



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Ana Isabel da Silva Mendes

Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas contendo miconazol

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Professora Doutora Carla Martins
Lopes (Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa)

Vila Real

Janeiro 2013

Agradecimentos

Expresso o meu sincero agradecimento a todas as pessoas e entidades que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Carla Martins Lopes por me ter dado a possibilidade de realizar este trabalho, pela orientação, disponibilidade e dedicação demonstradas ao longo deste ano.

À Professora Doutora Ana Catarina Silva por todo o apoio na realização deste trabalho, pelas revisões e sugestões efetuadas.

Ao Professor Doutor José Catita pela disponibilidade, pelo apoio e contributo nos ensaios de DSC, PCS e SEM.

À Professora Doutora Fátima Cerqueira pela atenção, disponibilidade e pela colaboração nos estudos *in vitro* da atividade antifúngica.

À Professora Doutora Paula Lopes por ter criado a oportunidade de realizar este trabalho.

À Universidade Fernando Pessoa (UFP) pelas condições e meios disponibilizados para a concretização deste trabalho.

Aos técnicos Ricardo, Pedro e Miguel do Centro de Recursos Laboratoriais (CERLAB) por todo o auxílio prestado.

À Paralab S.A. pela utilização dos equipamentos para as análises de DSC, PCS e SEM.

À Carla pela ajuda nos estudos *in vitro* da atividade antifúngica.

À minha família, em especial aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e compreensão.

Ao Tiago pela cumplicidade e apoio incondicional.

À Janssen-Cilag pela gentileza de ter fornecido o miconazol.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas contendo miconazol

Resumo

A candidose oral é uma infecção oportunista da cavidade oral e é causada pela proliferação de micro-organismos da espécie *Candida*, sendo a *C. albicans* a mais comum. O tratamento farmacológico desta infecção baseia-se na administração de compostos antifúngicos, nomeadamente o miconazol. O miconazol é um imidazol que apresenta uma reduzida solubilidade em água e uma fraca permeabilidade nas membranas biológicas, o que pode comprometer a sua atividade terapêutica. Deste modo, a sua administração na mucosa oral de forma eficaz depende do desenvolvimento de novas formulações. A mucosa oral apresenta inúmeras vantagens para a administração de fármacos, nomeadamente a excelente acessibilidade, a supressão do metabolismo hepático, a redução da dose administrada e a administração indolor. Contudo, a administração de fármacos nesta mucosa é influenciada pela secreção salivar, podendo ocorrer a deglutição involuntária da formulação farmacêutica e, por conseguinte, a perda do fármaco do local de ação. Deste modo, é imperativo o desenvolvimento de estratégias que promovam e prolonguem o contacto entre o fármaco e a mucosa oral. Neste sentido, os sistemas coloidais transportadores de fármacos têm merecido uma especial atenção por parte dos investigadores, dos quais se destacam as nanopartículas lipídicas pela elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, risco de toxicidade reduzido e possibilidade de libertação de fármacos em locais específicos de uma forma controlada. De acordo com a composição da matriz lipídica, as nanopartículas lipídicas podem ser distinguidas em SLN (nanopartículas de lípidos sólidos) e NLC (vetores lipídicos nanoestruturados).

O presente trabalho teve como objetivo encapsular miconazol em dispersões de nanopartículas lipídicas tendo em vista a sua aplicação na mucosa oral. Para tal, foram desenvolvidas e caracterizadas dispersões de SLN e NLC placebo pela técnica dos ultrassons e selecionada a formulação mais promissora. A caracterização da formulação de NLC selecionada permitiu verificar que os sistemas foram estáveis ao longo do tempo, cujas partículas apresentaram tamanho nanométrico (cerca de 200 nm) com um índice de polidispersão reduzido ($<0,3$). Adicionalmente, os NLC foram eficazes na encapsulação do miconazol, cuja atividade antifúngica se demonstrou superior à do miconazol na forma livre. Para permitir a sua aplicabilidade na mucosa oral, os NLC

foram incorporados num hidrogel que demonstrou um comportamento pseudoplástico com valor de cedência e tixotropia, favorecendo a administração mucosal de fármacos. Os estudos de libertação *in vitro* permitiram confirmar que os NLC possibilitam a libertação de fármacos de forma sustentada. Adicionalmente, constatou-se que a libertação do miconazol através da dispersão de NLC incorporada no hidrogel foi controlada pela matriz lipídica dos NLC e pela estrutura de rede do hidrogel. O estudo da atividade antifúngica do hidrogel realçou a melhoria da ação do miconazol contra a *C. albicans*, na medida em que foi necessário uma menor concentração de fármaco para obter o mesmo efeito antifúngico que a formulação comercial oral Daktarin[®]. De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que os sistemas de NLC permitem reduzir a dose de fármaco administrada e minimizar os possíveis efeitos adversos, mostrando um elevado potencial para a aplicação do miconazol na mucosa oral.

Palavras-chave: mucosa oral; miconazol; nanopartículas de lípidos sólidos; vetores lipídicos nanoestruturados; hidrogel.

Preparation and characterization of miconazole-loaded lipid nanoparticles dispersions

Abstract

Oral candidiasis is an opportunistic infection of the oral cavity caused by an overgrowth of different species of *Candida*, being *C. albicans* the most common. The pharmacological treatment of this infection often consists in the administration of antifungals, namely miconazole, which is an imidazole. However, the activity of this antifungal can be compromised by its poor aqueous solubility and low permeability in biological membranes. Therefore, the development of new formulations containing miconazole is required in order to improve their administration to the oral mucosa. This mucosal route is advantageous for drug administration due to its excellent accessibility, by-pass of hepatic first-pass metabolism, reduction of the drug dose and painless administration. Nonetheless, saliva secretion can prejudice the drug administration to the oral mucosa by involuntary swallowing that can result in drug loss from the target-site. To overcome this drawback, efforts have been done to promote and prolong contact of the drug to the oral mucosa, in particular by using colloidal delivery carriers. Among these nanocarriers, lipid nanoparticles offer distinct advantages as a great biocompatibility and biodegradability, which in turns reduce the risk of toxicity, target delivery and controlled drug release. According to the lipid matrix composition, lipid nanoparticles can be divided in solid lipid nanoparticles (SLN) or nanostructured lipid carriers (NLC).

The aim of this work was to encapsulate miconazole in lipid nanoparticles dispersions in order to deliver the drug in the oral mucosa. Different placebo dispersions were prepared by ultrasounds. The most promising NLC formulation was selected. The characterization of lipid nanoparticles dispersions showed that particle size was in a nanometric range (about 200 nm) with low polydispersity index ($<0,3$). In addition, lipid dispersions demonstrated long term stability, with high encapsulation efficiency of miconazole. Miconazole-loaded NLC had a great antifungal activity compared to the free miconazole. Further, NLC-based hydrogel formulation was prepared to allow oral mucosal delivery of miconazole. Pseudoplastic flow with yield value and thixotropy was obtained for the NLC-based hydrogel, which can favor the therapeutic effect of the formulation on the oral mucosa. In vitro release studies showed a sustained miconazole release from NLC formulations. The diffusion of miconazole from NLC-based hydrogel

was controlled by lipid matrix and network structure of hydrogel. Furthermore, activity antifungal of NLC-based hydrogel was compared to the commercial available product Daktarin[®], being concluded that it was required a much lower concentration of miconazole with NLC-based hydrogel to achieve the same effect of commercial product. Therefore, NLC systems allow the reduction of drug dose administrated and minimize possible adverse effects, showing a high potential for the application of miconazole oral mucosa.

Key words: oral mucosa; miconazole; solid lipid nanoparticles; nanostructured lipid carriers; hydrogel.

Índice

	Pág.
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xvi
Lista de abreviaturas e de símbolos	xviii
Introdução geral	1
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	1
1. Infeções fúngicas orais	4
1.1. Tratamento de infecções fúngicas orais.....	5
1.1.1. Miconazol.....	6
2. Administração de fármacos por via da mucosa oral	10
2.1. Anatomia e histologia da mucosa oral.....	11
2.2. Ambiente da mucosa oral.....	13
2.3. Permeabilidade da mucosa oral	14
2.4. Vias e mecanismos de absorção da mucosa oral.....	15
2.5. Vias de transporte de fármacos na mucosa oral	16
2.5.1. Estratégias para a administração de fármacos na mucosa oral.....	17
3. Veiculação de fármacos em nanopartículas lipídicas.....	19
3.1. Composição e caracterização estrutural.....	20
3.1.1. Influência da composição dos constituintes na formulação das nanopartículas	23
3.2. Técnicas de preparação	25
3.2.1. Homogeneização por alta pressão (HPH)	25
3.2.2. Técnica da microemulsão.....	28
3.2.3. Ultrassons.....	29
3.2.4. Emulsificação-evaporação do solvente.....	30
3.2.5. Dupla emulsão A/O/A.....	30

3.2.6.	Substituição do solvente.....	31
3.2.7.	Emulsificação-difusão do solvente	31
3.2.8.	Inversão de fases.....	31
3.2.9.	Extrusão em membrana.....	32
3.2.10.	Fluídos supercríticos	32
3.3.	Incorporação do fármaco e capacidade de carga	34
3.3.1.	Modelos de incorporação de fármacos	36
3.4.	Possíveis problemas na preparação e performance das SLN e NLC.....	40
3.4.1.	Degradação do fármaco	40
3.4.2.	Alterações na estrutura cristalina dos lípidos	40
3.4.3.	<i>Supercooled melts</i>	41
3.4.4.	Transformações polimórficas	43
3.4.5.	Fenómeno de gelificação.....	44
3.4.6.	Coexistência de diversas espécies coloidais.....	44
3.5.	Formulações contendo nanopartículas lipídicas para administração na mucosa oral	45
3.6.	Tolerância e toxicidade das nanopartículas lipídicas.....	46
	CAPÍTULO II - TRABALHO EXPERIMENTAL.....	49
1.	Objetivos.....	50
2.	Materiais	51
2.1.	Reagentes	51
2.2.	Leveduras	52
3.	Estudo da solubilidade lipídica do miconazol	53
3.1.	Metodologia.....	53
3.2.	Resultados e discussão	53
4.	Análise da miscibilidade lípido sólido/lípido líquido	56
4.1.	Metodologia.....	56
4.2.	Resultados e discussão	56
5.	Cristalinidade e polimorfismo das matérias-primas e das misturas lipídicas com fármaco.....	57

5.1.	Metodologia.....	57
5.2.	Resultados e discussão.....	58
6.	Estudos de pré-formulação	60
6.1.	Metodologia.....	60
6.1.1.	Preparação das dispersões de SLN e de NLC placebo	60
6.1.2.	Caracterização das dispersões de SLN e de NLC placebo.....	61
6.2.	Resultados e discussão	65
7.	Preparação e caracterização físico-química de dispersões de NLC contendo miconazol	69
7.1.	Metodologia.....	69
7.1.1.	Preparação de dispersões NLC placebo e contendo miconazol	69
7.1.2.	Caracterização das dispersões de NLC	70
7.2.	Resultados e discussão	70
7.2.1.	Estudo da cristalinidade	70
7.2.2.	Tamanho de partícula, PI e ZP	71
8.	Caracterização da dispersão de NLC _{2b} – morfologia, parâmetros de encapsulação, estabilidade ao longo do tempo e atividade antifúngica	73
8.1.	Metodologia.....	73
8.1.1.	Análise morfológica.....	73
8.1.2.	Determinação dos parâmetros de encapsulação da dispersão de NLC _{2b} M	74
8.1.3.	Estabilidade física ao longo do tempo das dispersões de NLC _{2b} placebo e contendo miconazol.....	75
8.1.4.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica da dispersão de NLC _{2b} M	75
8.2.	Resultados e discussão	76
8.2.1.	Análise morfológica.....	76
8.2.2.	Eficácia de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC)	76
8.2.3.	Estabilidade física ao longo do tempo das dispersões de NLC _{2b} placebo e contendo miconazol.....	76
8.2.4.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica da dispersão de NLC _{2b} M	77

9.	Preparação e caracterização de hidrogéis incorporando as dispersões de NLC _{2b} placebo e contendo miconazol.....	79
9.1.	Metodologia.....	79
9.1.1.	Preparação do hidrogel	79
9.1.2.	Incorporação das dispersões de NLC _{2b} placebo e contendo miconazol no hidrogel	79
9.1.3.	Análise da reologia dos hidrogéis	80
9.1.4.	Estudos de libertação <i>in vitro</i> do miconazol	81
9.1.5.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do HG-NLC _{2b} M	84
9.2.	Resultados e discussão	85
9.2.1.	Reologia dos hidrogéis	85
9.2.2.	Libertação <i>in vitro</i> do miconazol.....	87
9.2.3.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do HG-NLC _{2b} M	89
10.	Conclusões	91
	CAPÍTULO III - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	93
1.	Introdução	94
2.	Metodologia	95
2.1.	Preparação das soluções-padrão	95
2.2.	Determinação do espectro de absorção do miconazol.....	95
2.3.	Parâmetros de validação do método analítico	95
3.	Resultados e discussão	98
3.1.	Análises por espectrofotometria de absorção no UV/Vis	98
3.2.	Parâmetros de validação do método	98
3.2.1.	Especificidade.....	98
3.2.2.	Linearidade.....	98
3.2.3.	Precisão	100
3.2.4.	Exatidão	100
3.2.5.	Limite de deteção e limite de quantificação.....	101
4.	Conclusões	102

CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO GERAL E PERSPETIVAS FUTURAS	103
Referências bibliográficas	105

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1 - Estrutura química do miconazol [23].....	6
Figura 2 - Representação esquemática da distribuição e extensão das diferentes classes de mucosa oral. Adaptado de Squier e Kremer [45]......	11
Figura 3 - Representação esquemática da histologia da mucosa oral. Adaptado de Patel <i>et al.</i> [39]......	12
Figura 4 - Mecanismos de transporte de fármacos através do epitélio da mucosa oral. Adaptado de Silva <i>et al.</i> [58]......	16
Figura 5 - Estrutura cristalina da matriz lipídica: a) formação de uma estrutura “quase perfeita” nas SLN; b) matriz cristalina com várias imperfeições nos NLC. Adaptado de Müller <i>et al.</i> [72]......	23
Figura 6 - Tipos de SLN segundo os modelos teóricos de incorporação de fármacos. Adaptado de Muchow <i>et al.</i> [143]......	37
Figura 7 - Tipos de NLC segundo os modelos teóricos de incorporação de fármacos. Adaptado de Souto <i>et al.</i> [99]......	39
Figura 8- Termogramas das matérias-primas.	58
Figura 9 - Termogramas das matérias-primas ([1.3], [5.3], [6.3] e [7.3]) e das misturas lipídicas com miconazol ([2.3], [3.3] e [4.3])......	59
Figura 10 - Representação esquemática da concentração iônica e da diferença de potencial em função da distância a partir da superfície carregada da partícula no meio de dispersão. Adaptado de Malvern [185]......	64
Figura 11 - Termogramas das dispersões de SLN e de NLC placebo armazenadas a 25°C.....	65
Figura 12 - Termograma da dispersão de NLC ₂ placebo armazenada a 4°C.....	66
Figura 13 - Termogramas das dispersões NLC _{2a} e NLC _{2b} placebo e contendo miconazol, armazenadas a 25°C.....	70
Figura 14 - Comportamento reológico dos sistemas de acordo com a relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte: a) perfis dos sistemas Newtonianos e não-Newtonianos; b) perfil de tixotropia. Adaptado de Beck <i>et al.</i> [203]......	81
Figura 15 - Estudo da libertação <i>in viro</i> do miconazol pelo método de difusão por membrana de diálise.....	82

Figura 16 - Reogramas dos hidrogéis (HGs): a) no dia de preparação e b) após 30 dias de armazenamento.....	85
Figura 17 - Reograma da formulação comercial oral Daktarin®.....	86
Figura 18 - Perfis de libertação cumulativa de miconazol a partir da dispersão de NLC _{2b} M, do HG-NLC _{2b} M e da formulação comercial oral Daktarin® (valores médios, n=3).....	88
Figura 19 - Zonas de inibição dos hidrogéis preparados e da formulação comercial oral: 1 – HG; 2 – Daktarin®; 3 – HG-NLC _{2b} M e 4 – HG-NLC _{2b} P.....	90
Figura 20 - Curva analítica obtida através da medição dos valores de absorvência em função da concentração de miconazol (0,6-3,6 mg/ml).....	99

Índice de tabelas

	Pág.
Tabela 1 - Exemplos de lípidos utilizados para a preparação de nanopartículas lipídicas para administração oral.	21
Tabela 2 - Exemplos de tensoativos e co-tensoativos utilizados para preparar nanopartículas lipídicas para administração oral.	22
Tabela 3 - Exemplos de fármacos encapsulados em dispersões de SLN e NLC para administração oral.....	35
Tabela 4 - Estudo da solubilidade do miconazol nos lípidos sólidos testados	54
Tabela 5 - Estudo da solubilidade do miconazol nos lípidos líquidos testados.....	55
Tabela 6 - Composição das formulações de SLN e de NLC placebo.....	60
Tabela 7 - Tamanho médio de partícula (Z-ave) e PI das dispersões de SLN e de NLC placebo.	67
Tabela 8 - Composição das formulações de nanopartículas lipídicas placebo (NLC _{2a} P e NLC _{2b} P) e contendo miconazol (NLC _{2a} M e NLC _{2b} M).....	69
Tabela 9 - Tamanho médio de partícula (Z-ave) e PI das dispersões de NLC _{2a-2b} placebo e contendo miconazol, armazenadas a 25°C durante dois dias.....	71
Tabela 10 - Tamanho médio de partícula (Z-ave) e PI das dispersões de NLC _{2b} placebo e contendo miconazol, nos dias de armazenamento 2 e 90, em valores médios ± desvio padrão (n=3).	77
Tabela 11 - Concentração mínima inibitória (MIC), em µg/ml, para o miconazol na forma livre (dissolvido em DMSO) e para as dispersões de NLC _{2b} M e NLC _{2b} P.	78
Tabela 12 - Composição do hidrogel (HG).	79
Tabela 13 - Composição dos HGs contendo NLC (HG-NLC _{2b} P, hidrogel incorporando NLC _{2b} placebo; HG- NLC _{2b} M, hidrogel incorporando NLC _{2b} contendo miconazol). ...	80
Tabela 14 - Interpretação do mecanismo de libertação de acordo com o valor de <i>n</i>	84
Tabela 15 - Comparação dos dados cinéticos obtidos após o ajuste da libertação do miconazol a diferentes modelos cinéticos, a partir da dispersão de NLC _{2b} M, do HG-NLC _{2b} M e do Daktarin [®] : <i>k</i> , constante cinética de libertação; <i>R</i> ² , coeficiente de determinação; <i>n</i> , expoente de libertação.	88
Tabela 16 - Atividade antifúngica dos hidrogéis e do Daktarin [®] (média ± desvio padrão).....	90
Tabela 17 - Análise da variância da regressão efetuada no intervalo 0,6-3,6 mg/ml.. ...	99

Tabela 18 - Resultados obtidos para a repetibilidade (precisão intra-ensaio) e para a precisão intermédia do método analítico.....	100
--	-----

Lista de abreviaturas e de símbolos

µg	Micrograma
µl	Microlitro
A/O/A	Água/óleo/água
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
ATP	Adenosina Trifosfato (do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>)
AUC	Área Sob a Curva (do inglês, <i>Area Under Curve</i>)
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CO ₂	Dióxido de Carbono
CV	Coefficiente de Variação (do inglês, <i>Coefficient of Variation</i>)
D.O.	Densidade Ótica
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento (do inglês, <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EE	Eficiência de Encapsulação (do inglês, <i>Encapsulation Efficiency</i>)
GAMA	Fusão de Atomização de Gás Assistida (<i>Gas Assisted Melting Atomization</i>)
GRAS	Geralmente Reconhecida como Substância Segura (do inglês, <i>Generally Recognised As Safe</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)

HPH	Homogeneização por Alta Pressão (do inglês, <i>High Pression Homogenization</i>)
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFI	Infeções Fúngicas Invasivas (do inglês, <i>Invasive Fungal Infections</i>)
<i>k</i>	Constante Cinética de Libertação
LC	Capacidade de Carga (do inglês, <i>Load Capacity</i>)
LD	Difração a Laser (do inglês, <i>Laser Diffraction</i>)
m/m	Massa/massa
MCG	Grânulos de Revestimento da Membrana (do inglês, <i>Membrane-Coating Granules</i>)
mg	Miligramma
MIC	Concentração Mínima Inibitória (do inglês, <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (do inglês, <i>3-(N-Morpholino)Propanesulfonic Acid</i>)
mV	Milivolts
<i>n</i>	Expoente de Difusão
NLC	Vetores Lipídicos Nanoestruturados (do inglês, <i>Nanostructured Lipid Carriers</i>)
nm	Nanómetro
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
O/A	Óleo/água
°C	Graus Celsius
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fotões (do inglês, <i>Photon Correlation</i>

Spectroscopy)

PGSS	Partículas a Partir de Soluções Gasosas Saturadas (do inglês, <i>Particles From Gas-Saturated Solutions</i>)
PI	Índice de Polidispersão (do inglês, <i>Polidispersity Index</i>)
PVA	Álcool Polivinílico (do inglês, <i>Polyvinyl Alcohol</i>)
R	Coefficiente de Correlação
R ²	Coefficiente de Determinação
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês, <i>Reactive Species Oxygen</i>)
rpm	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês, <i>Reactive Species Oxygen</i>)
SCF	Fluido Supercrítico (do inglês, <i>Supercritic Fluid</i>)
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento (do inglês, <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SLN	Nanopartículas de Lípidos Sólidos (do inglês, <i>Solid Lipid Nanoparticles</i>)
TEM	Microscopia Eletrónica de Transmissão (do inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês, <i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção

Introdução geral

A nanotecnologia compreende o estudo, desenvolvimento e utilização de materiais com dimensões na magnitude da bilionésima parte do metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9}$ metros) e que apresentam propriedades funcionais (e.g. físicas, químicas) distintas das apresentadas numa escala de dimensões maiores [1, 2]. Com a diminuição do tamanho das partículas para dimensões nanométricas, os materiais apresentam uma maior superfície específica, aumentando a sua reatividade química, e uma maior dominância dos efeitos quânticos, que afeta as propriedades óticas, mecânicas, magnéticas e elétricas [3]. Deste modo, a nanotecnologia é uma área interdisciplinar que envolve conhecimentos de várias áreas, nomeadamente da física, química, biologia e engenharia [4].

Em 1959, Richard Feynman introduziu as primeiras ideias relativas à nanotecnologia, na sua palestra “*There’s plenty of room at the bottom*” proferida no encontro da *American Physical Society*. Nessa altura, Feynman propôs a hipótese de, num futuro próximo, ser possível manipular a matéria à escala molecular e atômica [5]. Desde então, vários investigadores debruçaram o seu estudo na área da nanotecnologia, sendo que atualmente a nanotecnologia tem aplicação em diferentes setores industriais, nomeadamente na indústria têxtil, de cosméticos, alimentar e farmacêutica [4].

Como referido anteriormente, uma das indústrias que pode beneficiar extensivamente com a nanotecnologia é a indústria farmacêutica. Nos últimos anos, os investigadores têm prestado especial atenção ao desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes e que possibilitem o controlo da libertação e da distribuição dos fármacos aos locais-alvo, no sentido de reduzir os efeitos secundários. Neste sentido, os progressos da nanotecnologia têm contribuído para o desenvolvimento de sistemas coloidais de veiculação de fármacos que representam uma alternativa promissora para a terapêutica direcionada e para melhorar as propriedades físico-químicas dos fármacos (eg. solubilidade, estabilidade), possibilitando o aumento da biodisponibilidade e, por conseguinte, uma maior eficácia do fármaco no local de ação [6]. São vários os sistemas coloidais utilizados para a veiculação de fármacos, dos quais se destacam os lipossomas, as nanopartículas lipídicas e as nanopartículas poliméricas [4, 6].

Inserido na área da nanotecnologia farmacêutica, o presente trabalho explora o potencial das nanopartículas lipídicas para a veiculação do miconazol, com o objetivo de melhorar a eficácia terapêutica deste composto antifúngico.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

1. Infecções fúngicas orais

A cavidade oral apresenta um ambiente peculiar, em termos de nutrientes, pH e humidade, favorável ao crescimento de uma grande variedade de micro-organismos. A flora comensal oral é composta essencialmente por bactérias, mas podem ser identificados fungos, protozoários e eventualmente vírus [7]. A maioria das espécies microbianas que reside na cavidade bucal convive de uma forma compatível com a saúde do hospedeiro, estando presente em baixas concentrações sem causar infeção [8]. Adicionalmente, a presença desta flora bacteriana apresenta aspetos benéficos, uma vez que evita a colonização por outras bactérias ou fungos, prevenindo possíveis infeções [9]. Nestas circunstâncias, em condições normais, a flora microbiana da cavidade oral e o sistema imunológico encontram-se em equilíbrio. Porém, a alteração do ambiente oral (e.g. pH, lesões) ou estados de imunossupressão podem levar ao desequilíbrio e originar infeção na cavidade oral. Deste modo, as infeções orais causadas por fungos são muito frequentes em populações de risco, nomeadamente transplantados, doentes com cancro e outros imunodeprimidos [10]. As infeções fúngicas orais podem ser superficiais, ou seja, o(s) agente(s) patogénico(s) causa(m) infeção na membrana mucosa da cavidade oral, ou invasivas (*Invasive Fungal Infections*, IFI), nas quais a(s) espécie(s) fúngica(s) patogénica(s) penetra(m) a mucosa oral e se dissemina(m) por via sistémica. De acordo com Niimi *et al.* [11], as IFI são causadas maioritariamente por fungos do género *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* e estão associadas a uma elevada morbilidade e mortalidade.

A infeção fúngica oral mais comum é a candidose oral [11], ocorrendo principalmente na primeira infância e na senescência, e em doentes imunodeprimidos [8]. A candidose oral é provocada pela proliferação de várias espécies do género *Candida* na cavidade oral, nomeadamente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* [8]. A proliferação destes micro-organismos pode ser desencadeada por fatores locais (por exemplo, alteração do pH, lesão, secreção salivar reduzida) ou fatores sistémicos (por exemplo, má nutrição, infeção pelo vírus de imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), quimioterapia e radioterapia). De um modo geral, esta infeção é localizada [12]. No entanto, é possível ocorrer uma infeção mais agressiva e induzir a candidose orofaríngea, desencadeando infeções sistémicas [13]. As candidoses sistémicas apresentam uma elevada taxa de mortalidade (entre os 71% e os 79%) [8].

Na população geral, a candidose oral não constitui um problema grave pois os micro-organismos que a desencadeiam são comensais normais da cavidade oral. Em pessoas saudáveis, esta infecção apresenta uma incidência de 20-75% sem causar danos. Em contrapartida, afeta significativamente doentes portadores do HIV/síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS*), ocorrendo em mais de 90% destes indivíduos dependendo do estado da doença, e doentes a fazer tratamento citostático, com uma incidência média entre os 30% e os 70% [13]. Os sintomas provocados pela candidose oral incluem o desconforto local, a deterioração da mucosa oral, a alteração do paladar, a disfagia e anorexia, contribuindo para o agravamento do estado de saúde dos doentes [13].

1.1. Tratamento de infecções fúngicas orais

Tal como referido anteriormente, para a grande maioria da população, as infecções fúngicas orais apresentam uma evolução positiva. Contudo, em doentes de risco, estas infecções podem ser potencialmente fatais [14]. Este facto realça a necessidade de implementar estratégias terapêuticas eficazes para combater as infecções fúngicas orais, eliminando os sintomas da doença e prevenindo a sua recorrência [13].

O tratamento farmacológico das infecções fúngicas compreende a administração de compostos antifúngicos, cujas principais classes são os polienos, os azóis (imidazóis e triazóis), as alilaminas e as benzilaminas. Atualmente existe uma grande variedade de fármacos antifúngicos disponível no mercado [15, 16]. Para o tratamento de infecções fúngicas orais, os antifúngicos mais utilizados são os polienos e os azóis [11].

De acordo com Brennan e Leyden [17], e dependendo da via de administração, um antifúngico ideal deve apresentar as seguintes características: (i) amplo espectro de ação, (ii) eficácia quando administrado em concentrações baixas, (iii) atividade fungicida em vez de fungistática, (iv) evitar o desenvolvimento de resistência fúngica, (v) eficácia quando aplicado topicamente, (vi) boa tolerância e (vii) não ser sensibilizante.

De um modo geral, o tratamento da candidose oral baseia-se na aplicação tópica de compostos antifúngicos [8, 15], nomeadamente o miconazol, o clotrimazol e a nistatina [8, 18]. Contudo, por vezes, pode ser necessário administrar um tratamento sistémico de administração peroral [15]. Nestes casos, o tratamento tópico deve ser aplicado concomitantemente com a terapêutica sistémica, no sentido de reduzir a dose e a duração do tratamento sistémico [8].

Dos vários compostos antifúngicos disponíveis, o miconazol tem sido bastante utilizado para o tratamento da candidose oral [10], pois apresenta atividade antifúngica sobre as espécies fúngicas frequentemente responsáveis por esta infecção, incluindo *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* [13].

