceitáveis às velocidades de corte mínima e máxima selecionadas, i.e., entre 10 e 100% (Brookfield Ametek, 2016). Após um mês de armazenamento à temperatura ambiente, este creme contendo NLC estava ainda mais fluido do que no dia da incorporação, concluindo-se que este sistema é pouco estável para incorporação de dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas.

Os reogramas dos hidrogéis, 7 dias após a preparação (Figura 13), revelam que estes apresentam um comportamento não-Newtoniano do tipo reofluidificante ou pseudoplástico, visível pela diminuição da viscosidade em função do aumento da velocidade de corte. Todavia, ocorre uma sobreposição das curvas ascendentes e descendentes em ambos os reogramas, o que indica que os hidrogéis não apresentam tixotropia.

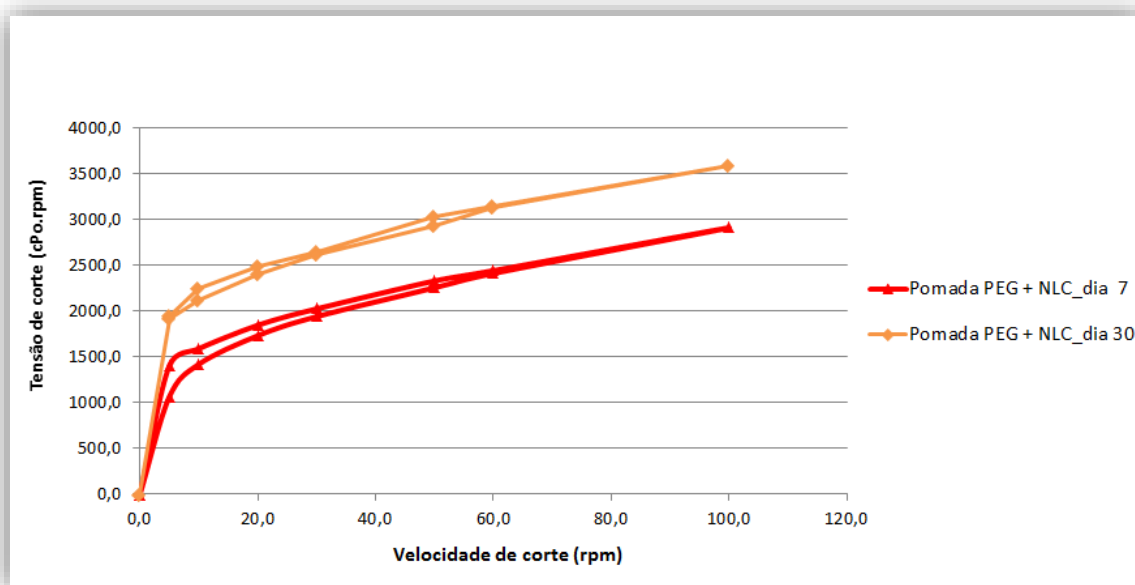
Herráez-Domínguez *et al.* (2005) constataram que, para certos tipos de metilcelulose, nomeadamente os que apresentam um baixo grau de viscosidade, e em concentrações superiores a 1 (% m/m), estabelece-se um equilíbrio entre a tensão de corte (responsável por quebrar as ligações entre as moléculas) e os movimentos Brownianos das partículas (responsáveis por restabelecer essas mesmas ligações), pelo que não se verificam mudanças na estrutura tridimensional e a viscosidade permanece constante.



**Figura 13:** Reogramas do hidrogel placebo e do hidrogel contendo NLC incorporados, 7 dias após a preparação.

A análise do comportamento reológico dos hidrogéis permite verificar que a tensão de corte necessária para que a base placebo do hidrogel flua é superior à tensão necessária para a fluidez do hidrogel com a dispersão aquosa de NLC incorporada. De facto, a presença das nanopartículas lipídicas influencia a consistência do hidrogel, conduzindo a uma diminuição da sua viscosidade (Tichota *et al.*, 2014). Não foi possível determinar através dos reogramas os efeitos do armazenamento na reologia dos hidrogéis, já que após um mês, o hidrogel contendo as nanopartículas lipídicas apresentava alterações pronunciadas quer da cor, quer da textura, quando armazenado à temperatura ambiente. Estas alterações são indicativas de problemas de estabilidade da formulação desenvolvida.

A Figura 14 apresenta os reogramas da pomada hidrófila de PEG contendo a dispersão de NLC incorporada. Não foi possível apresentar o comportamento reológico da pomada hidrófila placebo, devido à elevada consistência apresentada por esta base semissólida, o que impediu a avaliação da viscosidade aparente com o viscosímetro.



