

Alexandra de Lurdes Pacheco Garcês

Sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016



Alexandra de Lurdes Pacheco Garcês

Sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Alexandra de Lurdes Pacheco Garcês

Sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas

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

---

## Sumário

As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas no início dos anos 90 e, atendendo às vantagens que apresentam comparativamente a outros sistemas coloidais, têm-se demonstrado muito promissoras, tanto para uso cosmético como farmacêutico. No entanto, atualmente apenas existem comercializados produtos cosméticos à base de nanopartículas lipídicas, o que pode ser justificado pelas restrições regulamentares relacionadas com a introdução de medicamentos no mercado. Existem dois tipos de nanopartículas lipídicas, as nanopartículas de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles, SLN*) e os vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers, NLC*), consistindo ambos em dispersões aquosas de nanopartículas sólidas. A baixa viscosidade destes sistemas dificulta a sua aplicação tópica. Neste contexto, têm sido desenvolvidas várias formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas para aplicação tópica, nomeadamente cutânea, ocular, nasal e vaginal.

A primeira parte desta dissertação consiste na revisão bibliográfica relativa ao estado da arte dos sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas, para uso farmacêutico e cosmético, baseada nos estudos realizados por diversos autores, entre 2012 e 2016. Na segunda parte, são apresentados resultados do trabalho experimental relativo ao desenvolvimento e caracterização de uma formulação semissólida à base de nanopartículas lipídicas.

**Palavras-chave:** formulações semissólidas, nanopartículas lipídicas, SLN, NLC.

## **Abstract**

The lipid nanoparticles were developed in early 90's and, due to the advantages that they exhibit comparatively to the others colloidal systems; they have been demonstrated very promising for both cosmetic and pharmaceutical applications. However, currently there are only cosmetic products based on lipid nanoparticles on the market, which can be explained by the regulatory constraints related to the introduction of medicines on the market. There are two types of lipid nanoparticles, solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC), consisting both in aqueous dispersions of solid nanoparticles, which difficult its topical application. Thus, it has been developed several semi-solid formulations based on lipid nanoparticles for topical application, namely for cutaneous, ocular, nasal and vaginal administration.

The first part of the present dissertation provides the state of the art of semi-solids systems based on lipid nanoparticles for pharmaceutical and cosmetic applications, taking into account studies performed by various authors, between 2012 and 2016. In the second part, the results of experimental work on the development and characterization of a semi-solid formulation based on lipid nanoparticles are presented.

**Keywords:** semi-solid formulations, lipid nanoparticles, SLN, NLC.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Catarina Silva, pela disponibilidade, apoio, dedicação, acompanhamento, confiança, críticas construtivas, orientação científica e conselhos ao longo de todo o período de desenvolvimento desta monografia. Todo o acompanhamento e disponibilidade facilitaram a tarefa de desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora, a Professora Doutora Carla Martins Lopes, pela disponibilidade, apoio, críticas construtivas e ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada por me terem ajudado e acompanhado nesta etapa final do meu percurso académico, pela paciência, simpatia e por toda a motivação que me passaram.

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

Aos técnicos do CERLAB pela simpatia e acessibilidade de utilização de material.

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

Agradeço aos meus pais, por todo o acompanhamento e apoio incondicional durante todo o meu período académico. Agradeço pela paciência, força e motivação que sempre me deram. Agradeço por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e, principalmente, por acreditarem em mim.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a concretizar este sonho.

## Índice

<b>I. Introdução</b> .....	1
<b>II. Sistemas semissólidos</b> .....	3
<b>III. Nanopartículas lipídicas</b> .....	8
1. Nanopartículas de lípidos sólidos ( <i>Solid Lipid Nanoparticles, SLN</i> ) .....	13
2. Vetores lipídicos nanoestruturados ( <i>Nanostructured Lipid Carriers, NLC</i> ) .....	15
3. Métodos de produção .....	17
4. Caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas .....	22
<b>IV. Sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas</b> .....	24
i. Exemplos para aplicação cosmética e farmacêutica .....	24
1. Uso cosmético .....	25
2. Uso farmacêutico .....	29
<b>V. Trabalho Experimental</b> .....	39
1. Objetivos.....	39
2. Matérias-primas .....	39
3. Métodos .....	40
4. Resultados e Discussão .....	44
<b>VI. Conclusões e perspectivas</b> .....	51
<b>VII. Bibliografia</b> .....	53



## Índice de figuras

Figura 1: Matriz lipídica cristalina quase perfeita das SLN .....	13
Figura 2: Matriz lipídica com muitas imperfeições dos NLC .....	15
Figura 3: Representação esquemática do processo de produção de nanopartículas lipídicas por homogeneização a alta pressão (HPH), a quente e a frio.....	20
Figura 4: Comportamento reológico da pomada hidrófila após incorporação das SLN incorporadas, nos dias 7 e 30 .....	47
Figura 5: Comportamento reológico do hidrogel placebo e do hidrogel contendo SLN incorporadas, nos dias 7 e 30 .....	48
Figura 6: Pomada hidrófila com SLN incorporadas após o primeiro (à esquerda) e o segundo (à direita) ciclo de centrifugação .....	49
Figura 7: Hidrogel com SLN incorporadas após o primeiro (à esquerda) e o segundo (à direita) ciclo de centrifugação .....	50

## Índice de tabelas

Tabela 1: Exemplos de excipientes hidrófobos utilizados na preparação de formas farmacêuticas semissólidas.....	4
Tabela 2: Exemplos de excipientes água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) utilizados na preparação de formas farmacêuticas semissólidas.....	4
Tabela 3: Exemplos de excipientes hidrófilos utilizados na preparação de formas farmacêuticas semissólidas.....	5
Tabela 4: Exemplos de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas para aplicação em cosmética.....	25
Tabela 5: Exemplos de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas para aplicação farmacêutica.....	30
Tabela 6: Composição das dispersões aquosas de SLN.....	40
Tabela 7: Composição (% , m/m) das bases utilizadas para incorporação das SLN preparadas.....	42
Tabela 8: Tamanho de partícula (Z-ave e LD), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das dispersões de SLN, preparadas pela técnica da HPH a quente e dos ultrassons.....	44
Tabela 9: Avaliação do aspeto físico da formulação quanto à proporção adequada de base semissólida:dispersão de SLN para aplicação tópica.....	46

## **Lista de abreviaturas**

AVO: Avobenzona

A/O: Óleo em água

DHHB: Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato

DLS: Dispersão dinâmica de luz, do inglês *Dynamic light scattering*

DSC: Calorimetria de varrimento diferencial, do inglês *Differential scanning calorimetry*

EHT: Etil-hexiltriazona

FB: Flurbiprofeno

GRAS: Seguro para utilização em humanos, do inglês *Generally recognized as safe*

HPH: Homogeneização a alta pressão, do inglês *High pressure homogenization*

IM: Intramuscular

IV: Intravenosa

LD: Difractometria de laser, do inglês *Laser diffractometry*

NLC: Vetores lipídicos nanoestruturados, do inglês *Nanostructured lipid carriers*

O/A: Óleo em água

OMC: Octil-metoxicinamato

PCS: Espectroscopia de correlação de fótons, do inglês *Photon correlation spectroscopy*

PEG: Polietilenoglicol

PI: Índice de polidispersão, do inglês *Polidispersity index*

PVP: Polivinilpirrolidona

SC: Subcutânea

SEM: Microscopia eletrônica de varrimento, do inglês *Scanning electron microscopy*

SER: Sistema reticuloendotelial

SLN: Nanopartículas de lípidos sólidos, do inglês *Solid lipid nanoparticles*

SNC: Sistema nervoso central

TEM: Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês *Transmission electron microscopy*

UV: Ultravioleta

ZP: Potencial zeta, do inglês *Zeta potential*

## I. Introdução

As nanopartículas lipídicas surgiram nos anos 90 e, uma vez que apresentam vantagens significativas comparativamente a outros sistemas coloidais, têm sido alvo de intensa investigação, principalmente no meio acadêmico. Atualmente, as nanopartículas lipídicas são apenas comercializadas em produtos cosméticos, embora continuem a ser realizados estudos com o objetivo de avaliar o seu potencial para aplicação farmacêutica. Existem dois tipos de nanopartículas lipídicas, as nanopartículas de lípidos sólidos (SLN, do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*) e os vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*). Tanto as SLN como os NLC podem funcionar como transportadores de fármacos e ingredientes ativos cosméticos, ou como agentes hidratantes e filtros solares físicos, se aplicadas isoladamente, ou seja, sem substâncias encapsuladas (Müller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011b).

Do ponto de vista da tecnologia farmacêutica, as SLN e os NLC são sistemas coloidais que consistem em dispersões aquosas de nanopartículas sólidas à temperatura ambiente e corporal, apresentando baixa viscosidade para aplicação tópica (por ex. nas formulações para administração cutânea ou oftálmica). Desta forma, a preparação de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas tem sido usada como estratégia para solucionar o problema. Geralmente, estes sistemas possuem uma consistência adequada, o que facilita a adesão ao local de aplicação. Os sistemas semissólidos mais usados em formulações à base de nanopartículas lipídicas são cremes, geles e nanoemulgeles, que possuem viscosidade suficiente para facilitar a sua aplicação tópica (Prista *et al.*, 2014; Tichota *et al.*, 2014).

A presente dissertação teve como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica relativa ao estado da arte dos sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas, para aplicação cosmética e farmacêutica, assim como proceder à preparação laboratorial e caracterização de uma formulação deste tipo. Neste sentido, o trabalho experimental desenvolvido visou a preparação e caracterização de uma formulação semissólida à base de nanopartículas lipídicas, que tem como função promover a hidratação da pele.

Para elaborar o estado da arte, recorreu-se à pesquisa e análise de artigos científicos publicados no Google académico e Pubmed, e à pesquisa e análise de livros impressos e no Google livros. As palavras-chave utilizadas durante a pesquisa foram: “lipid nanoparticles”, “nanostructured lipid carriers”, “solid lipid nanoparticles”, “production methods for lipid nanoparticles”, “lipid nanoparticle cream”, “lipid nanoparticle semi-solid”, “lipid nanoparticle hydrogel”. A pesquisa realizou-se no espaço temporal compreendido entre 1998 e 2016, sendo este reduzido aos anos compreendidos entre 2012 e 2016 para apresentar os resultados dos estudos experimentais.

## II. Sistemas semissólidos

Os sistemas semissólidos são formas farmacêuticas com aspeto homogêneo e consistência mole, que podem ser utilizados quer para administração tópica ou sistémica de fármacos quer com a finalidade de proteção ou hidratação do local de aplicação (Infarmed, 2008). As propriedades plásticas apresentadas permitem que esta forma farmacêutica sofra uma modificação da consistência aquando da aplicação de uma força mecânica mínima e, devido à tixotropia inerente a este tipo de sistemas, quando a força cessa, a preparação volta a adquirir uma consistência com valores próximos dos normais. Uma vez que a viscosidade dos sistemas semissólidos tende a diminuir com o aumento da temperatura, diz-se que são termorreversíveis. Estes sistemas devem possuir um certo grau de adesividade, para que seja possível a sua fixação ao local de aplicação (Prista *et al.*, 2014).

Os excipientes utilizados nas formulações semissólidas são de elevada importância, podendo afetar a ação do fármaco ou ingrediente ativo cosmético incorporado. Os excipientes são vulgarmente classificados quanto à sua afinidade com a água, visto que esta é considerada o solvente universal, assim como o principal constituinte do organismo. Se os excipientes não apresentarem afinidade com a água são designados por hidrófobos (Tabela 1) e possuem capacidade de oclusão; se forem capazes de absorver uma quantidade de água são designados por excipientes água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (Tabela 2); quando possuem afinidade com a água mas têm a capacidade de incorporar uma quantidade de gorduras são designados por excipientes óleo em água (O/A) (Tabela 2) e não apresentam capacidade oclusiva; quando são excipientes com uma elevada afinidade com a água são designados de excipientes hidrófilos (Tabela 3) (Prista *et al.*, 2014; Fox, 2014).

**Tabela 1:** Exemplos de excipientes hidrófobos utilizados na preparação de formas farmacêuticas semissólidas (Prista *et al.*, 2014).

<b>Hidrocarbonetos</b>	Vaselina e parafina (líquida e sólida)
	Ozocerite e cera microcristalina
<b>Ácidos gordos</b>	Saturados: ácido esteárico, ácido palmítico
	Insaturados: ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico
<b>Ésteres não glicerídicos</b>	Cetióis <sup>®</sup> : oleato de oleilo, miristato de isopropilo
	Ceras
<b>Triglicerídeos</b>	Óleos: vegetais (óleo de amêndoas, óleo de soja) e sintéticos (silicones, derivados do petróleo)
	Óleos hidrogenados: óleo de sementes de algodão
<b>Silicones</b>	Ciclometicone e dimeticone

**Tabela 2:** Exemplos de excipientes água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) utilizados na preparação de formas farmacêuticas semissólidas (Prista *et al.*, 2014).

<b>Excipientes A/O</b>	<b>Álcoois gordos</b>	Cetílico, estearílico e cetosteárico
	<b>Lanolina</b>	
	<b>Derivados da lanolina</b>	Lanolina anidra (< 1% água)
		Lanolina modificada: hidrófila, hidratada, líquida, dura, hidrogenada
		Lanolina fracionada: ácidos gordos e álcoois gordos
	<b>Não iônicos</b>	Monoésteres de álcoois bi e tri hidroxilados: monoestearato de glicerilo, ésteres do propilenoglicol (monoésteres do ácido láurico, esteárico, oleico), ésteres do dietilenoglicol (monolaurato)
		Ésteres do sorbitol (SPANS <sup>®</sup> ): monoleato de sorbitano (SPAN <sup>®</sup> 80), monoestearato de sorbitano (SPAN <sup>®</sup> 60)
		Di e tri ésteres da sacarose
<b>Aniônicos</b>	Sabões alcalinos bivalentes: oleato ou estearato de cálcio ou magnésio	



<b>Excipientes O/A</b>	<b>Aniônicos</b>	Sabões alcalinos: monoestearato de potássio, sódio
		Sabões de etanolaminas: trietanolamina, dietanolamina
		Compostos sulfatados: laurilsulfato de sódio
		Compostos sulfonados
	<b>Não iônicos</b>	Ésteres de álcoois poli-hídricos: ésteres de glicerina (monoestearato de glicerilo autoemulsionado), ésteres do propilenoglicol e dietilenoglicol (monolaurato, monooleato, monoestearato)
		Derivados do polietilenoglicol (PEG): polissorbatos (TWEEN®), ésteres de PEG (monoestearato de polioxietileno), éteres de PEG (éter oleílico de PEG, éter cetílico de PEG)
		Monoésteres da sacarose (monolaurato de sacarose)
	<b>Catiônicos</b>	Compostos de amônio quaternário: cloreto de benzalcônio e cetrimida.
	<b>Anfotéricos</b>	Derivados de aminoácidos e de sarcosinas, betaínas e lecitinas

**Tabela 3:** Exemplos de excipientes hidrófilos utilizados na preparação de formas farmacêuticas semissólidas (Prista *et al.*, 2014).