1.1.1. Miconazol

O miconazol é um composto antifúngico da classe dos imidazóis que apresenta um largo espectro de ação [19]. Como propriedades químicas apresenta uma baixa solubilidade em água (inferior a 1 µg/ml) [20], sendo solúvel em metanol e em álcool [21], e um coeficiente de partilha (log P) octanol/água a 20°C de 5,6 [22] Este composto apresenta a fórmula molecular $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$, correspondendo a uma massa molecular relativa de 416,13 [21]. A estrutura química do miconazol encontra-se representada na Figura 1. Quanto às propriedades físicas, o miconazol possui um intervalo de fusão compreendido entre os 83-87°C, sendo que à temperatura ambiente se apresenta com o aspeto de pó branco [21].

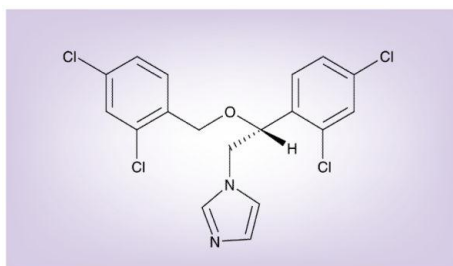


Figura 1 - Estrutura química do miconazol [23].

Atualmente, o miconazol encontra-se disponível para aplicação por diferentes vias, nomeadamente oral, parenteral e tópica [20]. A administração tópica representa a principal forma de aplicação, sendo o fármaco usado como base ou sal de nitrato [24, 25]. Para o tratamento de candidoses orofaríngeas é normalmente administrado sob a forma de gel oral [26].

1.1.1.1. Mecanismo de ação do miconazol

Os imidazóis são fungistáticos, ou seja, inibem o crescimento dos fungos [27]. No entanto, quando presentes em elevadas concentrações, podem apresentar atividade fungicida [28].

O principal mecanismo de ação dos imidazóis ocorre ao nível da membrana celular, inibindo reações de síntese nas vias metabólicas dos componentes da membrana celular dos fungos, como o ergosterol [29]. O miconazol inibe a esterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático dependente do citocromo P450, que é responsável pela produção do ergosterol [30]. A diminuição dos níveis de ergosterol e a acumulação de produtos intermediários de esterol tóxicos na membrana inibem o crescimento do fungo [30, 31].

O miconazol também pode apresentar uma atividade fungicida em várias espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* [23]. Além da inibição da biossíntese do ergosterol, o miconazol é capaz de induzir a acumulação de espécies reativas de oxigénio (*Reactive Species Oxygen*, ROS), provocando a morte celular dos micro-organismos por apoptose [31]. Francois *et al.* [32] verificaram essa indução em *C. albicans*, através de um mecanismo aparentemente relacionado com a inibição das enzimas peroxidase e catalase, ambas envolvidas na degradação dos radicais de peróxido e de peróxido de hidrogénio. Por sua vez, Thevissen *et al.* [33] demonstraram que o miconazol provocou alterações no citoesqueleto da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, indicativas do aumento da estabilidade dos filamentos de actina. Este acontecimento desencadeou a produção de ROS e consequentemente a apoptose da levedura.

Adicionalmente, o miconazol pode causar diretamente danos na membrana do micro-organismo pelo aumento da permeabilidade da mesma a substâncias intracelulares, como iões K^+ e adenosina trifosfato (ATP) [19, 29].

1.1.1.2. Farmacocinética e farmacodinâmica

A concentração mínima inibitória (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) do miconazol necessária para inibir o crescimento *in vitro* de dermatófitos, num meio mínimo essencial, está compreendida entre os 0,2 e os 10,0 $\mu\text{g/ml}$ [30]. A maioria das espécies *Candida* isoladas a partir de candidoses orais demonstra uma sensibilidade média a alta ao miconazol, com uma MIC que varia entre os 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ para *C. albicans* e inferior ou igual a 1 $\mu\text{g/ml}$ para *C. tropicalis* e *C. krusei* [34].

Cardot *et al.* [34] analisaram a farmacocinética do miconazol após a administração de um comprimido bioadesivo de libertação prolongada (Lauriad[®]), na mucosa bucal de 18 indivíduos saudáveis. Ao fim de 7 horas, o valor médio da concentração máxima salivar do miconazol foi de $15,1 \pm 16,2$ $\mu\text{g/ml}$. De acordo com estes dados, estimou-se uma

exposição média ao miconazol de $55,23 \pm 35,1$ $\mu\text{g/ml}$. Comparativamente à aplicação de um gel oral três vezes por dia, o comprimido mostrou ter uma concentração salivar maior e mais prolongada.

A absorção sistémica de comprimidos bucais de miconazol é limitada. As concentrações plasmáticas do miconazol encontram-se abaixo do limite mínimo de quantificação [35]. Uma quantidade significativa do miconazol absorvido é metabolizada pelo fígado, apresentando uma excreção renal inferior a 1% de fármaco inalterado [23].

O miconazol pode apresentar interações com outros fármacos. Num estudo recente realizado por Kovac *et al.* [36] foi administrado miconazol sob a forma de gel oral em doentes aos quais lhes era administrada a varfarina (fármaco anticoagulante). A interação entre o miconazol e a varfarina provocou hemorragias nos doentes. Os autores demonstraram a necessidade de ajustar a dose de varfarina quando esta é utilizada concomitantemente com antifúngicos tópicos (ex. miconazol e nistatina).

1.1.1.3. Resistência fúngica

O desenvolvimento da resistência é um processo multifatorial originado pela exposição repetida do agente patogénico a um determinado composto terapêutico. Os mecanismos envolvidos na resistência fúngica podem ser diversos, nomeadamente (i) a expulsão do antifúngico da célula patogénica através das bombas de efluxo (processo comum nos azóis), (ii) a existência de vias alternativas para a biossíntese de esterois, (iii) as modificações nos locais-alvo do antifúngico e (iv) a diminuição da concentração da enzima-alvo [14].

A população imunodeprimida, bem como o aumento da sua longevidade, tem contribuído para o aumento da utilização de compostos antifúngicos e consequente desenvolvimento da resistência fúngica [14]. A resistência da espécie *C. albicans* ao miconazol foi apontada como sendo superior a 17% e noutras espécies *Candida* foi de 45% [35].

1.1.1.4. Estudos clínicos

São diversos os estudos que demonstram a eficácia do miconazol contra vários organismos fúngicos [14]. Alguns exemplos desses estudos clínicos são apresentados seguidamente.

Isham e Ghannoum [10] determinaram a atividade antifúngica do miconazol contra isolados de *Candida* spp., nomeadamente *C. albicans*, *C. Krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (25 estirpes de cada espécie, das quais 22 são resistentes ao fluconazol). O miconazol apresentou uma atividade inibitória significativa contra todas as estirpes testadas. Apesar da maioria dos isolados serem resistentes ao fluconazol (composto triazólico), os mesmos mostraram-se suscetíveis ao miconazol. De acordo com estes resultados, é possível concluir que miconazol pode ser utilizado como tratamento de primeira linha em candidoses orofaríngeas.

Num outro estudo, foi determinada a eficácia e segurança de um comprimido bucal mucoadesivo contendo 10 mg de miconazol comparativamente com o tratamento sistémico com um comprimido contendo 400 mg de cetoconazol (composto imidazol), em doentes com infeção HIV/AIDS apresentando candidose orofaríngea. Os resultados demonstraram que, para além de ter sido bem tolerado, o comprimido de miconazol apresentou uma eficácia comparável ao cetoconazol [18].

Lappin *et al.* [37] demonstraram que a aplicação intravaginal de nitrato de miconazol a 2%, sob a forma de creme, durante um período de 7 dias, para o tratamento de candidose vulvovaginal apresentou uma eficácia comparável à aplicação de nitrato de butoconazol a 2%. A taxa de cura foi de 57,8% para o butoconazol e de 61,4% para o miconazol. Adicionalmente, ambos os tratamentos foram bem tolerados e não causaram efeitos adversos graves.

2. Administração de fármacos por via da mucosa oral

Nos últimos anos, a comunidade científica tem desenvolvido e reconsiderado novas estratégias de administração de fármacos que permitam melhorar a sua eficácia terapêutica e a segurança [38]. Neste sentido, tem sido prestada uma maior atenção às mucosas como local para a administração de fármacos, incluindo a mucosa oral, nasal, retal, vaginal e oftálmica [39].

A administração de fármacos é convencionalmente efetuada pela via peroral, dada a facilidade na administração e o reduzido custo [39]. Contudo, comparativamente com esta via, a administração através das mucosas confere diversas vantagens, nomeadamente: (i) a supressão do metabolismo hepático e da eventual degradação no trato gastrointestinal que, por sua vez, permite o aumento da biodisponibilidade; (ii) a redução na quantidade de fármaco administrada e (iii) o início rápido do efeito. A via mucosal permite ainda contornar a administração dolorosa característica da via parenteral [7, 39, 40].

Dentro das várias mucosas acessíveis, a mucosa oral é particularmente atrativa dada a excelente acessibilidade e a elevada aceitação por parte dos doentes [40, 41]. A mucosa oral é altamente vascularizada e, comparativamente com outras mucosas (e.g. intestinal, retal e nasal) apresenta uma atividade enzimática reduzida [42]. Porém, as propriedades de barreira à permeabilidade da mucosa oral constituem uma limitação ao transporte de fármacos por esta via [43]. A mucosa oral apresenta outras limitações, nomeadamente a necessidade de desenvolver fármacos com um sabor aceitável e que não sejam facilmente engolidos por acidente, a superfície específica relativamente pequena comparada com outras vias de administração e o tempo de exposição limitado, sendo mais apropriada para a administração de pequenas quantidades de fármaco [44].

A administração de fármacos através da mucosa oral pode ser designada como mucosal ou transmucosal. No primeiro caso, o efeito é local, ocorrendo uma libertação do fármaco num local específico da mucosa. Na administração transmucosal, ocorre a absorção do fármaco através da barreira mucosal, obtendo-se um efeito sistémico [39, 42]. Para o tratamento de doenças orais, a administração mucosal é mais eficaz, uma vez que reduz os efeitos adversos, diminui as perdas de fármaco noutras partes do corpo e permite o tratamento diretamente no local afetado [44]. Para uma melhor compreensão

das diferenças entre a administração mucosal e transmucosal, é apresentada uma breve descrição da anatomia e da histologia da mucosa oral.

2.1. Anatomia e histologia da mucosa oral

A cavidade oral engloba os lábios, as bochechas, a língua, os palatos duro e mole e o pavimento da boca [39]. Esta cavidade é revestida pela mucosa oral, que apresenta uma área de superfície de 100 cm² e inclui as mucosas bucal, sublingual, gengival, palatal e labial [39, 42].

De acordo com Squier e Kremer [45], a mucosa oral pode ser classificada em três tipos consoante a função desempenhada: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada. A Figura 2 ilustra a distribuição e a extensão dos diferentes tipos da mucosa oral. A mucosa de revestimento tem uma espessura compreendida entre os 500 e os 800 µm e representa cerca de 60% da mucosa oral, abrangendo os lábios, bochechas, palato mole, superfície inferior da língua, pavimento da boca e a mucosa alveolar. A espessura da mucosa mastigatória varia entre os 100 e os 200 µm e inclui as gengivas e o palato duro. A mucosa mastigatória corresponde a 25% da mucosa oral. A mucosa especializada reveste o dorso da língua e está envolvida no paladar, representando 15% da mucosa oral [42].

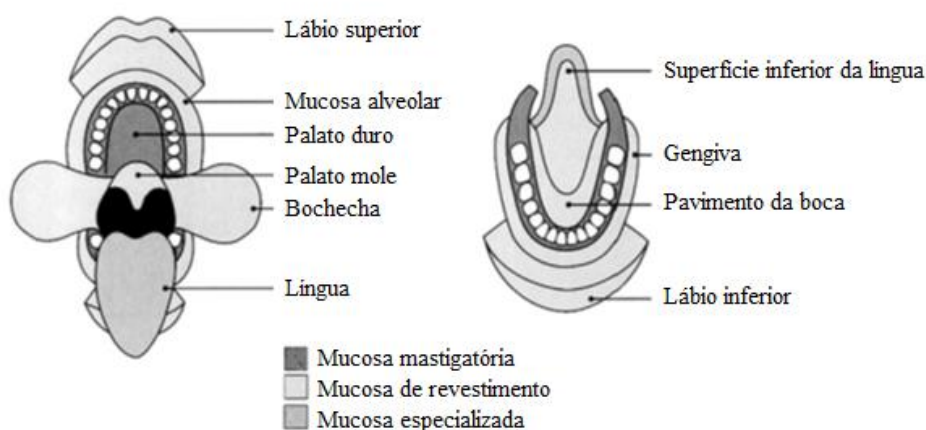


Figura 2 - Representação esquemática da distribuição e extensão das diferentes classes de mucosa oral. Adaptado de Squier e Kremer [45].

A Figura 3 apresenta esquematicamente a histologia da mucosa oral. A mucosa oral é estratificada, distinguindo-se três estratos fundamentais: o epitélio bucal, a membrana

basal e os tecidos conjuntivos. O epitélio bucal é o estrato mais superficial e é suportado pela membrana basal que, por sua vez, é sustentada pelos tecidos conjuntivos [41].

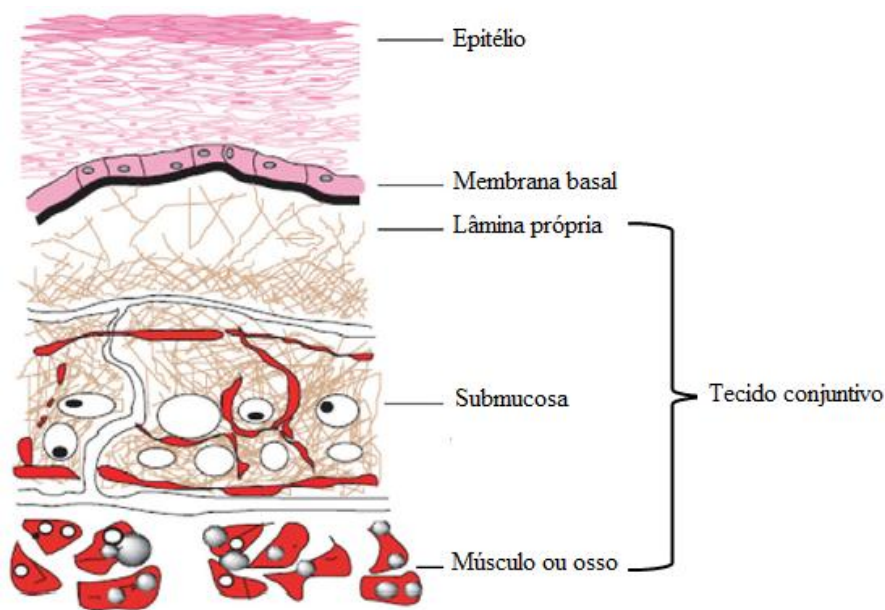


Figura 3 - Representação esquemática da histologia da mucosa oral. Adaptado de Patel *et al.* [39].

A maior diferença entre a mucosa da boca e do trato gastrintestinal é a organização do epitélio. Ao contrário do epitélio bucal, o epitélio no trato gastrintestinal é composto por uma única camada de células [45]. O epitélio bucal é um epitélio estratificado e escamoso composto por múltiplas camadas de células mitoticamente ativas, cujo nível de diferenciação diverge das camadas mais profundas para as mais superficiais [42]. Oriundas das células basais, as células epiteliais vão sofrendo um processo de maturação no qual alteram a sua forma, aumentam o seu tamanho e migram para a superfície [41]. Este estrato confere à mucosa oral uma função protetora contra alterações endógenas (por exemplo, a perda de fluídos dos tecidos conjuntivos), a entrada de potenciais agentes nocivos (micro-organismos, toxinas, antigénios) e contra as forças mecânicas [40, 46].

As células do epitélio podem ser ou não queratinizadas. Na mucosa de revestimento o epitélio não é queratinizado, uma vez que esta mucosa não está tão sujeita às forças mecânicas da mastigação. Pelo contrário, a mucosa mastigatória sofre diretamente os impactos da mastigação e, por isso, as suas células epiteliais são queratinizadas. O epitélio da mucosa especializada apresenta-se como um mosaico de células queratinizadas e não queratinizadas e encontra-se ligado ao músculo da língua [39, 45].

No epitélio bucal existem ainda junções intercelulares, nomeadamente junções *gap*, junções *tight*, desmossomas e hemidesmossomas [42]. As junções *gap* são as que apresentam maior interesse na administração de fármacos, uma vez que permitem o transporte de moléculas entre as células epiteliais [47].

A membrana basal, representando uma camada contínua de material extracelular, proporciona aderência entre o epitélio e o tecido conjuntivo e, adicionalmente atua como um suporte mecânico para o epitélio. Contudo, a maioria das propriedades mecânicas da mucosa oral provém dos tecidos conjuntivos. Estes tecidos são constituídos por fibras de colagénio, fibras elásticas, vasos sanguíneos, capilares e músculos lisos [40, 41]. A presença de inúmeros capilares sanguíneos confere à mucosa uma particular importância para a administração de fármacos [48, 49]. Na mucosa de revestimento, o tecido conjuntivo é mais elástico e flexível do que na mucosa mastigatória [45].

2.2. Ambiente da mucosa oral

A cavidade oral tem um ambiente rico em água devido à secreção contínua de saliva e à produção de muco [50].

A saliva é um fluido produzido pelas glândulas salivares que protege os tecidos da cavidade oral e atua como tampão, uma vez que mantém o pH da cavidade oral entre os 5,75 e os 7,05. A água é o principal constituinte da saliva (99,5%), mas esta também contém compostos orgânicos (0,3%), compostos inorgânicos e oligoelementos (0,2%) [7]. Diariamente, o volume de saliva produzido varia entre os 0,5 e os 2 litros [50]. A saliva pode influenciar positiva ou negativamente a administração de fármacos na mucosa oral. Se por um lado a secreção da saliva facilita o processo de dissolução do fármaco, por outro, a deglutição involuntária pode resultar na perda do fármaco do local de absorção. Adicionalmente, as enzimas presentes na saliva podem degradar alguns fármacos [51].

O muco é uma substância intercelular que reveste o epitélio oral, produzido pelas glândulas salivares como parte da saliva [50]. É essencialmente composto por água (cerca de 95-99%) e por complexos glicoproteicos aos quais se dá o nome de mucinas [52]. As mucinas podem estar ligadas a determinadas regiões da superfície das células, contribuindo para a adesão célula-célula. Adicionalmente, o muco atua como lubrificante e permite que as células se movimentem umas em relação às outras [50]. A

pH fisiológico, o muco está carregado negativamente devido à presença do ácido siálico e de resíduos de sulfato [53], formando uma estrutura coesiva em forma de gel que se liga à superfície epitelial. Dada esta característica, o muco pode ser vantajoso para promover a bioadesão de sistemas de transporte de fármacos mucoadesivos [50]. Contudo, o curto tempo de renovação do muco pode prejudicar a bioadesão a longo prazo e a libertação sustentada do fármaco [51].

2.3. Permeabilidade da mucosa oral

A mucosa oral é relativamente permeável, tendo uma permeabilidade 4-4000 vezes maior do que a pele [39, 48]. No entanto, a mucosa oral apresenta igualmente uma função de barreira à permeabilidade, fundamentalmente devido ao conteúdo lipídico dos espaços intercelulares nas camadas superiores do epitélio [46].

À medida que as células epiteliais migram para a superfície, formam-se junções desmossomais intercelulares e grânulos de revestimento da membrana (*Membrane-Coating Granules*, MCG) [43, 46]. Os MCG são pequenos organelos ovais ou esféricos derivados do complexo de Golgi, e encontram-se tanto no epitélio queratinizado como no epitélio não queratinizado, ainda que com conteúdos lipídicos diferentes. No epitélio queratinizado, os lípidos dos MCG incluem a esfingomiéline, ceramidas, glucosilceramidas e outros lípidos não polares, dispostos numa forma lamelar. Por sua vez, no epitélio não queratinizado, os componentes lipídicos dos MCG compreendem ésteres de colesterol, colesterol e glicoséfolípidos [50]. Nas camadas superficiais, os MCG fundem-se com a membrana plasmática e o conteúdo lipídico dos MCG é libertado para os espaços intercelulares, garantindo a coesão epitelial e dificultando a passagem de compostos hidrófobos pelo epitélio [41, 50].

A permeabilidade da mucosa oral varia consoante a região, devido às diferenças na espessura do epitélio e no grau de queratinização. Os tecidos queratinizados mostram-se menos permeáveis do que os tecidos não queratinizados, não devido à presença da queratina, mas sim pela variação na composição lipídica dos MCG entre estes tecidos [46]. A membrana basal também pode contribuir para a impermeabilidade da mucosa oral, embora em pouca medida dada a sua estrutura pouco densa [48]. Também os tecidos conjuntivos, pelo seu elevado nível de hidratação, dificultam a passagem de compostos lipófilos [46]. Contudo, as camadas superficiais do epitélio são o principal fator limitante à penetração de moléculas pela mucosa oral [48].

Resumindo, a permeabilidade da membrana da mucosa oral depende tanto de fatores relacionados com a própria membrana, que contribuem para a formação de fortes barreiras (e.g. mucina, queratina, lípidos intercelulares, espessura, membrana basal, renovação celular, drenagem sanguínea/linfática e atividade enzimática), como das características da molécula penetrante [41].

2.4. Vias e mecanismos de absorção da mucosa oral

As características físico-químicas da molécula penetrante, nomeadamente o peso e o tamanho molecular, a solubilidade lipídica e o grau de ionização, bem como o tipo de tecido a ser transposto, influenciam a taxa de penetração [40, 41]. Estes parâmetros intervêm também nas vias e mecanismos de absorção da mucosa oral.

O peso e o tamanho molecular dos fármacos influenciam o mecanismo de difusão através da camada epitelial [54]. Regra geral, as substâncias hidrófilas apresentam uma velocidade de penetração em função do seu peso molecular, diminuindo a permeabilidade com o aumento do seu peso molecular. As moléculas pequenas (i.e., com tamanho inferior a 75-100 Da) atravessam facilmente a mucosa oral. Contudo, no caso das moléculas hidrófobas esta relação peso molecular/permeabilidade não está demonstrada [55].

A capacidade de permear a mucosa oral depende também dos coeficientes de partilha óleo/água dos compostos, ou seja, da sua solubilidade lipídica. Regra geral, a permeabilidade aumenta à medida que aumenta o coeficiente de partilha óleo/água [56].

O grau de ionização dos compostos depende do seu pK e do pH da superfície da mucosa. No caso de ácidos e bases fracas, a forma não ionizada da molécula consegue permear a mucosa, uma vez que apresenta uma solubilidade lipídica compatível com a membrana da cavidade oral [40, 55]. Contudo, as espécies ionizadas possuem uma reduzida solubilidade lipídica, não conseguindo permear através da mucosa bucal, permanecendo no ambiente aquoso da saliva existente na cavidade oral [40, 57].

Atendendo à coexistência de regiões hidrófobas e hidrófilas na mucosa oral, os principais mecanismos pelos quais as moléculas de fármaco atravessam o epitélio mucosal são os seguintes (Figura 4): (i) difusão passiva, pela via transcelular (isto é, atravessando a membrana celular epitelial e entrando na célula, sendo a via de eleição para compostos hidrófobos) ou pela via paracelular (ou seja, passando entre as células

através do espaço intercelular, esta é a via de seleção para compostos hidrófilos devido à dificuldade que apresentam em permear a membrana celular lipófila); (ii) transporte mediado por proteínas transportadoras localizadas na membrana plasmática, por difusão facilitada (a favor do gradiente de concentração) ou por transporte ativo (contra o gradiente de concentração) e (iii) endocitose/exocitose (processo em que as células absorvem e excretam ativamente as moléculas) [40, 44]. Apesar das moléculas de fármaco permearem pela via que lhes oferece menos resistência, podem ser absorvidas por meio de um ou mais mecanismos em associação, podendo recorrer a uma via numa determinada região da mucosa oral e a outra via numa outra região diferente [40]. Todavia, a difusão passiva pela via paracelular constitui o principal mecanismo de absorção através da mucosa oral [43].

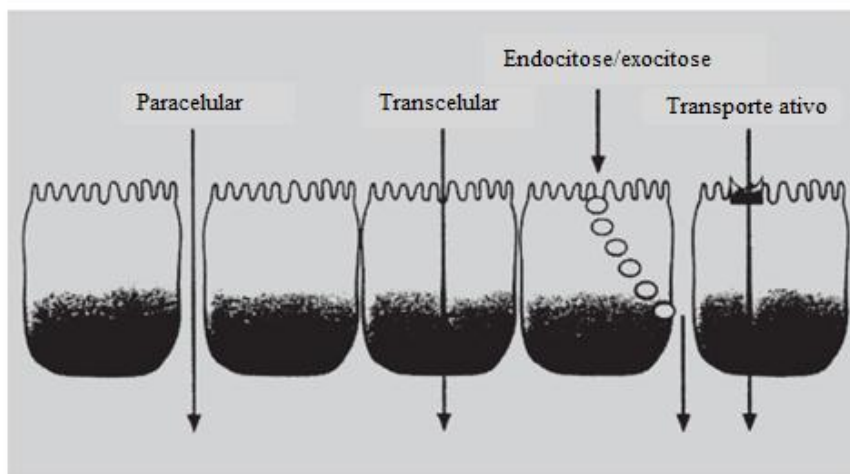


Figura 4 - Mecanismos de transporte de fármacos através do epitélio da mucosa oral. Adaptado de Silva *et al.* [58].

2.5. Vias de transporte de fármacos na mucosa oral

A mucosa oral representa uma via atrativa para o tratamento de diversas doenças, cujas terapias diferem nos perfis de penetração e retenção do fármaco. Deste modo, e com o objetivo de otimizar o tratamento e minimizar os efeitos adversos, a administração de fármaco na mucosa oral pode ocorrer em diferentes locais de administração, consoante o efeito terapêutico desejado [44].

A administração de fármacos na mucosa oral pode ocorrer por três principais vias de transporte de fármacos – a sublingual, a bucal e a local [50]. Estas categorias apresentam efeitos terapêuticos distintos, sendo que o transporte sublingual e bucal pretende uma ação sistêmica do fármaco, contrariamente ao transporte local [42]. O

transporte através da mucosa sublingual, devido ao elevado fluxo sanguíneo desta região, proporciona uma rápida absorção e biodisponibilidade do fármaco [50]. É adequado para o tratamento de doenças agudas [42] com regimes de dosagem pouco frequentes, e para uma libertação rápida de fármacos altamente permeáveis [50]. O transporte bucal é efetuado através da mucosa bucal (mucosa de revestimento das bochechas). Dado que esta mucosa é menos permeável do que a mucosa sublingual, o transporte bucal não possibilita uma absorção tão rápida e uma biodisponibilidade tão elevada, sendo mais adequado para a libertação sustentada do fármaco [50]. Comparativamente com outras mucosas, a mucosa bucal tem uma menor tendência para sofrer danos ou irritação, sendo também mais tolerante a potenciais agentes alergénicos. Deste modo, tem sido utilizada como local de administração de fármacos para o tratamento de doenças crónicas [7]. No transporte local, o fármaco é administrado nos tecidos da cavidade oral, nomeadamente nas gengivas e no palato. Esta categoria de transporte de fármacos é utilizada no tratamento de infeções fúngicas e bacterianas, doenças periodontais, estomatite dental, entre outras [50].

2.5.1. Estratégias para a administração de fármacos na mucosa oral

Para ultrapassar as limitações da mucosa oral à administração de fármacos, e de modo a obter o efeito terapêutico desejado, é necessário desenvolver estratégias que promovam e prolonguem o contacto entre o fármaco e a mucosa [42, 43]. Simultaneamente, estas estratégias devem garantir que a atividade farmacológica é restrita ao local-alvo, minimizando os efeitos adversos [59]. Os sistemas de veiculação de fármacos, nomeadamente os coloidais (e.g. nanopartículas, lipossomas) têm dado um grande contributo neste sentido, uma vez que permitem proteger as moléculas de fármaco da degradação enzimática própria dos mecanismos fisiológicos [59], podendo ainda promover a adesão à mucosa oral e limitar a biodistribuição do fármaco ao local de ação [60].

São vários os sistemas coloidais transportadores de fármacos que têm atraído a atenção dos investigadores farmacêuticos, dos quais se destacam as nanopartículas poliméricas, os lipossomas, as nanoemulsões e as nanopartículas lipídicas [61].

A seleção do vetor mais adequado para transportar os fármacos baseia-se em diversos aspetos, tais como: (i) capacidade de carga do fármaco; (ii) possibilidade de direcionar o fármaco a um local-alvo (i.e. *target delivery*); (iii) interação do sistema coloidal com o

meio biológico circundante; (iv) taxa de degradação e de acumulação do sistema; (v) toxicidade; (vi) transposição para produção em larga escala; (vii) estabilidade química e física durante o armazenamento e (viii) custos totais [62].

Aquando do desenvolvimento de sistemas coloidais transportadores de fármacos, um parâmetro importante a considerar é a composição dos mesmos, devendo esta ser aceitável para uso na terapêutica humana. Este requisito implica que os sistemas desenvolvidos sejam biocompatíveis, biodegradáveis e apresentem toxicidade reduzida ou nula [59]. Deste modo, as nanopartículas de natureza lipídica, por serem constituídas por moléculas semelhantes às fisiológicas, são suscetíveis de serem utilizadas em tecnologia farmacêutica, nomeadamente na administração direcionada de fármacos [63].

3. Veiculação de fármacos em nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas surgiram com o objetivo de obter um sistema coloidal transportador de fármacos que permitisse reunir as vantagens dos sistemas coloidais tradicionais (e.g. lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões), ao mesmo tempo que ultrapassasse as suas desvantagens [64].