**Figura 14:** Reogramas da pomada hidrófila de PEGs com NLC, 7 e 30 dias após a preparação.

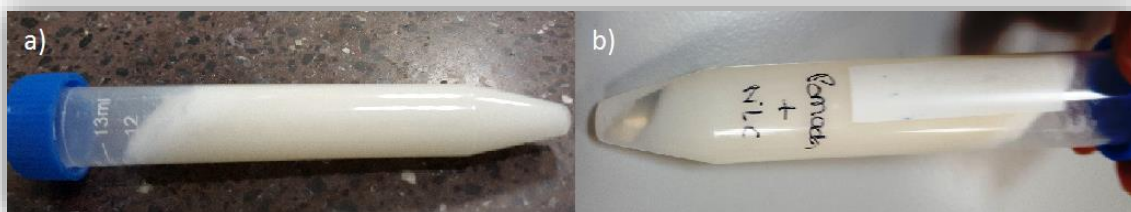
Tal como os hidrogéis, a pomada hidrófila de PEGs com NLC apresenta um comportamento do tipo reofluidificante ou pseudoplástico. Contudo, contrariamente ao hidrogel, verifica-se a presença de tixotropia, ainda que de forma muito discreta. Pela

análise da Figura 14, verifica-se que houve um aumento da viscosidade da pomada com NLC após 1 mês, acompanhada de uma ligeira diminuição da tixotropia, o que talvez se deva à evaporação de alguma quantidade de água da formulação. Consequentemente, a tensão de corte necessária para que a pomada flua também aumentou.

Apesar das alterações que o gel de metilcelulose sofreu, o cômputo dos resultados sugere que a pomada hidrófila de PEGs pode ser, das formulações testadas, a melhor alternativa para incorporar as dispersões de nanopartículas lipídicas, já que para além de um comportamento pseudoplástico, demonstrou tixotropia. No desenvolvimento de uma formulação semissólida apropriada para a administração tópica de bioativos, ambas as propriedades devem estar presentes (Silva *et al.*, 2009).

#### 6.4.2. Estabilidade acelerada por centrifugação

Ao fim de 30 dias de armazenamento, apenas a pomada hidrófila de PEGs contendo NLC se encontrava em condições apropriadas, pelo que somente esta preparação foi submetida ao estudo de estabilidade acelerada. Após o primeiro ciclo de centrifugação, a base semissólida continuava intacta (Figura 15a). Contudo, no final do segundo ciclo, verificou-se a ocorrência de separação de fases, no fundo do tubo de Falcon® (Figura 15b), o que deixa prever uma instabilidade da preparação ao longo do tempo de armazenamento.



**Figura 15:** Aspeto da pomada hidrófila de PEGs com NLC: a) após um ciclo de centrifugação; b) após dois ciclos de centrifugação.

## Conclusões

---

Inserido na área da veiculação de substâncias por meio de sistemas coloidais, este trabalho visou o desenvolvimento de um veículo lipídico nanoestruturado (NLC) com ómega-3 destinado à aplicação tópica, ao nível da pele.

Relativamente à preparação das nanopartículas lipídicas, este estudo foi realizado com êxito. Inicialmente, procedeu-se a uma seleção criteriosa da mistura e concentração lipídica mais adequadas, com base na análise da miscibilidade lípido sólido/lípido líquido e na técnica de DSC. Das duas técnicas de produção utilizadas, a técnica dos ultrassons demonstrou ser mais eficaz, levando à obtenção de NLC com tamanhos menores e mais homogêneos e um elevado ZP, tendo-se mostrado estáveis ao longo do tempo de armazenamento.

Devido à baixa viscosidade que caracteriza as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas, os NLC foram incorporados em diferentes bases semissólidas para adquirirem consistência adequada à aplicação pretendida. Contudo, as formulações preparadas apresentaram diversos problemas quanto à sua consistência e textura, sendo que para o creme O/A não foi possível proceder à análise do comportamento reológico. Das três alternativas em estudo, a pomada de PEGs demonstrou ser a mais indicada para incorporar os NLC, devido ao comportamento pseudoplástico e alguma tixotropia. Todavia, quando sujeita ao estudo de estabilidade acelerada por centrifugação, verificou-se a ocorrência de separação de fases, o que aponta para uma reduzida estabilidade do sistema ao longo do tempo de armazenamento. Com o objetivo de obter sistemas com características mais adequadas, é necessária uma reformulação da composição das bases semissólidas escolhidas.

Concluindo, os NLC representam um sistema promissor para a veiculação do ómega-3 no tratamento da psoríase. Adicionalmente, o facto de serem constituídos por lípidos fisiológicos biocompatíveis e promoverem a oclusão cutânea, são fatores que contribuem para a promoção da hidratação cutânea da pele psoriática e uma eventual melhoria da patologia. Para comprovar esta aplicação, é fundamental a realização de estudos *in vitro*, em culturas celulares, e *ex vivo* de permeação na pele. Por fim, é

necessário efetuar testes *in vivo*, em animais e humanos, que comprovem a eficácia terapêutica da formulação para utilização clínica.

## Referências Bibliográficas

---

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2004). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. [Em linha]. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. [Consultado em 15/07/2016].

Ahmad, S. e Kumar, N. (2014). Omega 3 – Fatty Acid (EPA and DHA) Rich Salmon Fish Oil Enhance Anti-Psoriatic activity of Glucocorticoid (Betamethasone Dipropionate) in Nano Form. *Int J Drug Dev & Res*, 6(2), pp. 61-76.

