

Ana Cláudia Pinto Barbosa

Avaliação pré-clínica da segurança dos nanossistemas lipídicos

Faculdade Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa
Porto, 2020

Ana Cláudia Pinto Barbosa

Avaliação pré-clínica da segurança dos nanossistemas lipídicos

Faculdade Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa
Porto, 2020

Avaliação pré-clínica da segurança dos nanossistemas lipídicos

Ana Cláudia Pinto Barbosa
(assinatura)

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

Sumário

A utilização de nanossistemas lipídicos na veiculação de substâncias ativas tem revelado bastante interesse nos últimos anos, principalmente por veicular compostos lipófilos e/ou hidrófilos, direcioná-los para os locais de ação, potenciando o seu efeito farmacológico e proporcionar uma liberação controlada, reduzindo, desta forma, os potenciais efeitos adversos dos fármacos no organismo.

Este trabalho tem como objetivo reportar as evidências relativas à avaliação pré-clínica da segurança dos nanossistemas lipídicos utilizados para a veiculação de fármacos, exemplificando com alguns estudos *in vitro* e *in vivo*. Para tal, realizei uma pesquisa de vários estudos científicos e analisei os resultados obtidos com o intuito de verificar se existia reações adversas associadas à utilização dos nanossistemas lipídicos.

Com a realização deste trabalho concluo que os nanossistemas lipídicos demonstram ser seguros na sua utilização, devido a serem compostos por substâncias biocompatíveis e biodegradáveis. Os estudos analisados, apesar de não refletirem a totalidade da literatura disponível, permitirem verificar que não existiu toxicidade associada aos lipossomas, micelas lipídicas, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas.

Palavras-chave: Nanossistemas lipídicos; Lipossomas; Micelas de núcleo lipídico; Nanoemulsões; Nanopartículas lipídicas; Segurança; Toxicidade.

Abstract

The use of lipid nanosystems in the delivery of active substances has shown a lot of interest in recent years, mainly because it carries lipophilic and / or hydrophilic compounds, directing them to the action sites, enhancing their pharmacological effect and providing a controlled release, reducing, thus, the potential adverse effects of drugs on the body.

This work aims to report the evidence related to the preclinical evaluation of the safety of lipid nanosystems used for the delivery of drugs, exemplifying with some *in vitro* and *in vivo* studies. To this end, I conducted a survey of several scientific studies and analyzed the results obtained in order to check if there were any adverse reactions associated with the use of lipid nanosystems.

With the completion of this work I conclude that lipid nanosystems prove to be safe in their use, due to being composed of biocompatible and biodegradable substances. The analyzed studies, despite not reflecting all the available literature, allow us to verify that there was no toxicity associated with liposomes, lipid-core micelles, nanoemulsions and lipid nanoparticles.

Keywords: Lipid nanosystems; Liposomes; Lipid-core micelles; Nanoemulsions; Lipid nanoparticles; Safety; Toxicity.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Carla Martins Lopes, pela sua dedicação, disponibilidade, compreensão, paciência, conhecimentos transmitidos e amizade demonstrada ao longo destes últimos meses que foram fundamentais para a realização da minha dissertação.

Ao meu marido, José Rodrigues, que alinhou comigo nesta nova etapa das nossas vidas, com muito sacrifício e dedicação, sendo, sem dúvida, a minha força para nunca desistir e o meu pilar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e avós, por mais uma vez acreditarem em mim e me ajudarem a alcançar mais uma marca no meu percurso académico.

À minha amiga, Marta Morais, por me ter convencido a embarcar com ela nesta aventura de nos tornarmos mestres em Ciências Farmacêuticas e por me ter ajudado a ultrapassar todos os momentos menos bons com que nos deparamos ao longo destes três anos e meio.

À minha entidade patronal agradeço a compreensão e a disponibilidade de horários.

Aos meus colegas e amigos que embarcaram nesta aventura agradeço a coragem, o companheirismo e a boa disposição. Sem vocês não teria sido a mesma coisa.

Índice

Sumário.....	1
Abstract.....	2
Agradecimentos	3
Índice de Figuras	5
Índice de Tabelas	6
Abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	10
2. Nanossistemas lipídicos	12
2.1. Lipossomas	13
2.2. Micelas de núcleo lipídico.....	15
2.3. Nanoemulsões.....	17
2.4. Nanopartículas lipídicas	18
3. Avaliação pré-clínica da segurança dos nanossistemas lipídicos.....	23
3.1. Avaliação pré-clínica da segurança dos lipossomas.....	27
3.2. Avaliação pré-clínica da segurança das micelas de núcleo lipídico	38
3.3. Avaliação pré-clínica da segurança das nanoemulsões.....	45
3.4 Avaliação pré-clínica da segurança das nanopartículas lipídicas.....	51
4. Conclusão	60
5. Referências bibliográficas	62

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de um lipossoma.....	14
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do lipossoma: (A) unilamelar e (B) multilamelar.....	15
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da micela de núcleo lipídico.....	16
Figura 4 – Representação esquemática da estrutura da nanoemulsão O/A.....	18
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura interna das nanopartículas lipídicas: Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, do inglês <i>Solid Lipid Nanoparticles</i>) e Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês <i>Nanostructured Lipid Carriers</i>).....	20
Figura 6 – Exemplo dos parâmetros fisiológicos a avaliar após administração de nanossistemas lipídicos.....	26

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Avaliação <i>in vitro</i> da segurança/toxicidade das formulações lipossomais...	29
Tabela 2 – Avaliação <i>in vivo</i> da segurança/toxicidade das formulações lipossomais...	35
Tabela 3 – Avaliação <i>in vitro</i> da segurança/toxicidade das formulações de micelas de núcleo lipídico.....	40
Tabela 4 – Avaliação <i>in vivo</i> da segurança/toxicidade das formulações de micelas de núcleo lipídico.....	43
Tabela 5 – Avaliação <i>in vitro</i> da segurança/toxicidade das formulações de nanoemulsões.....	47
Tabela 6 – Avaliação <i>in vivo</i> da segurança/toxicidade das formulações de nanoemulsões.....	50
Tabela 7 – Avaliação <i>in vitro</i> da segurança/toxicidade das formulações de nanopartículas lipídicas.....	53
Tabela 8 – Avaliação <i>in vivo</i> da segurança/toxicidade das formulações de nanopartículas lipídicas.....	57

Abreviaturas

ATO-Lipo - Lipossoma carregado com atosiban

BHE - Barreira hematoencefálica

Blank H-Lip - Lipossoma revestido com herceptin não carregado

Blank Lip - Lipossoma placebo

BNE - Nanoemulsão placebo

CHEMS - Hemissuccinato de colesterol

CMC - Concentração micelar crítica

DLMN - Micela de núcleo lipídico revestida por células de Sertoli e carregada com doxorrubicina

DMPC - Dimiristiol fosfatidilcolina, do inglês *dimyristoylphosphocholine*

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic Acid*

DOPE - Dioleoilfosfoetanolamina, do inglês *dioleoylphosphoethanolamine*

DOX - Doxorrubicina

DOX-Sim - Combinação de doxorrubicina com sinvastatina

DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina, do inglês *dipalmitoylphosphatidylcholine*

DS - Dantroleno sódico

DS-M - Micela de núcleo lipídico carregada com dantroleno sódico

DSPC - Diestearoil fosfatidilcolina, do inglês *distearoyl phosphatidylcholine*

DSPE - Fosfatidil etanolamina, do inglês *phosphatidylethanolamine*

DSPE-PEG 2000 - Diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000

DSPE-PEG 2000-Fol - Diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000 conjugado com folato

DSPE-PEG2000-NHS - 1,2- diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol - N-[amino - 2000]

Estearato de PEG-660 - Estearato de polietilenoglicol – 660

FO - Óleo de *Eucalyptus globulus* livre

FOL - Folato

GRAS - Excipientes geralmente reconhecidos como seguros, do inglês *Generally Recognized as Safe*

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

KTZ - Cetoconazol

KTZ-SLN - Nanopartícula lipídica sólida carregada com cetoconazol

LUV - Vesículas unilamelares grandes, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*

MLV - Vesículas multilamelares, do inglês *Large Multilamellar Vesicles*

NEO - Nanoemulsão contendo *Eucalyptus globulus*

NLC - Vetores lipídicos nanoestruturados, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*

NLC - Citral - Vetores lipídicos nanoestruturados carregados com citral

NLC - placebo – Vetores lipídicos nanoestruturados sem fármaco

NO - Óxido nítrico

OTR - Lipo - Lipossoma carregado com anticorpo monoclonal

PE - Polietilenoglicol fosfatidiletanolamina

PEG - Polietilenoglicol, do inglês *polyethylene glycol*

PVP - Polivinilpirrolidona, do inglês *polyvinylpyrrolidone*

ROS - Espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

SC - Células de Sertoli

SC-PEG - Células de Sertoli com polietilenoglicol

SC-Dox - Células de Sertoli com doxorrubicina

SIM - Sinvastatina

SLN - Nanopartículas lipídicas sólidas, do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*

SLN placebo - Nanopartícula lipídica sólida sem fármaco

SLN-β - Nanopartícula lipídica sólida carregada com β-elemento

SPC - Fosfatidilcolina de soja

SpHL - Lipossomas não revestidos com folato e não carregado

SpHL-DOX - Lipossomas carregados com doxorubicina

SpHL-DOX-Fol - Lipossomas carregados com doxorubicina e revestidos com folato

SpHL-Fol - Lipossomas revestidos com folato e não carregado

SRE - Sistema reticuloendotelial

SUV - Vesículas unilamelares pequenas, do inglês *Small Unilamellar Vesicles*

TGI - Tracto gastrintestinal

β -E - β -elemeno

1. Introdução

A Nanomedicina é um campo interdisciplinar, onde a nanociência, a nanoengenharia e a nanotecnologia interagem com as ciências da vida. A nanomedicina, cada vez mais, faz parte da prática clínica, e, para isso, alguns requisitos devem ser satisfeitos, incluindo especificações de segurança, regulamentares e éticos. Espera-se que a nanomedicina continue no caminho do desenvolvimento e criação de dispositivos, medicamentos e outras aplicações, para o diagnóstico precoce ou tratamento de uma ampla variedade de doenças, apresentando propriedades únicas, com elevada especificidade, eficácia e personalização, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos doentes (Pelaz *et al.*, 2017).

A Nanotecnologia pode ser definida como o processo de manipulação/fabrico e caracterização das propriedades de estruturas funcionais com dimensões na escala nanométrica. Estes materiais podem adquirir propriedades físicas, químicas e biológicas diferentes, que podem afetar várias características do nanomaterial, como condutividade, reatividade, conformação funcional e temperatura de fusão (Mazzeo and Santos, 2018).

A nanotecnologia é muito discutida atualmente, no meio científico, e muito se deve aos investimentos e às expectativas criadas na aplicação dos nanossistemas. Os países que mais contribuem para o desenvolvimento desta ciência são os Estados Unidos, a Alemanha e o Japão (Paschoalino *et al.*, 2010). É de realçar que, a União Europeia tem investido muito, nos últimos anos, no estudo e na avaliação da toxicidade e da segurança dos nanomateriais e dos possíveis riscos associados à sua utilização (Paschoalino *et al.*, 2010, Fadeel *et al.*, 2018).

A aplicação da nanotecnologia demonstra bastante interesse em diferentes setores, desde a cosmética, a indústria alimentar, a biotecnologia, a eletrónica e a indústria farmacêutica (Smith *et al.*, 2007). A nanotecnologia revolucionou a indústria farmacêutica, principalmente na veiculação de fármacos, assim como, no desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a biodisponibilidade, permitir a libertação controlada e o direcionamento de fármacos para o local de ação. Neste contexto, a utilização de determinados nanossistemas, nomeadamente os de natureza

lipídica, têm demonstrado ser bastante promissores como sistemas de veiculação de compostos bioativos, no que concerne à sua eficácia e segurança (Bilia *et al.*, 2019).

A presente dissertação tem como objetivo compilar a evidência pré-clínica relativamente à segurança/toxicidade dos nanossistemas lipídicos, avaliada por estudos *in vitro* e *in vivo*, atendendo à sua composição e à via de administração.

A seleção de um tema relacionado com nanotecnologia justifica-se pelo facto de esta ser uma área que cativa bastante o meu interesse e atenção devido a estar em constante desenvolvimento e demonstrar novas estratégias que apresentam benefícios quando aplicada à veiculação de fármacos.