Os lipossomas são sistemas transportadores de fármacos que, apesar da elevada biocompatibilidade e baixa toxicidade, demonstram alguma instabilidade sob condições fisiológicas no trato gastrointestinal, o que pode desencadear a rápida libertação do fármaco e comprometer a sua eficácia terapêutica [65]. Adicionalmente, existem problemas associados à técnica de esterilização e à produção em larga escala dos lipossomas, dificultando a introdução no mercado de formulações contendo estes sistemas [49, 65]. As nanoemulsões representam uma potencial alternativa aos lipossomas devido à facilidade na produção à escala industrial. Outras vantagens referidas para estes sistemas transportadores de fármacos são a elevada biocompatibilidade e eficiência de encapsulação de fármacos. No entanto, a libertação imediata do fármaco e a necessidade de utilizar elevadas concentrações de agentes tensoativos e co-tensoativos são fatores limitantes para a administração oral de formulações à base de nanoemulsões [49]. As nanopartículas poliméricas permitem o *target delivery* e a libertação controlada do fármaco. Contudo, não são facilmente produzidas à escala industrial e podem apresentar citotoxicidade, uma vez que a sua produção utiliza solventes orgânicos [64]. Deste modo, as nanopartículas lipídicas surgem como um sistema transportador alternativo e bastante atrativo, cuja matriz lipídica é sólida à temperatura ambiente e corporal, possibilitando a proteção e o controlo da libertação do fármaco [64, 66]. As nanopartículas lipídicas são constituídas por lípidos semelhantes aos fisiológicos, prevendo-se que sejam bem toleradas pelo organismo. Os excipientes utilizados na preparação das nanopartículas lipídicas são considerados substâncias GRAS (*Generally Recognised As Safe*), o que proporciona uma elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade e diminui o risco de toxicidade crónica e aguda [67, 68].

As nanopartículas lipídicas apresentam vantagens adicionais, tais como: (i) elevada estabilidade físico-química sem recurso a processos de liofilização ou de secagem por atomização; (ii) ausência de problemas associados à esterilização; (iii) facilidade de transposição para a escala industrial; (iv) possibilidade de encapsular fármacos

hidrófilos e lipófilos; (v) permitem direcionar o fármaco encapsulado para locais-alvo específicos; (vi) baixo custo de produção, tanto dos excipientes como da linha de produção; (vii) na sua produção não são utilizados solventes orgânicos [62, 66, 67].

A primeira geração de nanopartículas lipídicas, designadas por nanopartículas de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) foi desenvolvida na década de 90. Nessa altura, os grupos de investigadores de R.H. Müller e J.S. Lucks (Berlim, Alemanha) e de M.R. Gasco (Turim, Itália) patentaram as SLN usando técnicas de produção distintas [49]. Desde então, vários grupos de investigação têm focado a pesquisa nas nanopartículas lipídicas, visando a sua aplicação em diversas vias de administração, nomeadamente a oral, parenteral, dérmica/transdérmica, oftálmica e pulmonar [64].

Contudo, tal como os sistemas coloidais tradicionais, as SLN também apresentam algumas limitações. As SLN são constituídas por lípidos sólidos que tendem a formar uma estrutura cristalina mais ou menos perfeita, o que se pode traduzir numa insuficiente capacidade de carga do fármaco no seio da matriz lipídica sólida. Durante o período de armazenamento da formulação, pode ocorrer a expulsão do fármaco da matriz sólida, em virtude das transições polimórficas dos lípidos de configurações instáveis para configurações mais estáveis. Adicionalmente, as formulações de SLN apresentam uma elevada quantidade de água (70-95%), podendo ser facilmente contaminadas por micro-organismos [66, 69, 70].

A criação de uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os denominados vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) permitiu minimizar as potenciais limitações das SLN. Os NLC são constituídos por uma matriz lipídica com muitas imperfeições, o que possibilita a acomodação de uma maior quantidade de fármaco [66, 69]. Deste modo, os NLC apresentam uma maior capacidade de carga do que as SLN e, simultaneamente, uma menor possibilidade de ocorrer a expulsão do fármaco durante o armazenamento. Além disso, os NLC apresentam um menor teor de água e uma menor tendência para ocorrerem fenómenos de gelificação imprevisíveis [71].

3.1. Composição e caracterização estrutural

As nanopartículas lipídicas, i.e., as SLN e os NLC apresentam uma matriz lipídica que é sólida à temperatura ambiente e corporal [72]. De acordo com Müller e Mader [73], o tamanho médio destas nanopartículas varia entre os 50 e os 1000 nm.

As nanopartículas lipídicas são dispersões aquosas constituídas essencialmente por lípidos, agentes tensioativos e água. A fase lipídica das SLN é formada apenas por lípidos sólidos, contrariamente aos NLC que apresentam na sua composição lípidos sólidos misturados com lípidos líquidos [62]. A presença dos agentes tensioativos na formulação é essencial, uma vez que estes compostos revestem os lípidos e permitem estabilizar as partículas. Dependendo do tipo e da concentração do lípido, a concentração do(s) agente(s) tensioativo(s) pode variar entre os 0,5 e os 5% [74, 75]. A seleção criteriosa destes excipientes possibilita a preparação de partículas apropriadas ao fármaco a veicular e à via de administração a ser utilizada [62]. As Tabelas 1 e 2 apresentam, respetivamente, alguns exemplos de lípidos e agentes tensioativos utilizados na preparação de nanopartículas lipídicas.

Tabela 1 - Exemplos de lípidos utilizados para a preparação de nanopartículas lipídicas para administração oral.

Lípidos	Ponto de fusão	Referências
Triglicerídeos		
Trimiristina (Dynasan [®] 114)	55-58°C	[76, 77]
Tripalmitina (Dynasan [®] 116)	61-65°C	[76-79]
Tristearina (Dynasan [®] 118)	70-73°C	[77, 80]
Witepsol [®] 85E	42-44°C	[81]
Ácidos gordos		
Ácido esteárico	67-72°C	[80, 82]
Ácido palmítico	61-64°C	[83]
Ácido oléico	-	[80, 82]
Misturas de mono, di e triglicerídeos		
Monoestearato de glicerilo (Imwitor [®] 900)	54-64°C	[84-86]
Behenato de glicerilo (Compritol [®] 888 ATO)	65-77°C	[81, 86-88]
Palmito estearato de glicerilo (Precirol [®] ATO 5)	50-60°C	[81, 89, 90]
Ceras		
Palmitato de cetilo	54°C	[91, 92]
Cera de abelha	62-65°C	[93, 94]
Cera de carnaúba	80-88°C	[94]
- Óleo à temperatura ambiente		

Tabela 2 - Exemplos de agentes tensioativos e co-tensioativos utilizados para preparar nanopartículas lipídicas para administração oral.

Agentes tensioativos e co-tensioativos	Concentração	Referências
Poloxâmero 188	1% (m/v)	[77, 92, 95]
	1,5% (m/v)	[79, 95]
	2% (m/v)	[95]
	2,5%; 5% (m/m)	[86]
Poloxâmero 188 e Myverol 18-04K (monoglicerídeos ácido palmítico)	2,68% + 0,2% (m/m)	[90]
	2,4% + 0,2% (m/m)	[96]
Poloxâmero 407	2% (m/v)	[81, 91]
Polissorbato 80 (Tween [®] 80)	2% (m/v)	[81, 95]
	2,5%; 5% (m/m)	[86]
Polissorbato 80 (Tween [®] 80) e lecitina	1% + 2% (m/m)	[97]
	1,5% + 2% (m/m)	[97]
	2% + 2% (m/m)	[97]
	0,5% + 0,5% (m/v)	[94]
Polissorbato 20 (Tween [®] 20)	1,5% (m/v)	[82]
Tagat [®] S (monoestearato de polioxietileno glicerol) e Colato de sódio	2,5% + 0,5% (m/m)	[85, 98]

As SLN derivam das emulsões óleo/água (O/A) nas quais se substitui o lípido líquido (óleo) por um lípido sólido. A matriz resultante da preparação destas nanopartículas tende a formar uma estrutura cristalina relativamente perfeita (Figura 5a) diminuindo o espaço no qual o fármaco se pode acomodar. Por sua vez, os NLC são constituídos por uma mistura de lípidos estruturalmente diferentes - lípido sólido e lípido líquido, originando uma matriz lipídica com imperfeições (Figura 5b).

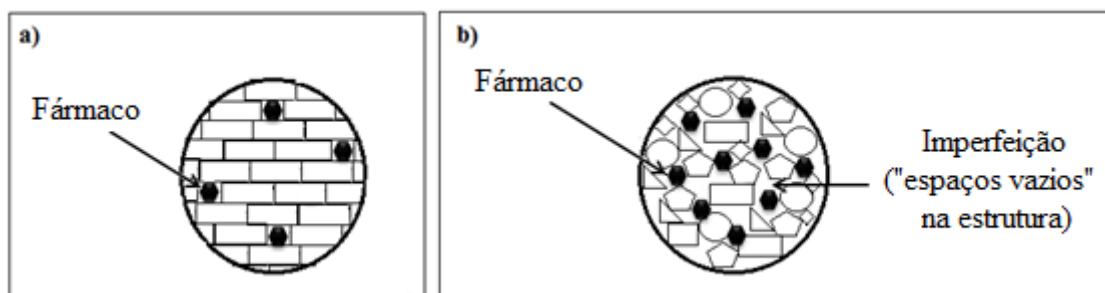


Figura 5 - Estrutura cristalina da matriz lipídica: a) formação de uma estrutura “quase perfeita” nas SLN; b) matriz cristalina com várias imperfeições nos NLC. Adaptado de Müller *et al.* [72].

3.1.1. Influência da composição dos constituintes na formulação das nanopartículas

A composição da formulação (isto é, fase aquosa com agente(s) tensoativo(s), lípido(s) e fármaco), bem como a técnica e as condições de preparação (e.g. o tempo, a temperatura, a pressão, o equipamento, o número de ciclos, a esterilização e a liofilização) influenciam a estabilidade das dispersões de nanopartículas lipídicas [67].

A seleção do material lipídico depende das propriedades de solubilidade do fármaco. Desta forma, para obter uma elevada eficácia de encapsulação (*Encapsulation Efficiency*, EE) e capacidade de carga (*Load Capacity*, LC), o fármaco deve ser dissolvido ou disperso na fase lipídica fundida. Como referido anteriormente, a mistura de lípidos com estruturas distintas possibilita uma maior capacidade de carga, em virtude das imperfeições que se criam na matriz lipídica. No entanto, a mistura de lípidos quimicamente muito diferentes pode originar os designados *supercooled melts* [99]. Estas estruturas serão abordadas posteriormente no subcapítulo 3.4.3.

3.1.1.1. Influência do material lipídico

A preparação das nanopartículas lipídicas é influenciada por parâmetros que variam consoante o material lipídico, como por exemplo, a composição, o comportamento de cristalização do lípido e a hidrofobicidade que, por sua vez, afeta a forma, a superfície específica e as propriedades autoemulsionantes dos cristais lipídicos [67].

De uma forma geral, os lípidos são constituídos por uma mistura de vários compostos químicos, cuja composição pode variar entre os diversos fabricantes ou, inclusive, entre diferentes lotes do mesmo fabricante. Uma pequena variação na composição do lípido pode ter um impacto significativo nas propriedades das nanopartículas produzidas,

como por exemplo, no tamanho e na estabilidade da formulação durante o armazenamento, uma vez que pode provocar alterações no valor do potencial zeta (*Zeta Potential*, ZP) [62, 67] e acelerar ou retardar o processo de cristalização [100].

Relativamente à influência dos lípidos sobre o tamanho das nanopartículas, Rai *et al.* [67] refere que lípidos com ponto de fusão mais elevados podem originar um aumento no tamanho das partículas de SLN. Verificou-se ainda que os lípidos com cadeias mais curtas de ácidos gordos e quantidades consideráveis de mono e diglicerídeos originam SLN com tamanho de partículas menor [67]. Adicionalmente, um aumento de 5-10% no conteúdo lipídico origina partículas de tamanho maior (inclusive a formação de micropartículas) e uma distribuição mais ampla do tamanho das partículas, isto é, um aumento no valor do índice de polidispersão (*Polidispersity Index*, PI) [62]. Este facto pode estar relacionado com o aumento da viscosidade do sistema e com o conseqüente decréscimo na eficácia da etapa de homogeneização que, por sua vez, possibilita a agregação das partículas [101, 102]. Deste modo, formam-se partículas com maior tamanho e maior índice de polidispersão [103].

3.1.1.2. Influência dos tensoativos

A seleção do(s) agente(s) tensoativo(s) e a sua concentração também afeta a estabilidade das nanopartículas lipídicas e as vias de administração da formulação. Tal como apresentado na Tabela 2, são vários os agentes tensoativos que têm sido utilizados na preparação de dispersões de nanopartículas lipídicas, incluindo os fosfolípidos, sais biliares, poloxâmeros e outros iónicos e não iónicos [62, 67, 104].

De uma forma geral, diminuindo a concentração do agente tensoativo ocorre o aumento do tamanho das partículas durante o armazenamento. Por sua vez, o aumento da concentração do agente tensoativo reduz a tensão de superfície e facilita a partição das partículas durante a etapa de homogeneização, promovendo a diminuição do tamanho das nanopartículas e o aumento da superfície específica das mesmas [62, 67, 105]. No entanto, a utilização de concentrações elevadas de tensoativos pode atribuir alguma toxicidade ao sistema de nanopartículas lipídicas [106].

A combinação de agentes tensoativos na formulação previne mais eficazmente a agregação das nanopartículas, conferindo-lhes uma maior estabilidade durante o armazenamento [62, 67].

3.2. Técnicas de preparação

A literatura científica descreve várias metodologias para a preparação das SLN e dos NLC. Entre elas, a técnica de homogeneização por alta pressão (*High Pressure Homogenization*, HPH) e a técnica de microemulsão têm-se revelado processos bastante atrativos pelo seu potencial de transposição para a escala industrial [107, 108]. Para além das anteriores, outras técnicas têm sido adaptadas a partir da preparação de nanopartículas poliméricas e testadas para a produção de nanopartículas lipídicas à escala laboratorial, das quais se destacam a técnica dos ultrassons, de emulsificação-*evaporação do solvente*, de substituição do solvente, de emulsificação-difusão do solvente, por inversão de fases, de extrusão em membrana e de fluídos supercríticos [66].

3.2.1. Homogeneização por alta pressão (HPH)

A HPH demonstrou ser uma técnica simples e rentável para a preparação de nanopartículas lipídicas [99]. Esta técnica foi desenvolvida por Müller e Lucks em 1993 e há vários anos que tem sido utilizada para a preparação de nanoemulsões para nutrição parenteral [62, 66]. Tal como referido anteriormente, ao contrário de outras técnicas de preparação de nanopartículas lipídicas, a HPH não apresenta problemas de transposição de escala, encontrando-se implementada na produção em larga escala desde os anos 50 [108-110].

A HPH consiste na fusão do material lipídico, no qual foi previamente dissolvido ou disperso o fármaco, e posterior emulsificação da fase lipídica com a fase aquosa que contém o(s) agente(s) tensoativo(s), mediante um homogeneizador de alta pressão [66, 108]. No homogeneizador, a dispersão aquosa é forçada a passar por um orifício muito estreito (10-30 μm) sob elevada pressão (100-2000 bar) que, numa curta distância, atinge uma velocidade elevada (acima de 1000 km/h). A tensão de corte elevada e a força de cavitação fragmentam as gotículas lipídicas em dimensões desejáveis, produzindo-se as nanopartículas [69, 105]. Devido à distribuição mais homogénea da energia de homogeneização e às reduzidas dimensões do orifício de saída do homogeneizador, esta técnica caracteriza-se por produzir partículas que apresentam tamanhos semelhantes, contribuindo para um menor índice de polidispersão e para uma maior estabilidade física da dispersão aquosa [66]. Geralmente, o conteúdo lipídico está presente numa concentração que varia entre os 5% e os 10%. Contudo, Lippacher *et al.*

[111] prepararam dispersões de SLN com concentrações lipídicas até 35%, mantendo o tamanho coloidal das partículas produzidas. Não obstante, durante a preparação das nanopartículas lipídicas, pode ocorrer a contaminação da dispersão por metais provenientes do homogeneizador [112]. A contaminação por metais foi analisada em nanosuspensões preparadas em condições extremas (20 ciclos de homogeneização a uma pressão de 1500 bar), tendo sido verificado que o ferro (metal predominante do aço) se encontrava presente num nível acrítico (valores inferiores a 1 parte por milhão) [113].

Na HPH, a homogeneização pode ser efetuada a elevadas temperaturas (HPH a quente) ou a temperaturas iguais ou inferiores à temperatura ambiente (HPH a frio). Em ambos os casos, o fármaco é previamente dissolvido ou disperso no lípido fundido, a uma temperatura 5-10°C acima do ponto de fusão do lípido [73].

3.2.1.1. HPH a quente

A HPH a quente é comparável à homogeneização de uma emulsão, uma vez que é efetuada a uma temperatura superior à do ponto de fusão dos lípidos. Numa primeira etapa, a fase lipídica fundida, que contém o fármaco, é dispersa numa solução aquosa de tensoativo, aquecida à mesma temperatura, por agitação mecânica (Ultra-Turrax) ou por recurso aos ultrassons [105]. Quando a pré-emulsão é submetida à HPH forma-se uma nanoemulsão. Após o arrefecimento da nanoemulsão à temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$), a fase lipídica solidifica, obtendo-se uma dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas [69, 107].

De uma forma geral, temperaturas elevadas resultam na preparação de partículas de menores dimensões, devido à diminuição da viscosidade da fase interna da emulsão. No entanto, a HPH a quente pode degradar o fármaco e/ou o sistema transportador devido às elevadas temperaturas [114]. A etapa de homogeneização pode ser repetida várias vezes, mas importa salientar que a HPH aumenta a temperatura da amostra (aproximadamente 10°C por cada 500 bar) [62]. Geralmente, 3 ciclos de homogeneização a uma pressão de 500 bar são suficientes para obter uma dispersão de nanopartículas com dimensões nanométricas [115, 116]. Um acréscimo do número de ciclos de homogeneização ou da pressão pode provocar um aumento do tamanho das partículas em virtude da elevada energia cinética das partículas e conseqüente coalescência das mesmas [62, 117].

A HPH a quente é adequada para incorporar fármacos lipófilos. Alguns autores referem que fármacos sensíveis à temperatura podem também ser encapsulados através desta técnica, dado que o tempo de exposição às temperaturas elevadas é relativamente curto [66, 73]. Quanto à encapsulação de fármacos hidrófilos, a HPH a quente não é a técnica mais apropriada pois, durante a homogeneização, estes fármacos não se incorporam na fase lipófila, resultando numa eficácia de encapsulação demasiado baixa. Para a encapsulação deste tipo de fármacos ou de fármacos termolábeis é preferível aplicar a técnica de HPH a frio [73].

3.2.1.2. HPH a frio

A HPH a frio é realizada com o lípido no estado sólido e consiste na moagem de uma suspensão a alta pressão. Nesta técnica, torna-se extremamente importante controlar e regular a temperatura, a fim de garantir que o lípido não funde devido ao aumento da temperatura durante a homogeneização [62].

Tal como na HPH a quente, é necessário executar a etapa pré-preparatória de dissolução ou dispersão do fármaco na fase lipídica fundida. Posteriormente, esta preparação é rapidamente arrefecida com recurso ao gelo seco ou ao azoto líquido. Este arrefecimento deve ser rápido, de forma a promover uma distribuição mais homogénea do fármaco na matriz lipídica [62]. Após a solidificação, ocorre a fragmentação da fase lipídica em micropartículas (apresentando um tamanho compreendido entre os 50 e os 100 μm) com o auxílio de um moinho. As micropartículas são posteriormente dispersas, sob agitação, numa solução aquosa gelada contendo o(s) agente(s) tensioativo(s). Como resultado desta etapa forma-se uma pré-suspensão que é homogeneizada a alta pressão no estado sólido a uma temperatura igual ou inferior à temperatura ambiente [99]. As forças de cavitação e de tensão de corte no orifício de saída do homogeneizador são suficientemente elevadas para produzir nanopartículas, que se mantêm no estado sólido [66].

A HPH a frio visa ultrapassar os problemas inerentes à HPH a quente, uma vez que minimiza a degradação da amostra devido à exposição térmica, embora não a evite dada a necessidade de dissolver ou dispersar o fármaco no lípido fundido; impede a passagem do fármaco da fase lipídica para a fase aquosa durante a homogeneização e facilita a solidificação das nanopartículas lipídicas à temperatura ambiente quando o processo de recristalização do lípido é complexo [62, 69, 107].

Comparativamente à produção de nanopartículas lipídicas pela HPH a quente, as partículas preparadas pela HPH a frio apresentam, geralmente, índices de polidispersão e tamanhos mais elevados [62, 75]. No entanto, um aumento no número de ciclos da HPH a frio pode originar nanopartículas com dimensões e índices de polidispersão mais reduzidos [66].

3.2.2. Técnica da microemulsão

O termo microemulsão é alvo de controvérsia, pois existem diferentes opiniões na comunidade científica sobre a sua estrutura e dinâmica [62, 73]. No contexto da preparação de nanopartículas lipídicas, Gasco e colaboradores desenvolveram SLN com base na diluição das microemulsões [118]. A microemulsão pode ser considerada como um sistema bifásico, que possui uma fase interna e outra externa, no qual se funde a fase lipídica contendo o fármaco e se aquece, à mesma temperatura, a fase aquosa contendo um agente tensioativo do tipo O/A e, na maioria dos casos, um agente co-tensioativo [66, 105]. Por agitação mecânica, as duas fases são emulsificadas em determinadas proporções (desde 1:2 até 1:100) para que se forme uma microemulsão transparente e termodinamicamente estável [66, 69]. Ainda quente e sob agitação moderada, a microemulsão é diluída em água fria, numa proporção típica de 1:25 a 1:50, o que induz a conversão da microemulsão numa nanoemulsão ultrafina. Simultaneamente, ocorre a precipitação da fase lipídica originando pequenas partículas dispersas no seio de uma fase aquosa [67, 107]. Uma estratégia para aumentar a concentração das nanopartículas obtidas consiste na remoção do excesso de água por ultrafiltração ou por liofilização [64].

O tamanho e a estrutura das nanopartículas formadas podem ser afetados pelas condições experimentais, como a composição da microemulsão, a velocidade da agitação mecânica aquando da diluição, o gradiente de temperatura e o valor de pH do meio [66, 119]. Uma diferença de temperatura elevada entre a microemulsão preparada e a solução aquosa resfriada facilita a rápida recristalização lipídica e previne a agregação [67, 119].

Esta técnica de preparação de nanopartículas lipídicas apresenta algumas limitações, tais como: (i) a necessidade da etapa de diluição em água, que conduz à redução da concentração das nanopartículas na suspensão [64, 68] e a um conteúdo lipídico menor comparativamente ao obtido com a HPH [119]; (ii) a remoção do excesso de água, que

apesar de aumentar a concentração das partículas, é uma tarefa difícil tendo em conta o tamanho das partículas [67, 115]; e (iii) as elevadas concentrações de agentes tensioativos e co-tensioativos necessários à estabilização da formulação [108].

A técnica da microemulsão tem potencial para ser facilmente transposta para a escala industrial, uma vez que não requer equipamentos de tensão de corte [105]. Na produção em larga escala, a técnica da microemulsão realiza-se num grande tanque de temperatura controlada e, de seguida, a microemulsão é bombeada para outro tanque que contém água fria para que ocorra a diluição. Tal como na produção à escala laboratorial, também à escala industrial a temperatura é um parâmetro importante que deve ser controlado, assim como a hidrodinâmica da mistura [73, 107].

3.2.3. Ultrassons

Para a preparação das nanopartículas lipídicas pela técnica dos ultrassons, a fase lipídica é submetida a uma temperatura superior à do ponto de fusão do lípido. Seguidamente, por agitação mecânica, procede-se à dispersão da fase lipídica na fase aquosa contendo o(s) agente(s) tensioativo(s) previamente aquecida à mesma temperatura [69, 120]. A pré-emulsão é submetida à sonda dos ultrassons para fragmentação das partículas que, após o arrefecimento da emulsão à temperatura ambiente, resulta na formação das nanopartículas lipídicas. Alterando a intensidade e a frequência da sonicação, é possível regular o tamanho das nanopartículas preparadas [67].

Os equipamentos necessários para o procedimento desta técnica são vulgarmente encontrados no laboratório, o que aliado ao seu fácil manuseamento resulta num modo simples e barato de preparar sistemas contendo nanopartículas lipídicas [62, 119, 120]. No entanto, a obtenção de partículas com tamanho nanométrico por ultrassons exige longos tempos de sonicação [121], aumentando o risco de contaminação da dispersão por metais libertados provenientes da erosão da sonda [96]. Adicionalmente, tem sido descrito que a técnica dos ultrassons origina dispersões com ampla distribuição do tamanho das partículas [122], o que pode conduzir à instabilidade física da dispersão durante o armazenamento. O aumento da concentração do(s) agente(s) tensioativo(s) ajuda a prevenir que tal instabilidade ocorra [62] podendo, contudo, acarretar problemas toxicológicos [119].

3.2.4. Emulsificação-evaporação do solvente

Esta técnica de preparação de nanopartículas lipídicas foi descrita por Sjöström e Bergenståhl e assenta na precipitação de lípidos em emulsões do tipo O/A [67]. O material lipídico é previamente dissolvido num solvente orgânico imiscível com a água (ex.: ciclohexano, clorofórmio, cloreto de metileno) e, de seguida, o fármaco é dissolvido na solução orgânica [66, 99]. A solução orgânica é posteriormente emulsionada, por agitação mecânica, numa fase aquosa contendo agente tensioativo do tipo O/A [107]. A dispersão de nanopartículas lipídicas forma-se através da precipitação do lípido no meio aquoso, após a remoção do solvente orgânico por evaporação sob pressão reduzida [67, 99].

O tamanho das nanopartículas lipídicas depende essencialmente do tipo e da concentração do(s) lípido(s), do(s) agente(s) tensioativo(s) e co-tensioativo(s) na fase orgânica. Esta técnica permite preparar partículas com tamanho muito reduzido (na ordem dos 30 a 100 nm) e índice de polidispersão baixo quando se utiliza uma concentração da fase lipídica de aproximadamente 5% [67, 123].

A grande vantagem desta técnica é a ausência da exposição térmica, o que a torna apropriada para a incorporação de fármacos termolábeis. Em contrapartida, a utilização de solventes orgânicos aumenta o risco de toxicidade da formulação final e a dispersão obtida pode estar demasiado diluída, necessitando de ser concentrada por ultrafiltração ou evaporação [107, 108].

3.2.5. Dupla emulsão A/O/A

A técnica da dupla emulsão água/óleo/água (A/O/A) baseia-se na técnica de emulsificação-evaporação do solvente e permite aumentar a eficácia de encapsulação de fármacos hidrófilos [65, 107]. Neste caso, obtém-se uma emulsão primária pela dissolução do fármaco numa solução aquosa (que corresponde à fase aquosa interna da dupla emulsão) e posterior emulsificação no lípido fundido. À pré-emulsão formada é adicionado um estabilizador (ex.: gelatina ou poloxâmero 407), para evitar que o fármaco se distribua pela fase aquosa externa durante a evaporação do solvente [69, 115]. Posteriormente, a emulsão primária é dispersa numa outra fase aquosa (externa) que contém um agente tensioativo hidrófilo, como por exemplo o álcool polivinílico (*Polyvinyl Alcohol*, PVA), obtendo-se uma dupla emulsão [69]. O solvente é removido por evaporação e as nanopartículas lipídicas obtidas por filtração [124].

3.2.6. Substituição do solvente

Fessi *et al.* [125] descreveram a técnica de substituição do solvente para a preparação de nanopartículas poliméricas. Posteriormente, esta técnica foi adaptada para a preparação de nanopartículas lipídicas [66]. Nesta técnica, o lípido é dissolvido num solvente orgânico semipolar miscível com a água (e.g. o etanol, a acetona ou o metanol) e o fármaco é de seguida dissolvido nesta solução [99]. Em simultâneo, é preparada uma fase aquosa contendo um agente tensioativo do tipo O/A. A etapa seguinte corresponde à injeção da fase orgânica na fase aquosa, sob agitação mecânica, para a formação das nanogotículas que são estabilizadas pelo agente tensioativo. O processo de formação de nanopartículas lipídicas decorre enquanto o solvente se difunde para a fase aquosa e o lípido da fase interna solidifica. Através do processo da destilação, o solvente é completamente removido [66].

3.2.7. Emulsificação-difusão do solvente

Patenteada por Quintanar-Guerrero *et al.* [126] a técnica de emulsificação-difusão do solvente utiliza um solvente orgânico parcialmente miscível em água (ex.: álcool benzílico, tetrahydrofurano, dimetilsulfóxido - DMSO) que é saturado previamente com água para obter um equilíbrio termodinâmico inicial entre os dois líquidos [66, 107]. Quando se dissolve o lípido no solvente orgânico saturado, forma-se uma solução orgânica na qual se dissolve o fármaco. Posteriormente, a solução é emulsionada com uma fase aquosa que contém um agente tensioativo do tipo O/A, sob agitação mecânica moderada [115]. A adição de água à emulsão recém-formada, numa proporção de 1:5 ou 1:10, resulta na difusão do solvente orgânico para a fase aquosa externa. Deste modo, o material lipídico precipita e formam-se as nanopartículas [69]. O solvente orgânico pode ser eliminado por ultrafiltração ou destilação, consoante o seu ponto de ebulição [66].