Alves, M. P., Raffin, R. P. e Fagan, S. B. (2011). Rheological Behavior of Semisolid Formulations Containing Nanostructured Systems. *In: Beck, R., Guterres, S. e Pohlmann, A. (Eds.). Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. 1<sup>st</sup> Edition, Berlim, Springer, pp. 37-48.

Ash, M. e Ash, I. (2008). *Handbook of Fillers, Extenders and Diluents*. Estados Unidos da América, Synapse Information Resources, Inc.

Avasatthi, V., Pawar, H., Dora, C. P., *et al.* (2016). A novel nanogel formulation of methotrexate for topical treatment of psoriasis: optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Pharm Dev Technol*, 21(5), pp. 1-9.

Averina, E. S., Müller, R. H., Popov, D. V., *et al.* (2011). Physical and chemical stability of nanostructured lipid drug carriers (NLC) based on natural lipids from Baikal region (Siberia, Russia). *Pharmazie*, 66(5), pp. 348-356.

Baboota, S., ur Rahman, M., Kumar, A., *et al.* (2012). Submicron Size Formulation of Linseed Oil Containing Omega-3 Fatty Acid for Topical Delivery. *J Disper Sci Technol*, 33(9), pp. 1259-1266.

Backes, J., Anzalone, D., Hilleman, D., *et al.* (2016). The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*, 15(1), pp. 118-122.

- Balbás, G. M., Regañá, M. S. e Millet, P. U. (2011). Study on the use of omega-3 fatty acids as therapeutics supplement in treatment of psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 4, pp. 73-77.
- Barrett, S. J. (2013). The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular health. *Altern Ther Health Med*, 19(Suppl. 1), pp. 26-30.
- Berton, A., Piel, G. e Evrard, B. (2011). Powdered Lipid Nanoparticles and Microparticles: Production and Applications. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 5(3), pp. 188-200.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., *et al.* (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, 453(7198), pp. 1051–1057.
- Bikkad, M. L., Nathani, A. H., Mandlik, S. K., *et al.* (2013). Halobetasol proprionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *J Liposome Res*, 24, pp. 113-123.
- Braff, M. H., Di Nardo, A. e Gallo, R. L. (2005). Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol*, 124(2), pp. 394-400.
- Brayfield, A. M. (2014). *The Complete Drug Reference*. Londres, Pharmaceutical Press.
- Brookfield Ametek. (2016). How do I choose a spindle? [Em linha]. Disponível em <<http://www.brookfieldengineering.com/support/faq.asp#chooseaspindle>>. [Consultado em 30/07/2016].
- Calder, P. C. (2006). Long-chain polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Scand J Food Nutr*, 50(S2), pp. 54-61.
- Calder, P. C. (2012). Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J Nutr*, 142(3), pp. 592-599.

Cansell, M. S., Moussaoui, N. e Mancini, M. (2007). Prostaglandin E2 and interleukin-8 production in human epidermal keratinocytes exposed to marine lipid-based liposomes. *Int J Pharm*, 343(1-2), pp. 277-280.

Chattopadhyay, P. Shekunov, B. Y., Yim, D., *et al.* (2007). Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(6), pp. 444-453.

Chaturvedi, S. P. e Kumar, V. (2012). Production Techniques of Lipid Nanoparticles: A Review. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 3(3), 525-541.

Chauvin, L., Goupille, C., Blanc, C., *et al.* (2016). Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating Akt and PKC $\epsilon/\delta$ -induced ERK pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1861, pp. 380–390.

Christophers, E. e Sterry, W. (1993). Psoriasis. *In*: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z. E Wolff, K. (Eds.). *Dermatology in General Medicine*. 4<sup>th</sup> Edition. Nova Iorque, McGraw Hill, pp. 489-515.

Chu, C. C., Di Meglio, P. e Nestle, F. O. (2011). Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol*, 23(1), pp. 28-41.

Cremer Health. (2013). Excipients for pharmaceuticals. [Em linha]. Disponível em <<http://warnergraham.com/wp-content/uploads/2013/11/Excipients-Brochure-2013.pdf>>. [Consultado em 30/07/2016].

Das, S. e Chaudhury, A. (2011). Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), pp. 62-67.

de Boer, A. G. e Gaillard, P. J. (2007). Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol*, 47(1), pp. 323-355.

de Mendoza, A. E. M., Campanero, M. A., Mollinedo, F., *et al.* (2009). Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. *J Biomed Nanotechnol*, 5(4), pp. 323-43.

Dinarello, C. A. (1999). IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*, 103(1 Pt 1), pp. 11–24.

Direcção-Geral da Saúde (2016). Gorduras Alimentares. [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-1/alimentacao-gorduras-pdf.aspx>>. [Consultado em 30/07/2016].

Durán, N., Teixeira, Z. e Marcato, P. D. (2011). Topic Application of Nanostructures: Solid Lipid, Polymeric and Metallic Nanoparticles. In: Beck, R., Guterres, S. e Pohlmann, A. (Eds.). *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. 1<sup>st</sup> Edition, Berlim, Springer, pp. 69-100.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergens (NDA). (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3), p. 107.

Ehrler, S., Pieves, U., Wirth-Heller, A., *et al.* (2007). Surface modification of resorcinarene based-self assembled solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Chem Commun (Camb)*, 25, pp. 2605-2607.