Com este trabalho constato que a nanotecnologia, cada vez mais, faz parte do nosso dia-a-dia e que tem muita importância no desenvolvimento de novas estratégias para que a substância ativa possa atingir o local de ação sem sofrer alterações, minimizar a toxicidade por ela provocada e garantir que o fármaco possa ser libertado de forma controlada.

Na elaboração desta dissertação realizou-se uma pesquisa relativa à segurança pré-clínica dos nanossistemas lipídicos, incluindo os estudos *in vivo* e *in vitro*, recorrendo a bases de referências bibliográficas, como o Pubmed, o Google Académico e a *b-on*. Para a pesquisa bibliográfica foram utilizadas as seguintes palavras-chave, em combinações variadas: “lipid nanocarriers”, “security”, “safety” “toxicity”, “liposomes”, “lipid-core micelles”, “nanoemulsions”, “lipid nanoparticles”, “*in vivo*”, “*in vitro*”. Foram analisados e reportados nas tabelas de cada um dos nanossistemas lipídicos apenas alguns exemplos de artigos publicados após o ano de 2000. A revisão bibliográfica desta dissertação foi complementada com algumas informações contidas em livros médicos.

2. Nanossistemas lipídicos

Os nanossistemas, enquanto sistemas de veiculação de substâncias ativas, apresentam vantagens quando comparadas com as formas farmacêuticas convencionais (Hort *et al.*, 2019, Bilia *et al.*, 2019): redução da frequência de administração; direcionamento da substância ativa ao local de ação, com consequente, redução dos efeitos adversos; proteção da substância ativa contra o metabolismo rápido *in vivo* e da ação de condições suscetíveis de degradar os compostos veiculados, como por exemplo, a acidez do trato gastrointestinal (TGI), quando administrados por via oral, e dos fatores externos, como a radiação solar e a oxidação; permite modular a liberação dos fármacos. As vantagens mencionadas podem ser uma mais valia para o doente, pois permitem uma melhor adesão à terapêutica.

Apesar da pesquisa intensiva na área dos nanossistemas, o seu uso é limitado na indústria farmacêutica, uma vez que a produção de certos tipos de nanossistemas é dispendiosa, existe dificuldade na transposição para a escala industrial, devendo sempre garantir a estabilidade, quer durante o armazenamento quer *in vivo*, e a segurança dos produtos formulados. Deste modo, a escolha dos excipientes para uma formulação é essencial para a qualidade, eficácia e segurança geral dos produtos farmacêuticos (Lopes *et al.*, 2018).

Neste contexto, os lípidos representam uma opção bastante promissora, com propriedades consideradas únicas, principalmente para veicular fármacos insolúveis em água, uma vez que, muitos destes compostos são semelhantes aos lípidos que se encontram nas membranas biológicas, apresentando biocompatibilidade fisiológica e apresentam a vantagem de serem biodegradáveis (Lopes *et al.*, 2018).

Os nanossistemas lipídicos têm sido desenvolvidos para serem administrados por várias vias, como por exemplo, via oral, via parenteral, via tópica, via oftálmica e nasal (Ibrahim *et al.*, 2019). Atualmente existem vários tipos de nanossistemas lipídicos, nomeadamente os lipossomas, as micelas de núcleo lipídico, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*) e os vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*).

2.1. Lipossomas

Os lipossomas têm recebido uma atenção especial devido às vantagens que demonstram relativamente às formas farmacêuticas convencionais. Os lipossomas são nanossistemas termodinamicamente estáveis que se formam espontaneamente quando um agente anfifílico contacta com uma solução aquosa. Os agentes anfifílicos, como por exemplo, os fosfolípidos, são constituídos por uma “cabeça” hidrófila ligada a duas cadeias hidrófobas de ácidos gordos, que, quando colocados em solução aquosa, formam vesículas esféricas constituídas por uma ou mais bicamada(s) lipídica(s) concêntrica(s). Durante a sua formação, as vesículas aprisionam no seu interior parte do solvente aquoso (Silva *et al.*, 2012, Bangham and Horne, 1964, Bozzuto and Molinari, 2015).

Os lipossomas apresentam propriedades únicas que os tornam sistemas de veiculação de fármacos bastante atrativos. Atendendo à variabilidade da composição lipídica e das propriedades estruturais dos lipossomas, estes nanossistemas são muito versáteis, permitindo veicular substâncias hidrófilas, assim como substâncias lipófilas. Se o objetivo for transportar fármacos lipossolúveis, a incorporação da substância ativa ocorre ao nível das cadeias hidrocarbonadas da bicamada (Bozzuto and Molinari, 2015).

No caso de se pretender transportar fármacos hidrossolúveis, a incorporação da substância ativa ocorre no interior do lipossoma ou na superfície externa do lipossoma, isto é, ao nível das “cabeças” hidrófilas ou ao nível do compartimento aquoso dos lipossomas (Figura 1) (Bangham and Horne, 1964, Silva *et al.*, 2012, Bozzuto and Molinari, 2015).

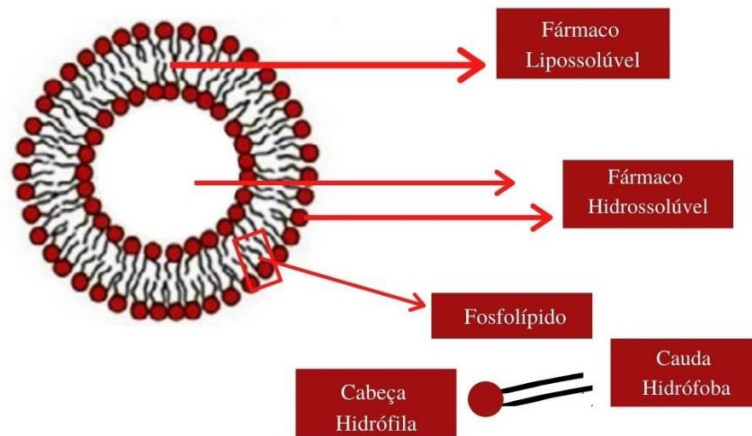


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de um lipossoma. Adaptado com permissão (Tavares *et al.*, 2018).

Apesar das primeiras formulações lipossomais serem compostas exclusivamente por lípidos naturais, estes nanossistemas podem ser constituídos por diferentes lípidos que apresentam o estatuto GRAS (do inglês, *Generally Recognized as Safe*), tais como naturais e lípidos semelhantes aos das membranas biológicas (como por exemplo, colesterol, lecitina de soja e lecitina de ovo) e/ou fosfolípidos semissintéticos (como por exemplo, dioleoilfosfoetanolamina (DOPE, do inglês *dioleoylphosphoethanolamine*) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, do inglês *dipalmitoylphosphatidylcholine*), dimiristiolfosfatidilcolina (DMPC, do inglês *dimyristoylphosphocholine*) (Silva *et al.*, 2012).

Os lipossomas podem ser classificados quanto à sua estrutura em (Figura 2) (Pinheiro *et al.*, 2011, Lúcio *et al.*, 2010, Días-Torres, 2010):

- Vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *Small Unilamellar Vesicles*), as quais contêm uma bicamada lipídica, apresentando um diâmetro médio que pode variar entre os 25 nm e os 100 nm (Figura 2 – A);
- Vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*), que são constituídos por uma bicamada lipídica, apresentando um diâmetro médio compreendido entre os 100 nm e os 500 nm;
- Vesículas multilamelares (MLV, do inglês *Multilamellar Vesicles*), as quais são compostas por várias bicamadas lipídicas, com diâmetro que varia entre os 1000 e os 2000 nm (Figura 2 – B).

A espessura da membrana do lipossoma mede aproximadamente 5 – 6 nm (Días-Torres, 2010).

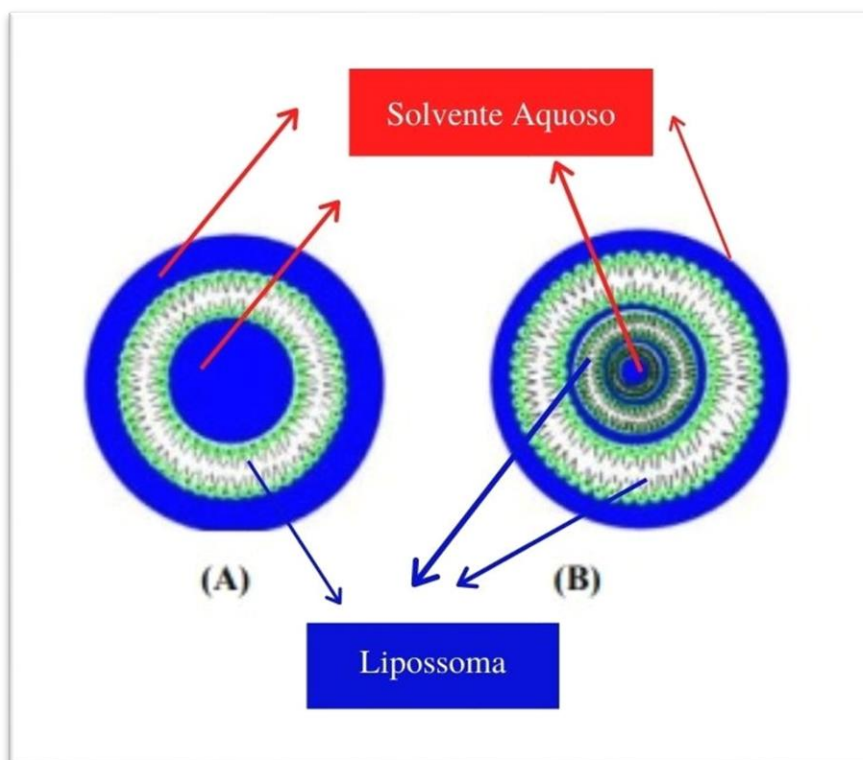


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do lipossoma: (A) unilamelar e (B) multilamelar. Adaptado com autorização (Lebron *et al.*, 2020).

Adicionalmente, atendendo à composição e à semelhança da estrutura dos lipossomas com as membranas biológicas, teoricamente estes nanossistemas são considerados sistemas biocompatíveis, biodegradáveis, não imunogênicos e que não apresentam ou apresentam baixa toxicidade para o ser humano (Bardania *et al.*, 2017, Mozafari, 2005). Apesar dos lipossomas serem considerados seguros, a adição de compostos não fisiológicos na sua preparação, como por exemplo, constituintes utilizados para aumentar a biodisponibilidade do fármaco, podem aumentar o risco de toxicidade associado ao produto final (Bozzuto and Molinari, 2015).

2.2. Micelas de núcleo lipídico

As micelas com núcleo hidrófobo são nanossistemas formados pela associação/agregação espontânea de fosfolípido, em solução aquosa, quando a sua

concentração está acima da concentração micelar crítica (CMC). As caudas hidrófobas dos fosfolípidos associam-se, espontaneamente, formando um núcleo hidrófobo que pode veicular moléculas insolúveis em água (Figura 3) (Silva *et al.*, 2012, Hou *et al.*, 2019). As micelas são sistemas termodinamicamente estáveis e apresentam, tipicamente, uma forma próxima da esférica. Quando usadas como sistemas de veiculação de substâncias ativas, as dimensões das micelas variam num intervalo entre os 10 nm e os 80 nm, dependendo da solubilidade dos compostos a veicular (Torchilin, 2007).

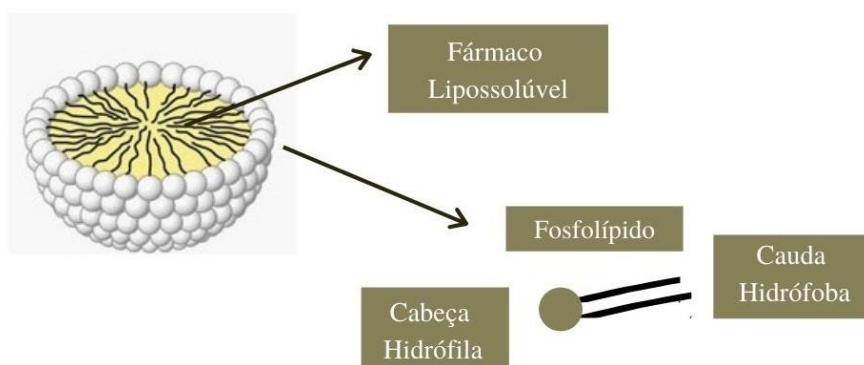


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da micela de núcleo lipídico. Adaptado de <http://www.asturnatura.com/articulos/lipidos/bicapas.jpg>

As micelas podem ser constituídas por polímeros, fosfolípidos, ou misturas de ambos, como por exemplo: polivinilpirrolidona (PVP, do inglês *polyvinylpyrrolidone*) e polietilenoglicol (PEG, do inglês *polyethylene glycol*) conjugado com fosfatidiletalona (DSPE, do inglês *phosphatidylethanolamine*) (Webster *et al.*, 2007), sendo que as micelas fosfolipídicas, isto é micelas de núcleo lipídico, possuem menor toxicidade, uma vez que são preparadas com excipientes considerados seguros com estatuto GRAS. A natureza hidrófoba dos micelas contendo um núcleo de natureza lipídica facilita a encapsulação/solubilização dos compostos lipófilos, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos e, conseqüentemente, reduzindo a toxicidade de muitos fármacos, incrementa a permeação através das várias barreiras fisiológicas e protege os fármacos sensíveis da possível inativação (Torchilin, 2007).