<b>Poliálcoois</b>	Glicerol (glicerina®), propilenoglicol, sorbitol
<b>Polietilenoglicóis</b>	PEG 200, 300, 400 (líquidos) PEG 1000, 1500 (semissólidos) PEG 4000, 6000 (sólidos)
<b>Agentes espessantes e gelificantes</b>	Gomas: adraganta, karaya, xantana, arábica
	Derivados da celulose: metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, hidroxipropilmetilcelulose
	Argilas: bentonite
	Polímeros sintéticos: carbómero (Carbopol®), polivinilpirrolidona (PVP), poloxamer (Pluronic®)

As formas farmacêuticas semissólidas podem ser classificadas quanto à ação terapêutica e quanto aos excipientes utilizados (Prista *et al.*, 2014). Relativamente à ação terapêutica, podem ser divididas em três tipos: epidérmicas, quando apresentam fraco

ou nenhum poder de penetração cutânea; endodérmicas, quando são capazes de penetrar na epiderme e exercer o seu efeito em camadas mais profundas; e diadérmicas, quando apresentam elevada capacidade de penetração cutânea e os fármacos conseguem alcançar a corrente sanguínea, tomando estas preparações a designação de transdérmicas (Prista *et al.*, 2014).

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9, quando as formas farmacêuticas semissólidas são classificadas quanto aos excipientes utilizados, podem ser divididas em pomadas propriamente ditas, cremes, geles, pastas, cataplasmas e emplastos medicamentosos (Infarmed, 2008). As pomadas propriamente ditas caracterizam-se por serem formas untuosas e possuírem excipientes de fase única. As pomadas propriamente ditas podem ainda ser classificadas em três tipos (Infarmed, 2008; Prista *et al.*, 2014; Fox, 2014): i) hidrófobas, capazes de absorver pequenas quantidades de água e constituídas por excipientes hidrófobos; ii) absorventes de água, constituídas por excipientes hidrófobos e excipientes A/O e O/A, sendo capazes de absorver uma quantidade de água considerável; iii) hidrófilas, constituídas por excipientes hidrófilos.

Os cremes são sistemas que apresentam duas fases, uma hidrófila e uma hidrófoba, podendo encontrar-se na fase interna ou descontínua tanto a fase hidrófila (creme água em óleo, A/O ou creme hidrófobo), como a fase hidrófoba (creme óleo em água, O/A ou creme hidrófilo) (Infarmed, 2008; Prista *et al.*, 2014; Fox, 2014).

Os geles são sistemas de fase única, que formam uma estrutura reticular em contacto com a água (mais comum) ou um óleo, intumescendo e aumentando de tamanho, apresentando um aspeto final de gel, contendo as moléculas de fármaco ou ingrediente ativo cosmético nos interstícios da rede polimérica. São constituídos por líquidos gelificados por agentes gelificantes adequados, que podem ser excipientes hidrófilos (mais comum) ou hidrófobos (Infarmed, 2008; Prista *et al.*, 2014; Fox, 2014).

As pastas, os cataplasmas e os emplastos medicamentosos são formas farmacêuticas semissólidas que não serão abordadas uma vez que se encontram fora do âmbito deste trabalho.

Nos sistemas semissólidos, as moléculas de fármaco são libertadas, com maior ou menor dificuldade, consoante a atividade termodinâmica. Quanto maior for a atividade termodinâmica, mais facilmente o fármaco se liberta do veículo. A viscosidade do veículo também afeta a libertação do fármaco de uma forma inversamente proporcional, ou seja, quanto menor for a viscosidade do veículo, maior será a difusão do fármaco (Prista *et al.*, 2014; Fox, 2014). Além disso, quando se pretende obter uma absorção sistémica, é importante considerar o coeficiente de partilha óleo/água do fármaco, uma vez que este deve ter a capacidade de se dissolver nos líquidos do organismo (Fox, 2014).

Os ensaios de controlo da qualidade das formas farmacêuticas semissólidas, designadamente, dos cremes e dos geles, incluem a avaliação das características organolépticas (aspeto, cor e odor), determinação do pH, avaliação do perfil de libertação dos fármacos ou ingredientes ativos veiculados, determinação da consistência por penetrometria, viscosimetria, plasticidade, espalmabilidade e texturometria (Infarmed, 2008; Prista *et al.*, 2014).

### III. Nanopartículas lipídicas

A veiculação de fármacos em formas farmacêuticas convencionais (por ex. comprimidos, cápsulas, pomadas, cremes, soluções e suspensões) nem sempre permite obter um efeito terapêutico satisfatório, sendo cada vez mais evidentes as suas desvantagens, tais como (Mehnert e Mäder, 2001; Silva *et al.*, 2015): veiculação de uma quantidade insuficiente de fármaco; rápida metabolização e/ou eliminação do fármaco, podendo comprometer a eficácia do tratamento; baixa solubilidade dos fármacos em meio aquoso; elevada variação dos níveis plasmáticos de fármaco, principalmente após a administração oral. Perante estas constatações, surgiu a necessidade de desenvolver sistemas mais adequados, que permitissem modular a libertação dos fármacos veiculados. As nanopartículas lipídicas são um bom exemplo destes sistemas, as quais apresentam várias vantagens, quando usadas como transportadores de fármacos ou ingredientes ativos cosméticos, tais como (Mehnert e Mäder, 2001; Chattopadhyay *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Pardeike *et al.*, 2009; Patidar *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011b; Silva *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015): boa estabilidade físico-química, evitando a necessidade de recorrer a processos de secagem, como a liofilização ou a secagem por atomização; versatilidade; biocompatibilidade, uma vez que são constituídas por lípidos semelhantes aos fisiológicos; reduzida/ausência de toxicidade, porque na sua produção são utilizadas substâncias classificadas como seguras para utilização em humanos (GRAS, do inglês *Generally Recognized As Safe*); biodegradabilidade, apesar do tempo de biodegradação variar de acordo com a natureza dos lípidos e dos agentes tensoativos; libertação controlada e proteção das moléculas encapsuladas; possibilidade de veicular moléculas hidrófobas e hidrófilas, embora a eficácia de encapsulação reduza bastante nas últimas; baixo custo de produção e facilidade de transposição para a escala industrial; não utiliza solventes orgânicos durante o processo de produção, evitando o risco de existência de toxicidade residual na formulação final; possibilidade de direcionamento dos fármacos para os locais alvo da terapêutica. Ao nível cosmético, as nanopartículas lipídicas têm sido descritas como protetores solares eficazes, pois apresentam a vantagem de conferir proteção física contra as radiações UV, refletindo-as, atuando como filtros solares físicos. Além disso, exercem uma ação sinérgica quando encapsulam filtros solares químicos, assim como um tempo de duração do efeito protetor solar superior, uma vez que os filtros químicos são libertados mais lentamente. Por outro lado, as nanopartículas lipídicas conferem uma elevada adesividade à

superfície de aplicação, permitindo um tempo de residência superior à superfície da pele, promovendo também, desta forma, a ação protetora (Jain e Jain, 2010; Morabito *et al.*, 2011; Nikolić *et al.*, 2011).

As nanopartículas lipídicas são dispersões aquosas de nanopartículas, com tamanhos compreendidos entre 40 e 1000 nm (Pardeike *et al.*, 2009). O desenvolvimento destes sistemas tem como base o conceito das nanoemulsões do tipo O/A, nas quais se faz a substituição do lípido líquido (óleo) por um lípido que é sólido, às temperaturas ambiente e corporal (Müller *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). A substituição do lípido líquido por um sólido permite obter uma matriz sólida, que exerce um papel fundamental na modulação da cinética de libertação das moléculas, pois a mobilidade destas no seio da matriz sólida é menor, comparativamente à apresentada nas nanoemulsões, onde se utiliza apenas um lípido líquido (Mehnert e Mäder, 2001; Silva *et al.*, 2011b).

Como referido anteriormente, as SLN foram o primeiro tipo de nanopartículas lipídicas a ser desenvolvido, sendo constituídas por apenas um lípido sólido. Os NLC surgiram cerca de 10 anos mais tarde e a sua matriz é constituída por uma mistura de um lípido sólido com um lípido líquido, embora mantenham o aspeto exterior semelhante ao da matriz das SLN. Estes sistemas, para além dos lípidos, possuem uma fase aquosa e agentes tensioativos. Alguns exemplos de lípidos sólidos utilizados na produção de nanopartículas lipídicas são (Mehnert e Mäder, 2001; Wissing *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012b; Mendes, 2013; Silva *et al.*, 2015): triglicerídeos puros (triestearina, tripalmitina, trilaurina, trimistina), misturas de triglicerídeos, ceras (palmitato de cetilo, cera de abelha, cera de carnaúba), esteroides (colesterol), ácidos gordos (ácido esteárico, ácido palmítico) e monoésteres de álcoois hidroxilados (monoestearato de gliceril, palmitoestearato de gliceril, behenato de glicerilo). Como exemplos de lípidos líquidos usados na produção de NLC citam-se (Ricci *et al.*, 2005; Pardeike *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2010; Haag *et al.*, 2011; Puglia e Bonina, 2012; Mendes, 2013): triglicerídeos de cadeia média do ácido caprílico e cáprico (Mygliol<sup>®</sup> 812), ácido oleico, óleo de sésamo, labrasol<sup>®</sup>, labrafac<sup>®</sup> PG e o Cetiol<sup>®</sup> V. Os agentes tensioativos são utilizados com a finalidade de conferir estabilidade à dispersão de nanopartículas, prevenindo a sua agregação. Estes agentes estabilizantes podem ser iónicos (por ex. colato de sódio), não

iônicos (por ex. polissorbato 80, tyloxapol), anfotéricos (por ex. fosfatidilcolina) e poliméricos (por ex. álcool polivinílico) (Kovacevic *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). A estabilização conferida por moléculas carregadas (i.e. iônicas) é designada por electroestática, e a estabilização espacial conferida por moléculas sem carga (i.e. não iônicas, poliméricas) é designada por estérica (Mehnert e Mäder, 2001). A estabilização estérica e electroestática são complementares e, como tal, as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas devem conter ambos os tipos de agentes estabilizantes (Kovačević *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

A elevada variedade de lípidos e agentes tensioativos biocompatíveis disponíveis para a preparação de nanopartículas lipídicas tem tornado estes sistemas alvo de investigação para várias vias de administração farmacêutica (por ex. parenteral, oral, cutânea, ocular, pulmonar, nasal e vaginal) e para aplicações cosméticas (Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009).

Ao nível da administração parentérica, as nanopartículas lipídicas podem ser administradas pelas vias intravenosa (IV), intramuscular (IM) e subcutânea (SC), pois possuem um diâmetro médio inferior ao dos glóbulos vermelhos ( $< 1 \mu\text{m}$ ), não apresentando risco de formação de trombos. Podem funcionar como um sistema de libertação modificada, se administradas pelas vias SC ou IM, sendo o fármaco libertado lentamente, por difusão ou por erosão dos lípidos das nanopartículas (Müller *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011b). Uma das limitações associadas à administração IV é a opsonização, seguida da fagocitose por parte dos macrófagos presentes nas células dos órgãos do sistema reticuloendotelial (SRE), o que leva à rápida eliminação das nanopartículas da corrente sanguínea. No entanto, a acumulação em órgãos do SRE pode ser vantajosa quando se pretende o tratamento de doenças específicas desses órgãos. Para evitar este fenómeno têm sido desenvolvidas nanopartículas com modificações de superfície, resultantes da ligação ou adsorção de certas moléculas (por ex. polietilenoglicol ou anticorpos monoclonais, respetivamente) (Esposito *et al.*, 2015).

Quando administradas por via oral, as nanopartículas lipídicas vão aderir à parede intestinal, uma vez que possuem propriedades adesivas. Neste tipo de administração verifica-se a existência de um mecanismo promotor da absorção designado por “Efeito

Cavalo de Tróia”, que consiste na absorção intestinal do fármaco através de dois mecanismos: i) adesão das nanopartículas à parede intestinal, levando à rápida absorção do fármaco; ii) as nanopartículas sofrem um processo de degradação por ação das lipases e, ao serem misturadas com os sais biliares, vão ser absorvidas na forma de micelas. A administração por esta via possui a desvantagem de haver risco de destabilização das dispersões, por agregação de partículas devido ao meio ácido do estômago e à elevada carga iônica. No entanto, se se proceder à otimização da mistura lípido/tensioativo este problema pode ser ultrapassado (Silva *et al.*, 2011b; Silva *et al.*, 2012b).

A administração pulmonar não tem sido alvo de muita investigação, embora esteja descrito que as nanopartículas podem ser nebulizadas sem que se verifiquem alterações consideráveis do tamanho ou aglomeração das mesmas (Silva *et al.*, 2011b). Quando se utilizam lípidos com um ponto de fusão acima de 70°C, pode proceder-se à liofilização das dispersões permitindo a sua administração, na forma de pós para nebulização (Silva *et al.*, 2011b; Garud *et al.*, 2012; Attama *et al.*, 2012). Estudos comprovaram que a administração pulmonar de fármacos encapsulados em nanopartículas lipídicas aumenta o tempo de residência e a biodisponibilidade desses fármacos (Pandey *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2007; Nassimi *et al.*, 2010).

Relativamente à administração ocular, verifica-se um aumento da biodisponibilidade de fármacos lipófilos, pois a encapsulação em nanopartículas lipídicas promove a sua permeação ocular, através do aumento do tempo de residência na córnea, promovendo o efeito terapêutico. Estas características são observáveis devido à biocompatibilidade e mucoadesividade apresentadas pelas nanopartículas lipídicas (Üner, 2006; Silva *et al.*, 2011b; Garud *et al.*, 2012; Attama *et al.*, 2012).

A via nasal permite efetuar uma administração não invasiva dos fármacos e promover a sua absorção. Esta via tem sido sugerida como vantajosa para a administração de fármacos destinados ao tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC), nomeadamente ao nível cerebral, devido à possibilidade de transporte direto dos fármacos, através do epitélio nasal até ao cérebro (Shah *et al.*, 2015a; Singh *et al.*, 2015). A administração nasal de fármacos recorrendo a nanopartículas lipídicas permite

um aumento da especificidade (i.e. direcionamento para o local alvo da terapêutica), da biodisponibilidade e da eficácia do tratamento (Shah *et al.*, 2015a). Esta via de administração pode ser utilizada para veicular fármacos sensíveis às condições do trato gastrointestinal e que sofram efeito de primeira passagem, permitindo um início de ação e uma absorção rápida dos mesmos, o que faz dela uma via promissora (Chavan *et al.*, 2013).