Enns, J.E., Yeganeh, A., Zarychanski, R., *et al.* (2014) The Impact of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on the Incidence of Cardiovascular Events and Complications in Peripheral Arterial Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Cardiovasc Disord*, 4, p. 70.

Feldman, S. R. (2016). Treatment of Psoriasis [Em linha]. Disponível em <<http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-psoriasis>>. [Consultado em 22/07/2016].

Fetterman Jr., J. W. e Zdanowicz, M. M. (2009). Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health-Sys Pharm*, 66(13), pp. 1169-1179.

Fink, H. H. e Mikesky, A. E. (2015). Fats. *In*: Fink, H. H. e Mikesky, A. E. (Eds.). *Practical Applications in Sports Nutrition*. 4<sup>th</sup> Edition. Massachusetts, Jones & Bartlett, pp. 97-124.

Fotuhi, M., Mohassel, P. e Yaffe, K. (2009). Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association. *Nat Clin Pract Neurol*, 5(3), pp. 140-152.

Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V., *et al.* (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*, 14(9), pp. 585–600.

Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., *et al.* (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*, 206(9), pp. 1983–1994.

Garcia, N. (2016). Saturated Fatty Acid: Structure, Formula & Example. . [Em linha]. Disponível em <<http://study.com/academy/lesson/saturated-fatty-acid-structure-formula-example.html>>. [Consultado em 29/07/2016].

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

Ghorbandaze, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., *et al.* (2016). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chem*, 216, pp. 146-152.

Giron, D. (2013). Thermal analysis of drugs and drug products. *In*: Swarbrick, J. e Boylan, J. (Eds.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Nova Iorque, Taylor & Francis, pp. 3726–3751.

Gonzalez-Mira, E., Nikolić, S., Calpena, A. C., *et al.* (2012). Improved and safe transcorneal delivery of flurbiprofen by NLC and NLC-based hydrogels. *J Pharm Sci*, 101(2), pp. 707-725.

Greene, S. J., Temporelli, P. L., Campia, U., *et al.* (2016). Effects of Polyunsaturated Fatty Acid Treatment on Postdischarge Outcomes After Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*, 117(3), pp. 340-346.

Grimminger, F. e Mayser, P. (1995). Lipid mediators, free fatty acids and psoriasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 52(1), pp. 1–15.

Guimarães, K. L. e Ré, M. I. (2011). Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC). *In: Beck, R., Guterres, S. e Pohlmann, A. (Eds.). Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. 1ª Edição, Berlim, Springer, pp. 101-122.

Harbige, L. S. (2003). Fatty acids, the immune response, and auto- immunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*, 38(4), pp. 323-341.

Herráez-Domínguez, J. V., de León, F. G. G., Díes-Sales, O., *et al.* (2005). Rheological characterization of two viscosity grades of methylcellulose: an approach to the modeling of the thixotropic behaviour. *Colloid Polym Sci*, 284, pp. 86-91.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., *et al.* (2002). A novel phase-inversion based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res*, 19(6), pp. 875-880.

Hirafuji, M., Machida, T., Hamaue, N., *et al.* (2003). Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid. *J Pharmacol Sci*, 92(4), pp. 308-316.

Hommos, A. (2009). Nanostructured Lipid Carriers (NLC) in Dermal and Personal Care Formulations. Tese de Doutorado, Freie Universität Berlin.

Hu, F-Q., Jiang, S-P., Du, Y-Z., *et al.* (2006). Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm*, 314(1), pp. 83-89.

Ibrahim, W. M., AlOmrani, A. H. e Yassin, A. E. B. (2014). Novel sulpiride-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 129-144.

Insel *et al.* (2013). Lipids. In: Insel, *et al.* (Eds.). *Nutrition*. 5<sup>th</sup> Edition. Massachusetts, Jones & Bartlett Learning, pp. 177-218.

Institute of Medicine. (2005). Dietary Fats: Total Fat and Fatty Acids. In: Institute of Medicine. (Ed.). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington, National Academies Press, pp. 422-541.

Jain, S. K. e Gupta, A. (2009). Development of Gelucire 43/01 Beads of Metformin Hydrochloride for Floating Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 10(4), pp. 1128.

Joseph, S. e Bunjes, H. (2012). Preparation of nanoemulsions and solid lipid nanoparticles by premix membrane emulsification. *J Pharm Sci*, 101(7), pp. 2479-2489.

Kalepu, S., Manthina, M. e Padavala, V. (2013). Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm Sin B*, 3(6), pp. 361-372.

Kasongo, W. K., Pardeike, J., Müller, R. H., *et al.* (2011). Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *J Pharm Sci*, 100(12), pp. 5185-5196.

Kaur, I. P., Bhandari, R. E Yakhmi, J. V. (2014). Lipids as Biological Materials for Nanoparticulate Delivery. In: Bharat, B., Luo, D., Schricker, S. R., *et al.* (Eds.). *Handbook of Nanomaterials Properties*. Springer, pp. 409-456.

Kheradmandnia, S., Vasheghani-Farahani, E., Nosrati, M, *et al.* (2010). Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine*, 6(6), pp. 753-759.