As micelas de núcleo lipídico têm algumas desvantagens, como por exemplo, a instabilidade fisiológica do sistema coloidal após a sua administração devido a um

efeito de diluição. Uma das estratégias que se pode adotar para ultrapassar esta limitação é acoplar/conjugar copolímeros hidrófilos (e.g. PEG e PVP) com os fosfolípidos, o que estabiliza o sistema coloidal por um efeito estérico, prevenindo o processo de opsonização e a captura por parte do sistema reticuloendotelial (SRE) (Webster *et al.*, 2007). O tamanho reduzido das micelas de núcleo lipídico também minimiza a captura por parte das células do SRE (Silva *et al.*, 2012, Hou *et al.*, 2019).

2.3. Nanoemulsões

As nanoemulsões demonstram bastante interesse na veiculação de fármacos, uma vez que, tal como os outros nanossistemas lipídicos, são compostas por substâncias biocompatíveis e biodegradáveis, considerando-se que apresentam baixa ou total ausência de toxicidade e, deste modo, são referidos como seguros para encapsular substâncias ativas (Anuchapreeda *et al.*, 2012). Para além disso, demonstram alta eficiência na encapsulação de fármacos protegendo-os contra a sua degradação (e.g. hidrólise) (Sharma *et al.*, 2010).

A nanoemulsão forma-se a partir da mistura de duas fases líquidas imiscíveis, estabilizadas pela adição de um ou mais agentes tensioativos, formando-se um sistema com aspeto macroscópico homogéneo, mas que se mantém heterogéneo ao nível microscópico (Anuchapreeda *et al.*, 2012). As nanoemulsões podem ser do tipo óleo/água (O/A), considerando-se a fase interna a oleosa e a fase externa a aquosa do nanossistema, ou água/óleo (A/O), e neste caso a fase externa é a oleosa e a fase interna é a aquosa. O tipo de nanoemulsão mais comum é a O/A, permitindo veicular fármacos lipossolúveis (Figura 4) (Silva *et al.*, 2012).

As nanoemulsões são sistemas coloidais com aspeto transparente, formados por gotículas uniformes de dimensões muito reduzidas, geralmente, compreendidas entre os 10 nm e os 100 nm. (Silva *et al.*, 2012, Wooster *et al.*, 2008).

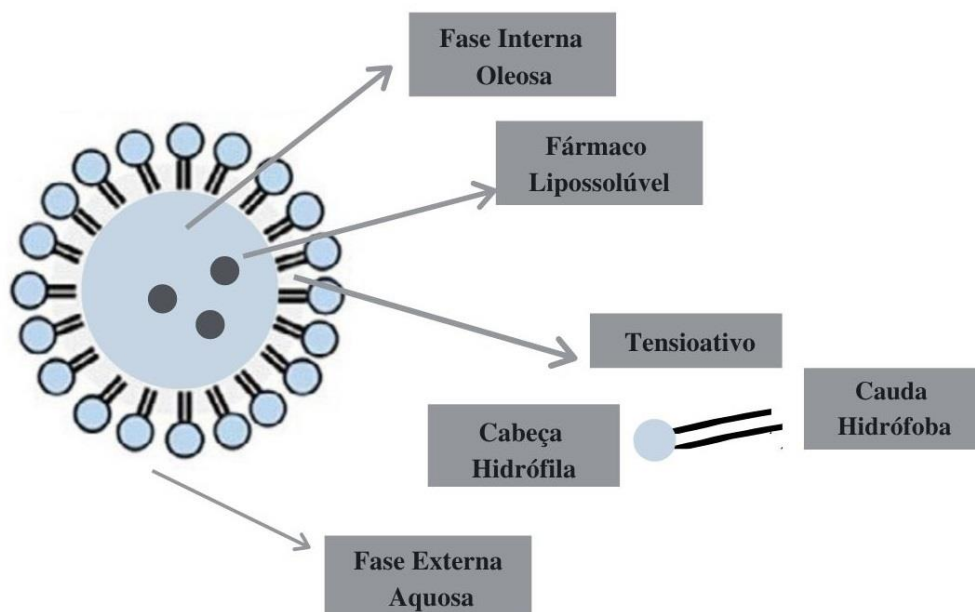


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura da nanoemulsão O/A. Adaptado com permissão (Tavares *et al.*, 2018).

As nanoemulsões possuem várias vantagens como sistemas de veiculação de fármacos, tais como, facilidade e baixo custo de preparação, elevada área de superfície e elevada estabilidade física e cinética (Alam *et al.*, 2018).

A principal desvantagem deste nanossistema é possuir baixa estabilidade termodinâmica, sendo fundamental existir na sua constituição um estabilizador da nanoemulsão (e.g. Tween 80) (Silva *et al.*, 2012, Wooster *et al.*, 2008).

2.4. Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas têm bastante interesse na veiculação de fármacos e a estabilidade que proporcionam às formulações são uma mais valia no fabrico em grande escala (Prasad *et al.*, 2018, Mehnert and Mäder, 2001).

As formulações de nanopartículas lipídicas contêm nanopartículas lipófilas sólidas dispersas num meio aquoso e são estabilizadas através da ação de agente(s) tensoativo(s) apropriado(s). Estes nanossistemas derivam dos conceitos das

nanoemulsões O/A e das nanopartículas poliméricas, tentando ultrapassar as desvantagens associadas a cada um destes sistemas coloidais (Mehnert and Mäder, 2001).

As vantagens de utilização destes nanossistemas comparativamente com os outros já abordados são: permitir obter uma libertação controlada das substâncias ativas e o direcionamento até ao local de ação, proporcionar maior estabilidade e eficácia de aprisionamento do fármaco no interior do nanossistema, evitar a utilização de solventes orgânicos no método de produção e, deste modo, garantir a diminuição do grau de toxicidade, possuir baixos custos de produção e facilidade de transposição para a escala industrial (Mehnert and Mäder, 2001, Müller *et al.*, 2000, Prasad *et al.*, 2018).

Estes sistemas de veiculação exibem dimensões coloidais, apresentando tamanhos que variam, geralmente, entre os 150 nm e os 300 nm. Tal como outros nanossistemas, possuem uma superfície específica elevada e uma capacidade elevada para permear as membranas fisiológicas, aumentando a biodisponibilidade dos compostos veiculados (Müller *et al.*, 2000, Müller *et al.*, 2011).

De acordo com a composição e a estrutura interna da matriz lipídica, as nanopartículas lipídicas são divididas em dois tipos: as SLN e os NLC (Müller *et al.*, 2011). Para se compreender melhor a diferença entre as SLN e os NLC, Müller e colaboradores, normalmente, comparam a estrutura interna das SLN a um muro de tijolos (Figura 5 - A) e a dos NLC a um muro de pedras (Figura 5 - B) (Müller *et al.*, 2011). Nos NLC, o espaço livre entre as moléculas lipídicas que constituem a matriz lipídica da partícula é maior e está mais desorganizado, proporcionando, teoricamente, a veiculação de uma quantidade superior de composto encapsulado e um aumento da estabilidade do sistema (Müller *et al.*, 2011).

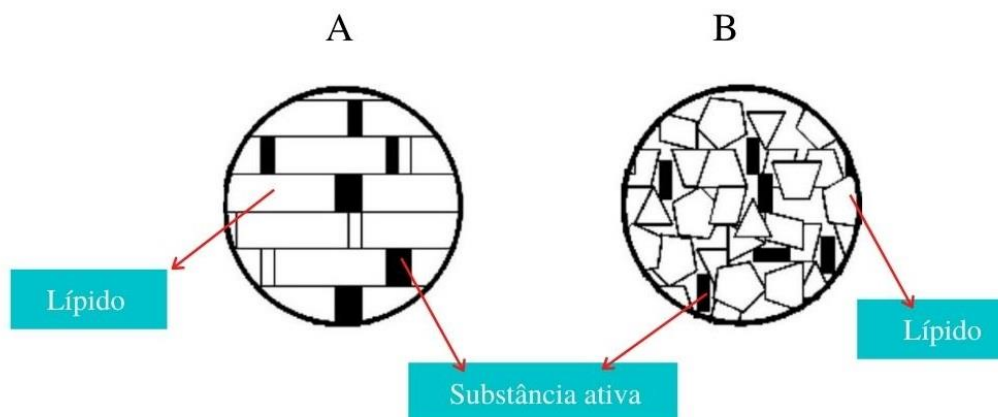


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura interna das nanopartículas lipídicas: (A) Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*) e (B) Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*). Adaptado com permissão (Pardeike *et al.*, 2009).

As SLN representam a primeira geração das nanopartículas lipídicas e são veículos lipídicos coloidais sólidos à temperatura corporal e ambiente, formados por um lípido sólido e agente(s) tensoativo(s), geralmente reconhecidos como seguros (*GRAS*) e fisiologicamente bem tolerados (Silva *et al.*, 2012). Alguns exemplos de lípidos sólidos utilizados na preparação das SLN incluem os triglicerídeos puros (por exemplo, triestearina, tripalmitina e trilaurina), os triglicerídeos compostos (por exemplo, monoestearato de glicerilo e bases Witepsol®), os ácidos gordos (por exemplo, ácido esteárico e ácido palmítico) e as ceras (por exemplo, o palmitato de cetilo) (Silva *et al.*, 2012).

Contudo, as SLN podem apresentar alguns problemas de estabilidade durante o período de armazenamento, tais como, expulsão das substâncias do interior das nanopartículas, instabilidade física das dispersões e capacidade limitada para encapsular moléculas (Silva *et al.*, 2012). Devido à estrutura cristalina do lípido sólido, transições lipídicas polimórficas podem ocorrer aquando da recristalização do lípido sólido após a preparação das SLN. Estes problemas surgem devido ao lípido sólido, que constitui as SLN, recristalizar facilmente, provocando uma mudança na estrutura cristalina da nanopartícula. Durante o armazenamento, as formas polimórficas menos estáveis do

lípidos sólidos, as quais se caracterizam por uma estrutura lipídica menos ordenada, tendem a transitar para formas polimórficas termodinamicamente mais estáveis e a adquirirem uma estrutura cristalina perfeita com poucas imperfeições. Desta forma, as substâncias que estão aprisionadas no seu interior podem ser expelidas da matriz lipídica das SLN, especialmente quando se utilizam lípidos sólidos com elevada pureza (Müller *et al.*, 2011). Como consequência, as SLN apresentam uma capacidade limitada para encapsular as substâncias ativas, podendo ocorrer alterações nos perfis de libertação destas substâncias durante o tempo de armazenamento das formulações.

Os NLC foram propostos com o objetivo de superar algumas das limitações de estabilidade durante o armazenamento que as SLN apresentam. Os NLC representam a segunda geração das nanopartículas lipídicas que são constituídas por uma mistura de lípidos líquidos e lípidos sólidos, dispersos em água, e estabilizados por um ou mais agentes tensioativos. Estas nanopartículas apresentam-se no estado sólido às temperaturas ambiente e corporal e as moléculas do composto a veicular solubilizam-se mais frequentemente no lípido líquido, contudo também podem estar dissolvidas no lípido sólido (Silva *et al.*, 2012). A adição do lípido líquido na preparação dos NLC permite que se forme uma estrutura cristalina com mais imperfeições, assim a presença do óleo na formulação previne a recristalização do lípido sólido deixando mais espaço para encapsular as substâncias ativas (Lopes *et al.*, 2018, Müller *et al.*, 2011). Os lípidos líquidos mais utilizados na preparação dos NLC são os triglicerídeos de cadeia média do ácido caprílico e cáprico (por exemplo, o Miglyol[®] 812); no entanto, outros (e.g. ácido oleico, esqualeno, Cetiol V) também têm sido empregues (Silva *et al.*, 2012, Lopes *et al.*, 2018).