Quando as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas são utilizadas na administração cutânea, verifica-se a formação de um filme oclusivo à superfície da pele, que está relacionado com as propriedades adesivas destas nanopartículas. Este filme oclusivo promove a hidratação da pele através de dois mecanismos, nomeadamente ao nível do estrato córneo, uma vez que impede a perda de água por evaporação e, por outro lado, fornece lípidos fisiológicos, reforçando a barreira lipídica da pele (Wissing e Müller, 2002; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011b; Attama *et al.*, 2012). A maior dificuldade da administração cutânea de fármacos é a obrigatoriedade de ultrapassar o estrato córneo, uma vez que quando a pele está íntegra, esta se comporta como uma barreira eficaz à permeação de compostos exógenos. No entanto, a passagem de moléculas por esta camada pode ser promovida utilizando nanopartículas lipídicas, uma vez que estas possuem um tamanho muito reduzido, promovendo o contacto com o estrato córneo e facilitando a absorção das moléculas (Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011b).

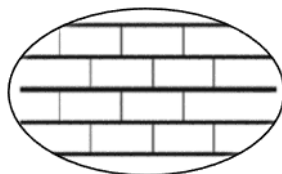
A utilização de nanopartículas lipídicas para administração vaginal tem sido alvo de estudos, uma vez que aumentam a capacidade de permeação do fármaco incorporado, favorecendo a terapêutica aplicada. Ultimamente as SLN têm sido alvo de estudo para aplicação vaginal, com o objetivo de verificar a eficácia das mesmas na veiculação de microbicidas preventivos da infeção pelo HIV (Alukda *et al.*, 2011).



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

As SLN constituem a primeira geração de nanopartículas lipídicas, que surgiu nos anos 90 com o objetivo de conjugar as vantagens e evitar as desvantagens apresentadas pelos sistemas coloidais convencionais (por ex. nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanoemulsões) para veiculação de fármacos e ingredientes ativos cosméticos (Mehnert e Mäder, 2001; Müller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011b).

A matriz lipídica das SLN (Figura 1) apresenta uma estrutura cristalina quase perfeita, comparada a um “muro de tijolos”, constituída por um lípido sólido ou por uma mistura de lípidos sólidos, na qual estão dissolvidas as substâncias a veicular, e é revestida por um ou dois agentes tensioativos, que conferem estabilidade ao sistema (Müller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011b; Mendes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).



**Figura 1:** Matriz lipídica cristalina quase perfeita das SLN (adaptado de (Silva *et al.*, 2011b)).

As dispersões aquosas de SLN podem ser constituídas por 0,1% a 30% de fase lipídica, sendo mais frequente a utilização de 5 a 10% de fase lipídica, e estabilizadas por 0,5% a 5% de agentes tensioativos (Pardeike *et al.*, 2009). Se a quantidade de lípidos sólidos for superior a 30% ocorre a formação de um creme em vez da dispersão aquosa. Por outro lado, se a quantidade de água presente se encontrar entre 99,9% e 70% poderá ser difícil a incorporação das dispersões de SLN em cremes convencionais, como referido na secção IV deste trabalho (Müller *et al.*, 2002).

Apesar de não ser consensual e de nem sempre se conseguir associar um modelo específico às SLN, existem três modelos teóricos que descrevem a estrutura e a forma de incorporação das moléculas na matriz das SLN, classificando-as em (Müller *et al.*,

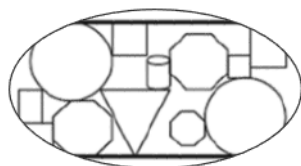
2002; Silva *et al.*, 2011b): i) SLN tipo I, designadas também por modelo da matriz homogénea, formado quando ocorre a incorporação de moléculas muito lipófilas nas SLN, originando nanopartículas com uma matriz na qual as moléculas se encontram homogeneamente dispersas no lípido; ii) as SLN tipo II, designadas por modelo parede de fármaco, em que ocorre separação de fases aquando do processo de arrefecimento, levando à formação de uma parede externa rica em moléculas de fármaco ou ingrediente ativo cosmético, fazendo com que não seja possível obter uma libertação modificada das mesmas; iii) as SLN tipo III, também designadas por modelo de núcleo de fármaco, onde, tal como no modelo anteriormente referido, ocorre uma separação de fases aquando do processo de arrefecimento, levando à formação de uma camada interna rica em fármaco ou ingrediente ativo cosmético, o que permite obter uma libertação controlada do mesmo mediada por um mecanismo de difusão.

Apesar das vantagens que as nanopartículas lipídicas possuem, as SLN apresentam também algumas desvantagens, tais como (Freitas e Müller, 1998; Müller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011b; Mendes *et al.*, 2013): capacidade de encapsulação limitada das moléculas no seio da matriz sólida; elevada quantidade de água presente (70,0-99,9%), que pode ser perdida por evaporação, ao longo do tempo, levando a um aumento da consistência da dispersão; problemas de estabilidade durante o armazenamento, relacionados com a expulsão das substâncias do interior das SLN, devido à ocorrência de alterações polimórficas na estrutura cristalina dos lípidos, originando uma matriz mais estável, assim como instabilidade física devido à agregação das nanopartículas.

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

Os NLC representam a segunda geração de nanopartículas lipídicas, que surgiu no início do século e, tal como as SLN, consistem numa dispersão aquosa de nanopartículas sólidas, cuja matriz é formada por uma mistura de um lípido líquido (óleo) com um lípido sólido, estabilizada por um ou dois tensioativos (Pardeike *et al.*, 2009; Tichota *et al.*, 2014). A mistura do lípido sólido e do lípido líquido deve ser feita numa proporção de 70:30 até 99,9:0,1, sendo que a quantidade máxima de lípidos deve ser de 30% (Müller *et al.*, 2002; Pardeike *et al.*, 2009). Apesar da matriz resultante da junção de um lípido líquido e um lípido sólido apresentar um ponto de fusão inferior comparativamente ao lípido sólido, a matriz mantém-se sólida às temperaturas ambiente e corporal (Müller *et al.*, 2002).

As NLC surgiram com o propósito de ultrapassar algumas desvantagens apresentadas pelas SLN (Müller *et al.*, 2002; Pardeike *et al.*, 2009). A junção de um lípido sólido e um lípido líquido origina uma matriz lipídica com muitas imperfeições, comparável a um “muro de pedras”, permitindo uma maior encapsulação das moléculas (Figura 2). Como os NLC possuem uma matriz sólida amorfa, o processo de recristalização é impedido, sendo a expulsão das substâncias durante o armazenamento evitada. Na matriz resultante da junção de um lípido sólido e um lípido líquido, as moléculas a encapsular encontram-se entre as cadeias de ácidos gordos, entre as camadas de lípidos e nas próprias imperfeições da matriz lipídica (Müller *et al.*, 2002; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2013).



**Figura 2:** Matriz lipídica com muitas imperfeições dos NLC (adaptado de (Silva *et al.*, 2011b)).

De modo semelhante ao que acontece com as SLN, as NLC são divididas em três tipos, de acordo com a estrutura interna da sua matriz lipídica (Müller *et al.*, 2002; Silva *et al.*,

2011b): i) NLC tipo I, definidas como modelo de cristal imperfeito, que possuem uma matriz com muitas imperfeições, resultante da junção de um lípido sólido com uma baixa quantidade de lípido líquido, o que permite encapsular uma maior quantidade de moléculas; ii) NLC tipo II, designadas por modelo amorfo, sendo constituídas por lípidos que não sofrem recristalização, originando uma matriz amorfa que minimiza a expulsão das moléculas ao longo do armazenamento; iii) NLC tipo III, designadas por tipo múltiplo, que consistem numa emulsão do tipo óleo em lípido sólido em água (O/LS/A), que permite aumentar a capacidade de encapsulação das moléculas lipófilas.

### 3. Métodos de produção

Ao longo dos anos têm sido descritos diversos métodos de produção de nanopartículas lipídicas, sendo os mais utilizados a técnica da homogeneização a alta pressão (*high pressure homogenization, HPH*), da microemulsão e dos ultrassons. Além destes, têm sido adaptadas algumas das técnicas habitualmente usadas na produção de nanopartículas poliméricas, tais como: evaporação do solvente, substituição do solvente, difusão do solvente, injeção do solvente e dupla emulsão. No entanto, o uso destes métodos não é vantajoso, uma vez que todos requerem a utilização de solventes orgânicos durante a produção, o que pode originar toxicidade residual nas dispersões finais (Üner, 2006; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011b). Alguns autores descreveram ainda a utilização da técnica da inversão de fases, o recurso aos fluidos supercríticos e a extrusão por membrana, como métodos adequados para a preparação de nanopartículas lipídicas (Almeida e Souto, 2007; Silva *et al.*, 2011b; Garud *et al.*, 2012; Reverchon *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2015b). Deste modo, na presente dissertação apenas estão descritos com detalhe os três métodos mais utilizados para a produção de nanopartículas lipídicas.

O método da HPH apresenta várias vantagens comparativamente às restantes técnicas, pois é um método facilmente aplicável ao nível da produção industrial, evita solventes orgânicos e, como tal, evita a possibilidade de toxicidade residual na preparação final, beneficia de um tempo de produção curto e origina um baixo conteúdo de micropartículas na formulação final (Üner, 2006; Pardeike *et al.*, 2009). Esta técnica consiste na fusão do lípido, no qual se dissolve ou dispersa, previamente, a molécula a veicular. Posteriormente, a fase lipídica é emulsificada com a fase aquosa, constituída por água e tensioativo(s), que é previamente aquecida à mesma temperatura. Esta emulsificação é realizada a quente e a uma velocidade elevada, recorrendo-se a um agitador mecânico (geralmente, um Ultra-turrax®). A emulsão O/A obtida é submetida, a quente, a um processo de elevada energia, através de um homogeneizador de alta pressão, obtendo-se uma nanoemulsão O/A, também designada por pré-emulsão O/A, que é imediatamente arrefecida, levando à solidificação do(s) lípido(s) e à subsequente formação das nanopartículas sólidas (Figura 3). Este método permite obter dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas estáveis e com reduzido índice de polidispersão (i.e.,

tamanhos uniformes). Este fato resulta da dimensão reduzida do orifício de saída do homogeneizador e de uma distribuição mais homogênea da energia de homogeneização. As partículas de dimensões nanométricas são obtidas devido à aplicação de uma tensão de corte elevada e à força de cavitação resultantes da passagem da dispersão aquosa pelo orifício de tamanho reduzido, a uma pressão elevada (100-2000 bar), fazendo com que o fluido atinja uma velocidade acima dos 1000 km/h numa curta distância, levando ao choque e conseqüente quebra das gotículas oleosas da emulsão O/A, formando-se a nanoemulsão O/A. Normalmente são aplicados 3 a 5 ciclos de homogeneização, a uma pressão entre os 500 e os 1500 bar. A utilização de uma pressão demasiado alta e/ou um número elevado de ciclos pode criar uma energia cinética elevada que origina a coalescência das nanopartículas, aumentando o seu tamanho (Mehnert e Mäder, 2001; Müller *et al.*, 2002; Wissing *et al.*, 2004; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011b).

A técnica da HPH pode ser realizada a uma temperatura superior à temperatura de fusão do lípido sólido, sendo designada por HPH a quente, ou a uma temperatura igual ou inferior à temperatura ambiente, designando-se por HPH a frio. Em ambas as técnicas, as moléculas são dispersas ou dissolvidas no lípido fundido, a uma temperatura de 5-10°C acima do seu ponto de fusão (Mehnert e Mäder, 2001; Wissing *et al.*, 2004; Üner, 2006; Pardeike *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011b). O método da HPH a quente permite a encapsulação eficaz de moléculas lipófilas e, uma vez que o tempo de exposição a elevadas temperaturas é curto, pode também ser utilizada para encapsular algumas moléculas termosensíveis. No entanto, no que diz respeito à encapsulação de moléculas hidrófilas, este método origina uma baixa eficácia de encapsulação, pois durante o processo de homogeneização as moléculas hidrófilas têm tendência a passar para a fase aquosa (Mehnert e Mäder, 2001; Üner, 2006; Silva *et al.*, 2011b).

Na técnica da HPH a frio, as moléculas são previamente dissolvidas ou dispersas no lípido fundido. Posteriormente, esta fase é arrefecida, recorrendo-se a gelo seco ou azoto líquido, com o objetivo de solidificar o lípido e facilitar o processo de moagem subsequente. Após o processo de moagem, no qual ocorre fragmentação das partículas por ação de um moinho, obtém-se micropartículas (com tamanhos entre 50 e 100 µm), que posteriormente são dispersas, a frio, numa solução aquosa contendo agentes tensioativos, originando uma macro-suspensão. Por sua vez, esta é submetida à HPH, à

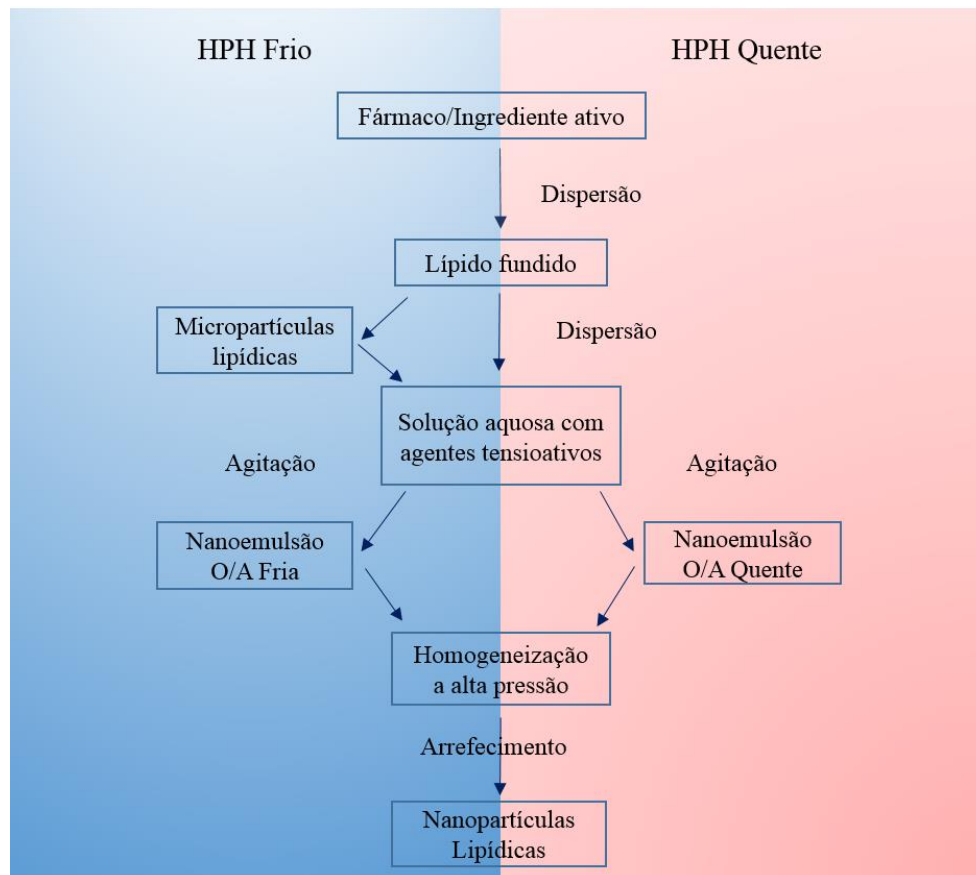
temperatura ambiente ou a uma temperatura mais baixa (0°C). As nanopartículas são obtidas pela ação da força de cavitação e da tensão de corte, originadas pela passagem das micropartículas pelo orifício do homogeneizador (Müller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011b).