Kromann, N. e Green, A. (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland: incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*, 208(5), pp. 401-406.

Kromhout, D. (2012). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease. The final verdict? *Curr Opin Lipidol*, 23(6), pp. 554-559.

Kubota, H., Matsumoto, H., Higashida, M., *et al.* (2013). Eicosapentaenoic Acid Modifies Cytokine Activity and Inhibits Cell Proliferation in an Oesophageal Cancer Cell Line. *Anticancer Res*, 33(10), pp. 4319-4324.

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., *et al.* (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449(7162), pp. 564–569.

Lande, R. Botti, E., Jandus, C., *et al.* (2014). The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun*, 5, 5621.

Lee, C. H., Moturi, V. e Lee, Yugyung. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J Control Release*, 136(2), pp. 88-98.

Lee, Y. H., Bae, S. C. e Song, G. G. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Arch Med Res*, 43(5), pp. 356-362.

Lim, G. P., Calon, F., Morihara, T., *et al.* (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci*, 25(12), pp. 3032-3040.

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

Mahil, S., Capon, F. e Barker, J. N. (2016). Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. *Semin Immunopathol*, 38(1), pp. 11-27.

Malvern. (2012a). Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. [Em linha]. Disponível em <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>>. [Consultado em 15/06/2016].

Malvern. (2012b). Zeta potential: An introduction in 30 minutes. [Em linha]. Disponível em <[https://caliscc.org/images/presentations/Morante\\_Zeta\\_Potential.pdf](https://caliscc.org/images/presentations/Morante_Zeta_Potential.pdf)>. [Consultado em 15/06/2016].

Malvern. (2016). Laser Diffraction. [Em linha]. Disponível em <<http://www.malvern.com/en/products/technology/laser-diffraction/>>. [Consultado em 15/06/2016].

Manore, M. M., Meyer, N. L. e Thompson, J. (2009). Fat as a Fuel for Exercise. *In: Manore, M. M., Meyer, N. L. e Thompson, J. (Eds.). Sport Nutrition for Health and Performance*. 2<sup>nd</sup> Edition. Illinois, Human Kinetics, pp. 69-103.

Martins, S. (2012). Drug delivery across blood-brain barrier by means of intravenous administration of lipid nanoparticles. PhD Dissertation. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Martucci, A. (2014). Characterization Methods. *In: Guglielmi, M., KICKELBICK, G. e Martucci, A. (Eds.). Sol-Gel Nanocomposites*. Nova Iorque, Springer, pp. 83-108.

Mason, P. (2011). *Dietary Supplements*. Londres, Pharmaceutical Press.

Mastropietro, D. J., Nimroozi, R. e Omidian, H. (2013). Rheology in Pharmaceutical Formulations - A Perspective. *J Develop Drugs*, 2(108), pp. 1-6.

Matos, C. e Moutinho, C. (2011). Lipossomas. *In: Souto, E. B. e Lopes, C. M. (Eds.). Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 237-270.

Mayser, P., Grimm, H. e Grimminger, F. (2002) N-3 fatty acids in psoriasis. *Br J Nutrition*, 87(Suppl. 1), pp. 577-582.

Mazzotta, P. e Jeney, C. M. (2009). Anorexia-cachexia syndrome: a systematic review of the role of dietary polyunsaturated Fatty acids in the management of symptoms, survival, and quality of life. *J Pain Symptom Manage*, 37(6), pp. 1069-1077.

Meffert, J. (2015). Psoriasis – Practice Essentials. [Em linha]. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/1943419-overview#a1>>. [Consultado em 07/12/2015].

Mehnert, W. e K. Mader, (2001) Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 47(2-3), pp. 165-196.

Mendes, A. I., Silva, A. C., Catita, J. A., *et al.* (2013). Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 111(1), pp. 755-763.

Miles, E. A. e Calder, P. C. (2012). Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr*, 107(2), pp. 171-184.

Micronutrient Information Center da Oregon State University. (2016). Essential Fatty Acids. [Em linha]. Disponível em <<http://ipi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids>>. [Consultado em 22/01/2016].

Mohebi-Nejad, A. e Bikdeli, B. (2014). Omega-3 Supplements and Cardiovascular Diseases. *Tanaffos*, 13(1), pp. 6-14.

Morganti, P., Ruocco, E., Wolf, R., *et al.* (2001). Percutaneous absorption and delivery systems. *Clin Dermatol*, 19(4), pp. 489-501.

Morris, M. C., Brockman, J., Schneider, J. A., *et al.* (2016). Association of Seafood Consumption, Brain Mercury Level, and APOE  $\epsilon$ 4 Status with Brain Neuropathology in Older Adults. *JAMA*, 315(5), 489-497.

Morizane, S. e Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol*, 39(3), pp. 225-230.

Mozaffarian, D. e Wu, J. H. Y. (2011). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Effects on Risk Factors, Molecular Pathways and Clinical Events. *J Am Coll Cardiol*, 58(20), pp. 2047-2067.

Muchow, M., Schimitz, E. I., Despatova, N., *et al.* (2009). Omega-3 fatty acids-loaded lipid nanoparticles for patient-convenient oral bioavailability enhancement. *Pharmazie*, 64(8), pp. 499-504.