Os agentes tensioativos que fazem parte da composição das nanopartículas lipídicas podem ser usados em associação, para melhorar a estabilidade física e evitar a agregação das nanopartículas, através de mecanismos diferentes, como a estabilização electrostática e estérica (Doktorovova *et al.*, 2016). Os tensioativos mais utilizados são os não iónicos (por exemplo, polissorbato 80), os iónicos (por exemplo, os compostos de amónio quaternário – e.g. cloreto de benzalcónio) e os anfotéricos (por exemplo, os fosfolípidos, como a lecitina) (Silva *et al.*, 2012).

As nanopartículas lipídicas também possuem algumas desvantagens, nomeadamente: serem termodinamicamente menos estáveis que as nanopartículas poliméricas, as SLN

veicularem menos fármaco que os NLC. Adicionalmente, na preparação das nanopartículas lipídicas é necessário um controlo rigoroso na escolha dos lípidos, pois estes podem alterar algumas propriedades importantes das partículas, como por exemplo o tamanho médio, a carga de superfície e a estabilidade (Das and Chaudhury, 2011, Shah *et al.*, 2014).

3. Avaliação pré-clínica da segurança dos nanossistemas lipídicos

Com a evolução da nanotecnologia surgiu a importância de avaliar a segurança da utilização dos nanossistemas lipídicos, de modo a que estes sistemas coloidais não apresentem limitações em termos de toxicidade aquando da sua administração aos seres humanos. Para alcançar tal objetivo, durante a investigação pré-clínica, recorre-se a estudos *in vivo* (em animais, normalmente em ratos) e *in vitro*, utilizando diferentes linhas celulares de acordo com as especificações de cada formulação (Duncan and Gaspar, 2011).

A toxicidade do sistema, como um todo ou dos seus componentes individuais, deve ser considerada logo desde o início quando se seleciona a via de administração. A indústria farmacêutica utiliza os nanossistemas com o intuito de reduzir a toxicidade e os efeitos adversos dos fármacos, sendo que os investigadores sempre estudaram a toxicidade geral, hematocompatibilidade, imunotoxicologia, farmacocinética, toxicologia e destino metabólico de todos os materiais propostos para a composição dos sistemas de libertação de fármacos (Winter *et al.*, 2016, Liechty *et al.*, 2010).

Deste modo, os materiais/produtos a utilizar em nanomedicina devem ser submetidos a uma avaliação pré-clínica rigorosa, assegurando as boas práticas de fabrico e de laboratório em todo o seu processo de desenvolvimento (Gaspar and Duncan, 2009).

No entanto, todos os medicamentos apresentam efeitos adversos e a questão consiste em saber estimar a sua relação risco-benefício. As técnicas utilizadas para avaliar a segurança dos nanossistemas estão em constante evolução. Muitas vezes, são efetuados testes de avaliação da citotoxicidade *in vitro* para se obter uma primeira indicação do risco da utilização de determinado material para uma aplicação particular. Para cada nanossistema lipídico é essencial assegurar que o conjunto de testes e ensaios a realizar esteja cuidadosamente otimizado (Duncan and Gaspar, 2011).

A duração dos ensaios deve ter em consideração a farmacocinética do material utilizado: uma única leitura de resultados a um dado tempo pode conduzir a falsos positivos ou negativos; sendo, por isso, necessário o recurso a um intervalo de tempo adequado, para que se consiga, efetivamente, traduzir a realidade. Similarmente, a linha celular escolhida para avaliar a toxicidade *in vitro* deverá ser aquela a que, *in vivo*, a

probabilidade de exposição seja a mais elevada sem causar nenhum dano no organismo (Duncan and Gaspar, 2011).

Os estudos de toxicidade *in vitro* são geralmente realizados para estabelecer o direcionamento dos testes de toxicidade *in vivo*. O recurso a uma cultura de células é considerado uma boa alternativa para o estudo *in vitro* da toxicidade dos nanossistemas, podendo ser utilizadas diversas linhas celulares, com características próprias de acordo com o objetivo de estudo (Nel *et al.*, 2006).

Muitos casos de toxicidade associados aos nanossistemas resultam da adsorção de determinados agentes contaminantes à superfície dos nanossistemas, durante o processo de fabrico ou no transporte, e não propriamente à composição do nanossistema. Num estudo realizado em 2003, os autores reportaram que o stress oxidativo provocado em macrófagos tratados com nanopartículas recolhidas do ar numa cidade dos Estados Unidos estava relacionado com o teor de contaminantes orgânicos presentes nos nanossistemas (Li *et al.*, 2003).

O stress oxidativo é caracterizado pela alteração na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), que pode levar a uma série de mudanças fisiológicas e causar danos nas biomoléculas, tendo um impacto negativo sobre todo o organismo do ser humano (Ahamed, 2011). A produção de ROS é um processo fisiológico que ocorre naturalmente durante a respiração celular mitocondrial ou pode ser provocada pela ação de vários agentes, como por exemplo, pela radiação ultravioleta. As ROS podem ser produzidas por neutrófilos e macrófagos nos processos inflamatórios do organismo, causando danos nos lípidos das membranas celulares, no ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês, *deoxyribonucleic acid*), nas proteínas e podem promover apoptose e necrose mesmo em células sãs. Contudo, em condições fisiológicas de equilíbrio, estas ROS são benéficas para o organismo, quando são utilizadas pelo sistema imunitário para eliminar agentes patogénicos ou quando atuam para sinalizar células com alguma anomalia (Valko *et al.*, 2006). Atendendo a estas considerações, a indução de danos oxidativos nos constituintes celulares, quer seja por induzir a produção de ROS quer pela inativação dos sistemas de defesa fisiológicos, é uma das estratégias utilizadas para avaliar a potencial toxicidade induzida pelos nanossistemas (Valko *et al.*, 2006).

Para avaliar a toxicidade torna-se fulcral analisar a viabilidade celular nas culturas de células em estudo. A divisão celular baseia-se na ocorrência de dois processos consecutivos caracterizados, essencialmente, pela replicação do DNA e a segregação dos cromossomas replicados em duas células (Silva, 2011).

Quando uma célula apresenta um dano, o ciclo celular é imediatamente interrompido para que se processe a reparação do DNA, através de proteínas específicas, e, posteriormente, se continue o ciclo celular. Deste modo, a análise do ciclo celular permite avaliar a composição do DNA, servindo como uma ferramenta essencial na análise da toxicidade dos nanossistemas na cultura de células em estudo (Wang *et al.*, 2009).

Os estudos de toxicidade *in vivo* envolvem questões éticas relativamente aos animais utilizados, geralmente ratos, e são estudos mais demorados. Desta forma, os estudos *in vitro* têm sido mais utilizados pelos investigadores que trabalham com nanomateriais, pois são mais rápidos, menos dispendiosos e não requerem nenhuma questão ética, como acontece nos estudos *in vivo*. Contudo, os efeitos crónicos de uma substância ou de um produto só são passíveis de análise recorrendo aos estudos *in vivo* (Dhawan and Sharma, 2010).

Embora as questões éticas relativamente aos animais não favoreçam estes estudos, é de extrema importância analisar os órgãos principais dos animais (e.g. coração, fígado, rins e cérebro) com o intuito de avaliar a toxicidade da formulação, garantindo que esta é segura para a administração no ser humano. Normalmente, os animais antes de serem expostos aos estudos de avaliação dos nanossistemas, são analisados no que concerne aos parâmetros indicativos do estado de saúde geral e, após a administração dos nanossistemas, continuam a ser avaliados durante o estudo. Os parâmetros de toxicidade são avaliados constantemente, sendo exemplo deles: as alterações de peso, de pele, cardíacas, neuronais, perturbações TGI, alterações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, histológicas, genéticos e funcionais dos órgãos (Abo Aasy *et al.*, 2019).

A avaliação do peso corporal e o exame anatopatológico devem ser realizados individualmente e no início e fim do tratamento. As mudanças morfológicas dos vários órgãos – e.g. cérebro, pulmão, coração, rins, fígado, baço e estômago - são avaliadas após a remoção e, posterior, pesagem e comparados com as alterações verificadas no

grupo de animais controlo. No decorrer do tratamento importa registar se existem sinais de toxicidade sistémica, tais como: alteração no consumo de água e alimentos e na produção de fezes e urina (Figura 6) (Silva, 2011).

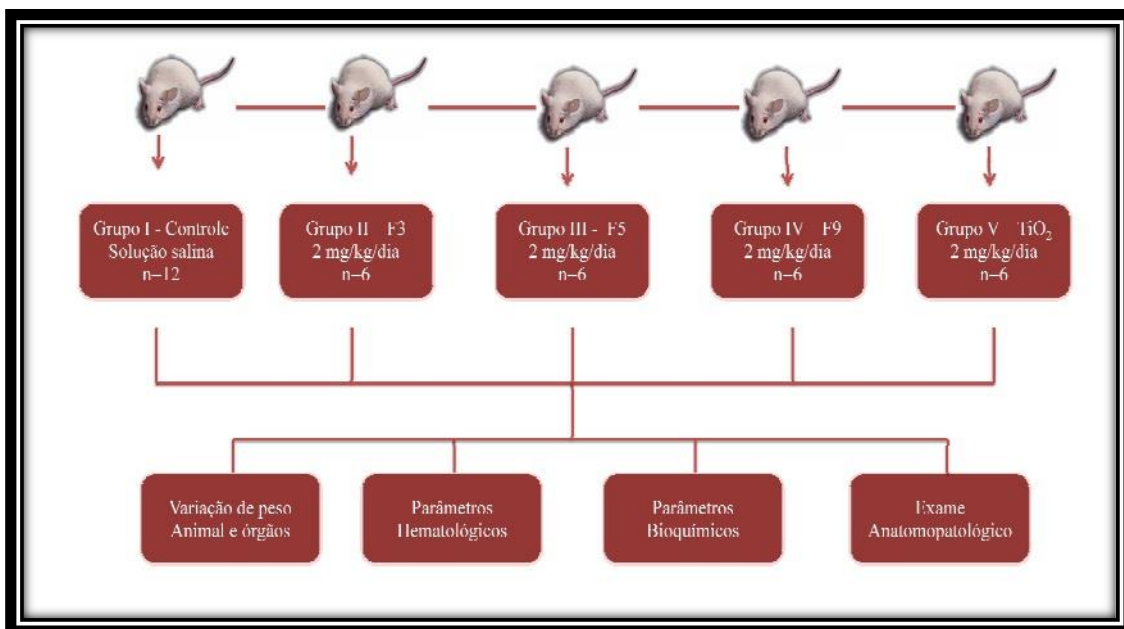


Figura 6 – Exemplo dos parâmetros fisiológicos a avaliar após administração de nanossistemas lipídicos. Adaptado de (Silva, 2011).

Os marcadores hematológicos são frequentemente usados para avaliar a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade provocada pelos nanossistemas (Zhang *et al.*, 2010). A nefrotoxicidade pode ser evidenciada através da análise dos níveis de creatinina e de ureia serológica, pois são metabolitos que se formam pela disfuncionalidade renal (Lasagna-Reeves *et al.*, 2010).

Os estudos toxicológicos devem iniciar-se na compreensão da cinética do nanossistema lipídico em estudo. A farmacocinética estuda os mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco/composto ou seu metabolito. Uma análise quantitativa da farmacocinética do nanossistema permite saber quais os tecidos/células-alvo, o tempo de permanência no organismo e a dose que pode ser tóxica para o ser humano (Dhawan and Sharma, 2010).

A farmacocinética tem elevado interesse quando se pretende direccionar o nanossistema para uma célula-alvo e ajuda a decifrar a segurança de administração, embora seja bastante difícil de se prever um perfil de toxicidade, pois se existir alguma diferença nas

propriedades físico-químicas do nanossistema, o perfil farmacocinético do mesmo também vai ser alterado. Importa considerar a via de administração desde o início do estudo para a perfeita análise dos parâmetros farmacocinéticos (Dhawan and Sharma, 2010).

A mortalidade é um parâmetro de elevado interesse nos estudos pré-clínicos dos nanossistemas e, por isso, este parâmetro é rigorosamente registado e analisado após a administração das formulações (Abo Aasy *et al.*, 2019).

Idealmente, estes estudos devem ser realizados em animais tratados com placebos e com a formulação em estudo, possibilitando a comparação dos resultados e a avaliação do grau de segurança/toxicidade dos nanossistemas administrados (Abo Aasy *et al.*, 2019).