Otimizando as formulações, esta técnica permite obter nanopartículas com tamanho inferior a 100 nm e índices de polidispersão reduzidos (na ordem dos 0,06) [127]. À semelhança da técnica de evaporação do solvente, existe a possibilidade da formulação final conter resíduos do solvente orgânico, o que limita a utilização desta técnica [107].

3.2.8. Inversão de fases

Uma outra técnica que permite preparar nanopartículas lipídicas é a técnica da inversão de fases, desenvolvida por Heurtault *et al.* [128]. Numa primeira etapa, todos os

componentes da formulação são misturados sob agitação mecânica, utilizando um programa de temperatura entre os 25°C e os 85°C. Após mistura, a preparação é submetida a um tratamento térmico, composto por três ciclos de aquecimento e arrefecimento (85°C-60°C-85°C-60°C-85°C), a uma velocidade de 4°C/minuto, para que ocorra a inversão da emulsão. A segunda etapa consiste na adição de água destilada fria à mistura, induzindo um choque térmico irreversível. Este processo conduz à fragmentação do sistema e à consequente formação das nanopartículas lipídicas. A agitação mecânica lenta da dispersão aquosa evita a agregação das partículas [66, 99].

A técnica de inversão de fases é vantajosa na medida em que não utiliza solventes orgânicos e pode ser aplicada a fármacos termolábeis, pois, para além de possibilitar a alteração da escala da temperatura mediante o uso de eletrólitos, o período de aquecimento é reduzido [66]. Deste modo, e segundo Heurtault *et al.* [128], a probabilidade de degradação do fármaco durante o processo é reduzida.

3.2.9. Extrusão em membrana

A técnica de extrusão em membrana, descrita por Charcosset *et al.* [129], é uma alternativa recente para a preparação de nanopartículas lipídicas, estando também a ser investigada para a preparação de nanopartículas poliméricas. Nesta técnica a fase lipídica é aquecida a uma temperatura superior ao seu ponto de fusão e, seguidamente, pressiona-se a sua passagem por uma membrana porosa, formando-se pequenas gotículas de lípido líquido [75, 99]. Dentro da membrana circula uma fase aquosa no sentido transversal à sua superfície, arrastando as gotículas que se formaram nos poros para a superfície. Uma vez na superfície da membrana e sujeitas à temperatura ambiente, as gotículas cristalizam e formam-se as nanopartículas [66, 75].

O tamanho das nanopartículas pode ser controlado pelos vários parâmetros do processo, tais como a temperatura das duas fases (aquosa e lipídica), a velocidade do fluxo transversal da fase aquosa, a pressão da fase lipídica e o tamanho dos poros da membrana [75]. Como vantagens adicionais refere-se a facilidade da utilização e a capacidade de transposição para a escala industrial [66, 75].

3.2.10. Fluidos supercríticos

Recentemente têm sido desenvolvidas novas metodologias baseadas na tecnologia dos fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid*, SCF) para a preparação de micro e

nanopartículas. Os SCF formam-se quando se ultrapassa o ponto crítico termodinâmico de pressão e temperatura, exibindo propriedades de gases e de líquidos [66, 114]. A utilização do dióxido de carbono (CO₂) é muito comum no processamento de substâncias pelos SCF devido ao seu baixo ponto crítico, reduzida toxicidade, pureza aceitável e custos reduzidos [64, 114].

A tecnologia dos SCF demonstra flexibilidade para o processamento de materiais com propriedades físico-químicas distintas e tem como vantagens: (i) as condições de processamento moderadas com utilização limitada de produtos químicos agressivos, (ii) a utilização de uma substância supercrítica com propriedades esterilizadoras (CO₂), (iii) a fácil transposição para a escala industrial e (iv) a produção de formulações de partículas sob a forma de pós secos [65, 130].

Relativamente à preparação de nanopartículas de origem lipídica pela tecnologia de SCF, as publicações científicas são poucas. Contudo, citam-se em seguida dois exemplos descritos na literatura.

Chattopadhyay *et al.* [68], através do processo de extração de emulsões de fluidos supercríticos, preparou suspensões aquosas de SLN que incorporaram fármacos hidrófobos, nomeadamente a indometacina e o cetoprofeno, para administração pulmonar. No referido processo, as nanosuspensões lipídicas foram preparadas pela extração através do SCF do solvente orgânico das emulsões do tipo O/A. Inicialmente, prepararam uma emulsão do tipo O/A pela dissolução do lípido (tristearina, tripalmitina ou Gelucire[®] 50/13) e do fármaco (indometacina ou cetoprofeno) em clorofórmio e posteriormente, adicionaram uma fase aquosa contendo os agentes tensioativos (lecitina de soja e glicolato de sódio). A emulsão obtida foi submetida à homogeneização por alta pressão para a obtenção de uma nanoemulsão. Posteriormente, a nanoemulsão foi introduzida numa coluna de extração para a remoção do solvente orgânico mediante a utilização de CO₂ supercrítico. No final, obtiveram-se nanosuspensões aquosas de SLN puras que foram eficazmente transformadas em aerossóis pelos sistemas Aradigm's AERx[®] Single Dose Platform (SDP) e AERx Essence[™] com potencial para aplicação tópica ou administração sistémica. Neste processo, os parâmetros que afetaram o tamanho da partícula foram o tamanho das gotas da emulsão, a natureza da emulsão e a concentração do fármaco, do solvente e do agente tensioativo na emulsão. Para a precipitação da partícula é requerido um tempo curto de processamento, o que permite uma operação mais controlada e a distribuição uniforme do tamanho da partícula.

Durante a extração do solvente orgânico, a interação entre o SCF e o lípido pode diminuir ou suprimir o ponto de fusão, possibilitando a geração de partículas sólidas com diferentes estruturas e propriedades físicas [68].

Um outro exemplo da preparação de nanopartículas lipídicas com o uso da tecnologia dos SCF são as SLN contendo insulina preparadas por uma variante do processo PGSS (*Particles from Gas-Saturated Solutions*), denominada fusão de atomização de gás assistida (*Gas Assisted Melting Atomization*, GAMA). Neste caso, a formulação destinava-se à administração cutânea. No processo, a insulina foi dissolvida num solvente orgânico – o DMSO, e posteriormente incorporada numa mistura lipídica, constituída por triestearina, fosfatidilcolina e dioctil sulfosucinato, previamente fundida. A massa lipídica resultante foi comprimida com CO₂, resultando em SLN com insulina incorporada, apresentando propriedades de libertação controlada com a atividade biológica da insulina preservada. Contudo, esta técnica recorre a um solvente orgânico, mesmo que moderado como o DMSO, conferindo-lhe alguma desvantagem sobre as técnicas clássicas [64, 65].

3.3. Incorporação do fármaco e capacidade de carga

Um sistema farmacêutico para ser eficaz deve apresentar uma elevada capacidade de carga para a incorporação de fármacos [73, 115]. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos recentes da encapsulação de fármacos em nanopartículas lipídicas para administração oral.

Tabela 3 - Exemplos de fármacos encapsulados em dispersões de SLN e NLC para administração oral.

Fármaco	Sistema lipídico	Técnica de preparação	Efeitos relevantes	Ref.
Apomorfina	SLN	Ultrassons	- Aumento da biodisponibilidade oral - Direcionamento do fármaco ao local alvo (i.e., corpo estriado do cérebro)	[131]
Carvedilol	SLN	Microemulsão	- Aumento da biodisponibilidade oral	[132]
Ciclosporina	SLN	HPH a quente	- Aumento da biodisponibilidade oral - Liberação modulada do fármaco, <i>in vivo</i> (em porcos)	[98]
Curcumina	SLN	Microemulsão	- Aumento da biodisponibilidade oral	[133]
Insulina	SLN	Emulsificação-difusão do solvente	- Aumento da biodisponibilidade oral	[134]
Isoniazida, pirazinamida, rifampicina	SLN	Emulsificação do solvente	- Prolongamento do tempo de circulação sanguínea do fármaco - Redução da frequência de administração do fármaco	[135]
Luteína	NLC	Ultrassons	- Proteção do fármaco da degradação enzimática do fluido gástrico simulado - Liberação controlada do fármaco (<i>in vitro</i>)	[96]
Norfloxacina	SLN	Ultrassons	- Aumento da biodisponibilidade oral - Prolongamento dos níveis plasmáticos do fármaco	[136]
Praziquantel	SLN	Ultrassons	- Aumento da biodisponibilidade oral	[137]
Quercetina	SLN	Emulsificação e solidificação a baixa temperatura	- Aumento da biodisponibilidade oral - Liberação controlada do fármaco (<i>in vivo</i>)	[138]
Ramipril	SLN	Ultrassons	- Aumento da biodisponibilidade oral - Liberação controlada do fármaco (<i>in vitro</i>)	[95]

Risperidona	SLN	HPH a quente; ultrassons	- Libertação controlada do fármaco (<i>in vitro</i>)	[121]
Silimarina	SLN	HPH a quente e a frio	- Aumento da biodisponibilidade oral - Direcionamento do fármaco ao local terapêutico (fígado)	[139]
Sinvastatina	SLN	Emulsificação- evaporação do solvente	- Aumento da biodisponibilidade oral	[140]
Tripterina	NLC	Emulsificação- evaporação do solvente	- Aumento da quantidade de fármaco absorvido no intestino - Diminuição da citotoxicidade do fármaco (em modelos celulares Caco-2)	[141]
Undecanoato de testosterona	NLC	HPH a quente	- Redução da frequência de administração do fármaco	[80]

A capacidade de carga representa a percentagem de fármaco encapsulado em relação à fase lipídica (ou seja, matriz lipídica + fármaco) [73], sendo expressa pela Equação 1 [142]:

$$LC(\%) = \frac{\text{Quantidade total de fármaco} - \text{Fármaco livre}}{\text{Quantidade total de fármaco} - \text{Fármaco livre} + \text{Quantidade total de lípido}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

O fármaco pode ser incorporado em diferentes locais da nanopartícula lipídica: no núcleo, na interface ou estar molecularmente disperso [73, 115, 143]. São vários os fatores que determinam a capacidade de carga de fármaco no lípido, nomeadamente (i) a solubilidade do fármaco no lípido sólido (no caso das SLN) ou na mistura de lípido(s) sólido(s) e lípido(s) líquido(s) (no caso dos NLC); (ii) a estrutura química e física da matriz lipídica e (iii) o estado polimórfico do material lipídico [73, 144].

3.3.1. Modelos de incorporação de fármacos

Consoante a composição da formulação e as condições de preparação, diferentes tipos de SLN e NLC podem ser preparados, permitindo a incorporação de fármacos conforme a descrição de vários modelos [145]. No caso das SLN, os modelos de incorporação diferem na localização e na distribuição do fármaco no interior do núcleo lipídico

sólido. No que respeita aos NLC, a diferença reside principalmente no tipo de lípidos que constitui a matriz [99].

3.3.1.1. Modelos de incorporação de fármacos em SLN

Para a incorporação de fármacos nas SLN existem três modelos descritos na literatura (Figura 6): (i) modelo da matriz homogénea (SLN do tipo I), (ii) modelo da parede enriquecida em fármaco (SLN do tipo II) e (iii) modelo do núcleo enriquecido em fármaco (SLN do tipo III) [143].

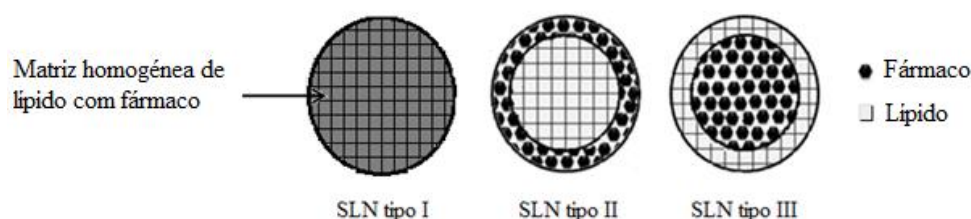


Figura 6 - Tipos de SLN segundo os modelos teóricos de incorporação de fármacos. Adaptado de Muchow *et al.* [143].

As SLN do tipo I derivam de soluções com uma relação otimizada de lipídeo e fármaco, obtidas através da técnica de homogeneização por alta pressão, a frio ou a quente [99]. Quando se recorre à HPH a frio, o fármaco está molecularmente disperso no lipídeo e após a solidificação desta mistura, as forças mecânicas exercidas pelo HPH promovem a formação de nanopartículas com uma matriz homogénea. Por sua vez, na HPH a quente, as gotículas do lipídeo produzidas durante o processo cristalizam após o arrefecimento, não havendo separação entre o lipídeo e o fármaco [145]. Este modelo de incorporação origina nanopartículas contendo o fármaco molecularmente disperso ou em agregados amorfos [75, 99]. Consequentemente, as SLN do tipo I possibilitam a libertação controlada do fármaco por um mecanismo de difusão a partir da matriz lipídica ou pela degradação da nanopartícula no intestino [99, 143].

Nas SLN do tipo II, o fármaco está presente em baixa concentração no lipídeo fundido e encontra-se maioritariamente na parede que reveste o núcleo lipídico. Este modelo é função da solubilidade do fármaco na fase aquosa contendo agente tensioativo a temperaturas elevadas, durante o processo de HPH a quente. O fármaco difunde-se da fase lipídica para a fase aquosa durante a etapa de homogeneização. Após o arrefecimento das nanoemulsões O/A, e porque a solubilidade na fase aquosa diminui, o fármaco tenta redistribuir-se na fase lipídica. Porém, as moléculas lipídicas solidificam

primeiramente, originando um núcleo sólido livre de fármaco e uma parede externa rica em fármaco [99, 143, 145]. Ao contrário do modelo anterior, este modelo de incorporação não é adequado para a libertação controlada, pois proporciona uma libertação rápida do fármaco [99, 143]. Em contrapartida, é adequado para a preparação de SLN para administração tópica nos casos em que se pretende aumentar a biodisponibilidade do fármaco, promovendo a sua penetração cutânea através da libertação imediata e simultaneamente obter um efeito oclusivo resultante do núcleo lipídico [66].

As SLN do tipo III apresentam um núcleo enriquecido em fármaco. Contrariamente às SLN do tipo II, nas SLN do tipo III o fármaco precipita antes de ocorrer a recristalização do lípido fundido, pois encontra-se na sua concentração de saturação ou relativamente próxima desta [69, 75, 99]. Desta forma, atinge-se um valor superior ao da saturação do fármaco no lípido fundido e subsequente precipitação do fármaco. Quando ocorre a recristalização lipídica, forma-se uma membrana protetora em torno do fármaco precipitado. Este modelo, à semelhança do modelo da matriz homogénea permite a libertação controlada do fármaco [99, 143].

Os modelos acima referidos representam tipos ideais da incorporação de fármacos nas SLN. No entanto, podem existir tipos mistos, considerados como um quarto modelo, uma vez que a distribuição das moléculas do fármaco nas SLN depende não só das condições de preparação, mas também da natureza química do fármaco e dos excipientes e da interação entre eles [145].

3.3.1.2. Modelos de incorporação de fármacos em NLC

Relativamente aos NLC, existem também três modelos que descrevem a incorporação de fármacos (Figura 7): (i) o modelo do cristal imperfeito (NLC do tipo I), (ii) o modelo amorfo (NLC do tipo II) e (iii) o modelo múltiplo (NLC do tipo III) [69, 75, 99].

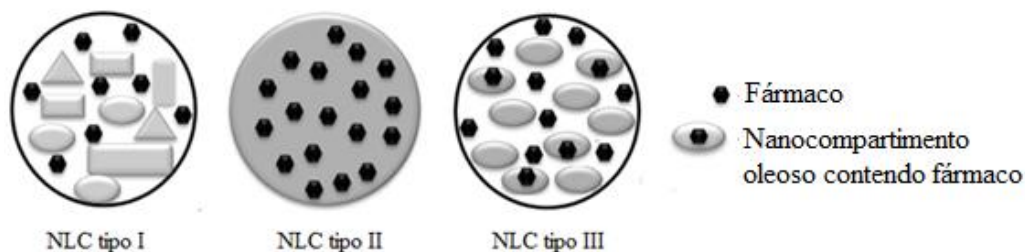


Figura 7 - Tipos de NLC segundo os modelos teóricos de incorporação de fármacos. Adaptado de Souto *et al.* [99].

O modelo de cristal imperfeito (i.e. NLC tipo I) obtém-se pela mistura de lípidos sólidos e pequenas quantidades de lípidos líquidos (óleos) que, devido a diferenças na estrutura e nas condições no processo de cristalização, não são capazes de formar uma estrutura ordenada. Desta forma, origina-se uma matriz com várias imperfeições e espaços vazios que permitem uma maior acomodação das moléculas de fármaco [69, 75, 99]

Os NLC do tipo II são obtidos a partir da mistura de lípidos sólidos com lípidos especiais, como por exemplo o hidroxioctacosanil-hidroxioleato, o miristato de isopropilo ou triglicerídeos de cadeia média (e.g. Miglyol[®] 812) que não recristalizam após o processo de homogeneização e arrefecimento da nanoemulsão [146]. Estes lípidos permitem a preparação de partículas sólidas com estrutura amorfa mas não cristalina, minimizando a expulsão do fármaco durante o armazenamento pois evita a cristalização para formas mais estáveis [69, 75, 99]. Geralmente, este tipo de nanopartículas apresenta um elevado teor de lípidos líquidos, uma vez que a solubilidade do fármaco nestes lípidos é maior do que nos lípidos sólidos [69].

O modelo múltiplo compreende os NLC do tipo III que apresentam pequenos nanocompartimentos oleosos dentro da matriz lipídica sólida, gerados pela separação de fases. Este tipo de NLC é obtido através da mistura de lípidos sólidos com lípidos líquidos numa proporção onde se excede a solubilidade das moléculas de óleo no lípido sólido. Após a produção da nanoemulsão a elevadas temperaturas (80°C), ocorre o arrefecimento e as gotas de lípido alcançam a miscibilidade (cerca dos 40°C), precipitando sob a forma de pequenas gotas no lípido sólido fundido. Com a solidificação da matriz sólida, ocorre a fixação dos nanocompartimentos oleosos [75, 99]. Este modelo aumenta a capacidade carga das nanopartículas pelo aumento da quantidade de lípido líquido na fase lipófila [69, 99].

3.4. Possíveis problemas na preparação e performance das SLN e NLC

Embora apresentem inúmeras vantagens comparativamente com outros sistemas coloidais transportadores de fármacos, as nanopartículas lipídicas têm também limitações associadas à sua preparação e performance [62, 105]. Durante o armazenamento, a estabilidade da dispersão lipídica pode ser comprometida por diversos fenómenos, como a gelificação, o aumento do tamanho das partículas e as modificações lipídicas para estruturas cristalinas mais estáveis que, em última análise, conduzem à expulsão do fármaco do sistema transportador [62]. Estes e outros aspetos que afetam a estabilidade da dispersão durante o armazenamento são referidos de seguida.

3.4.1. Degradação do fármaco

Durante a preparação das nanopartículas lipídicas pode ocorrer a degradação do fármaco, essencialmente induzida pela tensão de corte e temperaturas elevadas. O peso molecular e a estrutura molecular do fármaco são os parâmetros mais importantes para prever a sua degradação. Deste modo, os fármacos com peso molecular baixo ou moléculas com forma esférica são menos sensíveis do que os que apresentam elevado peso molecular e moléculas de cadeia longa. Um exemplo deste facto é a degradação do ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA), da albumina ou da eritropoietina causada pela HPH durante a preparação das nanopartículas [62], em contraste com a lisozima que se manteve inalterável e ativa após a HPH [65]. Atendendo a estas considerações, a HPH pode não ser a técnica mais adequada ao processamento de fármacos sensíveis ao cisalhamento, embora a degradação induzida pela técnica HPH não represente um problema para a maioria dos fármacos [62, 105]. Por outro lado, e tal como já foi referido anteriormente, durante o armazenamento das formulações contendo nanopartículas, o fármaco pode ser expulso do sistema transportador, ocorrendo a sua rápida degradação [147].

3.4.2. Alterações na estrutura cristalina dos lípidos

A estrutura cristalina lipídica é um fator determinante da performance das nanopartículas lipídicas, uma vez que se relaciona com a incorporação do fármaco a longo prazo. A caracterização do estado físico das partículas lipídicas permite a otimização controlada da incorporação do fármaco. Esta caracterização é realizada por diferentes métodos, como a calorimetria diferencial de varrimento (*Differential*

Scanning Calorimetry, DSC), a ressonância magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) ou os raios-X [62, 73].

Devido ao seu tamanho coloidal, os lípidos na dispersão de SLN e de NLC exibem propriedades diferentes da matéria-prima (*bulk*), particularmente no que se refere ao comportamento de fusão e de cristalização e à cinética das transições polimórficas [148]. A existência de *supercooled melts*, as transformações polimórficas durante o armazenamento e os fenômenos de gelificação são os aspectos mais importantes relacionados com a estrutura cristalina dos lípidos, que influenciam a incorporação do fármaco nas nanopartículas lipídicas [62].

3.4.3. *Supercooled melts*

Durante a preparação das nanopartículas, as gotículas dos lípidos da emulsão devem ser arrefecidas a uma temperatura inferior à do ponto crítico de cristalização, ou seja, bastante inferior à do ponto de fusão do lípido. A diferença de temperatura entre os pontos de fusão e de cristalização dá-se no nome de *supercooling* [99]. Se a temperatura crítica de cristalização não for alcançada, as partículas permanecem no estado líquido e não se formam as dispersões das nanopartículas lipídicas [99]. Nestas situações obtêm-se, por sua vez, as *supercooled melts*, que não são mais do que nanoemulsões. Este fenómeno não é invulgar durante o armazenamento das SLN. Contudo, e dado que as vantagens das SLN e dos NLC sobre as nanoemulsões estão relacionadas com o estado sólido do lípido, as *supercooled melts* merecem uma atenção especial [62, 148]. A presença das *supercooled melts* pode ser verificada por diferentes técnicas analíticas, como os raios-X, o DSC ou o NMR, embora esta última permita uma análise mais rápida e não destrutiva [62].

A temperatura crítica de cristalização depende essencialmente da natureza do lípido [149]. Determinados lípidos, como a trilaurina, a tricaprina e algumas bases de Witepsol[®], têm tendência a formar *supercooled melts* e, por conseguinte, não devem ser utilizados na preparação de SLN e de NLC caso se pretenda uma libertação controlada do fármaco [99].

Nas dispersões coloidais e devido ao seu tamanho reduzido, os nanocristais lipídicos fundem a uma temperatura 3 a 5°C inferior à do ponto de fusão do material lipídico *bulk*. Desta forma, a diferença entre a temperatura de fusão e a de recristalização (*supercooling*) é maior nas dispersões coloidais do que no material *bulk*. Por exemplo,

os lípidos tristearina, tripalmitina, trimiristina e trilaurina apresentam, respetivamente, uma temperatura de fusão de 73°C, 64°C, 56°C e 47°C e a recristalização dos lípidos *bulk* fundidos ocorre a 51°C, 42°C, 28°C e 11°C, pela mesma ordem. Nas dispersões coloidais, a recristalização dos lípidos ocorre a temperaturas inferiores, i.e., 30°C, 21°C, 9°C e 8°C, respetivamente [150]. Consequentemente, quando se preparam nanopartículas lipídicas a partir de lípidos sólidos à temperatura ambiente, a matriz lipídica da dispersão pode não recristalizar após o arrefecimento a temperaturas de armazenamento comuns [149, 150].

O fenómeno de *supercooling* tende a ser mais acentuado nos lípidos puros (nos quais a diferença entre as temperaturas de fusão e de recristalização é de 40°C), como os triglicerídeos monoácidos saturados, do que nas misturas glicéricas (nas quais a diferença entre a temperatura de fusão e de recristalização é de 10°C), como por exemplo o palmitato de cetilo e o behenato de glicerilo (Compritol® 888 ATO) [149]. Similarmente, a mistura de um triglicerídeo com temperatura de cristalização baixa (ex.: trilaurina) e de um triglicerídeo com cadeia longa (ex.: tristearina) diminui o *supercooling*, facilitando a cristalização das nanopartículas [151]. O mesmo é válido para a situação oposta, ou seja, a mistura de moléculas lipídicas com cadeia curta a triglicerídeos com temperatura de cristalização elevada, acentua o *supercooling* [99, 151].

Para além do material lipídico, a cristalização é também afetada pela incorporação do fármaco e pelos agentes tensoativos presentes na formulação [62]. No que respeita a incorporação do fármaco, esta pode suprimir a tendência de cristalização das nanopartículas. Por exemplo, observou-se que a incorporação da ubidecarenona em nanopartículas de tripalmitina diminuiu a temperatura de recristalização em cerca de 10°C. De forma idêntica, a adição de um óleo diminui a temperatura de cristalização da matriz lipídica. Ali *et al.* [152] constataram que a adição de uma fração rica em tocotrienol (*Tocotrienol-Rich Fraction*, TRF) a matrizes lipídicas compostas por behenato de glicerilo ou palmitato de cetilo aumentou significativamente o *supercooling* dos NLC, comparativamente com o *supercooling* dos lípidos sólidos *bulk*.

A estabilização das partículas com agentes tensoativos pode originar o aumento da temperatura de cristalização [149]. As cadeias do tensoativo presentes na superfície das gotículas lipídicas podem promover a orientação intermolecular entre as moléculas de lípido, conduzindo à nucleação e posterior cristalização lipídica [153].

A recristalização pode ser induzida armazenando a dispersão a temperaturas mais baixas (0-4°C), de forma a manter a estabilidade física dos sistemas coloidais. Contudo, na aplicação a temperaturas elevadas (e.g. superfície da pele, que apresenta uma temperatura de aproximadamente 32°C), a fase lipídica interna está na forma líquida [99, 149].

3.4.4. Transformações polimórficas

A incorporação do fármaco na matriz lipídica depende do polimorfismo da matriz cristalizada. Entende-se por polimorfismo a capacidade de um composto cristalizar em diferentes espécies cristalinas [99].

Nas nanopartículas lipídicas, durante o armazenamento ocorrem rearranjos da estrutura cristalina com o objetivo de alcançar as configurações mais estáveis, conduzindo, por vezes, à expulsão das moléculas de fármaco [62]. As transformações polimórficas podem ocorrer dias ou semanas após a solidificação da dispersão de nanopartículas lipídicas, ocorrendo mais rapidamente nas dispersões de nanopartículas lipídicas que no material lipídico *bulk* [99, 149].

A estrutura interna da matriz dos triglicerídeos apresenta como formas típicas as descritas por Hagemann, nomeadamente a hexagonal (α), ortorrômbica perpendicular (β') e triclinica paralela (β) [99]. A energia de ativação, a estabilidade termodinâmica, a densidade de empacotamento e o ponto de fusão aumentam desde a forma α até à forma β (via β') [99, 154]. A transição dos triglicerídeos fundidos da forma α para a forma β , via β' , representa o percurso para um melhor acondicionamento das moléculas lipídicas [150].

As transformações polimórficas afetam significativamente a performance dos sistemas farmacêuticos que contenham SLN ou NLC, uma vez que determinam a incorporação do fármaco e alteram o seu perfil de libertação. Deste modo, é essencial realçar a importância da análise do comportamento polimórfico para uma caracterização adequada das nanopartículas lipídicas [148]. A utilização de agentes co-tensioativos com elevada mobilidade pode prevenir ou retardar a modificação lipídica durante o armazenamento, conferindo uma elevada capacidade carga ao sistema transportador [62, 99].

3.4.5. Fenómeno de gelificação

A gelificação é um processo rápido e imprevisível que traduz o aumento da viscosidade das dispersões de SLN ou NLC. Na generalidade dos casos, este fenómeno é irreversível e implica a perda do tamanho coloidal das partículas [62, 74].

O fenómeno de gelificação relaciona-se com o processo de cristalização e é consequência da alteração da forma da partícula, que passa de esférica (α , hexagonal) a esferóide (β' , ortorrômbica) e depois à forma de plaqueta (β , triclínica) [99]. Uma vez que os lípidos cristalizam preferencialmente na forma de plaqueta e que, em comparação com as outras, esta forma apresenta uma maior superfície específica, este processo é acompanhado por um aumento das dimensões da partícula. Por conseguinte, as moléculas do agente tensoativo não são mais suficientes para estabilizar as novas superfícies, verificando-se a agregação das partículas. Com a agregação das partículas ocorre o aumento da viscosidade e, posteriormente, a formação de geles [62, 99].

A gelificação pode também ser induzida por outros fatores como: (i) o contato das dispersões de nanopartículas lipídicas com outras superfícies (como, por exemplo, a agulha de uma seringa), (ii) o *stress* mecânico, (iii) as temperaturas elevadas e exposição à luz durante o armazenamento, (iv) as forças iónicas e (v) as concentrações lipídicas elevadas [62, 155]. O ZP é um bom indicador da gelificação. Tem sido verificado que um potencial zeta de -15 mV não é suficientemente elevado para garantir a estabilização eletrostática necessária, ocorrendo a gelificação [155]. Por outro lado, amostras com ZP de -25mV têm-se demonstrado estáveis [62].