Mukherjee, S., Ray, S. e Thakur, R. S. (2009). Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Ind J Pharm Sci*, 71(4), pp. 349-358.

Müller, R. H., Mehnert, W., Lucks, J. S. (1995). Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(1), pp. 62-69.

Müller R.H. e Lucks J.S. (1996). Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN), European Patent No. EP 0605497.

Müller, R. H., Mader, K. e Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled delivery – a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 50(1), pp. 161-167.

Müller, R. H., Radtke, M. e Wissing, S. A. (2002a). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm*, 242(1-2), pp. 121-128.

Müller, R. H., Radtke, M. e Wissing, S. A. (2002b). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(Suppl. 1), pp. 131-155.

Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommoos, A., *et al.* (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(6), pp. 522-530.

Müller, R., Shegokar, R. e Keck, C. (2011). 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. *Current Drug Delivery*, 8, pp. 2-38.

Müller-Goyman, C. C. (2004). Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), p. 343-356.

Nelson, L. e Cox, M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Nova Iorque, W. H. Freeman and Company.

Nestle, F. O., Kaplan, D. H. e Barker, J. (2009a). Psoriasis. *N Eng J Med*, 361(1), pp. 496-509.

Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., *et al.* (2009b). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immun*, 9(10), pp. 679-691.

National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. (2013). Questions and Answers about Psoriasis. [Em linha]. Disponível em <[http://www.niams.nih.gov/Health\\_Info/Psoriasis/](http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Psoriasis/)>. [Consultado em 07/12/2015].

Obeidat, W. Schwabe, K., Müller, R., *et al.* (2010). Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm*, 76(1), pp. 56-67.

Olbrich, C., Müller, R. H., Tabatt, K., *et al.* (2002). Stable biocompatible adjuvants – a new type of adjuvant based on lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *Altern Lab Anim*, 30(4), pp. 443-458.

Oliveira, R. (2014). *Protocolos Laboratoriais de Tecnologia das Formas Farmacêuticas Semissólidas*. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

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

Pardeshi, G., Rajput, P., Belgamwar, V. *et al.* (2012). Solid lipid based nanocarriers: An overview. *Acta Pharm*, 62, pp. 433-472.

Pharmacist's Letter. (2012). *Natural Medicines: Comprehensive Database*. Stockton, Therapeutic Research Faculty.

Pelley, J. W. (2011). Structure and Properties of Biological Molecules. In: Pelley, J. W. (Ed.). *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> Edition. Pensilvânia, Saunders, pp. 7-18.

Puglia, C., Tropea, S., Rizza, L., *et al.* (2005). *In vitro* percutaneous absorption studies and *in vivo* evaluation of anti-inflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts. *Int J Pharm*, 299, pp. 41-48.

Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., *et al.* (2008). Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. *Int J Pharm*, 357(1-2), pp. 295-304.

Punam, T, Shubhangi, W., Rahul. S., *et al.* (2014). Stability Study of Dosage Form: An Innovative Step. *World Pharm and Pharm Sci*, 3(2), pp. 1031-1050.

Rahman, M., Alam, K., Ahmad, M. Z., *et al.* (2012). Classical to current approach for treatment of psoriasis: a review. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12(3), pp. 287-302.

Rahman, M., Beg, S., Ahmad, M. Z., *et al.* (2013). Omega-3 Fatty Acids as Pharmacotherapeutics in Psoriasis: Current Status and Scope of Nanomedicine in its Effective Delivery. *Curr Drug Targets*, 14(6), pp. 708-722.

Rahman, M., Akhter, S., Ahmad, M. Z., *et al.* (2015). Nanomedicine-based drug targeting for psoriasis: potentials and emerging trends in nanoscale pharmacotherapy. *Expert Opin Drug Deliv*, 12(4), pp. 635-632.

Raji, C. A., Erickson, K. I., Lopez, O., *et al.* (2014). Regular Fish Consumption and Age-Related Brain Gray Matter Loss. *Am J Prev Med*, 47(4), pp. 444-451.

Ries, A., Trottenberg, P., Elsner, S., *et al.* (2012). A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced cancer: an EPCRC cachexia guidelines project. *Palliat Med*, 26(4), pp. 294-304.

Roth, R. A. (2011). Lipids or Fats. In: Roth, R. A. (Ed.). *Nutrition & Diet Therapy*. 10<sup>th</sup> Edition. Nova Iorque, Delmar, pp. 95-110.

Rustan, A. C. e Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. [Em linha]. Disponível em <[https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty\\_acids.pdf](https://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty_acids.pdf)>. [Consultado em 29/10/2015].

Sahari, M. A., Moghimi, H. R. e Hadian, Z. (2016). Improved physical stability of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid encapsulated using nanoliposome containing  $\alpha$ -tocopherol. *Food Sci Technol*, 51(5), pp. 1075-1086.

Sánchez-Lara, K., Turcott, J. G., Juárez-Hernández, E., *et al.* (2014). Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: Randomised trial. *Clin Nutr*, 33(6), pp. 1017-1023.

Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., *et al.* (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, 447(7146), pp. 869-874.