3.1. Avaliação pré-clínica da segurança dos lipossomas

Na literatura estão descritos vários estudos *in vitro* que se propõe a avaliar a segurança/toxicidade dos lipossomas usando diferentes linhas celulares. Alguns exemplos destes estudos estão sumariados na Tabela 1.

Os lipossomas têm sido explorados com o intuito de melhorar a libertação seletiva de compostos quimioterápicos (como por exemplo, da doxorubicina (DOX)) para os tecidos tumorais e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade induzida por estes compostos (de Oliveira Silva *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019, Brand *et al.*, 2017, Yuan *et al.*, 2019) Adicionalmente, Yuan *et al.* constataram que a taxa de hemólise das formulações lipossomais placebo foi significativamente menor que a taxa de hemólise dos lipossomas peguilados contendo a substância ativa, bufalin (Yuan *et al.*, 2019). Nestes estudos, os autores demonstraram que as formulações de lipossomas placebo não afetaram a viabilidade celular nas células tumorais analisadas, sugerindo a ausência de toxicidade para o ser humano (de Oliveira Silva *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019).

Num outro estudo, os autores desenvolveram lipossomas para veicular a astaxantina, um pigmento predominante da família das xantofilas com propriedades antioxidantes, com o objetivo de manter a estabilidade deste composto e melhorar a sua biodisponibilidade oral (Sangsuriyawong *et al.*, 2019). Neste estudo, os autores demonstraram a ausência

de efeitos citotóxicos induzidos quer pelo composto ativo quer pelas formulações lipossomais.

Adicionalmente, Hua e Vaughan analisaram a viabilidade celular após a incubação das células hTERT-myo com as formulações lipossomais conjugadas com anticorpos monoclonais anti-recetor oxitocina ou conjugados com atosiban (antagonista da oxitocina) e com os inibidores endocitóticos, com o objetivo de analisar a ausência de toxicidade celular como potencial razão para diminuir a internalização de alguns lipossomas. Os resultados demonstraram que a viabilidade celular não foi significativamente afetada em qualquer uma das situações (Hua and Vaughan, 2019). Adicionalmente, os autores reportaram uma morte celular significativa para células hTERT-myo tratadas com Triton X-100 (controlo positivo).

Tabela 1 – Avaliação *in vitro* da segurança/toxicidade das formulações lipossomais.

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Linha celular estudada	Efeitos relevantes na avaliação da toxicidade	Referência bibliográfica
DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-Fol	Folato (FOL)	Doxorrubicina (DOX)	Células tumorais da mama de rato (linha 4T1)	<p>Viabilidade celular - A viabilidade das células tratadas com as formulações lipossomais placebo (SpHL, SpHL-Fol) mantém-se acima dos 90%, ao contrário da viabilidade das células incubadas com as formulações lipossomais contendo DOX (free DOX, SpHL-DOX, SpHL-DOX-Fol, and SpHL-DOX-Fol) e a solução de DOX.</p> <p>A citotoxicidade não foi observada em células tratadas com lipossomas placebo, sugerindo a ausência de toxicidade do veículo.</p>	(de Oliveira Silva <i>et al.</i> , 2019)
SPC, colesterol, e DSPE-PEG2000-NHS	Herceptin (H-Lip)	Doxorrubicina (DOX) e Sinvastatina (Sim)	Células humanas do cancro da próstata (linha PC3)	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilidade celular - Os lipossomas placebo não apresentaram citotoxicidade relevante nas células 	(Li <i>et al.</i> , 2019)

				<p>PC3 (Blank Lip e Blank H-Lip). Lipossomas contendo as substâncias ativas apresentaram citotoxicidade mais elevada do que a combinação livre DOX-Sim.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apoptose - Os resultados da apoptose demonstraram resultados semelhantes. Os lipossomas placebo apresentaram percentagem de apoptose inferior a 0,30% em contraste com as formulações lipossomas acoplado o ligando de direccionamento e as duas substâncias ativas (percentagem de apoptose superior a 50%). 	
L- α -fosfatidilcolina, colesterol e DSPE-PEG 2000	PEG	Bufalin	Células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano (linha HepG2) e células de cancro do	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilidade celular - Os lipossomas placebo não apresentaram efeitos citotóxicos. • Taxa de hemólise - Os lipossomas placebo não provocaram 	(Yuan <i>et al.</i> , 2019)

			cólon humano (linha HCT116)	hemólise nas células avaliadas quando comparado com o bufalin que provocou hemólise nas células. Verificou-se também que os lipossomas peguilados contendo bufalin apresentaram um decréscimo significativo na taxa de hemólise celular.	
Fosfolípido de soja com fosfatidilcolina (PC)	Não incluído	Astaxantina	Células de adenocarcinoma de cólon humano (linha Caco-2)	Viabilidade celular - A viabilidade das células de Caco-2 expostas tanto ao extracto de astaxantina como aos lipossomas foi superior a 80%, indicando a ausência de efeitos citotóxicos importantes.	(Sangsuriyawong <i>et al.</i> , 2019).
DSPC e colesterol	PEG	Anticorpo monoclonal anti-OTR (OTR-Lipo) ou atosiban (ATO-Lipo, antagonista OTR)	Células de miometria hTERT-imortalizadas (linha hTERT-myo)	Viabilidade celular – Não se verificou qualquer efeito significativo das formulações lipossomais na viabilidade das células hTERT-myo após 24 horas de incubação em duas concentrações avaliadas (2,02 e 4,05	(Hua and Vaughan, 2019)

				mM). Foi demonstrada uma morte celular significativa nas células hTERT-myo tratadas com Triton X-100 (controlo positivo).	
--	--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Abreviaturas: ATO-Lipo – Lipossoma carregado com atosiban; Blank H-Lip – Lipossoma revestido com herceptin não carregado; Blank Lip – Lipossoma placebo; CHEMS – Hemissuccinato de colesterol; DOX-Sim – Combinação de doxorubicina com sinvastatina; DSPC - 1,2-distearoyl-sn-glicero-2-fosfolina; DSPE-PEG2000 – Diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000; DSPE-PEG2000-Fol – Diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000 conjugado com folato; DSPE-PEG2000-NHS - 1,2- diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol - N- [amino - 2000]; OTR-Lipo – Lipossoma carregado com anticorpo monoclonal; SpHL - Lipossomas não revestidos com folato e não carregado; SpHL-DOX – Lipossomas carregados com doxorubicina; SpHL-DOX-Fol – Lipossomas carregados com doxorubicina e revestidos com folato; SpHL-Fol - Lipossomas revestidos com folato e não carregado.

No que concerne aos estudos *in vivo* para avaliação dos parâmetros da toxicidade (Tabela 2), diversos investigadores demonstraram que os lipossomas favorecem a permeação dos compostos quimioterápicos nos tecidos tumorais, permitindo alcançar uma maior concentração do composto veiculado nos locais alvo, em virtude das suas dimensões, da estratégia de peguilação e também das moléculas de direcionamento conjugadas com os lipossomas (de Oliveira Silva *et al.*, 2019, Yuan *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019). As propriedades farmacocinéticas dos lipossomas preparados por de Oliveira e colaboradores relevaram tempos de circulação sanguínea longos, melhorando a acumulação tumoral das formulações lipossomais e, conseqüentemente, a atividade antitumoral do fármaco veiculado (de Oliveira Silva *et al.*, 2019). Adicionalmente, estes autores demonstraram que os lipossomas placebo desenvolvidos não apresentaram qualquer influência no decréscimo do tamanho dos tumores se não veicularem a DOX, verificando-se um aumento de metástases nos pulmões e fígado (de Oliveira Silva *et al.*, 2019). Neste estudo, os autores constataram ainda que a veiculação da DOX nos lipossomas não induziu o efeito cardiotoxíco expectável da DOX, o qual foi avaliado nos registos dos eletrocardiogramas dos animais, apesar de serem registadas algumas áreas de vacuolização na análise histológica. A administração de uma solução de DOX livre provocou um efeito cardiotoxíco significativo.

Nos estudos realizados por Yuang *et al.*, os autores analisaram se a veiculação da bufalin numa dispersão lipossomal pode afetar a sua atividade antitumoral *in vivo* e o seu comportamento geral, toxicidade aguda e distribuição de tecidos. A administração intravenosa de lipossomas resultou numa redução do tempo de circulação sanguínea e num aumento da acumulação ao nível hepático e esplénico, que é conhecido como fenómeno de depuração sanguínea acelerada. Tal imunogenicidade dos lipossomas apresenta grandes desafios na pesquisa de formulações lipossomais e sua aplicação clínica (Yuan *et al.*, 2019).

Li e colaboradores registaram o peso corporal dos animais durante os estudos *in vivo* e nenhuma perda de peso significativa foi observada, indicando pouca toxicidade das formulações lipossomais (Li *et al.*, 2019). Os autores também não registaram lesões visíveis nos órgãos principais, sugerindo que não havia efeitos secundários tóxicos significativos causados pelo tratamento. Além disso, o tratamento não causou alterações significativas no coeficiente de peso dos órgãos. De acordo com estes resultados, os

autores concluíram que a co-administração da DOX e da sinvastatina (Sim) nas formulações lipossomais pode ser considerado seguro para o tratamento do cancro da próstata.

Tabela 2 – Avaliação *in vivo* da segurança/toxicidade das formulações lipossomais.

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Animal estudado	Via de administração	Efeito fisiopatológico observado	Referência bibliográfica
DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000 e DSPE-PEG2000-Fol	Folato (FOL)	Doxorrubicina (DOX)	Rato BALB/c fêmeas com 6-8 semanas enxertados com células tumorais da mama de rato (linha 4T1)	Via intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> • Maior absorção tumoral e atividade antitumoral nas formulações lipossomais revestidas com folato (SpHL-DOX-Fol) e redução drástica dos focos de metástase pulmonar. • O tamanho do tumor aumentou ao longo do tempo em comparação com o grupo de ratos que foi testado com os lipossomas contendo DOX • Ausência de efeitos cardiotoxicos nas formulações lipossomais contendo DOX. A administração de DOX livre 	(de Oliveira Silva <i>et al.</i> , 2019)

					provocou um efeito cardiotoxico significativo.	
L- α -fosfatidilcolina, colesterol e DSPE-PEG 2000	PEG	Bufalin	Ratos Sprague-Dawley machos; ratos Kunming e ratinhos Balb com 6 semanas de idade enxertados com células tumorais (linha U251)	Via intravenosa	A veiculação de bufalin nos lipossomas reduziu a citotoxicidade quando comparada com a administração de bufalin livre, resultando na libertação controlada de bufalin para a circulação sanguínea.	(Yuan <i>et al.</i> , 2019)
SPC, colesterol e DSPE-PEG2000-NHS	Herceptin (H-Lip)	Doxorrubicina (DOX) e Sinvastatina (Sim)	Ratos inoculados com células humanas do cancro da próstata (linha PC3)	Via intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da atividade antitumoral • Nenhuma perda do peso corporal significativa, indicando pouca toxicidade das formulações lipossomais. • Ausência de lesões visíveis nos órgãos principais e de alterações significativas no 	(Li <i>et al.</i> , 2019)

					coeficiente de peso dos órgãos, demonstrando a segurança das formulações lipossomais.	
--	--	--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------	--

Abreviaturas: CHEMS - Hemissuccinato de colesterol; DOPE - Dioleoilfosfoetanolamina; DSPE-PEG 2000 - Diestearoilfosfatidiletanolaminapolietilenoglicol 2000; DSPE-PEG2000-Fol - Diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000 conjugado com folato; DSPE-PEG2000-NHS - 1,2- diestearoilfosfatidiletanolaminapolietilenoglicol - N- [amino - 2000]; SPC - Fosfatidilcolina de soja; SpHL-Fol – Lipossomas revetidos com folato e não carregado.

3.2. Avaliação pré-clínica da segurança das micelas de núcleo lipídico

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de estudos *in vitro* usados para avaliar a segurança/toxicidade das micelas de núcleo lipídico.

Tal como reportado com os lipossomas, as micelas de núcleo lipídico têm sido consideradas vetores com propriedades superiores em comparação com a terapêutica convencional para a veiculação de compostos quimioterápicos. Neste contexto, Bahadori e colaboradores avaliaram e compararam a toxicidade (citotoxicidade e genotoxicidade), utilizando células L-929 de fibroblastos, das micelas preparadas com uma base lipídica de distearoilfosfatidilcolina polietilenoglicol (PEG-2000) e uma micela polimérica (Bahadori *et al.*, 2017). De acordo com os resultados, nenhuma das concentrações das micelas de núcleo lipídico demonstrou efeitos citotóxicos significativos (Bahadori *et al.*, 2017). Adicionalmente, o dano no DNA causado pela micela de núcleo lipídico foi muito inferior ao causado pela micela polimérica, nas quais foram detetadas algumas ruturas da cadeia de DNA. Desta forma, os autores concluíram que o dano no DNA não desempenhou um papel significativo e constataram que o mecanismo de morte celular nas concentrações estudadas foi a apoptose, pois através da análise dos resultados de fluorimetria, as células apópticas coraram de laranja o que significa que existe cromatina condensada e fragmentada (Bahadori *et al.*, 2017).