A técnica de HPH a frio possui vantagens comparativamente à técnica a quente, nomeadamente (Müller *et al.*, 2000; Wissing *et al.*, 2004; Üner, 2006; Silva *et al.*, 2011b; Singhal *et al.*, 2011; Das e Chaudhury, 2011): a minimização da exposição a elevadas temperaturas, embora esta não seja totalmente evitada, pois é necessária a fusão do lípido; uma melhor encapsulação de moléculas hidrófilas, uma vez que não ocorre a passagem destas da fase lipófila para a fase aquosa, no decorrer do processo de homogeneização; quando há dificuldades no processo de recristalização do lípido, o facto do processo de produção ser realizado a frio, facilita a solidificação das nanopartículas; facilita a incorporação de moléculas termossensíveis, no entanto é importante considerar que durante o processo de homogeneização pode ocorrer um aumento da temperatura da amostra, de 10 a 15 °C, após cada ciclo.

Comparativamente à HPH a quente, a HPH a frio possui a desvantagem de originar tamanhos de partícula e índices de polidispersão mais elevados, sendo necessária a aplicação de um maior número de ciclos de homogeneização (5-10 ciclos a uma pressão de 1500 bar) (Mehnert e Mäder, 2001; Pardeike *et al.*, 2009).

A técnica da microemulsão consiste na diluição de uma microemulsão previamente obtida, sendo esta constituída por uma fase lipídica, composta por um lípido sólido com baixo ponto de fusão, e uma fase aquosa, composta por um tensioativo e um co-tensioativo (Müller *et al.*, 2000; Mehnert e Mäder, 2001). Nesta técnica, ambas as fases são aquecidas a uma temperatura de 60-70°C e, posteriormente, por um processo de agitação mecânica, são emulsionadas, numa razão que pode variar desde 1:2 a 1:100, que permita a formação de uma microemulsão quente (Wissing *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2011b). Esta microemulsão é diluída pela adição, com agitação mecânica moderada, de água arrefecida (2-3°C), numa razão de 1:25 a 1:50, originando uma nanoemulsão O/A (Mehnert e Mäder, 2001; Wissing *et al.*, 2004; Üner, 2006; Garud *et al.*, 2012). A adição deste excesso de água é desvantajosa, uma vez que provoca uma redução da

concentração das nanopartículas lipídicas na dispersão final, obtendo-se uma concentração inferior a 1% (m/v). Para rentabilizar este processo recomenda-se proceder à remoção do excesso de água, por ultrafiltração ou liofilização. Outra desvantagem apresentada pelo método da microemulsão é a necessidade de utilizar elevadas concentrações de agentes tensoativos (Wissing *et al.*, 2004; Üner, 2006; Silva *et al.*, 2011b).



**Figura 3:** Representação esquemática do processo de produção de nanopartículas lipídicas por homogeneização a alta pressão (HPH), a quente e a frio (adaptado de (Pardeike *et al.*, 2009)).

Na técnica dos ultrassons, o processo inicial é semelhante ao referido anteriormente na técnica de HPH. Resumidamente, após a fusão do lípido é adicionada a fase aquosa, previamente aquecida à mesma temperatura. Esta mistura é colocada num agitador de elevada velocidade (geralmente, um Ultra-turrax®), originando uma emulsão O/A quente, que é imediatamente submetida à energia dos ultrassons, através de uma sonda



de sonicação, que origina uma energia de cavitação, provocando a colisão entre as gotículas e a consequente divisão destas em tamanhos nanométricos. A nanoemulsão O/A obtida é rapidamente arrefecida em banho de gelo, promovendo a formação das nanopartículas sólidas. Alguns autores têm apontado algumas desvantagens deste método de produção, as quais estão relacionadas com a presença de partículas de tamanhos micrométricos e o risco de contaminação metálica proveniente da sonda de sonicação (Wissing *et al.*, 2004; Üner, 2006; Garud *et al.*, 2012; Puglia e Bonina, 2012). No entanto, alguns estudos revelaram resultados contraditórios, evidenciando a eficácia deste método para a preparação de nanopartículas lipídicas, sem problemas de toxicidade (Silva *et al.*, 2011a).

#### 4. Caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas

Após a preparação de dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas é necessário proceder-se à sua caracterização, através da análise de diversos parâmetros, tais como (Mehnert e Mäder, 2001; Attama *et al.*, 2012): tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, análise térmica, morfologia e forma, eficácia de encapsulação e estudo do perfil de libertação do fármaco ou ingrediente ativo encapsulado.

A análise do tamanho da partícula pode ser efetuada por espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy, PCS*) ou dispersão dinâmica de luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*), que permite a medição de tamanhos de partícula com valores entre 0,6 e 6000 nm, e do índice de polidispersão (*Polidispersity Index, PI*), i.e. a avaliação da homogeneidade de tamanhos das nanopartículas em dispersão. Como complemento ou alternativa à DLS, pode ser usada a difratometria de laser (*Laser Diffraction, LD*), que permite a medição de tamanhos de partícula entre 0,01 e 3500 µm. Com efeito, para ter noção do tamanho de todas as partículas presentes na dispersão aquosa recomenda-se utilizar ambas as técnicas de medição (Mehnert e Mäder, 2001; Üner, 2006; Garud *et al.*, 2012; Tichota *et al.*, 2014).

O potencial zeta (*Zeta Potential, ZP*) permite avaliar a carga à superfície das nanopartículas e é determinado com a finalidade de prever a estabilidade das dispersões ao longo do tempo. Quanto maior for o valor absoluto de ZP, mais estável é a dispersão ao longo do tempo e, como tal, prevê-se que não ocorra agregação das nanopartículas (Üner, 2006; Garud *et al.*, 2012; Tichota *et al.*, 2014).

A morfologia e forma das nanopartículas podem ser avaliadas por diversas técnicas de microscopia eletrónica, sendo as mais usadas a microscopia eletrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy, SEM*) e a microscopia eletrónica de transmissão (*Transmission Electron Microscopy, TEM*) (Attama *et al.*, 2012).

A análise térmica das dispersões coloidais permite avaliar os diferentes estados cristalinos e o grau de cristalinidade dos lípidos, podendo ser realizada recorrendo às

técnicas de calorimetria de varrimento diferencial (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*) e de difração de raios X (*X-Ray Scattering*) (Üner, 2006; Garud *et al.*, 2012).

A avaliação da eficácia de encapsulação é importante para determinar a adequação do sistema para veicular um determinado fármaco ou ingrediente ativo. A eficácia de encapsulação pode ser afetada pela maior ou menor solubilidade das moléculas de fármaco ou ingrediente ativo no(s) lípido(s), pela estrutura físico-química da matriz lipídica e pelo estado polimórfico do(s) lípido(s) (Attama *et al.*, 2012).

#### **IV. Sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas**

As dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas são líquidas, apresentando baixa viscosidade, o que pode ser considerado uma desvantagem caso se pretenda a sua administração ao nível tópico, resultando num tempo de contato curto entre a formulação e o local de aplicação. A incorporação destas dispersões numa base semissólida convencional (por ex. pomada hidrófila, hidrogel ou creme O/A) constitui uma estratégia de ultrapassar este inconveniente, uma vez que aumenta a consistência da formulação final e promove a estabilidade das SLN ou NLC (Silva *et al.*, 2009). Esta prática permite também o aumento do efeito oclusivo, e, como consequência, o aumento da hidratação do local de aplicação (Silva *et al.*, 2012a; Tichota *et al.*, 2014). Em alternativa, é possível adicionar um agente gelificante diretamente à dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas, que gelifica a água e forma um nanoemulgel. Este sistema tem as vantagens de apresentar consistência semissólida e elevada concentração de nanopartículas, uma vez que é evitado o fenómeno de diluição resultante da incorporação das SLN ou NLC em bases semissólidas previamente preparadas. Podem ainda ser preparadas dispersões de nanopartículas lipídicas contendo elevadas concentrações de lípidos (40-50%), obtendo-se uma formulação final com a consistência apropriada para aplicação tópica, embora neste caso seja difícil conseguir sistemas estáveis (Pardeike *et al.*, 2009).

Numa formulação contendo nanopartículas lipídicas para aplicação tópica são usados excipientes habitualmente presentes nas formulações tópicas de aplicação cosmética e farmacêutica. Além disso, estes excipientes são empregues em concentrações semelhantes às dos produtos já comercializados para que, desta forma, se consiga ultrapassar a necessidade de efetuar ensaios de tolerabilidade dos mesmos (Müller *et al.*, 2002).

##### **i. Exemplos para aplicação cosmética e farmacêutica**

As nanopartículas lipídicas têm sido muito estudadas para aplicação tópica, através de sistemas semissólidos de uso cosmético e farmacêutico, uma vez que apresentam várias vantagens comparativamente aos sistemas semissólidos convencionais (Müller *et al.*,

2002; Wissing e Müller, 2003). Ao nível cosmético constituem sistemas para aplicação cutânea, enquanto, para uso farmacêutico, as aplicações têm sido estudadas para diversas vias de administração.

Nas próximas secções são apresentados exemplos de estudos realizados na área cosmética e farmacêutica, relativos à utilização de nanopartículas lipídicas e à sua incorporação em sistemas semissólidos, publicados entre 2012 e 2016.

### 1. Uso cosmético

Na Tabela 4 encontra-se a referência a alguns estudos realizados no âmbito da aplicação cosmética de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas.

**Tabela 4:** Exemplos de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas para aplicação em cosmética.

Sistema semissólido	Tipo de nanopartículas lipídicas	Ingrediente ativo	Referência
Hidrogel	SLN	Palmitato de retinol	(Jeon <i>et al.</i> , 2013)
Nanoemulgel	SLN e NLC	OMC	(Puglia <i>et al.</i> , 2012)
Nanoemulgel	NLC	Óleo de argão	(Tichota <i>et al.</i> , 2014)
Nanoemulgel	SLN	Isoflavonas de soja	(Deshmukh e Amin, 2013)
Nanoemulgel	NLC	OMC, AVO, EHT, TINO, DHHB	(Puglia <i>et al.</i> , 2014)

AVO: avobenzona; EHT: etil-hexiltriazona; DHHB: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato; OMC: octil-metoxicinamato; TINO: tinosorb S.

Jeon *et al.* (2013) avaliaram o efeito antirrugas do palmitato de retinol (vitamina A), após a encapsulação em SLN e veiculado num hidrogel preparado com o Carbopol®

940P. O efeito da modificação da superfície das SLN ao nível da sua capacidade de permeação da pele também foi observado. O fosfato de dicetil foi utilizado com a finalidade de modificar a superfície das SLN, carregando-a negativamente para aumentar o ZP, conferindo assim boa estabilidade às nanopartículas. As SLN foram produzidas pelo método da extrusão e incorporadas no hidrogel, sob agitação constante. Verificou-se uma eficácia de encapsulação de 99,5% para as SLN sem modificação de superfície e de 99,1% para as SLN com superfície modificada. Realizaram-se estudos *ex vivo* em pele de ratos machos de Sprague-Dawley com o hidrogel contendo palmitato de retinol encapsulado em SLN com a superfície modificada. Os resultados demonstraram que a formulação tem uma maior capacidade de permeação na pele e que a quantidade total de palmitato de retinol libertado é cerca de 4,8 vezes superior comparativamente a uma formulação de SLN sem modificação de superfície. Estudos *in vivo* realizados em ratinhos sem pêlo demonstraram que o efeito antirrugas do palmitato de retinol é obtido após 20 dias de tratamento e depende da quantidade utilizada. A avaliação histológica da pele demonstrou que o hidrogel contendo SLN com palmitato de retinol confere um efeito protetor contra a radiação UV e, conseqüentemente, um efeito preventivo relativamente à degradação das fibras elásticas provocada por estas radiações. Os autores concluíram que o hidrogel contendo palmitato de retinol encapsulado em SLN de superfície modificada pode ser útil no desenvolvimento de preparações cosméticas com efeito anti-idade.