O armazenamento da dispersão de nanopartículas em atmosfera de azoto ou a baixas temperaturas (inferior a 8°C) e na ausência de luz previne o crescimento das partículas, originando amostras mais estáveis [62]. A adição de agentes co-tensoativos com elevada mobilidade (e.g. glicocolato) permite retardar ou evitar a gelificação [62]. Uma outra estratégia para contornar o fenómeno de gelificação, e em relação às formulações tópicas, consiste na incorporação das nanopartículas lipídicas em geles ou emulsões [74, 99]. Em suma, otimizando a formulação e armazenando-a em condições protetoras, é pouco provável que se verifique o fenómeno de gelificação [99].

3.4.6. Coexistência de diversas espécies coloidais

A existência de outras estruturas coloidais na dispersão, como micelas e lipossomas, representa um problema para os sistemas de nanopartículas lipídicas. Estas estruturas

resultam do facto das moléculas de agentes tensioativos adicionados à formulação não se localizarem exclusivamente na superfície dos lípidos, mas também na fase aquosa. Desta forma, as moléculas de tensioativo podem encontrar-se na superfície lipídica, sob a forma de micela ou em monómeros [62, 105].

As micelas são capazes de solubilizar moléculas de fármaco e, por isso, representam locais alternativos para a incorporação do fármaco. No entanto, quando localizado nas micelas, o fármaco degrada-se mais rapidamente que na matriz lipídica. Assim, a coexistência de diversas espécies coloidais na dispersão lipídica interfere com a estabilização e libertação do fármaco. Está descrito na literatura que o aumento da viscosidade da matriz diminui o coeficiente de difusão do fármaco no sistema transportador. Atendendo a este facto, é expectável que os sistemas contendo SLN protejam melhor o fármaco contra a degradação do que as nanoemulsões [62].

3.5. Formulações contendo nanopartículas lipídicas para administração na mucosa oral

De uma forma geral, as formas de dosagem oral devem ser flexíveis e não irritantes de modo a promover a aceitação do doente [50]. Adicionalmente, as formulações destinadas à cavidade oral devem apresentar uma boa adesividade no local de aplicação [156].

As nanopartículas lipídicas podem ser administradas oralmente sob a forma de dispersão aquosa ou, em alternativa, podem ser transformadas em formas de dosagem tradicionais, como os comprimidos, as cápsulas, os *pellets* ou os pós [143, 157]. Tal como referido anteriormente, a mucosa oral apresenta-se carregada negativamente, pelo que a aplicação de nanopartículas lipídicas com carga positiva pode promover a sua ligação com a mucosa e, por conseguinte, aumentar o seu tempo de permanência [158].

No que respeita a aplicação de nanopartículas lipídicas sob a forma de dispersão aquosa, um fator limitante é a sua reduzida viscosidade, que pode afetar o tempo de permanência destes sistemas no local de aplicação e comprometer o efeito terapêutico desejado. Como forma de evitar este inconveniente, as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas podem ser incorporadas em formas farmacêuticas semissólidas, obtendo-se formulações finais mais consistentes e mais estáveis a longo prazo. Os hidrogéis representam um dos sistemas semissólidos mais utilizados e, quando administrados na mucosa oral, podem promover a adesividade devido às ligações que se

podem estabelecer entre a mucosa e os polímeros que constituem o hidrogel [84]. Neste sentido, os hidrogeles são sistemas utilizados com o objetivo de *drug targeting* [159].

A preparação de formulações semissólidas contendo nanopartículas lipídicas pode ser realizada consoante três abordagens: (i) incorporando as SLN ou os NLC em formulações tradicionais (e.g. hidrogeles); (ii) adicionando promotores de viscosidade (i.e. agentes gelificantes) à fase aquosa da dispersão lipídica, ou (iii) desenvolvendo, numa só etapa, um produto final com uma elevada concentração de SLN/NLC e viscosidade desejada [99, 145]. Na primeira abordagem, parte da água da formulação é substituída por dispersão de nanopartículas lipídicas. Contudo, apenas parte da dispersão de SLN/NLC pode ser incorporada pelo que esta abordagem pode afetar a capacidade de carga. Uma forma de minimizar este problema é a incorporação de dispersões de SLN/NLC bastante concentradas [145]. A libertação do fármaco a partir de SLN/NLC incorporados em formulações tradicionais pode ser controlada pela matriz lipídica e pela estrutura do veículo [99]. Nas restantes abordagens, a capacidade de carga do sistema não é comprometida, pois as formulações preparadas consistem apenas em nanopartículas lipídicas [145].

3.6. Tolerância e toxicidade das nanopartículas lipídicas

Nos últimos anos, tem-se notado uma preocupação crescente relativamente à potencial toxicidade dos nanomateriais, uma vez que a informação científica quanto à interação dos nanomateriais com o corpo humano é escassa [160]. As mesmas características que tornam as nanopartículas atrativas relativamente à capacidade de modular a libertação do fármaco, designadamente o tamanho reduzido, a composição química e a estrutura, podem conferir alguma toxicidade para os sistemas biológicos, nomeadamente pela interação com as células e pela sua internalização celular [161, 162].

A interação das nanopartículas com as células pode desencadear várias reações, das quais podem surgir efeitos citotóxicos [157]. Exemplos desta interação passível de causar citotoxicidade são a absorção celular das partículas [157] e a aderência das partículas à membrana celular [160]. As nanopartículas podem ser absorvidas pelas células e posteriormente degradadas, provocando efeitos tóxicos intracelulares. Por outro lado, as nanopartículas podem aderir à membrana celular originando-se produtos de degradação citotóxicos, que são posteriormente libertados para o meio extracelular [160].

As nanopartículas lipídicas são sistemas constituídos por materiais biocompatíveis e facilmente degradados por processos naturais, cujas vias metabólicas originam subprodutos naturais (ácidos gordos e glicerol). Desta forma, é previsível que estes sistemas apresentem uma boa tolerância por parte do organismo [160]. Contudo, mesmo os nanossistemas fisiológicos e biodegradáveis podem apresentar alguma toxicidade, uma vez que o comportamento *in vivo* dos materiais nanométricos pode diferir do seu comportamento enquanto matéria-prima [163]. Muller *et al.* [162] apresentam um sistema de classificação nanotoxicológico através do qual se pode considerar que o risco toxicológico das nanopartículas lipídicas administradas oralmente é reduzido. Estas nanopartículas apresentam geralmente um tamanho compreendido entre os 200 e os 300 nm [143] e, tendo em consideração que não ocorre endocitose de nanopartículas com tamanhos superiores a 100 nm, a sua internalização celular não é esperada. Adicionalmente, os produtos da sua degradação não são tóxicos [162].

A necessidade de realizar estudos de toxicidade é um dos maiores entraves à introdução dos novos sistemas transportadores de fármacos no mercado clínico e farmacêutico, mas dadas as características das nanopartículas lipídicas, apenas um número limitado de estudos deverá ser requerido [73, 99]. Para averiguar a segurança ou a toxicidade das nanopartículas lipídicas é importante comparar a toxicidade destes sistemas com outros nanossistemas e ainda, comparar a toxicidade de nanopartículas lipídicas compostas por diferentes excipientes [160]. Numa primeira fase dos estudos toxicológicos devem utilizar-se modelos celulares que mimetizem as condições do organismo humano. Estes estudos *in vitro* permitem prever os efeitos citotóxicos das nanopartículas lipídicas, enquanto minimizam o número de estudos em animais. Todavia, para obter conclusões mais concretas relativas à citotoxicidade dos nanossistemas deve proceder-se à realização de estudos *in vivo*, antes de serem efetuados ensaios clínicos humanos [164].

Pardeike *et al.* [160] citaram vários estudos que avaliaram a toxicidade das nanopartículas lipídicas, destacando-se o estudo desenvolvido por Müller *et al.* [165]. Estes autores averiguaram a citotoxicidade *in vitro* das SLN em células HL60 e em granulócitos humanos, em função da matriz lipídica (Dynasan[®] 114, Compritol[®] ATO 888) e do agente tensioativo (poloxâmero 407, polissorbato 80, lecitina de soja e dodecil sulfato de sódio). Adicionalmente, compararam a citotoxicidade das SLN com a de outros sistemas transportadores coloidais, como as nanopartículas de polialquicianoacrilatos e as nanopartículas de ácido poli láctico-glicólico. Os resultados

obtidos demonstraram que a natureza do lípido não interferiu na viabilidade celular. Quanto à influência do agente tensioativo, os autores comprovaram que os danos celulares dependeram do estado das moléculas tensioativas, sendo que as moléculas de tensioativo ligadas à superfície das SLN reduziram significativamente os efeitos citotóxicos comparativamente às moléculas livres na solução. Finalmente, as SLN demonstraram uma menor citotoxicidade comparativamente com as nanopartículas poliméricas.

Rawat *et al.* [166] desenvolveram SLN que incorporavam repaglinida para administração oral, baseadas numa matriz lipídica binária (monoestearato de glicerol e tristearina) e estabilizadas com Pluronic[®]-F68 (poloxâmero 188). Os estudos de toxicidade *in vitro* foram realizados em células de macrófagos de rato e demonstraram que as SLN são sistemas bem tolerados a nível celular.

Olbrich *et al.* [167] testaram a influência de diversos tensioativos na citotoxicidade das SLN compostas pelo lípido Dynasan[®] 114, em células RAW 264.7. Neste estudo, os autores testaram a viabilidade celular com o teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e a produção de citocinas, nomeadamente as interleucinas 6 e 12 (IL-6 e IL-12, respetivamente) e o fator de necrose tumoral α (*Tumoral Necrosis Factor*, TNF). Dos vários tensioativos testados, apenas o cloreto de cetilpiridínio (*Cetylpyridinium Chloride*, CPC) conferiu citotoxicidade às SLN de uma forma dependente da concentração, quer pela redução da viabilidade celular quer pela produção de citocinas. Os restantes tensioativos, nomeadamente o poloxâmero 188, o colato de sódio, o polissorbato 80, o dodecil sulfato de sódio e o poloxamina 908 não originaram efeitos tóxicos nas células nem estimularam a produção de citocinas.

Considerando os estudos citados e o facto das nanopartículas lipídicas serem constituídas por substâncias GRAS e não originarem produtos de degradação tóxicos, é possível prever uma boa tolerância celular das nanopartículas lipídicas [160].

CAPÍTULO II

TRABALHO EXPERIMENTAL

1. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de formulações à base de nanopartículas lipídicas contendo miconazol, para a administração na mucosa oral.

Como objetivos específicos foram definidos os seguintes pontos:

- (i) Preparação e caracterização de diferentes dispersões de SLN e NLC placebo pela técnica dos ultrassons e seleção da dispersão mais eficaz para a encapsular o miconazol;
- (ii) Desenvolvimento e validação de um método para a análise quantitativa do miconazol encapsulado em nanopartículas lipídicas, por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta/visível;
- (iii) Preparação de um hidrogel contendo a dispersão de nanopartículas lipídicas com miconazol para aplicação na cavidade oral;
- (iv) Estudo do perfil de liberação *in vitro* do miconazol a partir da dispersão de nanopartículas lipídicas e do hidrogel contendo a dispersão de nanopartículas lipídicas para aplicação na cavidade oral.
- (v) Estudo da atividade antifúngica *in vitro* do hidrogel contendo a dispersão de nanopartículas lipídicas com miconazol.

2. Materiais

2.1. Reagentes

O miconazol foi gentilmente cedido pela Janssen-Cilag, indústria farmacêutica do grupo Johnson & Johnson. Os lípidos sólidos selecionados Compritol[®] 888 ATO (behenato de glicerilo), Gelucire[®] 39/01 (ésteres de glicerol de ácidos gordos saturados), Gelucire[®] 43/01 (ésteres de glicerol de ácidos gordos saturados), Gelucire[®] 50/13 (glicerídeos de polietilenoglicol stearyl-32), Precirol[®] ATO 5 (palmito estearato de glicerilo), Suppocire[®] A, Suppocire[®] CM (triglicerídeos de ácidos gordos) foram doados pela Gattefossé (França). O Imwitor[®] 900 (monoestearato de glicerilo) e o ácido esteárico, também lípidos sólidos, foram fornecidos pela Sasol (Alemanha). Os lípidos líquidos Capryol[™] 90 (monocaprilato de propilenoglicol tipo II), Capryol[™] PGMC (monocaprilato de propilenoglicol tipo I), Labrafac[™] Lipophile WL 1349 (triglicerídeos de cadeia média), Labrafac[™] PG (dicaprilocaprato de propilenoglicol), Labrafil[®] M 1944 CS (glicerídeos de polietilenoglicol oleil-6), Labrafil[®] M 2125 CS (glicerídeos de polietilenoglicol linoleil-6), Labrasol[®] (glicerídeos de polietilenoglicol capril-caproil-8), Lauroglycol[™] 90 (monolaurato de propilenoglicol tipo II), Lauroglycol[™] FCC (monolaurato de propilenoglicol tipo I) foram também fornecidos pela Gattefossé (França) e o Miglyol[®] 812 (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico) pela Oxi-Med Express, S. A. (Espanha). Os outros lípidos líquidos, o óleo de sésamo e o ácido oleico foram adquiridos à Acofarma[®] (Espanha), bem como a trietanolamina e o Tween[®] 80 (polissorbato 80). O cloreto de benzalcónio foi fornecido pela Merck Schudart (Alemanha). O gelificante PFC[®] (carbómero 2001) foi adquirido à Guinama (Espanha) e a glicerina à Cmd Chemicals (Portugal). O fosfato de potássio monobásico e o hidróxido de sódio foram fornecidos pela VWR[®] International (Alemanha). O metanol foi adquirido à Metanol EMSURE[®] ACS, ISO, Merck KGaA (Alemanha). A água utilizada foi ultrapura, obtida pelo sistema de purificação de água Millipore Simplicity[™] 18S, Millipore[®] (França). O meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), o ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico (MOPS) e o DMSO foram adquiridos à Sigma-Aldrich[®] (Portugal). O meio de cultura Sabouraud dextrose agar foi adquirido à Liofilchem (Itália).

2.2. Leveduras

Foi utilizada a estirpe de *C. albicans* da *American Type Cell Culture* (ATCC) com a referência 90028.

3. Estudo da solubilidade lipídica do miconazol

No desenvolvimento de nanopartículas lipídicas, um dos parâmetros cruciais corresponde à escolha dos lípidos da formulação. Esta seleção baseia-se na quantidade máxima de fármaco capaz de se dissolver num lípido sólido ou numa mistura formada por lípido sólido e lípido líquido [168]. O estudo da solubilidade do miconazol em diferentes lípidos teve como objetivo selecionar os mais adequados para preparar as dispersões de nanopartículas lipídicas, capazes de encapsular a maior quantidade possível de miconazol, tendo como base a concentração de fármaco usada numa formulação comercial oral (Daktarin[®]), contendo 2% de fármaco.

3.1. Metodologia

A solubilidade lipídica do miconazol foi avaliada em concentrações de 2% e 3% (m/m), nos vários lípidos (sólidos e líquidos) referidos no item 2 do presente capítulo. Para o estudo da solubilidade do miconazol nos lípidos sólidos, diferentes quantidades de miconazol (0,02 e 0,03 g) foram adicionadas a cada lípido sólido (0,98 e 0,97 g). As pesagens foram efetuadas numa balança analítica (Acculab Sartorius Group). De seguida, as misturas foram colocadas numa estufa (Binder, Alemanha) a 80°C, durante 1 hora. A solubilidade do miconazol foi determinada visualmente, em intervalos de 15 minutos, observando a presença ou ausência de cristais de fármaco no lípido fundido [121]. No estudo da solubilidade do miconazol nos lípidos líquidos, após a adição de fármaco (0,02 e 0,03 g) ao lípido (0,98 e 0,97 g), procedeu-se a uma agitação manual de forma vigorosa com o auxílio de uma microespátula e observação visual para verificar a presença ou ausência de cristais de fármaco.

3.2. Resultados e discussão

No Tabela 4 são apresentados os resultados da solubilidade do miconazol a 2 e 3 % (m/m) nos diferentes lípidos sólidos testados. Nas misturas dos lípidos Precirol[®] ATO 5 e Imwitor[®] 900 e miconazol numa concentração a 2% (m/m) observou-se a presença de cristais de fármaco ao final de 1 hora, indicando que nesta concentração o miconazol não é solúvel nos lípidos analisados. Relativamente à solubilidade do miconazol na concentração a 3% (m/m), apenas nas misturas com Gelucire[®] 39/01 ou com Gelucire[®] 43/01 não se visualizaram a presença de cristais de fármacos. De acordo com os

resultados obtidos, conclui-se que na concentração máxima testada (3%) o miconazol é solúvel nos lípidos sólidos Gelucire[®] 39/01 e Gelucire[®] 43/01.

Tabela 4 - Estudo da solubilidade do miconazol nos lípidos sólidos testados.

Lípidos sólidos	Miconazol 2% (m/m)				Miconazol 3% (m/m)			
	Tempo (minutos)				Tempo (minutos)			
	15	30	45	60	15	30	45	60
Precirol [®] ATO 5	+	+	+	+	+	+	+	+
Compritol [®] 888 ATO	+	+	-	-	+	+	+	+
Gelucire [®] 39/01	+	-	-	-	-	-	-	-
Gelucire [®] 43/01	-	-	-	-	+	-	-	-
Gelucire [®] 50/13	-	-	-	-	+	+	+	+
Suppocire [®] A	-	-	-	-	+	+	+	+
Suppocire [®] CM	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido esteárico	-	-	-	-	+	+	+	+
Imwitor [®] 900	+	+	+	+	+	+	+	+

(+ presença de cristais de fármaco; - ausência de cristais de fármaco)

De modo a evitar a presença das *supercooled melts*, as nanopartículas lipídicas devem permanecer no estado sólido à temperatura ambiente e corporal [121]. Desta forma, a seleção do lípido sólido para preparar as dispersões de SLN e de NLC deve considerar o ponto de fusão do mesmo. Pelo mesmo motivo, tem sido referido que para preparar as dispersões de NLC, a combinação de lípido sólido e lípido líquido deve apresentar um ponto de fusão superior a 40°C [169, 170]. Deste modo, o Gelucire[®] 43/01 foi selecionado como lípido sólido para preparar as dispersões de SLN e de NLC, uma vez que apresenta um ponto de fusão de 43°C [171]. O Gelucire[®] 43/01 é composto por uma mistura de triglicerídeos saturados e apresenta um valor de equilíbrio lipófilo-hidrófilo baixo (igual a 1), o que lhe permite retardar a libertação de fármacos e, por conseguinte, ser utilizado em formulações de libertação controlada [171, 172].

Relativamente à solubilidade do miconazol nos lípidos líquidos na concentração de 2% (m/m) (Tabela 5), não se observou a presença de cristais de fármacos nas misturas dos seguintes lípidos: CapryolTM 90, CapryolTM PGMC, Labrafac[®] Lipophile WL 1349, Labrafil[®] M 2125 CS, Labrasol[®], ácido oleico e Miglyol[®] 812, concluindo-se quanto à

solubilidade do fármaco na concentração testada. Contudo, na concentração de 3% (m/m), somente nas misturas com CapryolTM PGMC, Labrasol[®], ácido oleico ou Miglyol[®] 812 se verificou a ausência de cristais de fármaco. Adicionalmente, constatou-se que o miconazol se solubilizou mais rapidamente nos lípidos CapryolTM PGMC e Miglyol[®] 812, sugerindo uma maior solubilidade do fármaco nestes lípidos.

Tabela 5 - Estudo da solubilidade do miconazol nos lípidos líquidos testados.

Lípidos líquidos	Miconazol 2% (m/m)	Miconazol 3% (m/m)
Lauroglycol TM 90	+	+
Lauroglycol TM FCC	+	+
Capryol TM 90	-	+
Capryol TM PGMC	-	-
Labrafac [®] PG	+	+
Labrafac [®] Lipophile WL 1349	-	+
Labrafil [®] M 2125 CS	-	+
Labrafil [®] M 1944 CS	+	+
Labrasol [®]	-	-
Ácido oleico	-	-
Óleo de sésamo	+	+
Miglyol [®] 812	-	-

(+ presença de cristais de fármaco; - ausência de cristais de fármaco)

Atendendo à Tabela 5, e considerando a rapidez da solubilização do miconazol, foram selecionados os lípidos CapryolTM PGMC e o Miglyol[®] 812 para preparar as dispersões de NLC.

4. Análise da miscibilidade lípido sólido/lípido líquido

Para o desenvolvimento das formulações de NLC é essencial que exista miscibilidade entre o lípido sólido e o lípido líquido [169]. Assim, após a seleção do Gelucire[®] 43/01, do Capryol[™] PGMC e do Miglyol[®] 812 foi necessário analisar a miscibilidade entre as duas misturas lipídicas - Gelucire[®] 43/01 com Capryol[™] PGMC e Gelucire[®] 43/01 com Miglyol[®] 812.

4.1. Metodologia

A miscibilidade do Gelucire[®] 43/01 com o Capryol[™] PGMC e com o Miglyol[®] 812 foi testada em diferentes proporções % m/m (50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10), com o objetivo de determinar a melhor composição da mistura lipídica para preparar as dispersões de NLC. Após pesagem em balança analítica, as diferentes misturas lipídicas foram agitadas a 200 rpm a uma temperatura de 60°C, utilizando um agitador orbital (Unimax 1010, Heidolph, Alemanha) durante 1 hora. Posteriormente, as misturas lipídicas foram arrefecidas à temperatura ambiente (25±1°C). Após a solidificação das misturas, a miscibilidade entre os dois lípidos foi analisada colocando uma porção de cada mistura lipídica em papel de filtro, seguida da observação visual. Este procedimento serve para verificar a existência de gotas de óleo (lípido líquido) no papel de filtro, o que seria um indicativo da falta de miscibilidade entre os lípidos [169].

4.2. Resultados e discussão

Para ambas as misturas lipídicas testadas, não foram observadas gotas de óleo no papel de filtro para as diferentes proporções testadas. Estes resultados indicam que existe uma elevada miscibilidade entre o Gelucire[®] 43/01 e o Capryol[™] PGMC e entre o Gelucire[®] 43/01 e o Miglyol[®] 812. De uma forma geral, a solubilidade dos fármacos é maior nos lípidos líquidos do que nos lípidos sólidos [173]. Atendendo a este facto, uma mistura lipídica com uma concentração relativamente elevada de lípido líquido pode melhorar a solubilidade do fármaco na fase lipídica e aumentar a eficácia de encapsulação das dispersões de NLC. De um modo geral, a matriz lipídica dos NLC é obtida pela mistura de lípidos sólidos com os lípidos líquidos numa proporção que pode ir de 70:30 até 99,9:0,1 [69]. Desta forma, desenvolveu-se uma formulação de NLC na qual a fase lipídica correspondeu a uma proporção de 70:30 (lípido sólido/lípido líquido).

5. Cristalinidade e polimorfismo das matérias-primas e das misturas lipídicas com fármaco

O grau de cristalinidade e o polimorfismo dos lípidos são parâmetros importantes uma vez que estes influenciam a capacidade de incorporação do fármaco, bem como o perfil de libertação e a estabilidade do sistema de nanopartículas lipídicas ao longo do tempo [62]. São diversas as técnicas analíticas utilizadas para este fim. Contudo, as técnicas de difração de raios-X e de DSC são as mais utilizadas, uma vez que fornecem informações importantes relativamente à estrutura das partículas dispersas e das respetivas matérias-primas usadas na sua produção [174].

A técnica de DSC fornece indicações sobre o comportamento de fusão e cristalização dos constituintes sólidos e líquidos das partículas, baseando-se no facto das alterações estruturais dos lípidos possuírem temperaturas e entalpias de fusão diferentes [62]. As variações de entalpia (ΔH) originam sinais endotérmicos ou exotérmicos consoante a transição consome energia, como acontece durante a fusão, ou liberta energia aquando da recristalização [175]. O DSC consiste em submeter a amostra a programas de temperatura controlados durante os quais se podem medir essas trocas de calor e aferir acerca das propriedades estruturais da amostra. Contudo, esta técnica não permite identificar a causa das transições térmicas, devendo ser complementada com outros métodos como a difração de raios-X, a observação microscópica ou a espectroscopia, de modo a distinguir entre fusão, transições polimórficas, perda de água ou decomposição da substância, entre outras [174].

5.1. Metodologia

A análise da cristalinidade e do polimorfismo das matérias-primas (lípidos e fármaco) e das misturas lipídicas (Gelucire[®] 43/01 com Capryol[™] PGMC e Gelucire[®] 43/01 com Miglyol[®] 812) com fármaco numa concentração de 3% (m/m) foi realizada por calorimetria diferencial de varrimento, utilizando o DSC 200 F3 Maia[®] (NETZCH, Alemanha) com trocador automático de amostras. As amostras, com massas compreendidas entre os 30-40 mg, pesadas em balança analítica, foram colocadas em cadinhos de alumínio selados com tampa perfurada. Como referência usou-se um cadinho e tampa equivalentes, vazio. Os perfis da análise térmica (termogramas) foram obtidos em atmosfera dinâmica de azoto (20 ml/minuto). O programa térmico contemplou um arrefecimento até aos 5°C (com uma taxa de 10°C por minuto), seguida

de uma isotérmica durante 8 minutos e, posteriormente um aquecimento dos 5 aos 200°C (5°C/minuto).

Os dados foram obtidos com recurso ao *software Proteus*[®] versão 5.2.1 (NETZCH, Alemanha).

5.2. Resultados e discussão

Os termogramas das matérias-primas encontram-se apresentados na Figura 8.

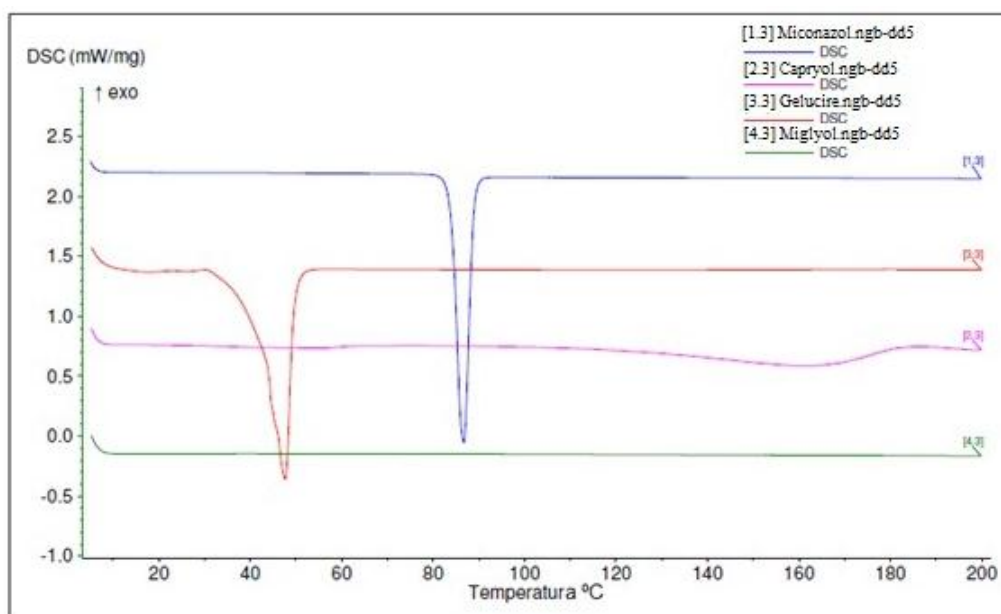


Figura 8- Termogramas das matérias-primas.

Analisando os termogramas das matérias-primas verificou-se para o miconazol um pico endotérmico e estreito indicativo de um composto puro e cristalino, cujo ponto de fusão ocorre aproximadamente aos 86°C (Figura 8, curva [1.3]), coerente com o intervalo de fusão que está descrito na literatura [21]. Este resultado foi também verificado por Ribeiro *et al.* [176]. Por sua vez, o termograma do Gelucire[®] 43/01 revelou um pico endotérmico largo, indicativo de mistura de compostos, cristalinidade parcial ou polimorfismo de um mesmo composto, coerente com a sua composição (mistura de triglicerídeos saturados). Adicionalmente, o seu termograma (Figura 8, curva [3.3]) demonstrou fenómenos endotérmicos próximos, sendo verificado um pico mais intenso que ocorre aproximadamente à temperatura de 47°C. O perfil térmico do Gelucire[®] 43/01 foi idêntico ao obtido por Chauhan *et al.* [171]. O Miglyol[®] 812 (Figura 8, curva [4.3]), tal como constatado por Puglia *et al.* [177], não sofreu qualquer fenómeno

térmico, uma vez que este composto é líquido à temperatura ambiente, não sofrendo alterações significativas nas temperaturas de análise. No entanto, o CapryolTM PGMC, apesar de também ser um óleo à temperatura ambiente, o seu termograma (Figura 8, curva [2.3]) demonstrou um fenómeno endotérmico acima dos 140°C, podendo ser explicado por uma possível decomposição do composto a temperaturas elevadas.

A Figura 9 demonstra os termogramas das misturas lipídicas contendo uma concentração de miconazol a 3% (m/m).