O interesse das micelas de núcleo lipídico para aplicação na área oncológica também inclui a tentativa de reduzir a toxicidade induzida pelos compostos quimioterápicos. Por exemplo, Das e colaboradores conduziram um estudo e concluíram que as micelas de núcleo lipídico foram eficazes na veiculação da DOX, conseguindo penetrar e distribuir a DOX pelo tecido pulmonar e permanecer durante mais tempo no citoplasma das células de carcinoma pulmonar, reduzindo os efeitos colaterais provocados pela DOX livre sem alterar a sua eficácia terapêutica (Das *et al.*, 2017).

Num outro estudo, Jin e colaboradores desenvolveram micelas compostas de fosfolípidos e Cremophor EL, um tensioativo não iónico muito utilizado pelas suas propriedades emulsificantes, com o objetivo de ultrapassar as limitações clínicas relacionadas com a solubilidade aquosa do dantroleno sódico (i.e. um fármaco utilizado no tratamento da hipertermia maligna) (Jin *et al.*, 2019). Os autores avaliaram a segurança realizando o ensaio da hemólise *in vitro* e constataram que as micelas de

núcleo lipídico são compatíveis com o sangue apresentando baixas taxas de hemólise, sendo adequadas para administração por via intravenosa (Jin *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Avaliação *in vitro* da segurança/toxicidade das formulações de micelas de núcleo lipídico

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Linha celular estudada	Efeitos relevantes na avaliação da toxicidade	Referência bibliográfica
PEG-2000 PE, 3β-(Dimetilaminoeta no) carbamoil], colesterol e DOPE	Células de Sertoli (SC)	Doxorrubicina (DOX)	Células de carcinoma pulmonar de rato (linha LLC1)	A micela lipídica carregada com DOX ficou retido no citoplasma de forma eficaz e durante mais tempo comparativamente com a DOX livre.	(Das <i>et al.</i> , 2017)
DSPE-PEG 2000	Não incluído	Não incluído	Células de fibroblastos de rato saudável, células L-929	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilidade celular - As micelas de núcleo lipídico não demonstraram citotoxicidade significativa comparativamente com as micelas poliméricas, após 24h, 48h e 72h de administradas as formulações micelares. • Efeito genotóxico – após incubação com células L-929, as micelas de núcleo lipídico (4 mg/mL) durante 24h, 48h e 72h 	(Bahadori <i>et al.</i> , 2017)

				<p>não se verificou danos significativos no DNA, contrariamente ao verificado após incubação das células com micelas poliméricas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apoptose e necrose – 72 h após incubação das células com as micelas de núcleo lipídico verificou-se que o mecanismo de morte celular é a apoptose, visualizando-se aproximadamente 60% de células normais. 	
Fosfolípido, Cremophor EL	Não incluído	Dantroleno sódico (DS)	Eritrócitos de coelho	<p>Taxa de hemólise – as micelas de núcleo lipídico placebo, na concentração de 1 mg/mL, provocaram uma leve hemólise (2,5%) na dispersão de eritrócitos a 2%.</p>	(Jin <i>et al.</i> , 2019)

Abreviaturas: DSPE-PEG 2000 - Diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000; DOPE – Dioleoilfosfoetanolamina; PE - Polietilenoglicol fosfatidiletanolamina; PEG – Polietilenoglicol.

No que diz respeito aos estudos *in vivo* (Tabela 4), Das e colaboradores demonstraram que as células de Sertoli (SC) são eficazes para direcionar o composto quimioterápico veiculado por micelas de núcleo lipídico para o pulmão, facilitando a penetração no tecido pulmonar, com o intuito de aumentar a eficácia e reduzir os efeitos adversos associados à administração da DOX (Das *et al.*, 2017). Estas conclusões resultaram após análise da DOX veiculada por micelas lipídicas por microscopia de fluorescência. A utilização de SC conjugadas com as micelas que veiculam a DOX reduziu significativamente a toxicidade cardíaca e hepática, aumentou a distribuição do fármaco nas áreas mais profundas do pulmão e aumentou o efeito terapêutico expectável da DOX (Das *et al.*, 2017).

Nos estudos conduzidos pelo Jin e colaboradores, as micelas de núcleo lipídico que veiculam o dantroleno sódico apresentaram um tamanho superior que as micelas lipídicas sem fármaco, efeito visualizado por microscopia eletrónica (Jin *et al.*, 2019). Os autores verificaram que, 120 minutos após a administração intravenosa das micelas de núcleo lipídico placebo e contendo o Cremophor EL, as reações alérgicas nos ratos foram significativamente mais graves no grupo que continha o Cremophor EL na sua composição (Jin *et al.*, 2019). Os parâmetros farmacocinéticos confirmaram que a biodisponibilidade do dantroleno sódico era superior quando veiculado pelas micelas lipídicas, potenciando o seu efeito terapêutico (Jin *et al.*, 2019).

Tabela 4 – Avaliação *in vivo* da segurança/toxicidade das formulações de micelas de núcleo lipídico.

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Animal estudado	Via de administração	Efeito observado	efeito fisiopatológico	Referência bibliográfica
PEG-2000 PE, 3β-[N-(Dimetilaminoetano) carbamoil] colesterol e DOPE	Células de Sertoli (SC)	Doxorrubicina (DOX)	Ratos C57BL /6 foram inoculados com células tumorais de carcinoma pulmonar (linha LLC1)	Via intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> • As SC conjugadas com a DOX (SC-DOX) têm maior efeito hepatotóxico que as SC conjugadas com a formulação micelar (SC-DLMN). A DLMN é menos hepatotóxica que a DOX livre. • O SC-DLMN provocou menor cardiotoxicidade em comparação com os ratos tratados com SC-DOX e a DOX livre. • O peso dos ratos tratados com SC-DLMN não sofreu alterações significativas durante o estudo. 		(Das <i>et al.</i> , 2017)

Fosfolípido, Cremophor EL	Não incluído	Dantroleno sódico (DS)	Ratos Sprague- Dawley machos	Via intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> • As reações alérgicas verificadas pelas micelas lipídicas foram significativamente menores do que as causadas pelo Cremophor EL puro, contudo verificaram-se algumas reações adversas comparativamente com o grupo controlo composto por solução salina. • A concentração plasmática atingida pelas micelas de núcleo lipídico contendo DS (DS-M) foi superior ao DS puro durante o período experimental. 	(Jin <i>et al.</i> , 2019)
------------------------------	--------------	---------------------------	------------------------------------	--------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------

Abreviaturas: DLMN – Micela de núcleo lipídico revestida por células de Sertoli e carregada com doxorrubicina; DOPE - Dioleoilfosfoetanolamina; DS-M – Micela de núcleo lipídico carregada com dantroleno sódico; PE - Polietilenoglicol fosfatidiletanolamina; SC-Dox – Células de Sertoli com doxorrubicina; SC-PEG – Células de Sertoli com polietilenoglicol.

3.3. Avaliação pré-clínica da segurança das nanoemulsões

A Tabela 5 apresenta alguns exemplos de estudos *in vitro* usados para avaliar a segurança/toxicidade das nanoemulsões.

O *Eucalyptus globulus* é uma planta medicinal pertencente à família da *Myrtaceae* e, embora seja uma espécie amplamente utilizada, todos os seus benefícios medicinais ainda não são conhecidos. Um dos produtos de interesse pela sua atividade terapêutica é o óleo essencial desta planta; contudo este produto é bastante instável na presença de luz, do oxigénio e é facilmente volátil. Com o objetivo de ultrapassar os problemas de estabilidade e aumentar a sua eficácia (de Godoi *et al.*, 2017). Os autores avaliaram a citogenotoxicidade *in vitro* recorrendo a células mononucleares do sangue periférico das seguintes formulações óleo de *Eucalyptus globulus* livre, nanoemulsão contendo *Eucalyptus globulus* e nanoemulsão placebo.

Tal como referido anteriormente, as ROS desempenham um papel importante no stress oxidativo, pois possuem a capacidade de atravessar as membranas celulares e produzem radicais hidroxilo que são altamente tóxicos para as células. Neste estudo, Godoi e seus colaboradores verificaram que o *Eucalyptus globulus* livre ou veiculado na nanoemulsão não apresentou citotoxicidade nas células estudadas, ao contrário do que ocorreu com o controlo positivo (peróxido de hidrogénio) que afetou a viabilidade celular em 50%. Adicionalmente, os autores avaliaram a peroxidação lipídica, utilizando como biomarcador o malondialdeído, das células mononucleares incubadas com a nanoemulsão contendo o *Eucalyptus globulus*. Todos os processos de oxidação provocam alterações nas membranas celulares, e.g. fluidez, permeabilidade e risco de rutura das membranas, resultando na morte celular. Após uma incubação de 72 h com as células, verificou-se que o óleo de *Eucalyptus globulus* livre revelou um perfil de toxicidade dependente da dose testada, contrariamente ao constatado para a nanoemulsão de *Eucalyptus globulus*. Neste último caso, um aumento na concentração da nanoemulsão resultou na proteção das células. As nanoemulsões placebo não induziram qualquer reação de oxidação celular, demonstrando que a formulação não exhibe toxicidade. Na avaliação da genotoxicidade, Godoi e colaboradores deduziram que não existia dano no DNA celular quer nas nanoemulsões contendo *Eucalyptus globulus* nas nanoemulsões placebo e no óleo de *Eucalyptus globulus* livre. No teste da hemólise, os resultados demonstraram que na concentração mais baixa (0,1%), as várias

formulações testadas não provocaram toxicidade para as células. Porém, na concentração de 0,2%, o óleo de *Eucalyptus globulus* livre e a nanoemulsão de *Eucalyptus globulus* provocaram hemólise, enquanto que a nanoemulsão placebo causou reações hemolíticas e mudanças no diâmetro das gotículas de nanoemulsões quando testada na concentração de 0,3%, provavelmente resultante da quantidade de polissorbato 80 (tensioativo) presente na composição da nanoemulsão. Os autores também reportaram o facto da segurança da nanoemulsão ir diminuindo à medida que se aumenta a concentração do óleo de *Eucalyptus globulus*, provocando toxicidade nos eritrócitos devido à sua capacidade hemolítica (de Godoi *et al.*, 2017).

Tabela 5 – Avaliação *in vitro* da segurança/toxicidade das formulações de nanoemulsões.

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Linha celular estudada	Efeitos relevantes na avaliação da toxicidade	Referência bibliográfica
Monooleato de sorbitano, polissorbato 80 e água ultrapura	Não incluída	Óleo de <i>Eucalyptus globulus</i>	Células mononucleares do sangue periférico	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilidade celular - o óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> livre (FO) e a nanoemulsão contendo o óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> (NEO) não apresentaram citotoxicidade nas células mononucleares, obtendo-se valores de viabilidade celular acima dos 80% comparativamente com o controlo positivo (H₂O₂) que provou 50% de morte celular. • A nanoemulsão placebo (BNE) não provocou oxidação celular, FO demonstra toxicidade celular dependente da dose testada (0,1%, 0,2% e 0,3%) e NEO protegeu as células da oxidação celular. • O FO, BNE e NEO não causaram dano no DNA. • Na concentração de 0,1% não se 	(de Godoi <i>et al.</i> , 2017)

				verificou lise celular, na concentração de 0,2% existe degradação dos eritrócitos provocada pelo FO e NEO, na concentração mais alta (0,3%) visualizou-se hemólise tanto na NEO, como no FO e no BNE.	
--	--	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Abreviaturas: BNE - Nanoemulsão placebo; FO - Óleo de *Eucalyptus globulus* livre; H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio; NEO - Nanoemulsão contendo *Eucalyptus globulus*.

Os estudos *in vivo* relativos à avaliação da segurança/toxicidade das nanoemulsões enquanto sistemas de veiculação de fármacos estão apresentados na Tabela 6.