Puglia *et al.* (2012) avaliaram a capacidade das SLN e NLC para encapsular o octilmetoxicinamato (OMC), um filtro solar químico contra as radiações UV. Neste estudo, as SLN e os NLC foram produzidas pelo método dos ultrassons e, posteriormente, adicionou-se glicerol e goma xantana às dispersões, formando-se nanoemulgeles. Os resultados obtidos demonstraram que os NLC apresentam uma maior atividade protetora solar, pois o OMC apresenta maior solubilidade no lípido líquido (Miglyol® 812) que no lípido sólido (Compritol® 888 ATO), observando-se um aumento dessa atividade de 72% (SLN) para 88% (NLC). Os ensaios *ex vivo*, realizados em amostras de pele humana adulta, foram realizados para comparar a permeação de quatro formulações (dispersões aquosas de NLC e SLN, microemulsão e nanoemulgeles contendo SLN ou NLC) e demonstraram que o nanoemulgel apresenta um fluxo de permeação de OMC consideravelmente superior comparativamente às restantes formulações. Adicionalmente, a dispersão de NLC apresenta um fluxo de permeação de

OMC inferior comparativamente à dispersão de SLN. Ensaios *in vitro*, realizados com a finalidade de verificar a fotoestabilidade das formulações, demonstraram que os seus espectros são os mesmos, tanto antes como depois da exposição à radiação UVA. Em todas as formulações verificou-se um decréscimo da capacidade de absorção da radiação UV, sendo este mais significativo no nanoemulgel e na dispersão de SLN, tendo apresentado um decréscimo de 61% e 50%, respetivamente. Tanto na dispersão de NLC como na microemulsão o decréscimo foi inferior comparativamente aos referidos anteriormente (37%). Estes resultados permitiram concluir que o OMC possui uma melhor fotoestabilidade na presença de Miglyol® 812. Foi também avaliada a fotoestabilidade do OMC aquando da adição de álcool às formulações, observando-se um decréscimo elevado na absorção da radiação após exposição às UVA, o que condiciona a utilização destas formulações na forma de sprays solares. Verificou-se ainda que a formação de espécies reativas de oxigénio, devido à peroxidação dos lípidos presentes na formulação, é improvável, pois a matriz organizada das nanopartículas lipídicas interfere na propagação da peroxidação, mesmo após exposição à radiação UVA. Com este estudo é possível concluir que os NLC contendo OMC conferem uma maior proteção contra a peroxidação lipídica e uma maior estabilidade contra as radiações UV. Em outro estudo, este grupo de investigação (Puglia *et al.*, 2014) avaliou a capacidade dos NLC e das nanoemulsões como transportadores de vários filtros solares. Para facilitar a aplicação tópica dos sistemas, estes foram transformados em nanoemulgeles, através da adição de glicerol e goma xantana diretamente à fase aquosa das dispersões. Tanto as dispersões de NLC como as nanoemulsões foram preparadas pelo método dos ultrassons. Os filtros solares utilizados foram: etil hexiltriazona (EHT), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHBB), bemotrizinol (Tinosorb S), OMC, avobenzona (AVO) e uma mistura de AVO e OMC. Estudos *in vitro*, efetuados com a finalidade de avaliar a fotoestabilidade das formulações desenvolvidas, demonstraram que a avobenzona se tornou significativamente instável e que o OMC, apesar de se mostrar menos instável que a AVO, adquiriu também um certo grau de instabilidade, reduzindo a sua ação protetora em 35%. A mistura destes dois filtros também apresentou instabilidade após exposição à radiação UVA. Todos os outros filtros solares testados não apresentaram alterações significativas na sua capacidade de absorção da radiação, indicando a sua estabilidade, mesmo após exposição à radiação UVA. Não se observaram alterações significativas no comportamento dos filtros solares encapsulados em NLC, comparativamente às nanoemulsões. Os estudos *ex vivo*, realizados com o

intuito de avaliar a absorção cutânea dos filtros solares, demonstram uma menor absorção das formulações à base de NLC comparativamente às nanoemulsões. Estes estudos demonstraram também que nenhuma destas formulações apresentou absorção percutânea, após 24 horas de exposição aos filtros Tinosorb S e EHT. Os autores referiram que este fato se deve à elevada afinidade destes filtros para a queratina. Observou-se ainda um maior fluxo de AVO e OMC, quando estes são aplicados conjuntamente, tanto nos NLC como nas nanoemulsões, sendo este aumento mais marcado para as últimas. Os autores concluíram que os NLC apresentam um elevado potencial como transportadores de filtros solares, uma vez que quando estes são encapsulados nos NLC mostram uma absorção percutânea inferior, que se traduz numa acumulação superior na camada córnea da pele.

Noutro estudo, Tichota *et al.* (2014) desenvolveram NLC contendo óleo de argão, com ação hidratante, preparados pela técnica dos ultrassons. A dispersão de NLC foi transformada num hidrogel, através da adição direta de um agente gelificante (carbómero 2001) à sua fase aquosa. A análise por crio-microscopia eletrónica de varrimento da dispersão de NLC e do hidrogel contendo NLC permitiu a visualização de NLC com tamanhos nanométricos, aprisionados nos interstícios da rede do hidrogel. Este hidrogel foi caracterizado através da avaliação do pH, textura, viscosidade e cor. Os resultados obtidos demonstraram que o pH da formulação se manteve constante ao longo do período de armazenamento (entre 7-8). A análise da textura permitiu verificar uma diminuição da firmeza do hidrogel devido à presença dos NLC, relativamente ao hidrogel placebo, passando de valores entre 0,7-0,8 N para valores entre 0,2-0,3 N, embora as formulações se mantenham estáveis por mais de 30 dias. Os estudos reológicos demonstraram uma diminuição da viscosidade do hidrogel contendo NLC comparativamente ao hidrogel placebo. Na análise realizada à cor das formulações (hidrogel e hidrogel contendo NLC) não foram observáveis alterações na coloração de ambas, podendo indicar que não ocorreu degradação lipídica ao longo do armazenamento. Os estudos *in vivo*, realizados em voluntários, demonstraram que o hidrogel contendo NLC aumenta significativamente a hidratação da pele, comparativamente ao hidrogel placebo, passados 30 dias. De acordo com os resultados deste estudo, os autores concluíram que o hidrogel à base de NLC contendo óleo de argão é promissor para potenciar a hidratação cutânea, uma vez que os NLC e o óleo de



argão têm ambos sido sugeridos como hidratantes da pele, podendo apresentar um efeito sinérgico.

Deshmukh e Amin (2013) desenvolveram um nanoemulgel contendo isoflavonas de soja encapsulada em SLN, com a finalidade de melhorar a permeação cutânea e a retenção na derme. Esta formulação tem como objetivo reverter o envelhecimento da pele após a menopausa. No presente estudo produziram-se duas dispersões de SLN utilizando diferentes lípidos sólidos (Softisan<sup>®</sup> 601 e o Tefose<sup>®</sup> 63). As dispersões de SLN foram produzidas pelo método da microemulsão e, posteriormente, adicionou-se um agente gelificante à fase aquosa (Carbopol<sup>®</sup>), sob agitação. Os resultados demonstraram a obtenção de uma dispersão com tamanhos pequenos e uma eficácia de encapsulação de 57% para a dispersão formulada com Softisan<sup>®</sup> 601. Uma vez que obtiveram melhores resultados com a formulação contendo Softisan<sup>®</sup> 601, esta foi a escolhida para dar continuidade ao estudo. A avaliação reológica do nanoemulgel desenvolvido demonstrou que a formulação apresenta um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Os estudos de permeação *ex vivo*, em pele de orelha de porco, demonstraram que, após a aplicação do nanoemulgel, é possível obter uma deposição de isoflavonas de cerca de 60% na derme. Estes estudos demonstraram também a ausência de irritação e edema na pele. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que o nanoemulgel desenvolvido pode ser usado para veicular isoflavonas de soja para a pele, sem apresentar efeitos irritantes.

## 2. Uso farmacêutico

Na Tabela 5 encontra-se a referência a alguns estudos realizados no âmbito da aplicação farmacêutica de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas.

**Tabela 5:** Exemplos de sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas para aplicação farmacêutica.

Sistema semissólido	Tipo de nanopartículas lipídicas	Fármaco	Referência
Hidrogel	SLN	Astragaloside IV	(Chen <i>et al.</i> , 2013)
Nanoemulgel	SLN	Ciclosporina A	(Karavana <i>et al.</i> , 2012)
Hidrogel	NLC	Flurbiprofeno	(Gonzalez-Mira <i>et al.</i> , 2012)
Nanoemulgel	SLN	Resina Draconis	(Hao <i>et al.</i> , 2014)
Hidrogel	NLC	Miconazol	(Mendes <i>et al.</i> , 2013)
Hidrogel e Nanoemulgel	SLN	Risperidona	(Silva <i>et al.</i> , 2012a)
Hidrogel	SLN	Aceclofenac	(Chawla e Saraf, 2012)
Nanoemulgel	SLN	Meloxicam	(Khurana <i>et al.</i> , 2013)
Creme O/A	SLN	Tretinoína	(Nasrollahi <i>et al.</i> , 2013)
Hidrogel	SLN	Cloroquina	(Bhalekar <i>et al.</i> , 2015)
Nanoemulgel	NLC	Minoxidil	(Uprit <i>et al.</i> , 2013)
Nanoemulgel	SLN	Hidroquinona	(Ghanbarzadeh <i>et al.</i> , 2015)
Hidrogel	SLN	Adapaleno	(Jain <i>et al.</i> , 2014)
Nanoemulgel	SLN, NLC	Cetoconazol, climbazol e clotrimazol	(Das <i>et al.</i> , 2014)

Chen *et al.* (2013) encapsularam o fármaco astragaloside IV em SLN, que foram posteriormente incorporadas num hidrogel, para administração cutânea. Este estudo teve como objetivo determinar os efeitos na cicatrização de feridas e na prevenção de cicatrizes. O método de produção das SLN foi a evaporação do solvente e, posteriormente, procedeu-se à incorporação da dispersão de SLN num hidrogel de Carbopol® 934 previamente preparado. Após a incorporação das SLN no hidrogel verificou-se que a sua estrutura foi mantida e que o fármaco foi libertado de forma mais

sustentada, quando comparado com a dispersão de SLN isolada, permitindo prolongar o tempo de residência do mesmo na pele. Realizaram-se estudos *in vitro*, em fibroblastos de pele humana, e *in vivo*, em ratos de Sprague-Dawley, com a finalidade de verificar a ação do astragaloside IV na cicatrização de feridas. Estes estudos demonstraram que o hidrogel de SLN contendo astragaloside IV aumentou significativamente a cicatrização da ferida, pois este composto promove a proliferação e migração de queratinócitos para a zona da ferida, acelerando a re-epitelialização no local lesado. Verificou-se também que esta formulação favorece a deposição de colagénio tipo I (prevalente na pele saudável) e o efeito angionénico (mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes).

Karavana *et al.* (2012) desenvolveram um nanoemulgel contendo ciclosporina A encapsulada em SLN. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia imunossupressora da formulação semissólida no tratamento da estomatite aftosa recorrente. As SLN foram produzidas por homogeneização a alta velocidade com Ultra-turrax<sup>®</sup> e, posteriormente, foi adicionado à dispersão um agente gelificante (Carbopol<sup>®</sup> 974 P NF), seguindo-se uma agitação constante para a obtenção do nanoemulgel. Foram obtidas SLN com uma elevada capacidade de encapsulação da ciclosporina A (94,81%), tendo-se verificado que a biodisponibilidade do fármaco foi promovida devido à sua encapsulação nas SLN. Os estudos reológicos demonstraram que o hidrogel preparado possui propriedades mecânicas desejáveis, tais como dureza, adesividade e elasticidade, apesar de, após a incorporação da dispersão de SLN, se verificar uma variação das mesmas. Verificou-se ainda que o hidrogel apresenta um comportamento reológico não-Newtoniano plástico. Os estudos *ex vivo* realizados em mucosa oral de vaca confirmaram que a ciclosporina A se mantém na mucosa oral, uma vez que foram detetados cerca de 72% de fármaco nesse tecido. Após 6 horas da aplicação do hidrogel, verificou-se a permanência de cerca de 65% de fármaco na mucosa oral. A eficácia imunossupressora da ciclosporina A foi também avaliada *in vivo*, na mucosa oral de ratos, tendo-se observado uma diminuição da área da úlcera ao fim de 3, 6 e 9 dias, respetivamente, nos grupos onde se aplicou o hidrogel com SLN, hidrogel base, comparativamente ao grupo controlo. Ao fim de 12 dias verificou-se uma redução do tamanho da úlcera superior no grupo sujeito à aplicação do hidrogel contendo SLN. Os autores constataram que o hidrogel contendo SLN com ciclosporina A encapsulada foi eficazmente produzido e que o mesmo

aumentou significativamente a reparação da mucosa, em comparação com o hidrogel base.

Gonzalez-Mira *et al.* (2012) desenvolveram um hidrogel contendo NLC com flurbiprofeno (FB) encapsulado. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia anti-inflamatória do fármaco para administração ocular. Os NLC foram produzidos pelo método da HPH a quente e foram posteriormente incorporados num hidrogel de carbómero 2001 previamente preparado, sob agitação a alta velocidade. Foram testados dois lípidos sólidos para preparar os NLC com FB encapsulado, os NLC com Compritol®888 ATO, designados por FB-C888NLC, e os NLC com ácido esteárico, designados por FB-SANLC. Todos os hidrogéis preparados (hidrogel placebo, hidrogel FB-C888NLC e hidrogel FB-SANLC) apresentaram um comportamento não-Newtoniano plástico, o que se torna vantajoso para aplicação ocular, uma vez que promove uma melhor tolerabilidade e adesão por parte do doente. Verificaram-se baixos valores de tixotropia no hidrogel placebo e no hidrogel FB-C888NLC e ausência desta propriedade no hidrogel FB-SANLC. Os estudos de textura demonstraram uma diminuição da adesividade e da firmeza dos hidrogéis contendo NLC comparativamente ao hidrogel placebo. Foram realizados estudos *in vitro* de libertação do fármaco, que demonstraram que o FB-C888NLC incorporado no hidrogel apresenta uma libertação inicialmente mais lenta do fármaco, enquanto que quando o FB-SANLC é incorporado no hidrogel se verifica um aumento da libertação. No entanto, a capacidade de libertação sustentada do fármaco foi confirmada em ambos os hidrogéis. Os estudos realizados *ex vivo*, recorrendo à utilização de córnea de coelho, indicaram que a integridade da córnea se manteve ao longo das experiências desenvolvidas e que as dispersões de NLC apresentam uma maior capacidade de permeação, comparativamente a uma solução preparada de flurbiprofeno. Foi avaliada a tolerância ocular das formulações preparadas, tendo sido verificado que a dispersão de FB-C888NLC e o hidrogel de FB-C888NLC são perfeitamente toleráveis, enquanto a dispersão de FB-SANLC e o hidrogel de FB-SANLC exerceram uma ligeira irritação ocular. Após a realização deste trabalho, os autores concluíram que os sistemas semissólidos desenvolvidos são eficazes e promissores para promover a administração ocular de flurbiprofeno.

Noutro estudo, Hao *et al.* (2014) desenvolveram um hidrogel, constituído por dois polímeros sensíveis à temperatura (Poloxamer<sup>®</sup> 407 e Poloxamer<sup>®</sup> 188), contendo SLN com Resina Draconis encapsulada, para administração ocular. As SLN foram produzidas pela técnica dos ultrassons e, à dispersão de SLN obtida, foi, após arrefecimento, adicionado o agente gelificante. Como se trata de uma formulação para administração ocular, adicionou-se ainda um agente isotonzante (glicerina) e um conservante (cloreto de benzalcónio). Após a análise dos resultados verificou-se a existência de SLN com tamanhos nanométricos, antes e depois da preparação do hidrogel, e uma capacidade de encapsulação de aproximadamente 93%. Verificou-se também que, após 30 dias de armazenamento do nanoemulgel este não apresentou alterações significativas no tamanho das partículas, podendo indicar que as SLN se encontram estáveis devido ao aprisionamento na rede tridimensional do hidrogel. Os estudos *ex vivo*, realizados na córnea isolada de coelhos, demonstraram que o nanoemulgel contendo as SLN com Resina Draconis encapsulada apresentou um atraso de 12 minutos na permeação transcorneal. Isto deve-se à mucoadesividade apresentada pela formulação, que leva a um aumento do tempo de retenção da mesma, favorecendo a permeação sustentada do fármaco. Estes estudos demonstraram também que a formulação não exerceu qualquer dano nem irritação na mucosa ocular. Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que o nanoemulgel desenvolvido é promissor para a administração ocular de Resina Draconis.