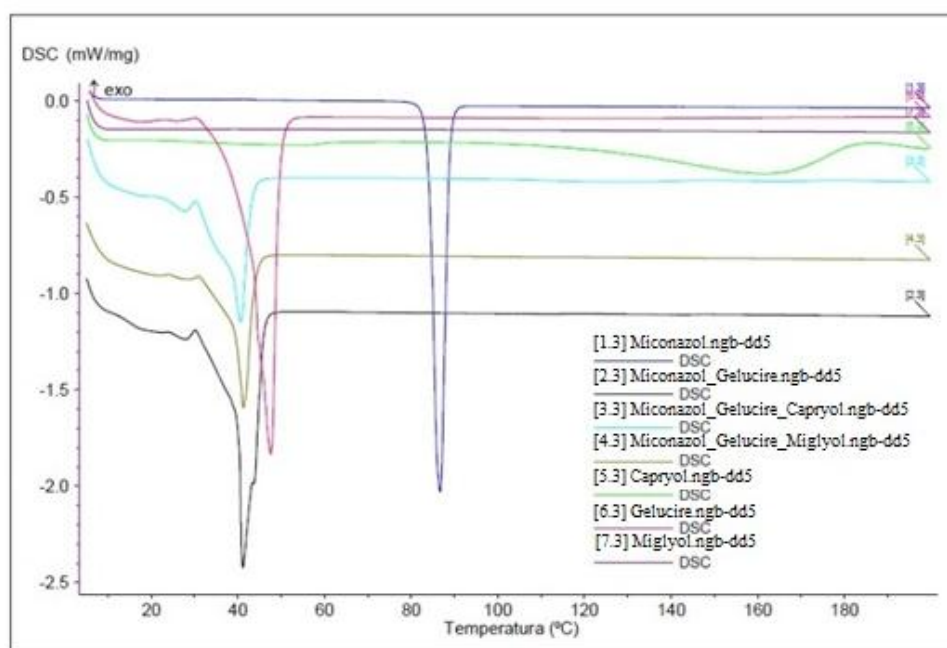


Figura 9 - Termogramas das matérias-primas ([1.3], [5.3], [6.3] e [7.3]) e das misturas lipídicas com miconazol ([2.3], [3.3] e [4.3]).

Analisando os termogramas das misturas lipídicas (Figura 9, curvas [2.3], [3.3] e [4.3]), verificou-se a ocorrência de fenómenos endotérmicos dentro da temperatura de fusão do lípido sólido, embora o pico mais intenso tenha ocorrido numa temperatura ligeiramente inferior à do pico do Gelucire[®] 43/01 enquanto matéria-prima. Este acontecimento foi também descrito por Muller *et al.* [178] e por Araújo *et al.* [179]. A diminuição na temperatura de fusão foi idêntica para as diferentes misturas e sugere uma interação entre o(s) lípido(s) e o fármaco. Adicionalmente, não se notou o pico endotérmico característico do fármaco nas misturas lipídicas, sugerindo que o miconazol se solubilizou completamente no(s) lípido(s) [179].

6. Estudos de pré-formulação

6.1. Metodologia

Inicialmente preparam-se dispersões de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) placebo com base em três formulações distintas. Após a caracterização das dispersões quanto ao comportamento polimórfico, tamanho de partícula e índice de polidispersão selecionou-se a formulação que pareceu mais promissora para encapsular o miconazol.

6.1.1. Preparação das dispersões de SLN e de NLC placebo

As dispersões de SLN e de NLC placebo foram preparadas pela técnica dos ultrassons, de acordo com a composição indicada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição das dispersões de SLN e de NLC placebo.

Formulação			
Composição (% m/m)	SLN-P	NLC₁-P	NLC₂-P
Gelucire [®] 43/01	10,00	7,00	7,00
Capryol [™] PGMC	-	3,00	-
Miglyol [®] 812	-	-	3,00
Miconazol	-	-	-
Tween [®] 80	2,00	2,00	2,00
Água	88,00	88,00	88,00

A primeira etapa de preparação das dispersões de SLN e de NLC placebo correspondeu ao aquecimento da fase lipídica e da fase aquosa, a uma temperatura 5-10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido. Após a fusão do lípido sólido, adicionou-se a fase aquosa à fase lipídica e homogeneizou-se com o Ultra-Turrax[®] T25 (IKA[®], Alemanha), a uma velocidade de 8000 rpm durante 5 minutos, formando-se uma pré-emulsão. Esta foi imediatamente submetida à ação de uma sonda de sonicação (Bamdelin Eletronic UW 2200, Berlim, Alemanha) com uma potência de 70% de amplitude, durante 15 minutos. A nanoemulsão O/A formada foi imediatamente transferida para viais de vidro, selada e arrefecida até à temperatura ambiente para formação das nanopartículas lipídicas.

Após a sua produção, as dispersões de SLN e de NLC placebo foram armazenadas a duas temperaturas distintas (4°C e 25°C), com o objetivo de verificar a sua estabilidade ao longo do tempo.

6.1.2. Caracterização das dispersões de SLN e de NLC placebo

6.1.2.1. Cristalinidade e polimorfismo

A análise da cristalinidade e polimorfismo das dispersões de SLN e de NLC placebo foi realizada pela técnica de DSC, como descrito na secção 5.1. As dispersões foram sujeitas ao mesmo arrefecimento e isotérmica que as matérias-primas, mas o aquecimento foi efetuado apenas dos 5 aos 85°C, com uma taxa de 5°C por minuto.

6.1.2.2. Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão

O diâmetro e a distribuição de tamanho das partículas são parâmetros que têm um impacto direto sobre a estabilidade física da dispersão [62, 175]. A espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), também designada por dispersão dinâmica de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) e a difratometria de laser (*Laser Diffraction*, LD) são as técnicas mais utilizadas para medir o tamanho de partículas em dispersões coloidais [62].

A técnica de PCS mede flutuações da intensidade da luz dispersa, dependentes do tempo, quando as partículas são iluminadas por um laser. Estas flutuações são causadas pelos movimentos Brownianos, os quais consistem no movimento das partículas devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido que as circunda. Deste modo, as partículas dispersas num líquido estão em constante movimento. A intensidade da luz dispersa varia com o tamanho das partículas, bem como a velocidade dos movimentos Brownianos, sendo que as partículas de menor tamanho dispersam menos luz e se movimentam mais rapidamente que as partículas maiores. A equação de Stokes-Einstein (Equação 2) define a relação entre o tamanho da partícula e a velocidade com que esta se movimenta [180]:

$$D_0 = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

Equação 2

na qual: D_0 corresponde ao coeficiente de difusão, k é a constante de Boltzmann, η se refere à viscosidade do solvente, T é a temperatura absoluta e d corresponde ao diâmetro da partícula.

Tendo em consideração que as partículas de menor tamanho se movimentam mais rapidamente, quando se medem partículas menores a intensidade de luz dispersa varia mais rapidamente. Do mesmo modo, quando se medem partículas de maior tamanho, como estas se movimentam mais lentamente, a intensidade de luz dispersa varia de forma mais lenta [181]. Contudo, como estas flutuações dependem do tempo, só é possível estabelecer uma correlação entre as diferentes intensidades medidas em muito curtos intervalos de tempo [175]. A PCS é uma técnica relativamente sensível que permite a medição de partículas com tamanhos que variem entre alguns Angstroms e alguns μm , sendo adequada para caracterizar dispersões de nanopartículas lipídicas. As partículas com tamanho superiores ($>6 \mu\text{m}$) podem ser medidas por difração a laser, dado que esta técnica abrange uma gama de tamanhos desde os nanômetros (aproximadamente 20 nm) até aos milímetros [62, 107]. A LD baseia-se na proporcionalidade entre o ângulo de difração e o raio da partícula, de acordo com a teoria de difração de Fraunhofer, sendo que quanto menor o tamanho da partícula, maior é o ângulo e mais intensa é a difração de um feixe luminoso que atravessa uma população de partículas. Para uma melhor investigação do tamanho da partícula, recomenda-se a utilização da PCS e da LD em simultâneo, uma vez que com esta última técnica pode detetar-se a presença de micropartículas não mensuráveis com a técnica de PCS [62, 175]. É de salientar que tanto a PCS como a LD não medem partículas individuais. Ao invés, detetam os efeitos de espalhamento de luz que, por sua vez, são utilizados para calcular o tamanho médio das partículas [62].

O índice de polidispersão (PI) pode ser determinado pela técnica de PCS e fornece informações acerca da homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas de um determinado sistema [182]. Quanto menor o seu valor, mais monodispersa é a população de partículas (o PI é de 0,000 para dispersões idealmente monodispersas, aproximadamente de 0,100 para distribuições estreitas e de 0,500 para distribuições muito amplas) [96]. Dada a natureza geralmente polidispersa dos sistemas de SLN e de NLC, valores de PI inferiores a 0,300 têm sido considerados como valores bastante aceitáveis para estes sistemas [107]. Contudo, dependendo da via de administração que se pretende utilizar, podem ser aceites valores superiores [182].

No presente trabalho, e de modo a avaliar a adequação das dispersões de SLN e NLC preparadas, mediu-se o tamanho das partículas e determinou-se o PI dois dias após a produção, através da técnica de PCS (Zetasizer Nano ZS, Malvern[®], Reino Unido). Antes da medição, as dispersões de SLN e de NLC foram diluídas (1:2) com água ultrapura de modo a evitar a multidispersão de luz decorrente de uma concentração elevada de partículas. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente e os resultados apresentados são valores médios (\pm desvio padrão) de três medições. O Z-ave e o PI foram obtidos a partir do correlograma, pelo *software* Zetasizer Nano ZS (Malvern[®], Reino Unido), o qual segue a norma ISO 22412:2008 [183].

6.1.2.3. Medição do potencial zeta

O potencial zeta (ZP) refere-se à carga total que a superfície de uma partícula adquire num determinado meio [107]. De um modo geral, as partículas dispersas num sistema aquoso adquirem carga à superfície, principalmente devido à presença de grupos ionizáveis ou pela adsorção de espécies iónicas, afetando a distribuição de iões no meio e aumentando a concentração de iões de carga oposta ao da partícula (contra-iões) junto à superfície. Assim, na interface da partícula com o meio da dispersão origina-se uma dupla camada elétrica com duas regiões: uma região interna, denominada por camada de Stern, na qual os iões estão firmemente ligados à superfície, e uma região externa e difusa onde os iões não estão tão fortemente ligados à superfície (Figura 10). Com o movimento Browniano, alguns iões da camada externa movem-se como parte da partícula, originando o ZP que decai com o aumento da distância da superfície da partícula, até atingir o potencial do meio de dispersão [181]. A magnitude do ZP está relacionada com o grau de repulsão/atração entre as partículas adjacentes e, deste modo, é um dos indicadores de estabilidade de uma dispersão coloidal [184].

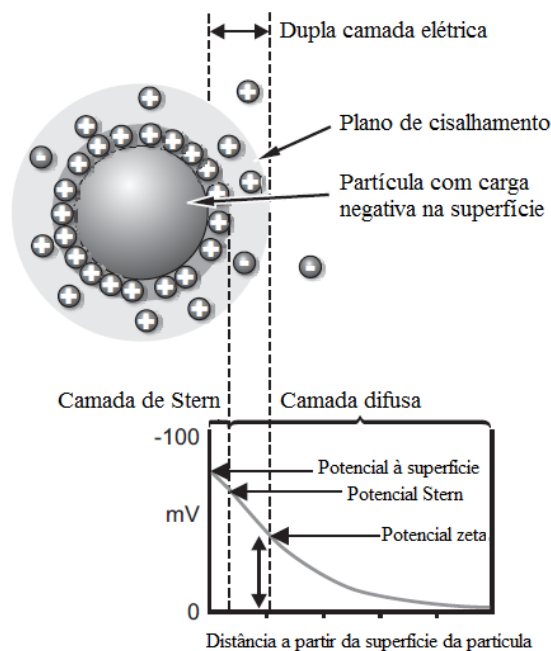


Figura 10 - Representação esquemática da concentração iônica e da diferença de potencial em função da distância a partir da superfície carregada da partícula no meio de dispersão. Adaptado de Malvern [185].

As partículas com carga elétrica (ZP elevado) têm menor tendência para a agregação durante o armazenamento devido à repulsão eletrostática que ocorre entre si. Contudo, se as partículas têm baixos valores de ZP, as forças de atração excedem as de repulsão, ocorrendo a agregação das partículas. No entanto, este facto não se aplica a dispersões coloidais que contenham estabilizadores estéricos, dado que estes compostos provocam uma diminuição do potencial zeta [62]. De um modo geral, as dispersões mais estáveis apresentam, em termos absoluto, valores de ZP elevados, isto é, mais positivos que +30 mV ou mais negativos que -30 mV [181].

As medições do ZP foram realizadas à temperatura de 25°C, utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern®, Reino Unido). As dispersões foram previamente diluídas com água ultrapura. A mobilidade eletroforética foi convertida em potencial zeta de acordo com a equação de Helmholtz–von Smoluchowski (Equação 3) [186]:

$$v_{eo} = \frac{-\epsilon_0 \epsilon \zeta}{\eta} E \quad \text{Equação 3}$$

na qual: E corresponde ao campo elétrico aplicado, ϵ_0 é a permissividade do vácuo, ϵ é a constante dielétrica e η a viscosidade da solução eletrolítica.

6.2. Resultados e discussão

A análise térmica das dispersões de SLN e de NLC placebo armazenadas à temperatura ambiente é apresentada na Figura 11.

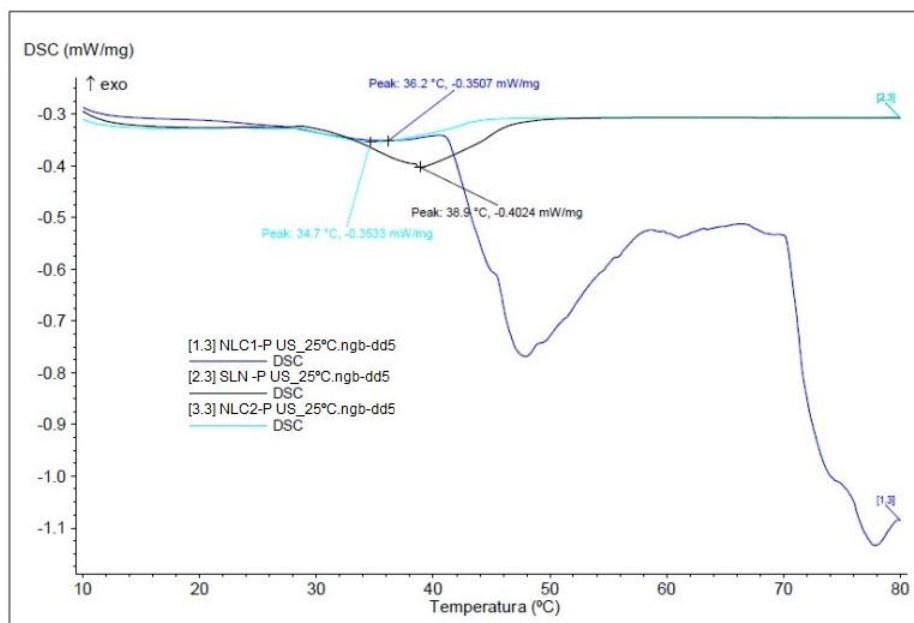


Figura 11 - Termogramas das dispersões de SLN e de NLC placebo armazenadas a 25°C.

À temperatura ambiente, os termogramas das dispersões de SLN e de NLC placebo apresentaram um fenómeno endotérmico entre os 28-46°C, que corresponde à fusão do lípido sólido. O lípido sólido quando presente na formulação sob a forma de nanopartícula fundiu a uma temperatura mais baixa do que a temperatura de fusão enquanto matéria-prima, sendo este resultado coincidente com o que se verificou nas misturas lipídicas. O perfil térmico da dispersão de SLN-P (Figura 11, curva [2.3]) foi idêntico ao da dispersão de NLC₂-P (Figura 11, curva [3.3]). A dispersão de NLC₁-P (Figura 11, curva [1.3]) destacou-se negativamente, na medida em que se verificou a sua decomposição após a fusão do lípido.

Nas dispersões de SLN-P e de NLC₁-P armazenadas a 4°C verificou-se a ocorrência do fenómeno de gelificação. Por conseguinte, não foi realizada a análise de DSC nestas dispersões. A análise térmica da dispersão de NLC₂-P (Figura 12) demonstrou que a fusão do lípido ocorreu dentro da temperatura de fusão que se verificou na mistura lipídica. No entanto, posteriormente à fusão verificou-se a sua decomposição.

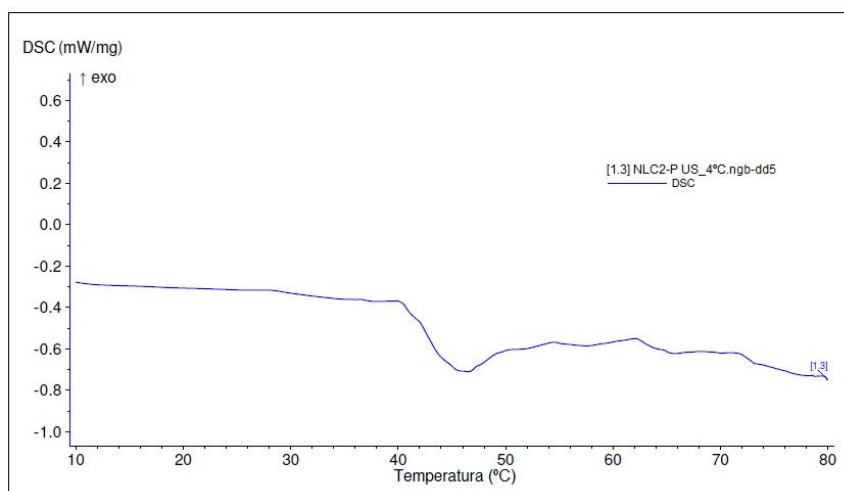


Figura 12 - Termograma da dispersão de NLC₂ placebo armazenada a 4°C.

De um modo geral, as várias dispersões de SLN e de NLC placebo preparadas demonstram fenómenos de fusão coincidentes com os que se verificaram nas misturas lipídicas, constatando-se porém que os picos de fusão são menos intensos. Este resultado decorre do facto das dispersões de SLN-P, NLC₁-P e NLC₂-P serem maioritariamente constituídas por água. Dado que a análise de DSC está normalizada para massa da amostra e a massa dos lípidos na formulação é reduzida (10 g em 100 g de formulação), o fenómeno de fusão da matriz lipídica é atenuado pela água.

A análise térmica permitiu ainda constatar que a temperatura de armazenamento das dispersões influenciou a estabilidade das mesmas, uma vez que a temperatura de armazenamento baixa (4°C) induziu a instabilidade das dispersões de SLN e de NLC placebo. Está descrito na literatura que as temperaturas de armazenamento mais baixas promovem a estabilidade das dispersões de nanopartículas lipídicas e, portanto, previnem o fenómeno de gelificação [62]. Os resultados obtidos neste estudo contrariam este facto, uma vez que se verificou que ocorreu o fenómeno de gelificação nas dispersões de SLN-P e de NLC₁-P armazenadas a 4°C. Adicionalmente foi possível concluir que entre as várias formulações de nanopartículas lipídicas preparadas, a formulação de NLC₁ é a menos estável.

No que diz respeito ao tamanho da partícula e ao PI, verificou-se que a composição da matriz lipídica influenciou o tamanho médio de partícula e o PI (Tabela 7). A dispersão de SLN-P apresentou partículas com tamanho médio nanométrico, embora com uma distribuição do tamanho de partícula bastante polidispersa. Em comparação com a dispersão de SLN-P, a dispersão de NLC₁-P demonstrou partículas com tamanho médio

superior, atingindo a escala micrométrica. O valor de PI da dispersão de NLC₁-P indica uma ampla distribuição do tamanho das partículas. Deste modo, esta formulação não se mostrou a mais adequada para a preparação de nanopartículas lipídicas. Em contrapartida, a adição do Miglyol[®] 812 à matriz lipídica (dispersão de NLC₂-P) promoveu a obtenção de partículas com tamanho nanométrico, sendo que dispersão de NLC₂-P apresentou partículas menores e uma distribuição mais estreita do que a dispersão de SLN-P. Este efeito do Miglyol[®] 812 na diminuição do tamanho médio das partículas foi também verificado por Puglia *et al.* [187].

Quanto à influência da temperatura de armazenamento, não se verificaram diferenças significativas no tamanho médio de partícula e no PI da dispersão de NLC₂-P armazenada a 25°C e a 4°C. Nas dispersões de NLC₁-P e de SLN-P armazenadas a 4°C presumiu-se que o fenómeno de gelificação tenha conduzido à perda do tamanho coloidal da partícula.

Tabela 7 - Tamanho médio de partícula (Z-ave) e PI das dispersões de SLN e de NLC placebo.

	25°C		4°C	
	Z-ave (nm)	PI	Z-ave (nm)	PI
SLN-P	707,2 ± 49,5	1,000 ± 0,070	-	-
NLC ₁ -P	2042,0 ± 142,9	0,681 ± 0,047	-	-
NLC ₂ -P	417,8 ± 29,2	0,471 ± 0,033	485,2 ± 33,9	0,477 ± 0,033

- Não se procedeu à medição uma vez que ocorreu o fenómeno de gelificação.

Relativamente ao ZP, as diferentes dispersões preparadas apresentaram um valor próximo de zero (dados não apresentados). Este resultado verificou-se pelo facto de nenhum dos constituintes das formulações apresentar carga iónica. Valores de ZP tão baixos fazem prever a aglomeração das partículas e, por conseguinte, a perda do tamanho coloidal. No entanto, o agente tensioativo utilizado para preparar as nanopartículas lipídicas (Tween[®] 80) atua por estabilização estérica [188], formando uma barreira estérica na interface pela adsorção das cadeias hidrófobas à superfície das partículas, voltando as cadeias hidrófilas para o meio aquoso [189]. Deste modo, ocorre a atração da água para o redor das partículas, prevenindo a aproximação e agregação das mesmas [190]. Portanto, em teoria, as dispersões de nanopartículas lipídicas preparadas no presente trabalho podem permanecer estáveis ao longo do tempo. Também

Zimmermann e Muller [191] constataram que a estabilização estérica proporcionada por tensoativos não iônicos foi capaz de estabilizar as partículas eficientemente e evitar a sua agregação a pH neutro.

De acordo com os resultados da caracterização físico-química das diferentes dispersões, constatou-se que a formulação de NLC₂ apresentou uma maior estabilidade, o menor tamanho de partícula e a menor distribuição de tamanho. Assim, as nanopartículas lipídicas contendo miconazol foram preparadas com uma matriz lipídica composta por Gelucire[®] 43/01 e Miglyol[®] 812. No entanto, tentou-se otimizar a formulação de NLC₂ com o objetivo de aumentar a estabilidade e promover a diminuição do tamanho médio de partícula e do PI.

7. Preparação e caracterização físico-química de dispersões de NLC contendo miconazol

As nanopartículas lipídicas contendo miconazol foram preparadas com base nos resultados obtidos com a dispersão de NLC₂ (secção 5.2). A partir desta foram preparadas duas novas dispersões, às quais se adicionou o cloreto de benzalcónio como agente co-tensioativo, uma vez que este agente tem propriedades tensioativas [192] e antimicrobianas [193]. Para comparação, foram preparadas dispersões NLC placebo e contendo miconazol. Posteriormente, estas foram caracterizadas quanto à cristalinidade, tamanho de partícula, PI e ZP.

7.1. Metodologia

7.1.1. Preparação de dispersões NLC placebo e contendo miconazol

A composição das formulações de NLC placebo e contendo miconazol baseadas na formulação NLC₂ é apresentada na Tabela 8. As dispersões de NLC foram preparadas pela técnica dos ultrassons, como descrito na secção 5.1.1. Após a preparação das dispersões placebo, foram preparadas dispersões de NLC contendo 3% (m/m) de miconazol em relação à fase lipídica total, adicionando o fármaco à fase lipídica antes da fusão. As dispersões de NLC foram armazenadas a 25°C.

Tabela 8 - Composição das formulações de nanopartículas lipídicas placebo (NLC_{2a}P e NLC_{2b}P) e contendo miconazol (NLC_{2a}M e NLC_{2b}M).

Formulação				
Composição (% m/m)	NLC_{2a}P	NLC_{2a}M	NLC_{2b}P	NLC_{2b}M
Gelucire [®] 43/01	7,00	6,79	7,00	6,79
Miglyol [®] 812	3,00	2,91	3,00	2,91
Miconazol	-	0,30	-	0,30
Tween [®] 80	2,50	2,50	2,00	2,00
Cloreto de benzalcónio	0,50	0,50	0,50	0,50
Água ultrapura	87,00	87,00	87,50	87,50

7.1.2. Caracterização das dispersões de NLC

6.1.2.1. Estudo da cristalinidade

A análise da cristalinidade das dispersões de NLC_{2a-2b} placebo e contendo o miconazol foi efetuada do modo descrito na secção 6.1.2.1.

6.1.2.2. Medição do tamanho de partícula, PI e ZP

A determinação do tamanho de partícula e do PI das dispersões realizou-se segundo o procedimento descrito em 6.1.2.2. O ZP foi medido como se encontra indicado na secção 6.1.2.3.

7.2. Resultados e discussão

7.2.1. Estudo da cristalinidade

Na Figura 13 encontram-se os resultados da análise térmica das dispersões de NLC_{2a-2b} placebo e contendo miconazol, armazenadas a 25°C.

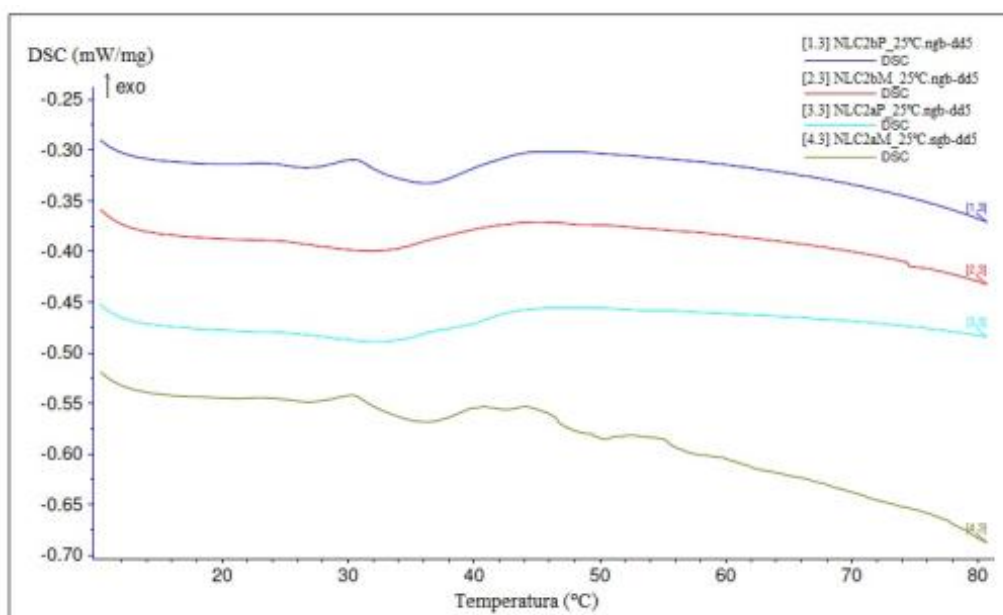


Figura 13 - Termogramas das dispersões NLC_{2a} e NLC_{2b} placebo e contendo miconazol, armazenadas a 25°C.

Os vários termogramas representados na Figura 13 mostram que a fusão do lípido sólido aconteceu dentro do intervalo de temperaturas de fusão do Gelucire[®] 43/01 quando este se encontra misturado com as restantes matérias-primas (secção 5.2, Figura 9, curva

[4.3]). A formulação de NLC_{2a} mostrou alguma instabilidade, sendo visível um decaimento da linha de base da dispersão de NLC_{2a}M (curva [4.3]) após a fusão lipídica. A formulação de NLC_{2b} aparentou uma maior estabilidade, sendo que as dispersões de NLC_{2b}P (curva [1.3]) e de NLC_{2b}M (curva [2.3]) apresentaram um perfil térmico idêntico, que foi também semelhante ao perfil térmico da mistura lipídica com Gelucire® 43/01, Miglyol® 812 e miconazol (secção 5.2, Figura 9, curva [4.3]).

As diferentes dispersões de NLC apresentaram uma matriz lipídica sólida mais amorfa, sugerindo que a incorporação do miconazol nos NLC ocorreu segundo o modelo amorfo (NLC do tipo II). Este fenómeno pode ser justificado pela cristalinidade parcial do Gelucire® 43/01 e pela adição do Miglyol® 812 à matriz lipídica, originando partículas sólidas mas menos cristalinas [146]. Adicionalmente, não se verificaram fenómenos de recristalização do miconazol nas dispersões de NLC preparadas, o que sugere que o fármaco se encontra solubilizado na matriz lipídica no estado amorfo. Este fenómeno foi também verificado por outros investigadores. Lv *et al.* [194] demonstrou que o penciclovir incorporado nas SLN se encontrava no estado amorfo e não no estado cristalino. Similarmente, Cavalli *et al.* [195] verificou que os fármacos hidrocortisona e progesterona se encontravam dispersos na matriz lipídica das SLN no estado amorfo.

7.2.2. Tamanho de partícula, PI e ZP

Os resultados da caracterização do tamanho de partícula e o PI das dispersões de NLC_{2a-2b} placebo e contendo miconazol são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Tamanho médio de partícula (Z-ave) e PI das dispersões de NLC_{2a-2b} placebo e contendo miconazol, armazenadas a 25°C durante dois dias.