Hort *et al.* reportaram que as nanoemulsões revelaram uma maior segurança quando administradas por via oral quando comparada com a via intraperitoneal, principalmente quando são administradas doses elevadas de nanoemulsão (Hort *et al.*, 2019). Neste estudo registou-se o peso dos animais e nenhuma perda de peso significativa foi examinada, demonstrando pouca toxicidade da nanoemulsão. Os investigadores também não registaram lesões visíveis nos órgãos principais, alterações a nível da mucosa ocular, pele e comportamental. De acordo com estes resultados, os autores concluíram que não havia efeitos secundários tóxicos significativos provocados pela administração oral da nanoemulsão. Na administração por via intraperitoneal, reportaram-se alteração de alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos, como por exemplo proteínas plasmáticas e leucócitos totais aumentados, e ainda registou-se oxidação celular, na dose máxima testada (800 mg/Kg). No que concerne aos testes de genotoxicidade, a nanoemulsão não demonstrou efeitos genotóxicos, uma vez que não foi detetado nenhum dano no DNA celular, evidenciando que são nanossistemas seguros para a administração oral. Adicionalmente, os autores constataram que o tamanho influencia o grau de toxicidade, exibindo uma maior toxicidade nos animais testados quanto menor o tamanho das gotículas das nanoemulsões, em virtude da maior probabilidade de interações com as células e os componentes celulares, como mitocôndrias e lisossomas (Hort *et al.*, 2019).

Tabela 6 – Avaliação *in vivo* da segurança/toxicidade das formulações de nanoemulsões.

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Animal estudado	Via de administração	Efeito fisiopatológico observado	Referência bibliográfica
Miglyol 812, lecitina de ovo (Lipoid E80) e estearato de PEG-660 (Solutol HS15)	Não incluído	Não incluído	Rato macho com 2 meses de idade	Via oral e via intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> • Para a dose de 800 mg/Kg, administrada por via intraperitoneal, verificou-se um ligeiro aumento das proteínas plasmáticas e leucócitos totais. • O aumento da peroxidação lipídica, quando a nanoemulsão foi administrada por via intraperitoneal, contudo os níveis de glutathione não foram alterados pelo tratamento com a dose máxima testada da nanoemulsão (800 mg/Kg). • Após administração da nanoemulsão pelas duas vias estudadas, não ocorreu dano no DNA. 	(Hort <i>et al.</i> , 2019)

Abreviaturas: Estearato de PEG-660 – Estearato de Polietilenoglicol – 660.

3.4 Avaliação pré-clínica da segurança das nanopartículas lipídicas

No que concerne aos estudos *in vitro* realizados com nanopartículas lipídicas (Tabela 7), He e colaboradores demonstraram que as SLN são uma boa escolha para veicular fármacos que tenham que ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) (He *et al.*, 2019). O β -elemeno é o principal componente do elemeno, uma mistura de óleo essencial natural extraída de várias plantas e ervas. É um sesquiterpeno com atividade antitumoral de amplo espectro, apresentando algumas limitações para a sua aplicação clínica, nomeadamente baixa solubilidade aquosa e limitada biodisponibilidade (He *et al.*, 2019).

No estudo realizado por Nordin e colaboradores verificou-se que os NLC são nanossistemas eficazes na libertação controlada de fármacos, como é o exemplo do citral. Este composto é um aldeído muito utilizado em perfumes devido ao seu aroma cítrico, mas também utilizado na indústria farmacêutica devido às suas propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas (Nordin *et al.*, 2018). A libertação controlada do citral encapsulado por NLC permitiu diminuir os efeitos adversos (Nordin *et al.*, 2018). Nos ensaios de viabilidade celular os investigadores concluíram que quer os NLC placebo quer os NLC que veiculam o citral, nas diversas concentrações analisadas (0,47 $\mu\text{g/mL}$ a 30 $\mu\text{g/mL}$), quando incubados com esplenócitos, não alteraram os efeitos da proliferação celular. Contrariamente, nos esplenócitos incubados com citral não encapsulado, na concentração máxima, reduziu a viabilidade celular para 95,2% (Nordin *et al.*, 2018).

Num outro estudo, Kakkar e colaboradores demonstraram que as SLN, devido ao tamanho nanométrico e natureza lipídica, são benéficas para melhorar a biodisponibilidade de fármacos por via ocular (Kakkar *et al.*, 2015). O cetoconazol é um antifúngico de largo espectro, que pode ser utilizado para tratar infeções oculares. A administração tópica deste composto é uma mais valia devido às diversas reações adversas induzidas pelo cetoconazol quando administrado por via oral (Kakkar *et al.*, 2015). A encapsulação do cetoconazol nas SLN permitiu que este penetre melhor através das membranas biológicas, uma vez que este possui elevado peso molecular. Em relação à viabilidade celular testada, os autores constataram que as SLN que veiculam o cetoconazol não provocaram nenhuma alteração nas células epiteliais de pigmento da

retina humana (linha ARPE-19) e células epiteliais de córnea de coelho (linha RCE), assim como as SLN placebo (Kakkar *et al.*, 2015).

Tabela 7 – Avaliação *in vitro* da segurança/toxicidade das formulações de nanopartículas lipídicas.

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Linha celular estudada	Efeitos relevantes na avaliação da toxicidade	Referência bibliográfica
Monoestearato de glicerilo, triestearato de glicerol e colato de sódio (surfactante) e água desionizada	Não incluído	β -elemeno (β -E)	Células de glioma U87, células de glioma C6 e células de glioma GL261	Viabilidade celular - As células de glioma U87, células de glioma C6 foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular e demonstrou-se que tanto o β -E livre como a sua encapsulação nas SLN (SLN- β) obtiveram resultados semelhantes, pois foram capazes de inibir a atividade celular, o que sugere que a formulação de SLN- β é eficaz e que a SLN placebo não evidencia sinais de citotoxicidade celular.	(He <i>et al.</i> , 2019)
Óleo de palma hidrogenado, Lipoid S-100 (fosfatidilcolina), Azeite, D-Sorbitol, Timerosal, Tween®	Não incluído	Citral	Esplenócitos de rato	Viabilidade celular – os NLC-placebo e NLC-citral não provocaram diminuição da viabilidade celular dos esplenócitos quando comparados com o citral livre, nas concentrações máximas estudadas (15 μ g/mL e 30 μ g/mL).	(Nordin <i>et al.</i> , 2018)

80 e água bidestilada					
Compritol® 888 ATO (behenato de glicerilo), Phospholipon 90G (fosfatidilcolina estabilizada com 0,1% palmitato de ascorbilo), PEG 600, Tween® 80 e água bidestilada	Não incluída	Cetoconazol (KTZ)	Células epiteliais de pigmento da retina humana (linha ARPE-19) e células epiteliais de córnea de coelho (linha RCE)	Viabilidade celular – para as diferentes concentrações testadas (1,5, 3 and 6 µg/ml), durante 96 h, quer a linha celular ARPE-19 quer a RCE não sofreu nenhum efeito citotóxico provocado pelas SLN placebo nem pelas SLN contendo o fármaco (KTZ-SLN).	(Kakkar <i>et al.</i> , 2015)

Abreviaturas: KTZ – Cetoconazol; KTZ-SLN - Nanopartícula lipídica sólida carregada com cetoconazol; PEG – Polietilenoglicol; NLC-Citral - Vetores lipídicos nanoestruturados carregados com citral; NLC-placebo – Vetores lipídicos nanoestruturados sem fármaco; SLN placebo – Nanopartícula lipídica sólida sem fármaco; SLN-β – Nanopartícula lipídica sólida carregada com β-elemeno; β-E - β-elemeno.

No que diz respeito aos estudos *in vivo* com nanopartículas lipídicas (Tabela 8), He e investigadores deduziram que o β -elemeno e o β -elemeno encapsulado nas SLN são capazes de atravessar a BHE mais facilmente do que nos restantes órgãos analisados, quer os animais em estudo fossem saudáveis ou possuíssem gliomas cerebrais (He *et al.*, 2019). Segundo estes autores, o β -elemeno encapsulado nas SLN retardou o desenvolvimento do glioma cerebral, permitindo que o animal sobrevivesse durante mais tempo (53 dias) comparado com o animal tratado com o β -elemeno livre (43 dias). Para efeitos de comparação utilizou-se um grupo controlo, ao qual foi administrado uma solução salina e o tempo de sobrevivência do animal foi menor (40 dias) (He *et al.*, 2019). Em nenhum dos animais ocorreu uma perda de peso significativo durante o estudo, nem se registou alterações fisiológicas e bioquímicas, sugerindo que as formulações de nanopartículas lipídicas são seguras para o tratamento antitumoral (He *et al.*, 2019).

No estudo conduzido por Nordin e colaboradores, o óxido nítrico é utilizado como uma molécula sinalizadora de inflamação em condições fisiológicas normais. Deste modo, com os resultados obtidos, concluíram que o citral e os NLC que veiculavam o citral possuem efeito antiinflamatório, uma vez que nos NLC placebo não se visualizou a redução da quantidade de óxido nítrico, contrariamente ao que aconteceu com o citral livre e o citral encapsulado nos NLC (Nordin *et al.*, 2018). Neste estudo, a determinação da resposta imune, nos animais tratados durante 28 dias com 50 mg/Kg de NLC placebo, NLC contendo citral e citral livre, foi realizado pelo ensaio de imunofenotipagem. A avaliação dos resultados demonstrou que a percentagem das populações de células T CD4/CD3 e T CD8/CD3 aumentou significativamente nos animais tratados com citral e NLC contendo citral quando comparamos com o grupo controlo de animais tratados com NLC placebo (Nordin *et al.*, 2018). Importa referir que o aumento de CD4 / CD3 e CD8 / CD3, nos esplenócitos tratados com NLC contendo citral e citral, indica que esses tratamentos induzem o efeito imunomodulador nos animais tratados (Nordin *et al.*, 2018).

Segundo os autores Kakkar *et al.*, as SLN desenvolvidas para veicular o cetoconazol são seguras para ser instiladas no globo ocular, pois não causam irritação e edema na mucosa ocular (Kakkar *et al.*, 2015). Adicionalmente, Kakkar *et al.* analisaram os cortes transversais da córnea, retina e conjuntiva do olho do rato exposto às SLN contendo

cetoconazol e confirmaram que a integridade do tecido estava intacta, não existindo sinais de reações adversas. Nenhuma inflamação ou dano foi observada na retina, evidenciando a biocompatibilidade ocular da formulação desenvolvida (Kakkar *et al.*, 2015).

Tabela 8 – Avaliação *in vivo* da segurança/toxicidade das formulações de nanopartículas lipídicas

Composição da formulação	Molécula de direcionamento	Substância ativa encapsulada	Animal estudado	Via de administração	Efeito fisiopatológico observado	Referência bibliográfica
Monoestearato de glicerilo, triestearato de glicerol e colato de sódio e água desionizada	Não incluído	β -elemeno (β -E)	Ratos machos BALB portadores de glioma cerebral U87	Via intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> • O β-E consegue atravessar mais facilmente a BHE que os outros tecidos de órgão analisados, similarmente ao verificado com a formulação SLN-β. • A concentração máxima de SLN-β no cérebro registada foi quase o dobro que a concentração β-E livre no cérebro. • Os animais tratados com β-E têm um tempo de sobrevivência significativamente menor do que os animais tratados com a SLN-β. • Não foram observadas alterações bioquímicas, fisiológicas e perda de peso nos animais 	(He <i>et al.</i> , 2019)

					testados.	
Óleo de palma hidrogenado, Lipoid S-100 (fosfatidilcolina), Azeite, D-Sorbitol, Timerosal, Tween [®] 80 e água bidestilada.	Não incluído	Citral	Ratos machos BALB com sete semanas	Via oral	<ul style="list-style-type: none"> • Não foram registadas mortes de animais durante o estudo, nem alterações no peso dos animais testados; embora existisse uma pequena alteração nos níveis dos marcadores bioquímicos os investigadores não a consideraram significativa para o estudo. • O nível de óxido nítrico (NO analisado no baço tratado com NLC-citral foi significativamente menor em comparação com os NLC-placebo. • Nos ensaios de imunofenotipagem observou-se que existe um aumento das populações de células T CD4/CD3 e T CD8/CD3 nos animais tratados com 	(Nordin <i>et al.</i> , 2018)

					citral e NLC-citral em comparação com os resultados nos NLC-placebo.	
Compritol [®] 888 ATO (behenato de glicerilo), Phospholipon 90G (fosfatidilcolina estabilizada com 0,1% palmitato de ascorbilo), PEG 600, Tween [®] 80 e água bidestilada	Não incluído	Cetoconazol (KTZ)	Globo ocular esquerdo de rato	Via ocular	<ul style="list-style-type: none"> • Cortes transversais da retina, conjuntiva e córnea do rato demonstraram que as KTZ-SLN não provocam nenhum efeito adverso quando expostas durante 10, 30, 120 minutos. 	(Kakkar <i>et al.</i> , 2015)

Abreviaturas: BHE – Barreira hematoencefálica; KTZ-SLN – Nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com cetoconazol; NO – óxido nítrico; PEG- Polietilenoglicol; SLN-β – Nanopartícula lipídica sólida carregada com β-elemeno; β-E - β-elemeno.