Schwendener, R. A. e Schott, H. (2010). Liposome formulations of hydrophobic drugs. *Methods Mol Biol*, 605, pp. 129-138.

Serhan, C. N., Clish, C. B., Brannon, J, *et al.* (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with anti-inflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2 non-steroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, 192(8), pp. 1197-1204.

Serhan, C. N., Chiang, N. e Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immun*, 8(5), pp. 349-361.

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., *et al.* (2014). Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. *J Phys Sci*, 25(1), pp. 59-75.

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., *et al.* (2015a). Production Techniques. *In: Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., et al. (Eds.). Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability.* Springer, pp. 23-44.

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., *et al.* (2015b). Characterization. *In: Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., et al. (Eds.). Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability.* Springer, pp. 45-74.

Shrestha, H., Bala, R. e Arora. S. (2014). Lipid-Based Drug Delivery Systems. *J Pharm*, 2014, pp. 1-10.

Singh, H. (2016). Nanotechnology Applications in Functional Foods; Opportunities and Challenges. *Prev Nutr Food*, 21(1), pp. 1-8.

Silva, A. C., Santos, D. e Souto, E. B. (2009). Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations. *Pharmazie*, 64(3), pp. 177-182.

Silva, A. C., Martins, S., Santos, D., *et al.* (2011a). Nanopartículas Lipídicas. *In: Souto, E. B. e Lopes, C. M. (Eds.). Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos.* Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 297-324.

Silva, A. C., González-Mira, E., García, M., *et al.* (2011b). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 86(1), pp. 158-165.

Silva, A. C., Amaral, M. H., González-Mira, E., *et al.* (2012). Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 93, pp. 241-248.

Silva, J. A. P., Fabre, M. E. S. e Waitzberg, D. L. (2015). Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review. *Clin Nutr*, 34(3), pp. 359-356.

Simões, S., Ribeiro, H. M. e Almeida., A. J. (2011). Micro e Nanoemulsões. *In: Souto, E. B. e Lopes, C. M. (Eds.). Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos.* Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 271-296.

Simopoulos, A. (2012). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(6), pp. 674-688.

Sinha, V.R., Srivastava, S., Goel, H., *et al.* (2010). Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. *Int J of Adv in Pharmac Sci*, 1(3), pp. 212-238

Siriwardhana, N., Kalupahana, N. S. e Moustaid-Moussa, N. (2012). Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid. *In: Kim, S. K. (Ed.). Marine Medicinal Foods: Implications and Applications – Animals and Microbes.* Academic Press, pp. 212-222.

Sjöström, B. e Bergenstahl, B. (1992). Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int J Pharm*, 88(2), pp. 53-62.

Skibinski, C. G., Das, A., Chen, K-M., *et al.* (2016). A novel biologically active acid stable liposomal formulation of docosahexaenoic acid in human breast cancer cell lines. *Chem Biol Interact*, 252(25), pp. 1-8.

Small, D. M. (2000). Structure and Properties of Lipids. *In: Stipanuk, M. H. (Ed.). Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. 1<sup>st</sup> Edition. Pensilvânia, W.B. Saunders Company, pp. 43-71.

Solis, M. Y., Sabbag, C. Y. e Frangella, V. S. (2014). Evidências do impacto da nutrição na psoríase. *Rasbran*, 5(1), pp. 41-51.

Souto, E.B. e Müller, R. H. (2007). Lipid Nanoparticles (Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal and Transdermal Applications. *In: Thassu, D., Deleers, M. e Pathak, Y. (Eds.). Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. Informa Healthcare USA, Inc., pp. 213-234.

Souto, E. B. e Müller, R. H. (2008). Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>). *Int J Cosmet Sci*, 30, pp. 157-165.

Souto, E. B., Petersen, R. D. e Müller, R. H. (2008). Lipid Nanoparticles with Solid Matrix for Dermal Delivery: Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. *In: Rathbone, M. J., Roberts, M. S. e Lane, M. (Eds.). Modified Release Drug Delivery Technology*. Berlim, Springer, pp. 115-142.

Stoker, H. S. (2012). Lipids. *In: Stoker, H. S. (Ed.). General, Organic and Biological Chemistry*. 6<sup>th</sup> Edition. California, Brooks/Cole, pp. 654-706.

Sun, S. N., Jia, W. D., Chen, H., *et al.* (2013). Docosahexaenoic acid (DHA) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 6(2), pp. 281-289.

Tabatt, K., Sameti, M., Olbrich, C., *et al.* (2004). Effect of cationic lipid and matrix lipid composition composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *Eur J Pharm Biopharm*, 57(2), pp. 155-162.

Taneja, A. e Singh, H. (2012). Challenges for the delivery of long-chain n-3 fatty acids in functional foods. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, pp. 105-123.

Tichota, D. M., Silva, A. C., Lobo, J. M. S., *et al.* (2014). Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 3855-3864.

Tiwari, P., Soni, S., Ram, V., *et al.* (2015). Raft forming buoyant pH dependent thixotropic gelling systems incorporated with Gelucire 43/01 as a potential stomach specific drug delivery system for famotidine. *J App Pharm*, 7(3), pp. 183-202.