	25°C	
	Z-ave (nm)	PI
NLC _{2a} P	186,6 ± 13,1	0,207 ± 0,014
NLC _{2a} M	244,9 ± 17,1	0,267 ± 0,018
NLC _{2b} P	238,9 ± 16,7	0,274 ± 0,019
NLC _{2b} M	182,1 ± 12,7	0,227 ± 0,016

A Tabela 9 indica que as dispersões de NLC preparadas em 6.1.1 apresentaram partículas com tamanho idêntico e nanométrico (Z-ave médio de 213,1 nm), adequado

para a administração oral [49]. As formulações apresentaram valores de PI entre os 0,207 e os 0,274 que são aceitáveis para este tipo de sistemas, tendo em conta a via de administração proposta [152]. Com base nestes resultados verificou-se que a adição do agente co-tensioativo promoveu a diminuição do tamanho das partículas e a obtenção de dispersões com uma distribuição do tamanho das partículas mais homogénea. É ainda possível constatar que a encapsulação do miconazol nos NLC não surtiu efeitos significativos no tamanho de partícula. Deste modo, a técnica dos ultrassons revelou-se eficaz na preparação de dispersões de NLC, levando à obtenção de partículas de tamanho nanométrico e reduzido PI. Também Neves *et al.* [196] e Silva *et al.* [121] demonstraram a eficácia dos ultrassons na preparação de dispersões de nanopartículas lipídicas.

No que diz respeito ao ZP, as dispersões de NLC_{2a-2b} placebo e contendo miconazol apresentaram valores próximos de zero (dados não apresentados). Apesar de ter sido adicionado um agente co-tensioativo catiónico (cloreto de benzalcónio), o valor de ZP não sofreu alterações significativas, podendo este facto ser justificado pela reduzida concentração em que este agente foi adicionado (0,5%). Contudo, prevê-se que a presença de dois agentes tensioativos, nomeadamente o Tween[®] 80 e o cloreto de benzalcónio, sejam capaz de estabilizar eficazmente as nanopartículas e prevenir a sua agregação, por estabilização estérica e eletrostática, respetivamente [94, 192]. Adicionalmente, o cloreto de benzalcónio pode exercer um efeito antimicrobiano, o que é desejável em preparações que possuam elevada quantidade de água [193], como as dispersões de NLC.

Entre as dispersões de NLC preparadas, e com base nos resultados da cristalinidade, do tamanho de partícula e do PI, a NLC_{2b} foi selecionada como a mais promissora para estudos posteriores de avaliação dos parâmetros de encapsulação (eficácia de encapsulação e capacidade de carga) do miconazol, estabilidade física ao longo do tempo, avaliação da atividade antifúngica do miconazol encapsulado nos NLC e potencial para aplicação na mucosa oral.

8. Caracterização da dispersão de NLC_{2b} – morfologia, parâmetros de encapsulação, estabilidade ao longo do tempo e atividade antifúngica

8.1. Metodologia

8.1.1. Análise morfológica

A microscopia eletrônica proporciona uma informação direta acerca da forma das partículas [62], uma vez que permite visualizar a microestrutura dos sistemas coloidais [175]. A microscopia eletrônica baseia-se na interação entre elétrons e os componentes da amostra gerando vários sinais mensuráveis, podendo os elétrons serem transmitidos, retroespalhados ou difratados. Esta pode ser distinguida em microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) e em microscopia eletrônica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), sendo que ambas produzem imagens bidimensionais com elevada resolução. A TEM utiliza os elétrons transmitidos através da amostra para formar a imagem, enquanto a SEM faz uso dos elétrons retroespalhados e dos elétrons secundários emitidos da superfície da amostra para formar a imagem [197]. A análise da morfologia por microscopia eletrônica requer o pré-tratamento da amostra para que esta resista ao alto vácuo [175]. A preparação da amostra pode causar artefactos que devem ser tidos em consideração [62].

A microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) é uma outra técnica que permite caracterizar morfológicamente as nanopartículas lipídicas. A AFM gera um perfil da superfície tridimensional e proporciona informações diretas acerca da superfície, nomeadamente informações estruturais, mecânicas, funcionais e topográficas [107]. Esta técnica utiliza a força que atua entre a superfície e a ponta da sonda, numa resolução espacial de até 0,01 nm para a geração de imagens. A AFM torna-se vantajosa em relação à microscopia eletrônica na medida em que a preparação da amostra é simples, já que não é necessário vácuo durante a análise e as amostras não têm de ser condutoras. Adicionalmente, a AFM gera imagens rapidamente (cerca de 20 segundos por imagem), o que permite a observação *in situ* dos processos que ocorrem na interface [62].

A análise morfológica das nanopartículas lipídicas preparadas foi realizada por microscopia eletrônica em modo de varrimento, usando um microscópio eletrônico Phenom G2 pro (Phenomworld[®], Holanda). As dispersões de NLC_{2b}P e de NLC_{2b}M

foram previamente diluídas em água ultrapura (1:200). As amostras foram secas à temperatura ambiente sobre um suporte de alumínio e colocadas num *Charge Reduction Sample Holder* (Phenomworld®), sem qualquer tratamento prévio ou revestimento.

8.1.2. Determinação dos parâmetros de encapsulação da dispersão de NLC_{2b}M

O sucesso do uso de dispersões de nanopartículas lipídicas como veículos transportadores de fármacos depende dos parâmetros de encapsulação de fármaco, nomeadamente a eficácia de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (LC) [73]. Elevados valores de EE e de LC permitem reduzir a dose de fármaco necessária para alcançar o efeito terapêutico desejado, minimizando por sua vez, os possíveis efeitos adversos e o número de tomas necessárias.

A EE e a LC da dispersão de NLC_{2b}M foram determinadas indiretamente através das Equações 4 e 1 (seção 3.3 do capítulo I), respetivamente, calculando a quantidade de miconazol livre (não encapsulado) presente na fase aquosa da dispersão [142]:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade total de fármaco} - \text{Fármaco livre}}{\text{Quantidade total de fármaco}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

A determinação dos parâmetros de encapsulação do miconazol na dispersão de NLC_{2b}M requereu o desenvolvimento e validação de um método analítico adequado para quantificar o fármaco (ver capítulo III). O método analítico baseou-se na espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta/visível (UV/Vis).

O miconazol livre foi separado da dispersão por filtração e centrifugação usando tubos Ultracel-50 K (Amicon®, Millipore Corporation, Estados Unidos da América). Antes da filtração e centrifugação, a amostra foi diluída com água ultrapura (1:2) para prevenir a medição de valores errados de EE, gerados pela subestimação de fármaco livre na fase aquosa, que pode ser originada pelo aprisionamento de cristais de fármaco entre as nanopartículas filtradas. A dispersão de NLC_{2b}M foi colocada no dispositivo de filtração (Heraeus Labofuge 200, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) e centrifugada a 5300 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi diluído com metanol (1:2). O miconazol livre, expresso como percentagem de miconazol não encapsulado presente no sobrenadante, foi determinado por espectrofotometria UV/Vis no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) do

miconazol (capítulo III, secção 3.1). As análises foram realizadas em triplicado (n=3) e os resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

8.1.3. Estabilidade física ao longo do tempo das dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol

As dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol foram armazenadas à temperatura ambiente, durante um período de 90 dias. A estabilidade física das dispersões de NLC_{2b} foi determinada através da medição do tamanho de partícula e do PI nos dias de armazenamento 2 e 90. Para determinar a existência de diferenças significativas foi realizado o teste *t* de Student através do *software* Microsoft Excel[®] 2010, para um nível de significância $\alpha = 0,05$. Os resultados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão.

8.1.4. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da dispersão de NLC_{2b}M

A atividade antifúngica exercida pelo miconazol foi avaliada por comparação entre a concentração mínima inibitória (MIC) de miconazol encapsulado na dispersão de NLC_{2b}M e na forma livre (dissolvido em DMSO).

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através do método de microdiluição em caldo de acordo com a Norma M27-A2 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*) [198]. O ensaio foi realizado em triplicado (n=3). A levedura foi mantida a -20°C e antes da realização de cada ensaio foi cultivada em meio de Sabouraud dextrose agar durante 24 horas.

A suscetibilidade foi testada num meio líquido de RPMI-1640 tamponado com 0,165 ml/l de MOPS. Para tal, preparou-se uma suspensão de levedura em soro fisiológico (densidade de 0,5 na escala de McFarland), sendo que a concentração final no poço foi de 5×10^2 UFC/ml. A suscetibilidade foi testada com a concentração final de miconazol de 25,00-0,39 μ g/ml a partir da solução de miconazol em DMSO ou da dispersão de NLC_{2b}M, diluídas 1:2 em meio de cultura. O ensaio incluiu ainda um controlo positivo (levedura), um controlo negativo (meio de cultura), um controlo da dispersão de NLC (NLC_{2b}P) e um controlo de DMSO. Após a inoculação dos poços, a placa foi incubada a 35°C (Binder, Alemanha) por 48 horas e, de seguida, determinada a MIC por leitura visual dos resultados. A MIC foi definida como a concentração mais baixa capaz de inibir totalmente o crescimento da levedura detetado por leitura visual. Para a

determinação da interferência dos NLC na MIC foi realizada uma leitura automática (Awareness Technology, Inc., Palm City), e determinada a percentagem de inibição através da densidade ótica (D.O.) de acordo com a Equação 5:

$$\% \text{ inibição NLC}_{2bP} = \frac{(\text{D.O. NLC}_{2bP+\text{levedura}}) - (\text{D.O. NLC}_{2bP})}{(\text{D.O. controlo positivo}) - (\text{D.O. controlo negativo})} \quad \text{Equação 5}$$

8.2. Resultados e discussão

8.2.1. Análise morfológica

Os estudos de SEM foram realizados para obter informações acerca da morfologia dos sistemas de NLC, tendo sido observadas partículas com tamanhos na gama nanométrica e com forma esférica. Também outros autores reportaram a forma esférica dos NLC, nomeadamente Araújo *et al.* [199] e Joshi e Patravale [200].

8.2.2. Eficácia de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC)

Os valores de absorvência registados relativos às medições das quantidades de miconazol livre no sobrenadante foram zero. Este facto pode ser justificado pela limitação do método analítico utilizado, nomeadamente no que respeita ao seu limite de quantificação. Contudo, tendo em conta o limite de quantificação determinado no item 3.2.5 do capítulo III, e recorrendo à Equação 4, presume-se que a EE da dispersão de NLC_{2bM} seja superior a 87,74%. Este valor de EE é bastante elevado e poderá estar relacionado com a elevada solubilidade lipídica do miconazol. Pela Equação 1, e com base no limite de quantificação do método obtido, a LC da dispersão de NLC_{2bM} será superior a 2,64%. Valores de LC reduzidos podem ser justificados pela reduzida concentração de fase lipídica na formulação pois, para assegurar a estabilidade do sistema, a capacidade de carga limita-se a cerca de 10% da fase lipídica [74]. Outros autores registaram valores idênticos de LC para dispersões de NLC, nomeadamente Hu *et al.* [142].

8.2.3. Estabilidade física ao longo do tempo das dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol

Foi estimada a estabilidade física das dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol por um período de 90 dias, sendo apresentados os resultados na Tabela 10.

Tabela 10 - Tamanho médio de partícula (Z-ave) e PI das dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol, nos dias de armazenamento 2 e 90, em valores médios \pm desvio padrão (n=3).

	Dia 2		Dia 90	
	Z-ave (nm)	PI	Z-ave (nm)	PI
NLC _{2b} P	231,3 \pm 15,7	0,230 \pm 0,038	199,6 \pm 13,0	0,244 \pm 0,001
NLC _{2b} M	212,9 \pm 26,7	0,233 \pm 0,020	212,6 \pm 20,0	0,246 \pm 0,033

Como se verifica pela Tabela 10, após um período de armazenamento de 90 dias à temperatura ambiente, o tamanho de partícula e o PI não sofreram alterações significativas ($p>0,05$), sugerindo que as dispersões de NLC preparadas foram estáveis ao longo do tempo e que os tensioativos utilizados foram capazes de estabilizar as partículas e evitar a sua agregação.

8.2.4. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da dispersão de NLC_{2b}M

A atividade antifúngica da dispersão de NLC_{2b} contendo miconazol foi avaliada *in vitro* e comparada com a do miconazol na forma livre, através da determinação da MIC, pelo método de microdiluição. Por leitura visual, a atividade antifúngica do miconazol demonstrou-se dependente da dose aplicada. No entanto, e de acordo com a Tabela 11, a concentração de miconazol necessária para inibir totalmente o crescimento de *C. albicans* foi menor para a dispersão de NLC_{2b}M do que para o miconazol na forma livre (dissolvido em DMSO). Relativamente ao controlo da formulação (dispersão de NLC_{2b}P) foi verificada uma MIC de 6,250 μ g/ml, que poderá dever-se às propriedades antimicrobianas do cloreto de benzalcónio. No entanto, na MIC da dispersão de NLC_{2b}M e à mesma concentração, a dispersão de NLC_{2b}P apresentou ausência de inibição, indicando que os constituintes da formulação NLC_{2b} não interferem com a atividade antifúngica do miconazol, para a concentração de 3,125 μ g/ml. O controlo de DMSO demonstrou ausência de inibição.

Tabela 11 - Concentração mínima inibitória (MIC), em µg/ml, para o miconazol na forma livre (dissolvido em DMSO) e para as dispersões de NLC_{2b}M e NLC_{2b}P.

Formulação	MIC (µg/ml)
Miconazol na forma livre	3,125
NLC _{2b} M	0,781
NLC _{2b} P	6,250

Estes resultados, determinados por leitura visual e confirmados por leitura automática, permitem constatar que a atividade antifúngica do miconazol é melhorada aquando da encapsulação daquele imidazol. Deste modo, a encapsulação do miconazol nas nanopartículas lipídicas permite diminuir a dose de administração requerida para alcançar o efeito terapêutico desejado, contribuindo por conseguinte para a redução dos potenciais efeitos adversos. À semelhança dos resultados obtidos, Esposito *et al.* [201] demonstrou que o clotrimazol, também um antifúngico do tipo imidazol, quando encapsulado em NLC foi mais ativo contra a *C. albicans* do que na forma livre (dissolvido em DMSO). Ainda Liu *et al.* [202] demonstrou o potencial dos NLC em minimizar os efeitos adversos dos fármacos encapsulados. Estes investigadores incorporaram o docetaxel em NLC e verificaram que a eficácia anticancerígena (*in vitro* e *in vivo*) do fármaco encapsulado foi superior à da forma comercial Duopafei[®]. Adicionalmente, os estudos *in vivo* permitiram constatar que, quando encapsulado em NLC, o docetaxel apresenta menos efeitos adversos.

9. Preparação e caracterização de hidrogéis incorporando as dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol

Atendendo à reduzida viscosidade das dispersões de nanopartículas lipídicas [84], as dispersões de NLC preparadas foram incorporadas em formas semissólidas (hidrogéis), de modo a facilitar a sua aplicação na mucosa oral.

9.1. Metodologia

9.1.1. Preparação do hidrogel

Para preparar o hidrogel (HG), o gelificante PFC[®] foi disperso em água ultrapura, na qual havia sido previamente adicionada a glicerina e o cloreto de benzalcónio. De seguida neutralizou-se a preparação com trietanolamina (pH 6,5) para obter a consistência semissólida. A Tabela 12 demonstra a composição do HG preparado. Este HG foi armazenado à temperatura ambiente, durante 24 horas.

Tabela 12 - Composição do hidrogel (HG).

Composição do HG (%m/m)	
Gelificante PFC [®]	1,00
Glicerina	3,00
Cloreto de benzalcónio	0,01
Água	95,99

9.1.2. Incorporação das dispersões de NLC_{2b} placebo e contendo miconazol no hidrogel

Após 24h da preparação do HG, as dispersões de NLC foram incorporadas neste, utilizando um agitador de alta velocidade (Cito E 100 Unguator[®] B, Gemini B.V., Holanda) a 1000 rpm durante 1 minuto, numa concentração de 40% (m/m) de dispersão no gel. A composição dos hidrogéis (HGs) incorporando as dispersões de NLC está apresentada na Tabela 13. Após a incorporação dos NLC, ambos os HGs foram armazenados à temperatura ambiente.

Tabela 13 - Composição dos HGs contendo NLC (HG-NLC_{2b}P, hidrogel incorporando NLC_{2b} placebo; HG-NLC_{2b}M, hidrogel incorporando NLC_{2b} contendo miconazol).

Formulação		
Composição (%m/m)	HG-NLC_{2b}P	HG-NLC_{2b}M
Gelucire [®] 43/01	2,800	2,716
Miglyol [®] 812	1,200	1,164
Miconazol	-	0,120
Tween [®] 80	0,800	0,800
Gelificante PFC [®]	0,600	0,600
Glicerina	1,800	1,800
Cloreto de benzalcônio	0,206	0,206
Água ultrapura	92,594	92,594

9.1.3. Análise da reologia dos hidrogeles

Considerando que as formulações para aplicação na cavidade oral devem ser flexíveis, a análise das suas propriedades de fluidez é indispensável, uma vez que estas intervêm na sua habilidade como sistemas transportadores de fármacos [203]. A reologia estuda as propriedades de fluidez e deformação da matéria, caracterizando-a de acordo com o seu comportamento reológico [204]. Consoante a relação entre a viscosidade e a tensão de corte, os sistemas farmacêuticos podem apresentar um comportamento Newtoniano ou não-Newtoniano. Nos sistemas Newtonianos verifica-se uma proporção direta entre a tensão de corte (τ) e a velocidade de corte (γ), onde a viscosidade é constante (Figura 14a). Por sua vez, nos sistemas não-Newtonianos nota-se uma variação da viscosidade em função da tensão de corte [204]. Deste modo, é possível dividir os sistemas não-Newtonianos em plásticos, pseudoplásticos ou dilatantes (Figura 14a). Os sistemas plásticos requerem uma tensão mínima de corte para que a ocorra a fluidez. Nos sistemas pseudoplásticos ocorre a diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de corte. Por sua vez, os sistemas dilatantes aumentam a sua viscosidade com o aumento da velocidade de corte [204]. Adicionalmente, estes sistemas podem apresentar tixotropia, caso se verifique uma diminuição da viscosidade com o tempo (Figura 14b) [203].

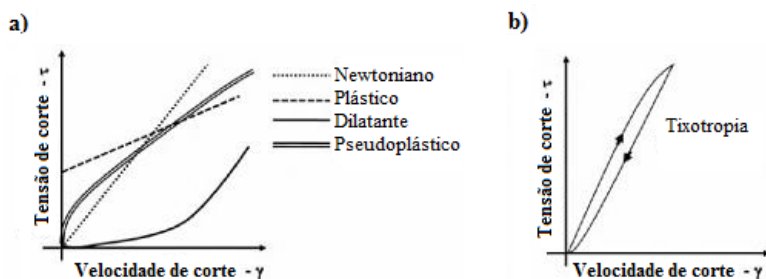


Figura 14 - Comportamento reológico dos sistemas de acordo com a relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte: a) perfis dos sistemas Newtonianos e não-Newtonianos; b) perfil de tixotropia. Adaptado de Beck et al. [203].

No presente trabalho, a análise da reologia foi efetuada com o auxílio do viscosímetro rotacional ST-2001, J.P. Selecta[®] (I.C.T, S.L., Espanha). O estudo do comportamento da fluidez dos HGs desenvolvidos realizou-se através da análise da variação da tensão de corte (Pa) em função da velocidade de corte (rpm). Os estudos reológicos foram efetuados no dia da preparação e após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, por forma a determinar a estabilidade das formulações semissólidas preparadas, no que respeita à sua viscosidade. Para comparação, as análises reológicas foram executadas sob as mesmas condições experimentais nos diferentes hidrogéis (HG, HG-NLC_{2b}P e HG-NLC_{2b}M). A reologia da formulação HG-NLC_{2b}M foi comparada com a formulação comercial oral Daktarin[®].

9.1.4. Estudos de libertação *in vitro* do miconazol

Os estudos de libertação *in vitro* do miconazol foram realizados a partir da dispersão de NLC_{2b}M e do HG-NLC_{2b}M. O perfil de libertação do miconazol foi comparado com a formulação comercial oral Daktarin[®], que contém 2% de miconazol.

O método utilizado para a libertação *in vitro* do miconazol foi o da difusão por membrana de diálise [84], que decorreu durante 48 horas. Para tal, foram colocados 2,5 ml de dispersão de NLC_{2b}M e 3,0 ml de HG-NLC_{2b}M e de formulação comercial oral em membranas de diálise (CelluSep[®], Estados Unidos da América), medidos com micropipetas. As membranas foram posteriormente fixadas e imersas num recipiente contendo 250,0 ml de tampão fosfato (pH 6,8). O sistema foi mantido sob agitação magnética (100 rpm) a 37,0±0,5°C e coberto para prevenir a evaporação de água durante o ensaio (Figura 15). Em intervalos de tempo predeterminados, foi recolhido 1,0 ml de cada amostra e substituído por 1,0 ml de meio de dissolução fresco. As amostras foram

filtradas com recurso a um filtro de seringa de $0,21\mu\text{m}$ (Millipore[®], Alemanha) e, seguidamente, a quantidade de miconazol libertada foi medida por espectrofotometria, no $\lambda_{\text{máx}}$ do miconazol utilizando um método analítico previamente validado segundo as especificações do guia da *International Conference on Harmonization* (ICH) (secção 3.1. do capítulo III). As análises foram realizadas em triplicado e os resultados apresentados em valores médios. O valor cumulativo de miconazol libertado foi calculado e expresso como uma percentagem do máximo teórico de teor de fármaco.



Figura 15 - Estudo da libertação in viro do miconazol pelo método de difusão por membrana de diálise.

A libertação do fármaco a partir de formas farmacêuticas pode ser descrita recorrendo a modelos cinéticos, nos quais a quantidade acumulada de fármaco libertado (M) é função do tempo (t). Diversos modelos matemáticos apareceram, e continuam a ser desenvolvidos na atualidade, com o objetivo de interpretar o fenómeno da libertação de fármacos [205]. O benefício prático da aplicação de modelos matemáticos adequados prende-se com a possibilidade de prever teoricamente o efeito de vários parâmetros de formulação no perfil de libertação/dissolução e elucidar qual o mecanismo de transporte do fármaco [206]. Deste modo, os modelos matemáticos podem facilitar significativamente a otimização de formulações já existentes e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos [207]. No entanto, é importante realçar que os modelos matemáticos não abrangem todos os fatores que influenciam a cinética de libertação de fármacos a partir das formas farmacêuticas, pelo que devem ser considerados modelos empíricos. A aplicação destes modelos deve ser realizada em situações específicas, nomeadamente quando a libertação do fármaco é controlada por um fenómeno simples ou por um fator limitante. Diversos modelos matemáticos têm sido utilizados para

interpretar a libertação de fármacos a partir das nanopartículas lipídicas, nomeadamente os que se seguem [208-210]:

- (i) Modelo de ordem zero (Equação 6), que descreve a libertação da mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo [206];
- (ii) Modelo de primeira ordem (Equação 7), no qual a quantidade de fármaco libertado diminui ao longo do tempo, uma vez que a libertação do fármaco ocorre de forma proporcional à quantidade de fármaco que permanece no interior da forma farmacêutica [205];
- (iii) Modelo de Higuchi (Equação 8), no qual a libertação do fármaco ocorre de forma dependente do tempo, por um processo de difusão baseado na lei de Fick [211];
- (iv) Modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 9), utilizado para descrever mecanismos de libertação do fármaco que não são previsíveis ou que envolvem mais do que um tipo de fenómeno de libertação e que podem apresentar um comportamento anómalo (não Fickiano) [205];
- (v) Modelo de Baker-Lonsdale (Equação 10), que deriva do modelo de Higuchi e permite a linearização do perfil de libertação a partir de matrizes esféricas [206].

$$M_0 - M_t = K_0 t \quad \text{Equação 6}$$

$$\ln \left(\frac{M_0}{M_t} \right) = K_1 t \quad \text{Equação 7}$$

$$M_t = K_H \sqrt{t} \quad \text{Equação 8}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Equação 9}$$

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = k t \quad \text{Equação 10}$$

onde: M_0 , M_t e M_∞ correspondem à quantidade de fármaco no tempo zero, dissolvido num determinado tempo (t) e ao tempo infinito, respetivamente. Os termos K , K_0 , K_1 e K_H referem-se às constantes cinéticas obtidas das curvas lineares dos modelos Korsmeyer-Peppas, ordem zero, primeira ordem e Higuchi, respetivamente. O termo n representa o expoente de libertação do fármaco [205, 212]. O valor de n pode ser utilizado para caracterizar os diferentes mecanismos de libertação que ocorre no sistema (Tabela 14).

Tabela 14 - Interpretação do mecanismo de libertação de acordo com o valor de n [205].

Expoente de libertação (n)	Mecanismo de transporte do fármaco	Velocidade em função do tempo
0,5	Difusão Fickiana	$t^{-0,5}$
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anómalo	t^{n-1}
1,0	Transporte caso II	Ordem zero
$> 1,0$	Transporte super caso II	t^{n-1}

De modo a prever o(s) mecanismo(s) que controla(m) a libertação *in vivo*, o perfil de libertação *in vitro* foi ajustado aos modelos matemáticos acima referidos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Baker-Lonsdale) e selecionado o modelo que melhor descreve o perfil de libertação do miconazol.

A seleção do modelo que melhor se ajusta ao perfil de libertação do miconazol teve como base o coeficiente de determinação (R^2), sendo que quanto maior o valor de R^2 melhor o ajuste. O *software* Curve Expert 1.4 foi utilizado para fazer o ajuste e calcular os parâmetros cinéticos e o R^2 .

9.1.5. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do HG-NLC_{2b}M

Após a incorporação dos NLC contendo miconazol no hidrogel procedeu-se à avaliação da sua atividade antifúngica em *C. albicans*. Para comparação, foi também avaliada a atividade da formulação comercial oral Daktarin[®].

O método utilizado para a avaliação da atividade antifúngica foi o da difusão em placa [213]. A levedura foi cultivada em meio de Sabouraud dextrose agar durante 24 horas. As placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura Sabouraud dextrose agar foram inoculadas com 100 μ l de levedura (densidade de 0,5 na escala de McFarland) e secas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente foram feitos poços com 7 mm de diâmetro no agar inoculado e colocados 100 mg de cada gele no respetivo poço, sendo que a concentração de miconazol no HG-NLC_{2b}M e no Daktarin[®] foi de 1,2 mg/g e 20 mg/g, respetivamente. Como controlos negativos foram utilizados os HG e HG-NLC_{2b}P. As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Binder, Alemanha), por um período de 24 horas. A atividade antifúngica foi expressa como a média \pm desvio padrão da zona de inibição (mm) em torno de cada poço. O ensaio foi realizado em quadruplicado ($n=4$). Para avaliar a diferença entre a atividade das várias formulações

foi realizado o teste *t* de Student através do *software* Microsoft Excel[®] 2010, considerando o valor de *p* inferior a 0,05 como a evidência de diferenças significativas.

9.2. Resultados e discussão

9.2.1. Reologia dos hidrogéis

Os resultados da caracterização reológica dos diferentes HGs desenvolvidos encontram-se representados na Figura 16. Os reogramas obtidos demonstraram que os HGs apresentam um comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico com valor de cedência, sendo necessária uma tensão de deformação inicial para que os sistemas fluam e acima da qual se observa um comportamento do tipo pseudoplástico, visível pela diminuição da viscosidade em função do aumento da velocidade de corte. Este aumento da velocidade provoca a quebra na estrutura de rede do gel, originando uma diminuição gradual da viscosidade [203]. No entanto, as curvas ascendentes e descendentes dos vários reogramas não se sobrepõem, o que indica que os HGs apresentam tixotropia, propriedade que se traduz pela ocorrência de uma variação da viscosidade com o tempo. De facto, com a diminuição da velocidade de corte, a estrutura interna do gel vai sendo lentamente restabelecida devido ao movimento das partículas por movimentos Brownianos [204]. Souto e Muller [214] desenvolveram formulações semissólidas de SLN e NLC para administração tópica de imidazóis, utilizando também um polímero do ácido acrílico (Carbopol 934) como agente gelificante, tendo obtido resultados semelhantes.

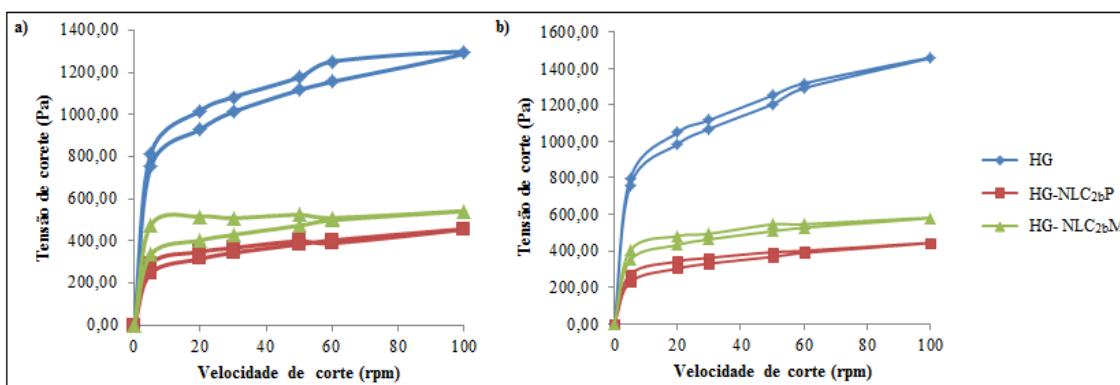


Figura 16 - Reogramas dos hidrogéis (HG): a) no dia de preparação e b) após 30 dias de armazenamento.