4. Conclusão

A Nanomedicina é uma área em constante evolução e o recurso aos nanossistemas lipídicos revela-se promissor no que respeita ao direcionamento dos fármacos para o local alvo, minimizando os efeitos adversos que estes possam causar.

Ao longo deste trabalho foram descritos alguns exemplos que demonstram a potencialidade dos nanossistemas lipídicos, sendo quase impossível a não rendição a esta nova realidade, não só pela segurança que este tipo de nanossistema nos proporciona, mas também pelo aspeto promissor em tratamentos mais eficazes, permitindo que a substância ativa seja libertada de forma controlada.

Com este trabalho concluo que a utilização dos nanossistemas lipídicos na veiculação de fármacos é segura e eficaz, devido a estes serem compostos por substâncias biocompatíveis e biodegradáveis e possuem a vantagem de conseguirem reduzir os efeitos adversos provocados pelos fármacos.

As expectativas são elevadas e os investimentos nesta área demonstram a confiança e a esperança que a sociedade coloca nas nanotecnologias, abrindo portas para o prosseguimento da investigação e desenvolvimento de alternativas que vão de encontro com a satisfação das dificuldades encontradas nas formulações convencionais.

No entanto, apesar dos progressos conseguidos ao nível da otimização destes nanossistemas lipídicos, a pesquisa deve continuar no sentido de responder às exigências da indústria farmacêutica, para que seja possível a introdução de novas formulações mais atrativas e com o efeito terapêutico desejado para os consumidores.

Na minha perspetiva considero que o nanossistema lipídico mais promissor será os NLC, uma vez que, estes podem ser facilmente transponíveis para escala industrial, possuem baixos custos de produção, teoricamente, conseguem aprisionar uma maior quantidade de substância ativa no seu interior e são biocompatíveis e biodegradáveis.

Como perspetivas futuras espera-se que os estudos realizados *in vitro* e *in vivo* possam incluir os efeitos tóxicos dos nanossistemas lipídicos sem substâncias ativas, uma vez que na elaboração deste trabalho constato a escassez de bibliografia no que concerne a

avaliação da segurança/toxicidade provocada pelos nanossistemas lipídicos (sem fármaco) no organismo.

5. Referências bibliográficas

- Abo Aasy, N. K., Ragab, D., Sallam, M. A., *et al.* (2019). A comparative study: the prospective influence of nanovectors in leveraging the chemopreventive potential of COX-2 inhibitors against skin cancer. *Int J Nanomedicine*, 14 pp. 7561-7581.
- Ahamed, M. (2011). Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro*, 25 (4), pp. 930-936.
- Alam, P., Shakeel, F., Anwer, M. K., *et al.* (2018). Wound Healing Study of Eucalyptus Essential Oil Containing Nanoemulsion in Rat Model. *J Oleo Sci*, 67 (8), pp. 957-968.
- Anuchapreeda, S., Fukumori, Y., Okonogi, S., *et al.* (2012). Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy. *Journal of Nanotechnology*, 2012 pp. 270-383.
- Bahadori, F., Kocyigit, A., Onyuksel, H., *et al.* (2017). Cytotoxic, Apoptotic and Genotoxic Effects of Lipid-Based and Polymeric Nano Micelles, an In Vitro Evaluation. *Toxics*, 6 (1), pp. 1-19.
- Bangham, A. D. and Horne, R. W. (1964). Negative Staining Of Phospholipids And Their Structural Modification By Surface-Active Agents As Observed In The Electron Microscope. *J Mol Biol*, 8 pp. 660-668.
- Bardania, H., Tarvirdipour, S. and Dorkoosh, F. (2017). Liposome-targeted delivery for highly potent drugs. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 45 (8), pp. 1478-1489.
- Bilia, A. R., Piazzini, V., Risaliti, L., *et al.* (2019). Nanocarriers: A Successful Tool to Increase Solubility, Stability and Optimise Bioefficacy of Natural Constituents. *Curr Med Chem*, 26 (24), pp. 4631-4656.
- Bozzuto, G. and Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 10 pp. 975-999.
- Brand, W., Noorlander, C. W., Giannakou, C., *et al.* (2017). Nanomedicinal products: a survey on specific toxicity and side effects. *Int J Nanomedicine*, 12 pp. 6107-6129.
- Das, M., Howell, M., Foran, E. A., *et al.* (2017). Sertoli Cells Loaded with Doxorubicin in Lipid Micelles Reduced Tumor Burden and Dox-Induced Toxicity. *Cell Transplant*, 26 (10), pp. 1694-1702.
- Das, S. and Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12 (1), pp. 62-76.
- De Godoi, S. N., Quatrin, P. M., Sagrillo, M. R., *et al.* (2017). Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing Eucalyptus globulus Oil. *Biomed Res Int*, 2017 pp. 1-10.

- De Oliveira Silva, J., Fernandes, R. S., Ramos Oda, C. M., *et al.* (2019). Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. *Biomed Pharmacother*, 118 pp. 109-323.
- Dhawan, A. and Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal Bioanal Chem*, 398 (2), pp. 589-605.
- Días-Torres, R. (2010). Current Technologies to Increase the Transdermal Delivery of Drugs. In: Escobar-Chávez, J. J. (ed.) *Transdermal Nanocarriers*. Sarjah: Benthan Science Publishers Ltd, pp. 120-141.
- Doktorovova, S., Kovacevic, A. B., Garcia, M. L., *et al.* (2016). Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*, 108 pp. 235-252.
- Duncan, R. and Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*, 8 (6), pp. 2101-2141.
- Fadeel, B., Bussy, C., Merino, S., *et al.* (2018). Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment. *ACS Nano*, 12 (11), pp. 10582-10620.
- Gaspar, R. and Duncan, R. (2009). Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 61 (13), pp. 1220-1231.
- He, H., Yao, J., Zhang, Y., *et al.* (2019). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system to across the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 519 (2), pp. 385-390.
- Hort, M. A., Alves, B. D. S., Ramires Junior, O. V., *et al.* (2019). In vivo toxicity evaluation of nanoemulsions for drug delivery. *Drug Chem Toxicol*, pp. 1-10.
- Hou, X., Cao, B., He, Y., *et al.* (2019). Improved self-assembled micelles based on supercritical fluid technology as a novel oral delivery system for enhancing germacrone oral bioavailability. *Int J Pharm*, 569 pp. 118-586.
- Hua, S. and Vaughan, B. (2019). In vitro comparison of liposomal drug delivery systems targeting the oxytocin receptor: a potential novel treatment for obstetric complications. *Int J Nanomedicine*, 14 pp. 2191-2206.
- Ibrahim, Y. H. Y., Regdon, G., Jr., Hamedelniei, E. I., *et al.* (2019). Review of recently used techniques and materials to improve the efficiency of orally administered proteins/peptides. *Daru*, pp. 403-416.
- Jin, W., Tan, X., Wen, J., *et al.* (2019). A Novel Dantrolene Sodium-Loaded Mixed Micelle Containing a Small Amount of Cremophor EL: Characterization, Stability, Safety and Pharmacokinetics. *Molecules*, 24 (4), pp. 728-739.
- Kakkar, S., Karuppayil, S. M., Raut, J. S., *et al.* (2015). Lipid-polyethylene glycol based nano-ocular formulation of ketoconazole. *Int J Pharm*, 495 (1), pp. 276-289.

- Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., *et al.* (2010). Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 393 (4), pp. 649-655.
- Lebron, J. A., Ostos, F. J., Lopez-Lopez, M., *et al.* (2020). Metallo-Liposomes of Ruthenium Used as Promising Vectors of Genetic Material. *Pharmaceutics*, 12 (5), pp. 482-499.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., *et al.* (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*, 111 (4), pp. 455-460.
- Li, N., Xie, X., Hu, Y., *et al.* (2019). Herceptin-conjugated liposomes co-loaded with doxorubicin and simvastatin in targeted prostate cancer therapy. *Am J Transl Res*, 11 (3), pp. 1255-1269.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., *et al.* (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 1 pp. 149-173.
- Lopes, C. M., Silva, J., Real Oliveira, M. E. C. D., *et al.* (2018). Lipid-based colloidal carriers for topical application of antiviral drugs. *In: Grumezescu, A. M. (ed.) Design of nanostructures for versatile therapeutic applications* Elsevier, pp. 565-622.
- Lúcio, M., Lima, J. L. and Reis, S. (2010). Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, 17 (17), pp. 1795-1809.
- Mazzeo, A. and Santos, E. J. C. (2018). Nanotechnology and multipotent adult progenitor cells in Reparative Medicine: therapeutic perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*, 16 (4), pp. 1-6.
- Mehnert, W. and Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 47 (2-3), pp. 165-196.
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett*, 10 (4), pp. 711-719.
- Müller, R. H., Mäder, K. and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 50 (1), pp. 161-177.
- Müller, R. H., Shegokar, R. and Keck, C. M. (2011). 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol*, 8 (3), pp. 207-227.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., *et al.* (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761), pp. 622-627.
- Nordin, N., Yeap, S. K., Zamberi, N. R., *et al.* (2018). Characterization and toxicity of citral incorporated with nanostructured lipid carrier. *PeerJ*, 6 pp. 3916-3935.

- Pardeike, J., Hommoss, A. and Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*, 366 (1-2), pp. 170-184.
- Paschoalino, M. P., Marccone, G. P. S. and Jardim, W. F. (2010). Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*, 33 pp. 421-430.
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., *et al.* (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, 11 (3), pp. 2313-2381.
- Pinheiro, M., Lúcio, M., Lima, J. L., *et al.* (2011). Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. *Nanomedicine (Lond)*, 6 (8), pp. 1413-1428.
- Prasad, M., Lambe, U. P., Brar, B., *et al.* (2018). Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomed Pharmacother*, 97 pp. 1521-1537.
- Sangsuriyawong, A., Limpawattana, M., Siriwan, D., *et al.* (2019). Properties and bioavailability assessment of shrimp astaxanthin loaded liposomes. *Food Sci Biotechnol*, 28 (2), pp. 529-537.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., *et al.* (2014). Optimization and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. *Journal of Physical Science*, pp. 59-75.
- Sharma, N., Mayank, B., Visht, S., *et al.* (2010). Nanoemulsion: A new concept of delivery system. *Chronicles of Young Scientists*, 1 pp. 1-6.
- Silva, A. C., Santos, D., Ferreira, D., *et al.* (2012). Lipid-based nanocarriers as an alternative for oral delivery of poorly water- soluble drugs: peroral and mucosal routes. *Current medicinal chemistry*, 19 (26), pp. 4495-4510.
- Silva, A. H. (2011). Estratégias para a avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados. Mestrado, *Universidade Federal de Santa Catarina*, pp. 1-137
- Smith, C. J., Shaw, B. J. and Handy, R. D. (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82 (2), pp. 94-109.
- Tavares, M., Da Silva, M. R. M., De Oliveira De Siqueira, L. B., *et al.* (2018). Trends in insect repellent formulations: A review. *Int J Pharm*, 539 (1-2), pp. 190-209.
- Torchilin, V. P. (2007). Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24 (1), pp. 1-16.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., *et al.* (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160 (1), pp. 1-40.
- Wang, F., Gao, F., Lan, M., *et al.* (2009). Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol In Vitro*, 23 (5), pp. 808-815.

- Webster, R., Didier, E., Harris, P., *et al.* (2007). PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 35 (1), pp. 9-16.
- Winter, E., Dal Pizzol, C., Locatelli, C., *et al.* (2016). Development and Evaluation of Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Study of Toxicity In, Vitro and In Vivo. *J Nanosci Nanotechnol*, 16 (2), pp. 1321-1330.
- Wooster, T. J., Golding, M. and Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24 (22), pp. 12758-12765.
- Yuan, J., Zeng, C., Cao, W., *et al.* (2019). Bufalin-Loaded PEGylated Liposomes: Antitumor Efficacy, Acute Toxicity, and Tissue Distribution. *Nanoscale Res Lett*, 14 (1), pp. 223-233.
- Zhang, R., Niu, Y., Li, Y., *et al.* (2010). Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, 30 (1), pp. 52-60.