Torres, T. e Filipe, P. (2014). Interleucina-17 como Alvo Terapêutico na Psoríase. *Acta Med Port*, 27(2), pp. 252-258.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B., *et al.* (2011). Fatty acids as Biocompounds: Their Role in Human Metabolism, Health and Disease – A Review. Part 1: Classification, Dietary Sources and Biological Functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155(2), pp. 117-130.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference. (2014). [Em linha]. Disponível em <<http://ndb.nal.usda.gov/>>. [Consultado em 22/01/2016].

Vassiliou, E. K., Kesler, O. M., Tadros, J. H., *et al.* (2008). Bone marrow-derived dendritic cells generated in the presence of resolvin E1 induce apoptosis of activated CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, 181, pp. 4534-4544.

Vianni, R. e Braz-Filho, R. (1996). Ácidos Graxos Naturais: Importância e Ocorrência em Alimentos. *Química Nova*, 19(4), pp. 400-407.

Vitorino, C., Carvalho, F. A., Almeida, A. J., *et al.* (2011). The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 84(1), pp. 117-130.

Wertz, P. W., Madison, K. C e Downing, D. T. (1989). Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 92(1), pp. 109-111.

Wissing, S. A. e Müller, R. H. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm*, 254(1), pp. 65-68.

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

Wu, X. e Guy, R. H. (2009). Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *J Drug Del Sci Tech*, 19(6), pp. 371-384.

Zacharias, E. (2012). Fats and Oils. In: Zacharias, E. (Ed.). *The Mediterranean Diet: A Clinician's Guide for Patient Care*. 1<sup>th</sup> Edition. Nova Iorque, Springer Science+Business Media, LLC, pp. 105-125.

Zulfakar, M. H., Edwards, M. e Heard, C. M. (2007). Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis? *Eur J Dermatol*, 17(4), pp. 284-291.

## Anexo

---

### **SUITABILITY OF SEMISOLID FORMULATIONS TO INCREASE LIPID NANOPARTICLES CONSISTENCY FOR TOPICAL APPLICATION**

Carla M. Lopes, Alexandra Garcês, M. Inês Teixeira, José Catita, Ana Catarina Silva

Fernando Pessoa Energy, Environment and Health Research Unit/ Biomedical Research Center (FP-ENAS/CEBIMED), Faculty of Health Sciences, Fernando Pessoa University, Rua Carlos da Maia n° 296, P-4200-150 Porto, Portugal

E-mail: cmlopes@ufp.edu.pt

#### **Introduction**

Lipid nanoparticles are colloidal systems consisting of aqueous dispersions of solid nanoparticles. There are two types of lipid nanoparticles, solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC), presenting advantages for topical application. However, these systems are liquid with low viscosity, showing a typical Newtonian behavior, which means that they are not suitable for topical administration. Thereby, their incorporation into conventional semisolid formulations (e.g. hydrophilic ointments or hydrogels) has been used to increase consistency, while promoting the stability of lipid nanoparticles. This strategy can modify the rheological properties of the semisolid formulation due to interactions between the components of the final formulation. The present study focused on the preparation and characterization of SLN and NLC aqueous dispersions, and their incorporation into semisolid formulations. The rheological behavior of the prepared formulations was assessed, in order to verify their suitability for topical application.

#### **Materials and methods**

Aqueous SLN and NLC dispersions containing glyceryl palmitostearate as solid lipid were prepared by ultrasound technique. NLC differ from SLN due to the presence of liquid lipid (fish oil), which was used in a proportion of 60:40 (w/w) of the lipid matrix. The mean particle size (Z-ave), polydispersity index (PI) and zeta potential (ZP) were assessed by dynamic light scattering (DLS) after a dilution with purified water (1:4).

The lipid nanoparticles were incorporated in methylcellulose-based hydrogel and polyethylene glycol-based hydrophilic ointment, and rheological studies were performed to evaluate their flow properties.

### **Results and discussion**

Concerning particles size, SLN presented higher values of both Z-ave ( $181.2 \pm 0.493$  nm) and PI ( $0.412 \pm 0.006$ ), compared to NLC dispersions, which had a Z-ave of  $177.8 \pm 0.757$  nm and a PI value of  $0.254 \pm 0.006$ . Despite this difference, both dispersions are suitable for topical application. Moreover, the ZP values were positive (SLN =  $36.3 \pm 0.849$  mV and NLC =  $42.2 \pm 1.27$  mV), due to the presence of a cationic surfactant (benzalkonium chloride), which is an electrostatic stabilizer of SLN and NLC dispersions. The results of rheological studies showed that both semisolid formulations containing SLN and NLC exhibited a non-Newtonian shear-thinning (or pseudoplastic) behavior, i.e. a decrease in viscosity with increase of shear rate. In addition, it was observed that the NLC decreased the viscosity of the formulation, which is probably related to the presence of the fish oil. Furthermore, the hydrophilic ointments exhibited thixotropy (the reversible variation of viscosity with time), and this phenomenon is more pronounced for the hydrophilic ointment-loaded SLN.

### **Conclusions**

The incorporation of SLN and NLC into semisolid formulations affect their rheological properties, facilitating flowing from the container and skin spreading of the formulation, which are both desirable for topical application.