Silva *et al.* (2012a) desenvolveram um hidrogel contendo SLN com risperidona encapsulada, para administração oral, com o objetivo de tratar desordens mentais tais como esquizofrenia. Neste trabalho as SLN foram produzidas pelo método dos ultrassons e da HPH a quente, tendo sido posteriormente preparadas duas formulações semissólidas designadas por HG<sub>i</sub>-DL (hidrogel preparado a partir da incorporação das SLN num hidrogel de carbómero 2001) e HG<sub>d</sub>-DL (nanoemulgel preparado pela adição direta do carbómero à fase aquosa da dispersão de SLN). A análise reológica demonstrou um comportamento não-Newtoniano plástico com tixotropia. A análise da textura das formulações permitiu concluir que o HG<sub>d</sub> apresenta uma maior firmeza, possivelmente devido à elevada concentração de SLN, e que não existem alterações significativas em nenhuma das formulações ao fim de 30 dias. Verificou-se que a incorporação de SLN num hidrogel melhora as suas propriedades de firmeza e adesividade, sendo adequadas para aplicação tópica. Os estudos de libertação *in vitro*

demonstraram uma liberação prolongada do fármaco em ambas as formulações semissólidas, embora esta tenha sido mais lenta no HG<sub>d</sub>-DL. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, os autores sugeriram que as formulações semissólidas desenvolvidas são adequadas para administração sublingual de risperidona, podendo evitar os inconvenientes decorrentes da administração peroral do fármaco.

Chawla e Saraf (2012) desenvolveram um estudo reológico em hidrogeles contendo SLN com aceclofenac encapsulado. Neste trabalho, as SLN foram preparadas pelo método da difusão e, posteriormente, foi adicionado um agente gelificante (Carbopol<sup>®</sup> 940) à fase aquosa da dispersão, sob agitação contínua. Foram efetuados testes com o objetivo de observar o efeito da temperatura na viscosidade do hidrogel à base de SLN preparado, tendo-se verificado uma diferença de apenas 12% na viscosidade, após um incremento da temperatura de 30 °C para 70 °C. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram a ocorrência de uma liberação sustentada do fármaco. Os autores concluíram que as SLN preparadas são eficientes para veicular aceclofenac e que os hidrogeles desenvolvidos são estáveis a variações de temperatura, o que pode indicar uma boa estabilidade ao longo do tempo.

Em outro estudo, Khurana *et al.* (2013) desenvolveram e avaliaram um nanoemulgel contendo SLN com meloxicam encapsulado para administração transdérmica. Neste estudo, as SLN foram preparadas pelo método da microemulsão, sendo posteriormente adicionado o agente gelificante (Carbopol<sup>®</sup> 940), sob agitação suave, à fase aquosa da dispersão para formação do hidrogel. Os estudos reológicos demonstraram que a formulação apresenta um comportamento não-Newtoniano plástico. Por outro lado, os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram uma liberação sustentada do fármaco a partir do nanoemulgel. Foram também realizados estudos *ex vivo*, em pele de ratinhos, para verificação da compatibilidade cutânea da formulação desenvolvida, tendo-se verificado boa tolerabilidade da pele após aplicação da formulação, uma vez que se verificou a ausência de alterações histológicas e sinais de inflamação. Verificou-se também que a formulação desenvolvida reduz o edema em  $72,54 \pm 0,89\%$ , após 24 horas da aplicação do nanoemulgel. Com este trabalho os autores concluíram que a utilização de nanoemulgeles à base de SLN contendo meloxicam encapsulado é

vantajosa na administração transdérmica, uma vez que evita os efeitos gastrointestinais adversos decorrentes da administração oral de anti-inflamatórios não esteroides.

Nasrollahi *et al.* (2013) desenvolveram um creme O/A contendo SLN com tretinoína encapsulada, para aplicação tópica no tratamento de algumas afeções dermatológicas, i.e. acne, psoríase e ictiose. As SLN foram produzidas pelo método da HPH a quente e posteriormente foram incorporadas num creme O/A previamente preparado, numa razão de 50:50. A fase lipófila do creme O/A produzido é constituída por miristato de isopropilo, cetilpalmitato, álcool estearílico, álcool cetílico e Span<sup>®</sup> 60, e a fase hidrófila é constituída por água destilada e Tween<sup>®</sup> 80. Após 24 meses da sua preparação, não foram observados fenómenos de agregação ou separação de fases no creme O/A contendo as SLN. Os estudos *ex vivo* para avaliação da permeação cutânea do fármaco, realizados em pele de rato, demonstraram que este é libertado mais lentamente tanto da dispersão de SLN como do creme O/A contendo SLN, comparativamente a um creme O/A simples com fármaco. Observou-se que a dispersão de SLN e o creme O/A contendo SLN apresentaram uma percentagem de libertação de tretinoína de 90,82% e 90%, ao fim de 6 e 4 horas, respetivamente, enquanto o creme O/A simples apresentou uma percentagem de libertação de 97,45% ao fim de 3 horas. Após a realização deste estudo, concluiu-se que o creme O/A desenvolvido é adequado para administração cutânea de tretinoína, apresentando uma redução da irritação da pele provocada pelo fármaco, o que promove uma melhor aceitação do produto por parte do doente.

Em outro estudo, Bhalekar *et al.* (2015) desenvolveram um hidrogel contendo SLN com cloroquina encapsulada, para tratamento da artrite reumatóide. Neste trabalho, as SLN foram produzidas pelo método dos ultrassons e posteriormente incorporadas num hidrogel de carboximetilcelulose sódica, previamente preparado. A formulação desenvolvida foi aplicada topicamente em ratos Wistar doentes com artrite reumatóide, durante um mês, tendo-se verificado uma melhoria (erosão inferior a 50%) significativa da doença, comparativamente ao grupo controlo (erosão superior a 75%), e uma melhoria superior, comparativamente ao grupo com o tratamento padrão (erosão até 75%). Verificou-se também uma diminuição mais acentuada do estreitamento do espaço articular e da destruição do osso no grupo ao qual foi aplicado o hidrogel contendo SLN com cloroquina, comparativamente aos restantes grupos. Após a análise dos resultados

obtidos, os autores concluíram que a formulação desenvolvida é eficaz no controlo da artrite reumatóide e que a sua utilização é aconselhada para evitar os efeitos adversos associados à administração oral de cloroquina.

Uprit *et al.* (2013) desenvolveram um hidrogel contendo NLC com minoxidil encapsulado para tratamento de alopecia. A dispersão de NLC foi preparada pelo método dos ultrassons, à qual foi posteriormente adicionado Carbopol<sup>®</sup> sob agitação constante. Os estudos de libertação *in vitro* demonstraram uma libertação sustentada do fármaco, tanto para a dispersão de NLC contendo minoxidil como para o hidrogel contendo as NLC com minoxidil. O hidrogel desenvolvido neste estudo apresenta um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, sendo vantajoso para o tratamento de alopecia.

Ghanbarzadeh *et al.* (2015) desenvolveram um nanoemulgel contendo SLN com hidroquinona encapsulada para tratamento de hiperpigmentações. No presente estudo, a dispersão de SLN foi produzida pelo método da HPH a quente à qual foi adicionada um agente gelificante (Carbopol<sup>®</sup>), que foi deixado a hidratar durante 24 horas, tendo-se, posteriormente, procedido à gelificação, com agitação suave. Os estudos realizados demonstraram que as SLN apresentam uma capacidade de encapsulação de aproximadamente 90%, tendo esta decrescido cerca de 22% após 5 meses de armazenamento. Foram realizados estudos com o intuito de analisar a estabilidade da formulação desenvolvida, após 5 meses de armazenamento a 25°C, tendo-se verificado que 31,5% do fármaco encapsulado nas SLN foi convertido a benzoquinona, enquanto a hidroquinona não encapsulada é degradada após 2 meses de armazenamento. Os resultados obtidos neste estudo mostram a capacidade das SLN para proteger a hidroquinona da oxidação, aumentando o prazo de utilização da formulação. Os estudos *ex vivo* realizados para avaliação da permeação cutânea de hidroquinona através da pele de abdómen de ratos Wistar demonstraram que a permeação do fármaco é superior quando este é veiculado no nanoemulgel com SLN, comparativamente a um hidrogel convencional. Verificou-se também que, quando o fármaco é veiculado no nanoemulgel com SLN, há uma maior deposição deste na pele e, conseqüentemente, uma menor absorção ao nível sistémico. Os autores concluíram que a utilização de um nanoemulgel à base de SLN para veicular hidroquinona é uma técnica promissora para o tratamento



tópico de hiperpigmentações, uma vez que esta formulação apresenta uma capacidade de encapsulação elevada e promove a estabilidade físico-química do fármaco.

Jain *et al.* (2014) desenvolveram um hidrogel contendo SLN com adapaleno encapsulado para tratamento tópico do *Acne vulgaris*. A dispersão de SLN foi produzida pelo método da injeção de solvente e foi, seguidamente, incorporada num hidrogel de Carbopol® previamente preparado. Os estudos de reologia realizados com o hidrogel desenvolvido demonstraram que este apresenta uma adesividade adequada para aplicação tópica. Os estudos de libertação *in vitro* comprovaram uma libertação sustentada do fármaco a partir do hidrogel. Foram também realizados estudos *ex vivo*, em pele de rato, com a finalidade de avaliar a permeação cutânea do fármaco, tendo-se verificado que, após 8 horas, a quantidade de adapaleno que penetrou na pele e chegou à corrente sanguínea é insignificante. O mesmo não se verificou com a tintura de adapaleno, utilizada como referência, que apresenta uma elevada absorção sistémica. Os autores realizaram ainda estudos histológicos, para avaliar a quantidade de fármaco nas diferentes camadas da pele. Os resultados demonstraram a presença de uma quantidade considerável de adapaleno na epiderme, no entanto, o mesmo não se verifica na derme. Estas observações permitiram concluir que a administração cutânea do hidrogel contendo o fármaco encapsulado em SLN aumenta o seu tempo de retenção no local de aplicação, minimizando os efeitos adversos decorrentes da sua absorção sistémica.

Mendes *et al.* (2013) desenvolveram um hidrogel contendo NLC com miconazol encapsulado, com o objetivo de avaliar a sua eficácia no tratamento da candidíase oral. Os NLC foram produzidos pela técnica dos ultrassons e a dispersão obtida foi posteriormente incorporada, sob agitação, num hidrogel de carbómero 2001, previamente preparado. Foram realizados ensaios *in vitro* (método de difusão em placas de agar) para verificação da eficácia antifúngica do miconazol após encapsulação nos NLC e posterior incorporação num hidrogel. Os resultados reportados demonstraram um aumento do efeito terapêutico do fármaco e, ao mesmo tempo, uma diminuição em 17 vezes da dose necessária, comparativamente a um gel oral comercial. A análise reológica do hidrogel preparado revelou a existência de um comportamento não-Newtoniano plástico com tixotropia, o que é desejável para a administração na cavidade oral. Os estudos de libertação *in vitro* demonstraram a ocorrência de uma libertação

controlada do fármaco quando este se encontra encapsulado nos NLC e incorporado no hidrogel. Após realização deste trabalho, os autores concluíram que o hidrogel desenvolvido é promissor para o tratamento da candidíase oral. Em outro estudo, Das *et al.* (2014) desenvolveram um nanoemulgel contendo SLN e NLC, estabilizadas por ésteres da sacarose, contendo, em ambos os tipos de nanopartículas lipídicas, clotrimazol, cetoconazol e climbazol encapsulados, com a finalidade de avaliar a sua ação antifúngica. No presente estudo, tanto a dispersão de SLN como a dispersão de NLC foram produzidas pelo método dos ultrassons. Posteriormente adicionou-se um agente gelificante (Noveon<sup>®</sup> AA-1 Policarbófilo) às dispersões obtidas, sob agitação constante para formar um nanoemulgel. Através da análise das formulações obtidas verificou-se que o tamanho das SLN e dos NLC, o índice de polidispersão e a capacidade de encapsulação, dependem do fármaco encapsulado. Os estudos reológicos demonstraram que os nanoemulgeles formulados possuem um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico e que o mesmo não é dependente do fármaco encapsulado. Os estudos de liberação do fármaco demonstraram que a liberação do fármaco é significativamente mais lenta nos nanoemulgeles desenvolvidos, comparativamente às respectivas dispersões de SLN e NLC. Nos ensaios de liberação verificou-se uma liberação mais rápida do climbazol, seguido do cetoconazol e, por fim, do clotrimazol. Após a realização deste estudo, os autores concluíram que os nanoemulgeles de SLN e os de NLC preparados são apropriados para a encapsulação de fármacos da classe dos imidazóis, permitindo a sua liberação prolongada.

## **V. Trabalho Experimental**

### **1. Objetivos**

O trabalho experimental teve os seguintes objetivos:

- 1) Preparar dispersões aquosas de SLN pelas técnicas dos ultrassons e da HPH a quente;
- 2) Avaliar o tamanho, o índice de polidispersão (PI) e o potencial zeta (ZP) das SLN;
- 3) Incorporar as SLN em diferentes bases semissólidas: hidrogel, creme O/A e pomada hidrófila;
- 4) Analisar a consistência e a estabilidade das preparações semissólidas.

### **2. Matérias-primas**

Precirol<sup>®</sup> ATO5 (palmitoestearato de glicerilo, Gatefossé, França), Tween<sup>®</sup> 80 (polissorbato 80, Acofarma, Espanha), cloreto de benzalcónio (MERCK, Schuchardt), água ultrapura (Milli<sup>®</sup>Q Plus, Millipore, Alemanha), polietilenoglicol 4000 (Acofarma, Espanha), polietilenoglicol 400 (Acofarma, Espanha), Span<sup>®</sup> 40 (monoestearato de sorbitano, Fluka, Alemanha), metilcelulose 1000 (Acofarma, Espanha), propilenoglicol (Acofarma, Espanha), ácido esteárico (VWR Chemicals, Prolabo, Bélgica), trietanolamina (Acofarma, Espanha), glicerina (Acofarma, Espanha), p-hidroxibenzoato de metilo (José M. Vaz Pereira, Portugal).

### 3. Métodos

#### 3.1. Preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas

As dispersões aquosas de SLN foram preparadas pelas técnicas da HPH a quente e dos ultrassons, sendo a sua composição apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6:** Composição das dispersões aquosas de SLN.

Composição (% , m/m)	
Precirol® ATO5	10,00
Tween® 80	2,50
Cloreto de benzalcónio	0,50
Água ultrapura	87,00

Na técnica da HPH, aqueceu-se o lípido sólido a uma temperatura 5-10°C acima do seu ponto de fusão (53 - 57 °C) e, seguidamente, adicionou-se a solução aquosa contendo os tensioativos, previamente aquecida à mesma temperatura (Alves, 2012). A mistura foi homogeneizada recorrendo a um Ultra-Turrax® T25 (IKA®, Alemanha), a uma velocidade de 9000 rpm, durante 5 minutos, obtendo-se uma emulsão O/A. Posteriormente, para que fosse possível obter partículas de tamanhos nanométricos, fez-se passar a emulsão O/A por um homogeneizador de alta pressão (EmulsiFlex-C3, Avestin, Alemanha), durante 10 ciclos de homogeneização, a uma pressão de 800-1000 bar, originando uma nanoemulsão O/A. Por fim, a nanoemulsão O/A quente foi imediatamente transferida para frascos de vidro e arrefecida em banho de gelo, até à temperatura ambiente, para que o lípido sólido solidifique originando as SLN.

O procedimento supracitado foi otimizado ao nível da quantidade de agente tensioativo, tempo de agitação no Ultra-Turrax®, ciclos e pressão de homogeneização.

O procedimento laboratorial da primeira parte da preparação das dispersões de SLN pela técnica dos ultrassons foi semelhante à da HPH. A principal diferença foi no processo energético aplicado para a obtenção de partículas de tamanho nanométrico. No

caso na técnica dos ultrassons, a emulsão O/A obtida foi submetida à energia dos ultrassons, através de uma sonda de sonicação (Bandelin Eletronic UW 2200, Alemanha), durante 15 minutos, com uma amplitude energética de 40%.

### 3.2. Medição do tamanho das nanopartículas lipídicas, do índice de polidispersão e do potencial zeta

Após a preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas procedeu-se à medição do tamanho das partículas, à determinação do PI e do ZP, através da técnica da DLS, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern® Instruments, Reino Unido) a 25°C. Antes da medição, as dispersões aquosas de SLN foram diluídas (1:2, 1:3, 1:4) com água ultrapura, para evitar a existência de agregados de nanopartículas. As medições foram efetuadas em triplicados, no dia da produção e após 90 dias de armazenamento, no frigorífico ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Os resultados apresentados são os valores médios (Z-ave)  $\pm$  desvio padrão (SD) de cada medição. No caso das medições realizadas após a produção, a média apresentada é a média das diluições 1:2, 1:3 e 1:4, uma vez que se obtiveram resultados concordantes. A média dos resultados da medição efetuada após 90 dias foi obtida pela medição, em triplicado, da diluição 1:4.

Com o objetivo de verificar a ausência/presença de partículas com tamanhos micrométricos, as dispersões de SLN foram também avaliadas por LD, utilizando um Mastersizer 3000 (Malvern, Reino Unido), medindo os valores D50 e D90 (percentagem de partículas com volume igual ou inferior ao valor apresentado, respetivamente) para os valores da distribuição das partículas de acordo com o seu volume. As análises foram efetuadas em triplicado, utilizando as seguintes condições: índice de refração = 1,6; índice de absorção = 0,01; densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) = 1,0. Os resultados apresentados são os valores médios (LD)  $\pm$  desvio padrão (SD) de cada medição.

### 3.3. Preparação de formulações semissólidas à base de dispersões de nanopartículas lipídicas

As dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas produzidas foram posteriormente incorporadas em bases semissólidas previamente preparadas (creme O/A, pomada hidrófila e hidrogel), em diferentes proporções base semissólida:SLN (60:40, 50:50 e 40:60), com a finalidade de verificar qual a que apresenta um aspeto mais indicado para aplicação tópica. A incorporação realizou-se num almofariz de porcelana, adicionando e misturando a dispersão de nanopartículas lipídicas à base semissólida.

A composição das diferentes bases semissólidas testadas é apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7:** Composição (% , m/m) das bases utilizadas para incorporação das SLN preparadas (Oliveira, 2014).

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

### 3.3.1. Avaliação do comportamento reológico das formulações semissólidas

O comportamento reológico das formulações semissólidas foi avaliado, antes e após a incorporação das dispersões de nanopartículas lipídicas, utilizando um viscosímetro rotacional ST-2001 (J.P. Selecta<sup>®</sup>, Espanha). Os valores das viscosidades aparentes foram obtidos pela aplicação de diferentes velocidades de corte, a uma temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , tendo-se traçado os gráficos da tensão de corte ( $\tau = \eta \times G$ ) *versus* velocidade de corte (G, rpm) das formulações armazenadas a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , após 7 e 30 dias da preparação.

### 3.3.2. Estudos de estabilidade acelerada

Com o intuito de prever a estabilidade das formulações semissólidas preparadas efetuaram-se estudos de estabilidade acelerada por centrifugação, após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Para o efeito, colocou-se 10 ml de preparação num tubo Falcon<sup>®</sup> e submeteu-se a preparação a 2 ciclos de centrifugação (Centrífuga Labofuge 200, Alemanha), de 30 minutos a uma velocidade de 3000 rpm. O processo de centrifugação produz *stress* na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades, que são observadas, através da separação de fases (Krambeck, 2011).

#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.1. Avaliação do tamanho, do índice de polidispersão e do potencial zeta das nanopartículas lipídicas

Os resultados dos tamanhos de partícula, do PI e do ZP das dispersões aquosas de SLN são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Tamanhos de partícula (Z-ave e LD), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das dispersões aquosas de SLN, preparadas pela técnica da HPH a quente e dos ultrassons.

	LD ± SD (nm)		Z-ave ± SD (nm)	PI ± SD	ZP ± SD (mV)
	D50	D90			
SLN HPH	82,4 ± 0,001	1350,0 ± 0,075	244,0 ± 23,000	0,589 ± 0,203	22,0 ± 0,000
SLN US dia 0	69,5 ± 0,000	206,0 ± 0,000	181,2 ± 0,4930	0,412 ± 0,006	36,3 ± 0,849
SLN US dia 90 (25°C)	-	-	180,5 ± 4,188	0,363 ± 0,032	35,5 ± 0,000
SLN US dia 90 (4°C)	-	-	175,1 ± 1,069	0,429 ± 0,017	34,8 ± 0,778

De acordo com a literatura, as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas devem apresentar um tamanho compreendido entre os 40 e os 1000 nm (Pardeike *et al.*, 2009). A análise dos resultados da caracterização das dispersões permite verificar a existência de diferenças no tamanho das nanopartículas entre as duas técnicas de produção utilizadas. Atendendo aos resultados apresentados na Tabela 8, verifica-se que a técnica de HPH a quente, apesar da otimização do procedimento, não demonstrou ser a mais indicada, uma vez que se verifica que 90% das partículas apresentam um tamanho igual ou inferior a 1350 nm, sendo este valor superior ao intervalo de referência supracitado. Comparativamente à técnica anteriormente referida, a técnica dos ultrassons apresentou melhores resultados, tendo sido obtidas 90% de nanopartículas com tamanho igual ou inferior a 206 nm. Contudo, é importante referir que os tamanhos médios (D50) da população de nanopartículas produzidas por ambas as técnicas se encontram na escala



nanométrica. No que concerne ao PI, sabe-se que quanto menor for o valor apresentado maior é a homogeneidade de tamanhos na população de nanopartículas presente na dispersão. Com efeito, comparando ambas as técnicas, verifica-se que a técnica dos ultrassons permite obter nanopartículas com um PI inferior às obtidas pela técnica da HPH a quente.

Verifica-se que as dispersões produzidas pelo método dos ultrassons apresentam um ZP superior, comparativamente às produzidas pelo método do HPH. De acordo com a literatura, quanto maior o valor absoluto do ZP, mais estável será a dispersão ao longo do tempo, esperando-se uma melhor estabilidade das dispersões que apresentem um valor absoluto de ZP superior a 30 mV. Uma vez que a dispersão de SLN tem na sua constituição um estabilizador estérico (Tween® 80) e um estabilizador eletrostático (cloreto de benzalcónio), prevê-se ainda, tal como descrito na literatura, que a dispersão apresente uma melhor estabilidade (Mendes, 2013; Mendes *et al.*, 2013). O resultado obtido indica uma maior estabilidade das dispersões produzidas pelo método dos ultrassons. Neste sentido, foi selecionada a dispersão aquosa de SLN produzida pela técnica dos ultrassons para os restantes estudos.

A dispersão de SLN obtida pelo método dos ultrassons e armazenada a diferentes temperaturas (25°C e 4°C) foi analisada e caracterizada após 90 dias da sua produção. A análise visual confirmou a ausência de alterações macroscópicas nas dispersões aquosas. Além disso, após a medição dos tamanhos, PI e ZP, verificou-se a existência de pequenas variações dos valores comparativamente ao dia da produção (dia 0). No entanto, uma vez que os valores obtidos são semelhantes, considera-se que a dispersão obtida pelo método dos ultrassons apresenta estabilidade a ambas as temperaturas de armazenamento.

#### 4.2. Preparação de formulações semissólidas à base de dispersões de nanopartículas lipídicas

Após seleção da dispersão de SLN a utilizar procedeu-se à sua incorporação em três bases semissólidas, em diferentes proporções. A escolha da proporção de base *versus* dispersão SLN mais adequada para aplicação tópica fez-se através da análise

organoléptica das formulações obtidas, baseada na consistência e homogeneidade final apresentada pelas mesmas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Avaliação do aspeto físico da formulação quanto à proporção adequada de base semissólida:dispersão de SLN para aplicação tópica.

Base semissólida	Proporção base semissólida:SLN		
	60:40	50:50	40:60
Pomada hidrófila	+++*	++	+
Hidrogel	+++*	++	++
Creme O/A	++*	+	+

\* +++: consistência adequada; ++: consistência suficiente; +: consistência baixa.

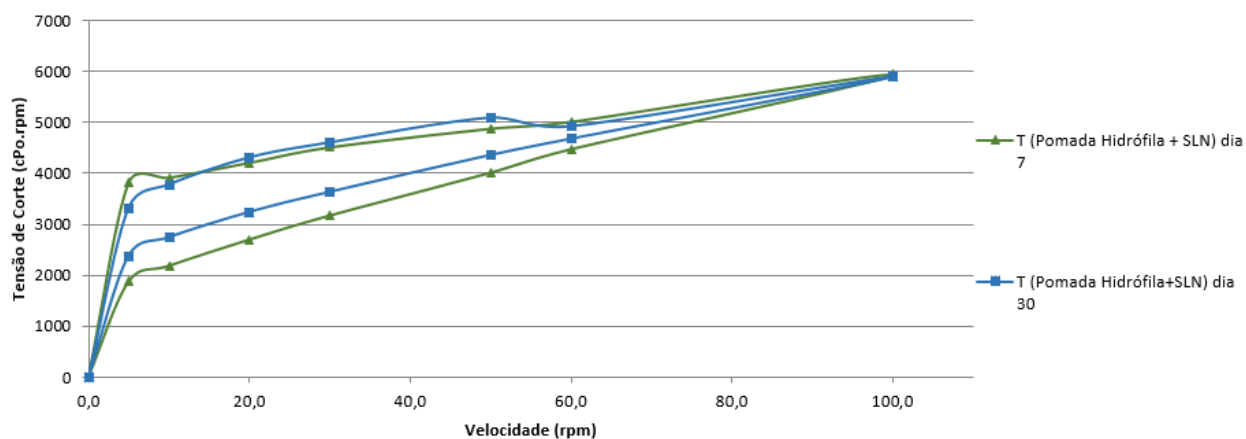
Após a incorporação da dispersão de SLN, observou-se uma diminuição da consistência original em todas as bases semissólidas testadas. Este comportamento já era previsível, uma vez que as dispersões de SLN apresentam uma elevada quantidade de água, tendo sido observado por outros autores (Gonzalez-Mira *et al.*, 2012; Karavana *et al.*, 2012; Tichota *et al.*, 2014).

De acordo com os resultados da Tabela 9, foram selecionadas como bases semissólidas a pomada hidrófila e o hidrogel, ambos na proporção 60:40.

O creme O/A ficou demasiado fluído após a incorporação das dispersões de SLN, não tendo sido possível efetuar a sua análise reológica. Além disso, após um mês de armazenamento à temperatura ambiente, este creme estava ainda mais fluído do que no dia da incorporação, concluindo-se que este sistema é pouco estável para incorporação de dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas.

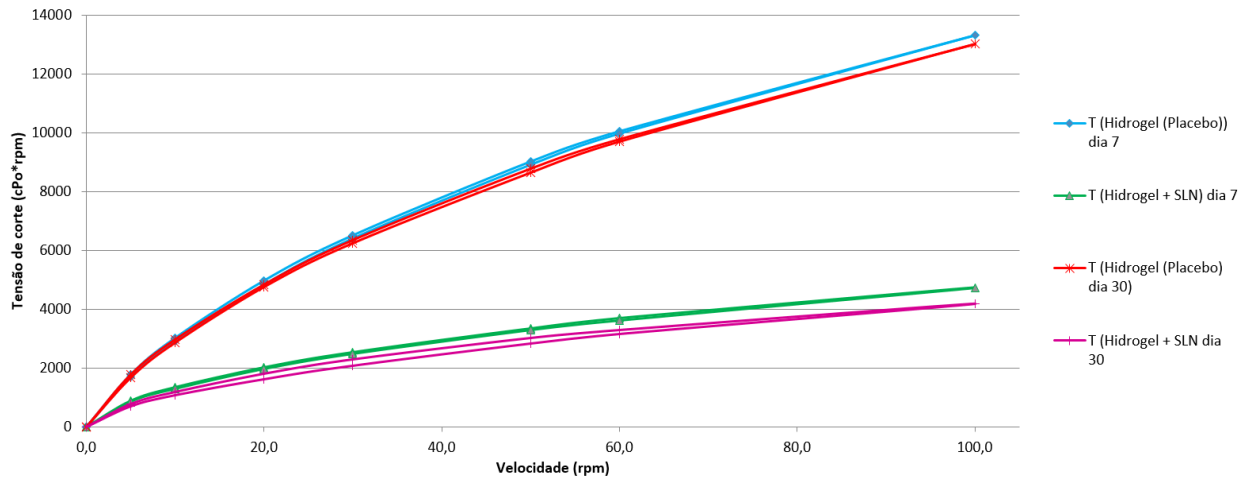
## 4.3. Avaliação do comportamento reológico das formulações semissólidas

A análise reológica foi realizada nos dias 7 e 30 após a incorporação das dispersões de SLN nas bases semissólidas. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4 e 5.



**Figura 4:** Comportamento reológico da pomada hidrófila contendo as SLN incorporadas, nos dias 7 e 30.

No gráfico anteriormente apresentado, não foi possível representar a curva Velocidade (rpm) *versus* Tensão de corte (cPo.rpm) da pomada hidrófila placebo, devido à elevada consistência apresentada por esta base, o que impossibilitou a avaliação do seu comportamento reológico.



**Figura 5:** Comportamento reológico do hidrogel placebo e do hidrogel contendo SLN incorporadas, nos dias 7 e 30.

Pela análise dos gráficos representados nas Figuras 4 e 5, verifica-se que todas as preparações semissólidas apresentaram um comportamento reofluidificante ou pseudoplástico (i.e. uma diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de corte). Além disso, a pomada hidrófila contendo SLN apresentou tixotropia, ou seja, uma diminuição da viscosidade aparente com a pressão exercida, ao longo do tempo. O comportamento tixotrópico é importante nas preparações semissólidas, pois permite o escoamento mais fácil destas a partir do recipiente de acondicionamento e um melhor espalhamento da preparação sobre a pele (Lee *et al.*, 2009; Mendes, 2013). O hidrogel contendo as SLN apresentou uma ligeira tixotropia após 30 dias, embora esta variação não seja relevante.

A análise dos gráficos permite ainda verificar um ligeiro aumento da viscosidade da pomada hidrófila ao longo do tempo de armazenamento. Por outro lado, no hidrogel verifica-se uma ligeira diminuição da viscosidade ao longo do tempo. Apesar das alterações anteriormente referidas, estas não são consideradas significativas, uma vez que os gráficos do comportamento reológico de ambos os sistemas semissólidos são praticamente sobreponíveis.

A análise dos gráficos anteriormente apresentados e dos valores de viscosidade obtidos indicam que os sistemas semissólidos sofrem uma diminuição da consistência aquando da incorporação das dispersões de SLN, como referido na secção 4.2.

#### 4.4. Estudos de estabilidade acelerada

Após 30 dias da incorporação da dispersão de SLN nas bases, procedeu-se à realização dos ensaios de estabilidade acelerada da pomada hidrófila (Figura 6) e do hidrogel (Figura 7), com o intuito de prever a estabilidade das mesmas.



**Figura 6:** Pomada hidrófila com SLN incorporadas após o primeiro (à esquerda) e o segundo (à direita) ciclo de centrifugação.

No caso da pomada hidrófila, verifica-se ausência de instabilidade após a primeira centrifugação, no entanto, após a segunda centrifugação, é possível observar uma ligeira alteração do sistema semissólido no fundo do tubo de Falcon<sup>®</sup>, através do aparecimento de um pequeno espaço de ar no sistema. No entanto, esta alteração não permite concluir acerca da instabilidade da formulação semissólida, uma vez que não é uma alteração marcada. Neste caso, uma vez que a alteração verificada não é significativa, espera-se também que este sistema seja estável ao longo do armazenamento, embora possa apresentar uma validade inferior comparativamente ao hidrogel.



**Figura 7:** Hidrogel com SLN incorporadas após o primeiro (à esquerda) e o segundo (à direita) ciclo de centrifugação.

A avaliação do aspeto dos tubos de Falcon<sup>®</sup> após ambos os ciclos de centrifugação permitiu verificar a ausência de instabilidade do hidrogel contendo SLN, uma vez que não apresenta espaços de ar na estrutura do sistema. Além disso, verifica-se a ausência de líquido sobrenadante após ambos os ciclos de centrifugação. Este resultado, tal como referido por Krambeck (2011), é preditivo de uma boa estabilidade do sistema ao longo do tempo.

Constatou-se também a ausência de alteração da cor de ambas as formulações semissólidas, após 30 dias de armazenamento, o que pode ser indicativo de ausência de degradação lipídica, embora esta observação necessite de confirmação, através de ensaios de análise de cor, efetuados com um colorímetro (Tichota *et al.*, 2014).

## **VI. Conclusões e perspectivas**

A utilização de nanopartículas lipídicas para veicular fármacos ou ingredientes ativos cosméticos apresenta vantagens relativamente aos sistemas tradicionais, sendo por isso desenvolvidos cada vez mais estudos nesta área.

Os estudos realizados, no período entre 2012 e 2016, e reportados neste trabalho comprovam a eficácia e utilidade deste sistema de veiculação. Apesar de ser comercializado apenas em cosméticos, verifica-se que as nanopartículas lipídicas têm bastante aplicabilidade e eficácia no setor farmacêutico, como sistemas de transporte de fármacos, permitindo a obtenção de melhores resultados da terapêutica e uma diminuição de efeitos secundários. Muitas vezes também permitem a diminuição do número de aplicações, devido à sua capacidade de libertação prolongada das substâncias encapsuladas, levando a uma maior adesão à terapêutica por parte do doente.

No decorrer do trabalho experimental realizado, concluiu-se que, de entre os dois métodos de produção utilizados, o método dos ultrassons se mostrou ser mais eficaz, levando à obtenção de sistemas de SLN com tamanhos menores e mais homogêneos. A incorporação da dispersão de SLN nos sistemas semissólidos testados levou a uma diminuição da sua consistência. Entre estes sistemas, o hidrogel e a pomada hidrófila mostraram ser adequados e, para além de manterem uma viscosidade e consistência apropriadas para aplicação tópica após incorporação das SLN, mantiveram-se estáveis durante 30 dias de armazenamento.

Conclui-se que as formulações semissólidas contendo SLN foram desenvolvidas com sucesso e prevê-se que apresentem uma boa estabilidade durante o armazenamento. Contudo, são necessários mais estudos no sentido de avaliar a estabilidade das formulações durante períodos de tempo mais longos. Se os resultados forem satisfatórios, as formulações desenvolvidas neste trabalho experimental podem ser utilizadas ao nível cosmético e farmacêutico. Em cosméticos, podem servir como hidratantes da pele, podendo ainda ser veiculados ingredientes ativos hidratantes, obtendo-se um efeito sinérgico da hidratação. Em formulações farmacêuticas, podem

ser usadas para veicular fármacos para administração cutânea, ocular, nasal e vaginal, onde é vantajoso aplicar preparações de consistência semissólida.



## VII. Bibliografia

- Agrawal, Y., Petkar, K. C. e Sawant, K. K. (2010). Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 401, pp. 93-102.
- Almeida, A. J. e Souto, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 478-490.
- Alukda, D., Sturgis, T. e Youan, B. B. C. (2011). Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, pp. 3345-3356.
- Alves, M. (2012). *Formulações Nanoestruturadas de Retinol*. Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Attama, A., Momoh, M. A. e Builders, P. F. (2012). Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. In: Sezer, A. D. (ed.) *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. InTech, pp 107-164.
- Bhalekar, M. R., Upadhaya, P. G., Nalawade, S. D., *et al.* (2015). Anti-rheumatic activity of chloroquine-SLN gel on wistar rats using complete freund's adjuvant (CFA) model. *Indian Journal of Rheumatology*, 10, pp. 58-64.
- Chattopadhyay, P., Shekunov, B. Y., Yim, D., *et al.* (2007). Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 444-453.

- Chavan, S. S., Ingle, S. G. e Vavia, P. R. (2013). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticle-based nasal spray of budesonide. *Drug Delivery and Translational Research*, 3, pp. 402-408.
- Chawla, V. e Saraf, S. A. (2012). Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, pp. 293-298.
- Chen, X., Peng, L.-H., Shan, Y.-H., *et al.* (2013). Astragaloside IV-loaded nanoparticle-enriched hydrogel induces wound healing and anti-scar activity through topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, pp. 171-181.
- Das, S. e Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12, pp. 62-76.
- Das, S., Ng, W. K. e Tan, R. B. (2014). Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: II. Evaluation of the imidazole antifungal drug-loaded nanoparticle dispersions and their gel formulations. *Nanotechnology*, 25, pp. 105-102.
- Deshmukh, K. e Amin, P. (2013). Formulation and evaluation of solid-lipid nanoparticle based 0.1% Soy isoflavone dermal gels. *Journal of Pharmaceutical and BioScience*, 1, pp. 7-18.
- Esposito, E., Vries, H., Pol, S., *et al.* (2015). Production, Physico-Chemical Characterization and Biodistribution Studies of Lipid Nanoparticles. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6, pp. 1-9.
- Fox, S. C. (2014). Drug delivery to skin. *Pharmaceutics*. Remington Education, pp. 401-422.

- Freitas, C. e Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 168, pp. 221-229.
- Garud, A., Singh, D. e Garud, N. (2012). Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1, pp. 384-393.
- Ghanbarzadeh, S., Hariri, R., Kouhsoltani, M., *et al.* (2015). Enhanced stability and dermal delivery of hydroquinone using solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, pp. 1004-1010.
- Gonzalez-Mira, E., Nikolić, S., Calpena, A. C., *et al.* (2012). Improved and safe transcorneal delivery of flurbiprofen by NLC and NLC-based hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, pp. 707-725.
- Haag, S., Chen, M., Peters, D., *et al.* (2011). Nanostructured lipid carriers as nitroxide depot system measured by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 421, pp. 364-369.
- Hao, J., Wang, X., Bi, Y., *et al.* (2014). Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, pp. 111-120.
- Infarmed (2008). *Farmacopeia Portuguesa IX*. Ministério da Saúde, Lisboa.
- Jain, A. K., Jain, A., Garg, N. K., *et al.* (2014). Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, pp. 222-229.

- Jain, S. e Jain, N. (2010). Multiparticulate carriers for sun-screening agents. *International Journal of Cosmetic Science*, 32, pp. 89-98.
- Jeon, H. S., Seo, J. E., Kim, M. S., *et al.* (2013). A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: effect of surface modification with dicetyl phosphate on skin permeation in vitro and anti-wrinkle effect in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 452, pp. 311-320.
- Karavana, S. Y., Gökçe, E. H., Rençber, S., *et al.* (2012). A new approach to the treatment of recurrent aphthous stomatitis with bioadhesive gels containing cyclosporine A solid lipid nanoparticles: in vivo/in vitro examinations. *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp. 5693-5704.
- Khurana, S., Bedi, P. e Jain, N. (2013). Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chemistry and Physics of Lipids*, 175, pp. 65-72.
- Kovacevic, A., Savic, S., Vuleta, G., *et al.* (2011). Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 406, pp. 163-172.
- Kovačević, A. B., Müller, R. H., Savić, S. D., *et al.* (2014). Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444, pp. 15-25.
- Krambeck, K. (2011). *Desenvolvimento de preparações cosméticas contendo vitamina C*. Dissertação de Mestrado Científico em Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto.
- Lee, C. H., Moturi, V. e Lee, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, 136, pp. 88-98.

- Mehnert, W. e Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, pp. 165-196.
- Mendes, A. (2013). *Preparação e Caracterização de Dispersões de Nanopartículas Lipídicas Contendo Miconazol*. Dissertação de Mestrado Científico em Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Mendes, A., Silva, A., Catita, J., *et al.* (2013). Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, pp. 755-763.
- Morabito, K., Shapley, N., Steeley, K., *et al.* (2011). Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. *International Journal of Cosmetic Science*, 33, pp. 385-390.
- Müller, R., Petersen, R., Hommos, A., *et al.* (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 522-530.
- Müller, R. H., Maèder, K. e Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, pp. 161-177.
- Müller, R. H., Radtke, M. e Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, pp. S131-S155.
- Nasrollahi, S. A., Abbasian, A. R. e Farboud, E. S. (2013). In vitro comparison of simple tretinoin-cream and cream loaded with tretinoin-SLN. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 2, pp. 1-7.

- Nassimi, M., Schleh, C., Lauenstein, H., *et al.* (2010). A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, pp. 107-116.
- Nikolić, S., Keck, C., Anselmi, C., *et al.* (2011). Skin photoprotection improvement: synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics*, 414, pp. 276-284.
- Oliveira, R. (2014). *Protocolos Laboratoriais de Tecnologia das Formas Farmacêuticas Semi-Sólidas*. Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Pandey, R., Sharma, S. e Khuller, G. (2005). Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis*, 85, pp. 415-420.
- Pardeike, J., Hommoss, A. e Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, pp. 170-184.
- Pardeike, J., Schwabe, K. e Müller, R. H. (2010). Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *International Journal of Pharmaceutics*, 396, pp. 166-173.
- Patidar, A., Thakur, D. S., Kumar, P., *et al.* (2010). A review on novel lipid based nanocarriers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, pp. 30-35.
- Prista, L. N., Alves, A. C., Morgado, R., *et al.* (2014). *Tecnologia Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

- Puglia, C. e Bonina, F. (2012). Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9, pp. 429-441.
- Puglia, C., Bonina, F., Rizza, L., *et al.* (2012). Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: in vitro percutaneous absorption and photostability studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, pp. 301-311.
- Puglia, C., Damiani, E., Offerta, A., *et al.* (2014). Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: characterization, in vitro penetration and photostability studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, pp. 211-217.
- Reverchon, E., Adami, R., Campardelli, R., *et al.* (2015). Supercritical fluids based techniques to process pharmaceutical products difficult to micronize: Palmitoylethanolamide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 102, pp. 24-31.
- Ricci, M., Puglia, C., Bonina, F., *et al.* (2005). Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, pp. 1149-1159.
- Shah, B., Khunt, D., Bhatt, H., *et al.* (2015a). Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: effect on formulation and characterization parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78, pp. 54-66.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., *et al.* (2015b). *Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability*. Springer Clam Heidelberg New York, Dor Drecht London, Springer.
- Silva, A., Amaral, M., González-Mira, E., *et al.* (2012a). Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of

- Risperidone: Preparation and characterization studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, pp. 241-248.
- Silva, A., González-Mira, E., García, M., *et al.* (2011a). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86, pp. 158-165.
- Silva, A., González-Mira, E., Lobo, J. S., *et al.* (2013). Current progresses on nanodelivery systems for the treatment of neuropsychiatric diseases: Alzheimer's and Schizophrenia. *Current Pharmaceutical Design*, 19, pp. 7185-7195.
- Silva, A., Santos, D., Ferreira, D., *et al.* (2009). Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, pp. 177-182.
- Silva, A. C., Amaral, M. H., Lobo, J., *et al.* (2015). Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16, pp. 291-302.
- Silva, A. C., Martins, S., Santos, D., *et al.* (2011b). Nanopartículas lipídicas. *In: Souto, E. B. e Lopes, C. M. (eds.). Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos*. Universidade Fernando Pessoa, pp. 299-336.
- Silva, A. C., Santos, D., Ferreira, D., *et al.* (2012b). Lipid-based nanocarriers as an alternative for oral delivery of poorly water-soluble drugs: peroral and mucosal routes. *Current Medicinal Chemistry*, 19, pp. 4495-4510.
- Singh, A., Ubrane, R., Prasad, P., *et al.* (2015). Preparation and Characterization of Rizatriptan Benzoate Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Brain Targeting. *Materials Today: Proceedings*, 2, pp. 4521-4543.



- Singhal, G. B., Patel, R. P., Prajapati, B., *et al.* (2011). Solid lipid nanoparticles and nano lipid carriers: as novel solid lipid based drug carrier. *International Research Journal of Pharmacy*, 2, pp. 20-52.
- Tichota, D. M., Silva, A. C., Lobo, J. M. S., *et al.* (2014). Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *International Journal of Nanomedicine*, 9, pp. 3855-3864.
- Üner, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, pp. 375-386.
- Uprit, S., Sahu, R. K., Roy, A., *et al.* (2013). Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, pp. 379-385.
- Wissing, S., Kayser, O. e Müller, R. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, pp. 1257-1272.
- Wissing, S. e Müller, R. (2002). The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, pp. 377-379.
- Wissing, S. A. e Müller, R. H. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 254, pp. 65-68.