Comparando os reogramas dos HGs desenvolvidos verificou-se que a tensão de corte necessária para que o HG flua é superior à tensão necessária para a fluidez dos HGs

com dispersão NLC incorporada. Assim, os HG-NLC_{2b}P e HG-NLC_{2b}M mostraram-se menos viscosos do que o HG, o que provavelmente se deve à menor quantidade de agente gelificante presente nestas formulações semissólidas. A Figura 16a mostra ainda que todos os HGs preparados apresentaram tixotropia.

Relativamente aos efeitos do armazenamento na reologia dos HGs (Figura 16b) observa-se um aumento da tensão de corte e, conseqüentemente, da viscosidade no HG-placebo. Este aumento deve-se provavelmente à perda de água por evaporação e, portanto, este hidrogel tornou-se mais viscoso. Nos HG e HG-NLC_{2b}M verificou-se a ocorrência de uma ligeira diminuição da área de histerese (i.e. da área entre as curvas ascendente e descendente), mantendo-se a tixotropia. Contrariamente, o HG-NLC_{2b}P não sofreu alterações significativas nas suas características reológicas, após o período de armazenamento.

A Figura 17 apresenta o reograma da formulação comercial oral Daktarin[®]. Esta formulação apresentou um comportamento do tipo pseudoplástico. A viscosidade do Daktarin[®] foi superior à dos HGs, não tendo sido verificada a existência de tixotropia.

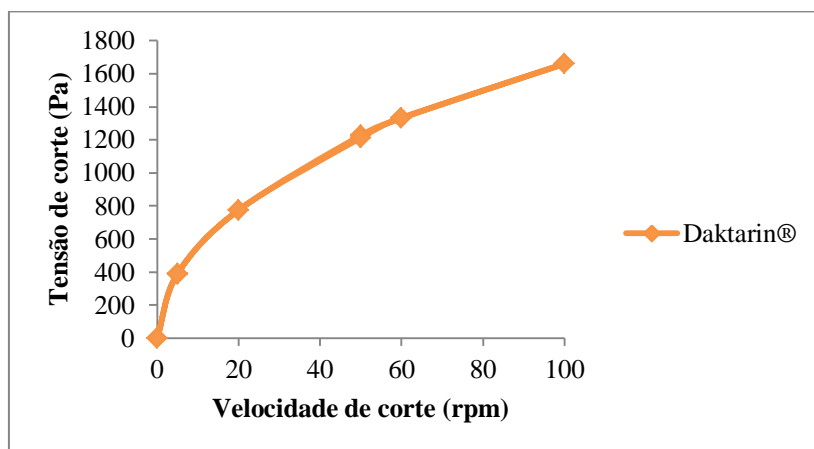


Figura 17 - Reograma da formulação comercial oral Daktarin[®].

A tixotropia pode influenciar a eficácia terapêutica da formulação farmacêutica, na medida em que contribui para o aumento do tempo de retenção da mesma no local-alvo, beneficiando a libertação do fármaco [215]. Desta forma, é desejável que as preparações semissólidas para aplicação na mucosa oral apresentem tixotropia, de modo a facilitar a sua aplicação local [84]. Contrariamente ao gel Daktarin[®], o HG-NLC_{2b}M apresenta tixotropia, sugerindo que este último é mais favorável para aplicação do miconazol na mucosa oral.

9.2.2. Liberação *in vitro* do miconazol

A matriz sólida das nanopartículas lipídicas pode prevenir a rápida liberação do fármaco, uma vez que em comparação com matrizes lipídicas líquidas (e.g. nanoemulsões), o fármaco apresenta uma menor mobilidade [62, 216]. Deste modo, e atendendo ao estado sólido da matriz lipídica dos NLC, prevê-se uma liberação controlada do miconazol a partir da dispersão de NLC_{2b}M. A liberação do miconazol incorporado nos NLC deve diferir do perfil de liberação a partir da formulação comercial oral Daktarin[®], dado que nesta última o fármaco não está encapsulado, podendo ser libertado de imediato. Adicionalmente, a incorporação dos NLC no hidrogel deve promover a liberação controlada do miconazol, dado que a estrutura tridimensional do hidrogel proporciona uma barreira difusora adicional [217]. Com base nestas considerações, presume-se que ocorra um efeito de retardamento na liberação do miconazol a partir do HG-NLC_{2b}M comparativamente com a dispersão de NLC_{2b}M.

Como é possível observar na Figura 18, a formulação comercial oral (Daktarin[®]) apresentou um perfil de liberação mais rápido do que as outras formulações testadas, tendo sido libertado cerca de 100% de miconazol após 5 horas. Nesta formulação o fármaco encontra-se totalmente disponível para a dissolução, permitindo uma liberação mais rápida do fármaco. Relativamente à liberação do miconazol a partir da dispersão de NLC_{2b}M verificou-se uma liberação de cerca de 8% do fármaco nos primeiros 30 minutos, ao qual se seguiu um perfil de liberação controlado. Ao final de 48h, a percentagem de miconazol libertada a partir da dispersão de NLC_{2b}M foi de aproximadamente 22%. A liberação rápida que ocorreu nos primeiros minutos resultou provavelmente da existência de moléculas de fármaco adsorvidas à superfície dos NLC que, por isso, não se dissolveram uniformemente no meio de dissolução. Contudo, o perfil de liberação controlado sugere a incorporação do fármaco no seio da matriz lipídica dos NLC [109]. No HG-NLC_{2b}M também se observou um perfil inicial de liberação rápida do miconazol (aproximadamente 6% nas primeiras 2h do ensaio), seguido de uma liberação controlada. No entanto, ao final de 48 horas, a percentagem de miconazol libertada do HG-NLC_{2b}M é de cerca de 16%. Esta diminuição na percentagem de miconazol libertado do HG-NLC_{2b}M em relação à dispersão de NLC_{2b}M pode ser explicada pela redução na difusão do fármaco devido à existência da matriz tridimensional do hidrogel que envolve as nanopartículas [84, 217]. Deste modo,

evidenciou-se que a difusão do fármaco é controlada pela matriz dos NLC e pela estrutura de rede do hidrogel [201].

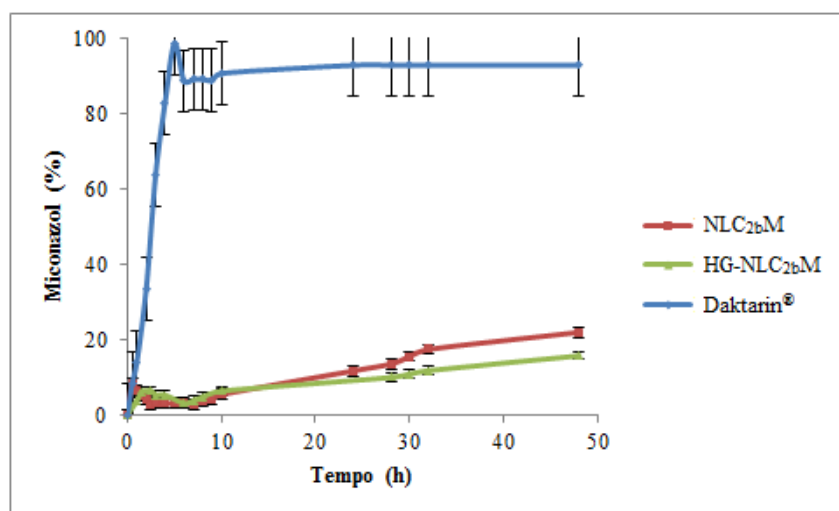


Figura 18 - Perfis de liberação cumulativa de miconazol a partir da dispersão de NLC_{2b}M, do HG-NLC_{2b}M e da formulação comercial oral Daktarin® (valores médios, n=3).

A Tabela 15 apresenta os parâmetros cinéticos com o ajuste dos perfis de liberação *in vitro* aos diferentes modelos cinéticos.

Tabela 15 - Comparação dos dados cinéticos obtidos após o ajuste da liberação do miconazol a diferentes modelos cinéticos, a partir da dispersão de NLC_{2b}M, do HG-NLC_{2b}M e do Daktarin®: k , constante cinética de liberação; R^2 , coeficiente de determinação; n , expoente de liberação.

Modelo cinético	Parâmetro	NLC _{2b} M	HG-NLC _{2b} M	Daktarin®
Ordem zero	k	1,3459	1,4394	28,1965
	R^2	0,9890	0,9723	0,6584
Primeira ordem	k	1,0667	0,8587	2,4776
	R^2	0,8628	0,7975	0,4766
Korsmeyer-Peppas	k	1,1947	0,0076	-5,1699
	R^2	0,9891	0,9875	0,8386
	n	0,9751	0,7308	0,3970
Higuchi	k	-4,0174	-1,7719	2,2496
	R^2	0,9351	0,9579	0,8264
Baker-Lonsdale	k	0,0122	0,0140	0,3259
	R^2	0,9895	0,9742	0,6578

Pela análise da Tabela 15 o modelo matemático que melhor se ajustou ao perfil de libertação a partir da dispersão de NLC_{2b}M foi o modelo de Baker-Lonsdale. Este modelo descreve a libertação controlada de fármacos a partir de uma matriz esférica [218], coincidente com os resultados da análise morfológica dos NLC. Por sua vez, para o HG-NLC_{2b}M e para o Daktarin[®], o melhor ajuste foi conseguido com o modelo de Korsmeyer-Peppas. De acordo com a interpretação do valor de n apresentada na Tabela 13, constatou-se que o HG-NLC_{2b}M apresenta um mecanismo de libertação anómalo não-Fickiano (combinação de mecanismos de difusão e de erosão), enquanto o Daktarin[®] demonstra um mecanismo de difusão clássica Fickiana. Em concordância com os resultados obtidos, tem sido observado que a libertação de fármacos através de HGs ocorre frequentemente por mecanismos de difusão, independentemente de ocorrerem simultaneamente outros mecanismos [159].

Em síntese, o estudo da libertação *in vitro* permitiu confirmar que tanto a formulação de NLC bem como o hidrogel incorporando os NLC possibilitam a libertação controlada do miconazol.

9.2.3. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do HG-NLC_{2b}M

A Tabela 16 apresenta os resultados da atividade antifúngica dos HGs em *C. albicans* pelo método de difusão em placa. O HG-NLC_{2b}M apresentou uma atividade antifúngica semelhante ao Daktarin[®], uma vez que não se notaram diferenças significativas das zonas de inibição entre as duas formulações ($p > 0,05$). Contudo, é importante salientar que a concentração de miconazol no HG-NLC_{2b}M é bastante inferior à concentração do miconazol na formulação comercial oral. Deste modo, verificou-se que, com uma concentração de miconazol aproximadamente 17 vezes menor, o HG-NLC_{2b}M exerceu o mesmo efeito que o Daktarin[®] contra a *C. albicans*. O controlo negativo HG-NLC_{2b}P apresentou uma ligeira inibição do crescimento da *C. albicans* que provavelmente ocorreu devido à ação conjunta do cloreto de benzalcónio (presente no HG e na dispersão de NLC), uma vez que este composto possui propriedades antimicrobianas [193]. No entanto, a atividade do HG-NLC_{2b}P é significativamente menor que a atividade do HG-NLC_{2b}M ($p < 0,05$). O HG, também utilizado como controlo negativo, não provocou inibição. Apesar de este HG conter cloreto de benzalcónio, na concentração presente na formulação (0,01%) não exerceu atividade antifúngica. Na

Figura 19 é demonstrada uma placa com as zonas de inibição das diferentes formulações testadas.

Tabela 16 - Atividade antifúngica dos hidrogéis e do Daktarin[®] (média \pm desvio padrão).

Formulação	Miconazol (mg/g)	Zona de inibição (mm)
HG-NLC _{2b} M	1,2	25,5 \pm 0,9
Daktarin [®]	20,0	24,3 \pm 1,4
HG-NLC _{2b} P	0,0	11,1 \pm 0,6
HG	0,0	0,0 \pm 0,0



Figura 19 - Zonas de inibição dos hidrogéis preparados e da formulação comercial oral: 1 – HG; 2 – Daktarin[®]; 3 – HG-NLC_{2b}M e 4 – HG-NLC_{2b}P.

Atendendo aos resultados acima apresentados, é possível afirmar que o HG contendo miconazol encapsulado nos NLC é vantajoso comparativamente com a formulação comercial oral, uma vez que requer uma concentração muito menor de fármaco para obter a mesma atividade terapêutica. Deste modo, a aplicação dos sistemas de NLC permite reduzir a dose de fármaco administrada e, por conseguinte, minimizar os possíveis efeitos adversos. Jain *et al.* [25] obtiveram resultados semelhantes no estudo da atividade antifúngica *in vivo* (em ratos) de SLN contendo nitrato de miconazol incorporadas num hidrogel. Comparativamente com um gel contendo nitrato de miconazol na forma livre e com uma suspensão de nitrato de miconazol, o hidrogel com fármaco encapsulado nas SLN foi mais eficaz no tratamento de candidose e promoveu uma recuperação mais rápida da infecção fúngica.

10. Conclusões

As dispersões de NLC do presente trabalho, preparadas por ultrassons, demonstraram-se adequadas para a incorporação do miconazol, representando um sistema promissor para administração deste composto na mucosa oral para o tratamento de candidoses. A otimização da formulação pela escolha adequada da composição lípido/agente tensoativo, bem como o armazenamento das dispersões à temperatura ambiente, permitiram obter partículas com tamanho nanométrico e reduzido índice de polidispersão, que se mostraram estáveis ao longo do tempo. Adicionalmente estima-se que os NLC preparados apresentem uma elevada eficiência de encapsulação, dada a elevada solubilidade do miconazol nos lípidos selecionados. Os estudos de análise térmica sugerem que a incorporação do miconazol nos NLC ocorreu segundo o modelo amorfo, caracterizado por uma matriz lipídica que é menos cristalina e que, por conseguinte, minimiza a expulsão do fármaco durante o armazenamento. Deste modo, é realçada a capacidade dos NLC para a incorporação do miconazol.

O desenvolvimento de uma formulação semissólida contendo NLC com miconazol incorporado, demonstrou-se vantajosa no sentido de facilitar a administração do fármaco na mucosa oral. O comportamento pseudoplástico e tixotrópico observado no HG-NLC_{2b}M são características desejáveis que beneficiam a eficácia terapêutica da formulação, pelo aumento do tempo de retenção e facilidade na aplicação local na mucosa oral. Os estudos *in vitro* mostraram que os NLC permitem obter uma libertação controlada do miconazol, ao mesmo tempo que melhoram a atividade antifúngica deste composto. Assim, estes sistemas reduzem a dose e o número de tomas do fármaco, possibilitando a minimização dos efeitos secundários indesejáveis.

CAPÍTULO III

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

1. Introdução

A validação de um método analítico tem por objetivo demonstrar que esse método é adequado para a finalidade a que se propõe [219], quer seja a determinação quantitativa, semiquantitativa e/ou qualitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos ou outros [220].

Vários métodos têm sido descritos para a determinação do miconazol em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos, sendo que a sua maioria se baseia em ensaios de espectrofotometria e de cromatografia [221, 222]. No presente trabalho, os ensaios analíticos para a quantificação do miconazol nas formulações preparadas basearam-se no método de espectrofotometria de absorção molecular na região do UV/Vis num comprimento de onda de máxima absorção.

2. Metodologia

2.1. Preparação das soluções-padrão

Para a validação do método analítico foram preparadas seis soluções-padrão de miconazol com concentrações de 0,6 a 3,6 mg/ml, o que corresponde a 20-120% da quantidade de fármaco prevista. Para preparar as soluções-padrão, diferentes quantidades de miconazol foram rigorosamente pesadas, em balança analítica (Acculab Sartorius Group), e dissolvidas em metanol até perfazer um volume final de 25,0 ml, recorrendo a balões volumétricos. Cada padrão foi preparado em triplicado, sob as mesmas condições experimentais. As soluções resultantes foram filtradas com recurso a filtros de seringa de acetato de celulose com poros de 0,45 μm (VWRTM International, Alemanha) e diluídas em metanol (1:10) até um volume final de 10,0 ml, em balão volumétrico.

2.2. Determinação do espectro de absorção do miconazol

O espectro de absorção molecular no UV/Vis do miconazol foi registado nos comprimentos de onda (λ) entre os 200 e os 400 nm, com o espectrofotómetro SpectronicTM HeliosTM Gamma UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América), utilizando a solução-padrão com concentração de 0,6 mg/ml de miconazol. Através do espectro de absorção obtido determinou-se o $\lambda_{\text{máx}}$ do miconazol.

2.3. Parâmetros de validação do método analítico

O método de espectrofotometria de absorção na região UV/Vis foi validado de acordo com as normas internacionais, descritas no guia da ICH [219]. Os parâmetros de validação selecionados foram os seguintes:

- Especificidade: define-se como a capacidade para avaliar, inequivocamente, o analito na presença de outros componentes da amostra. Este parâmetro foi avaliado pela análise do espectro de absorção do sobrenadante da dispersão de NLC_{2b}P (obtido como descrito na secção 7.1.2 do capítulo II) e posterior comparação com o espectro de absorção da solução-padrão com uma concentração igual a 0,6 mg/ml de miconazol.

- Linearidade: capacidade do método para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um determinado intervalo. Para verificar a linearidade, procedeu-se à leitura das

absorvências das soluções-padrão de miconazol compreendendo concentrações entre 0,6 e 3,6 mg/ml, por espectrofotometria, no $\lambda_{\text{máx}}$ do miconazol. Através dos valores de absorvência obtidos em função da concentração de miconazol foi construída uma curva de calibração. A linearidade foi verificada graficamente e, seguidamente, procedeu-se ao ajuste da linearidade através de métodos estatísticos, nomeadamente pela análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação (R) deve apresentar um valor igual ou superior a 0,99 [220] e o interceto com o eixo Y não deve ser significativamente diferente de zero [223] A análise da regressão linear foi realizada através do *software* Microsoft Office Excel[®] 2010.

- Precisão: mede o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de uma amostragem múltipla de uma amostra homogénea. É geralmente expressa como a variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de um conjunto de medições. A precisão de um método analítico pode ser considerada a três níveis: repetibilidade (ou precisão intra-ensaio) – expressa a precisão sob as mesmas condições de operação ao longo de um curto intervalo de tempo; precisão intermediária – refere-se à precisão obtida de medições de um único laboratório, mas em condições mais variáveis que a repetibilidade (ex. diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos), e reprodutibilidade – expressa a precisão obtida de medições em diferente laboratórios e por diferentes analistas. A precisão foi verificada quanto à repetibilidade e à precisão intermédia. Para a repetibilidade realizaram-se nove determinações dentro do intervalo do método, pela quantificação de soluções-padrão com concentrações diferentes de miconazol (1,2; 2,4 e 3,6 mg/ml), em triplicado, no mesmo dia. Para determinar a precisão intermédia procedeu-se à quantificação de soluções-padrão com 1,2; 2,4 e 3,6 mg/ml de miconazol, em triplicado e em dois dias diferentes. A precisão foi expressa como o coeficiente de variação (*Coefficient of Variation, CV*), em percentagem.

- Exatidão: descreve a proximidade entre os valores medidos em relação aos valores reais e pode ser determinada após o estabelecimento da precisão, linearidade e especificidade. Para avaliar a exatidão, foram preparadas soluções-padrão com diferentes concentrações de miconazol (1,2; 2,4 e 3,6 mg/ml), em triplicado. De seguida, procedeu-se à medição da absorvência das soluções-padrão por espectrofotometria, no $\lambda_{\text{máx}}$ do miconazol. A exatidão foi calculada pela percentagem de recuperação de quantidades conhecidas de miconazol adicionadas a três soluções-

padrão (1,2; 2,4 e 3,6 mg/ml), sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 10):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

- Intervalo de determinação: corresponde à faixa entre a concentração inferior e superior do analito na amostra (inclusive estas concentrações) para o qual tem sido demonstrado que o método analítico é preciso, exato e linear. O intervalo de determinação foi originado pela confirmação de que o método, quando aplicado a amostras contendo quantidades de miconazol dentro do intervalo 0,6-3,6 mg/ml, apresenta exatidão, precisão e linearidade.

- Limite de detecção (*Detection Limit*, DL): corresponde ao valor mais baixo de analito numa amostra, que pode ser detetado sem ser necessariamente quantificado como um valor exato. O valor de DL foi determinado com base no desvio padrão da resposta, segundo a Equação 11:

$$\text{DL} = \frac{3.3\sigma}{S} \quad \text{Equação 11}$$

onde σ corresponde ao desvio padrão da interceção com o eixo do Y da regressão linear e S é o declive da curva de calibração.

- Limite de quantificação (*Quantification Limit*, QL): é o valor mais baixo de analito que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Este valor é importante para avaliar os parâmetros de encapsulação nos sistemas de SLN e NLC, uma vez que é necessária a medição de baixos valores de substância ativa em sistemas de transporte eficientes [224]. O QL foi determinado com base no desvio padrão da resposta, aplicando a Equação 12:

$$\text{QL} = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 12}$$

onde: σ corresponde ao desvio padrão da interceção com o eixo do Y da regressão linear, e S é o declive da curva de calibração.

3. Resultados e discussão

3.1. Análises por espectrofotometria de absorção no UV/Vis

O espectro de absorção do miconazol, determinado por espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis, demonstrou que o miconazol apresenta três comprimentos de onda máximos de absorção distintos, nomeadamente aos 265 nm, 272 nm e 280 nm. Os respetivos valores de absorvência registados são 0,704; 0,951 e 0,755. Deste modo, selecionou-se o $\lambda_{\text{máx}}$ do miconazol de 272 nm.

3.2. Parâmetros de validação do método

3.2.1. Especificidade

A análise de especificidade do método permite verificar a possibilidade de ocorrerem interferências entre a quantificação do miconazol e os restantes componentes presentes nas dispersões de nanopartículas lipídicas, nomeadamente lípidos e agentes tensoativos. O espectro de absorção da dispersão de NLC_{2b}P foi registado entre os λ de 200 e 400 nm. Comparativamente com o espectro de absorção da solução-padrão com mais baixa concentração de miconazol (0,6 mg/ml), a dispersão de NLC_{2b}P não apresentou picos nos λ de absorção registados para o miconazol. Deste modo, é possível constatar que os componentes da formulação não interferem com a quantificação do miconazol e que, por isso, o método é específico para o miconazol.

3.2.2. Linearidade

A linearidade da relação entre a absorvência e a concentração de miconazol foi primeiramente avaliada pela curva analítica, no intervalo de concentrações de 0,6-3,6 mg/ml, representada na Figura 20.

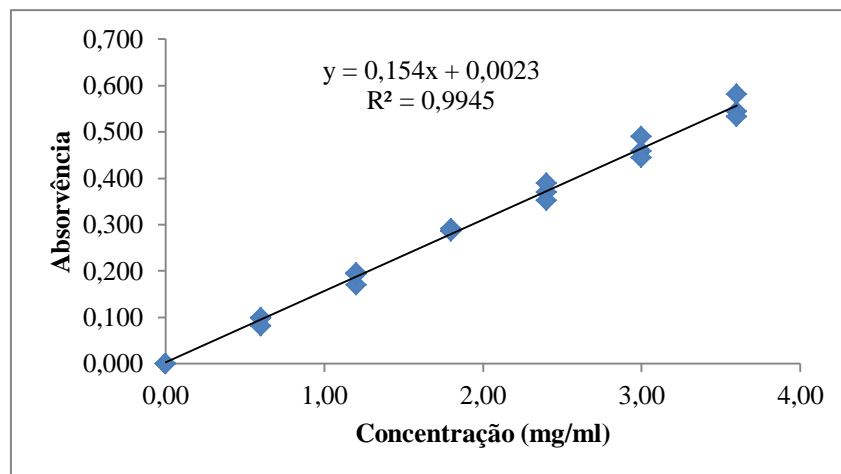


Figura 20 - Curva analítica obtida através da medição dos valores de absorvência em função da concentração de miconazol (0,6-3,6 mg/ml).

Os dados da curva analítica ($\text{absorvência} = 0,154 \times \text{concentração} + 0,0023$) foram ajustados pela análise da regressão linear (Tabela 17). O coeficiente de correlação (R) foi de 0,9973 e o coeficiente de determinação (R^2) apresentou um valor de 0,9945, o que indica que 99,45% da variação total em torno da absorvência é explicada pela regressão linear, com um resíduo de 0,39%. Adicionalmente, o valor da interceção com o Y não se mostrou significativamente diferente de zero.

A regressão é significativa e indica que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do miconazol na amostra, dentro do intervalo de 0,6-3,6 mg/ml. Deste modo, é possível concluir que o método analítico demonstrou uma boa linearidade dentro do intervalo de concentrações proposto.

Tabela 17 - Análise da variância da regressão efetuada no intervalo 0,6-3,6 mg/ml.

ANOVA					
	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Significância F
Regressão	1	0,71687619	0,716876	3459,693	5,78939E-23
Resíduos	19	0,003936952	0,000207		
Total	20	0,720813143			

	Coefficientes	Erro padrão	t	Valor p
Interceção	0,00228571	0,005662853	0,403633	0,690989
Variável X 1	0,15396825	0,002617655	58,81916	5,79E-23

3.2.3. Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada pela quantificação de soluções-padrão com concentrações de 1,2; 2,4 e 3,6 mg/ml (nível de concentração baixo, médio e alto, respetivamente), em triplicado e no mesmo dia (repetibilidade) e em 2 dias diferentes (precisão intermédia). Os resultados obtidos constam na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados obtidos para a repetibilidade (precisão intra-ensaio) e para a precisão intermédia do método analítico.

	Repetibilidade				Precisão intermédia			
	Miconazol* (mg/ml)	Miconazol** (mg/ml)	Desvio padrão	CV (%)	Miconazol* (mg/ml)	Miconazol** (mg/ml)	Desvio padrão	CV (%)
Dia 1	1,2	1,195	0,092	7,729	1,2	1,195	0,092	7,729
Dia 2					1,2	1,227	0,082	6,657
Dia 1	2,4	2,392	0,123	5,160	2,4	2,392	0,123	5,160
Dia 2					2,4	2,401	0,053	2,214
Dia 1	3,6	3,576	0,162	4,536	3,6	3,576	0,162	4,536
Dia 2					3,6	3,637	0,014	0,372

*Concentração de miconazol da solução-padrão; ** Média das concentrações de miconazol medidas.

De acordo com Shah *et al.* [225], o CV de um método preciso não deve exceder os 15%. Como é possível verificar na Tabela 18, tanto para a repetibilidade como para a precisão intermédia, o CV encontrou-se abaixo dos 15% para cada uma das concentrações testadas (1,2; 2,4 e 3,6 mg/ml), o que indica que o método analítico desenvolvido é preciso.

3.2.4. Exatidão

A exatidão foi verificada para três níveis de concentração (baixa, média e alta), calculando-se a percentagem de recuperação de miconazol das soluções-padrão com 1,2 mg/ml, 2,4 mg/ml e 3,6 mg/ml de miconazol. A solução-padrão com 1,2 mg/ml de miconazol obteve uma recuperação de miconazol adicionado igual a 99,6% (1,195 mg/ml \pm 0,092). Quanto à solução-padrão com 2,4 mg/ml de miconazol, a percentagem de recuperação foi de 99,7% (2,392 mg/ml \pm 0,123). Relativamente à solução-padrão com 3,6 mg/ml de miconazol, verificou-se uma recuperação de miconazol correspondente a 99,3% (3,576 mg/ml \pm 0,162). Tendo em conta que o valor médio da

recuperação de miconazol foi superior 99%, a exatidão do método analítico é satisfatória.

3.2.5. Limite de detecção e limite de quantificação

Com base na curva de calibração e através das Equações 11 e 12, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, respetivamente. O DL obtido foi de 0,121 mg/ml e o QL correspondeu a 0,368 mg/ml.

4. Conclusões

Pela análise dos resultados obtidos para os parâmetros de validação utilizados, é possível concluir que o método analítico desenvolvido e validado se mostrou específico, linear, preciso e exato, dentro de um intervalo de concentrações de miconazol entre os 0,6 mg/ml e os 3,6 mg/ml.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL E PERSPETIVAS FUTURAS

Nos últimos anos, a biotecnologia tem prestado um grande auxílio na área da medicina, designadamente através do desenvolvimento de novas moléculas de fármacos. Contudo, por vezes, a aplicação desses fármacos nos sistemas biológicos é dificultada pelas características físico-químicas do fármaco, influenciando a sua eficácia terapêutica. Deste modo, a comunidade científica continua à procura de novas estratégias terapêuticas para a libertação de fármacos, que atendam às propriedades intrínsecas do fármaco e que permitam, simultaneamente, aumentar a sua biodisponibilidade. Neste sentido, a nanotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos e, por conseguinte, para o progresso da indústria farmacêutica e biotecnológica. São vários os sistemas coloidais utilizados para a veiculação e libertação de fármacos, nos quais se inserem as nanopartículas lipídicas. As nanopartículas lipídicas apresentam uma elevada biocompatibilidade graças à sua composição com lípidos semelhantes aos fisiológicos, que simultaneamente confere uma reduzida toxicidade a estes sistemas. Outras vantagens têm sido mencionadas para as nanopartículas lipídicas, designadamente o direcionamento de fármacos a um local alvo, a libertação controlada do fármaco, a proteção do fármaco dos fenómenos de degradação *in vivo*, a facilidade na sua produção e os custos reduzidos. Vários investigadores têm demonstrado a aplicação das nanopartículas lipídicas em diferentes vias de administração, nomeadamente a oral. Dentro desta via, a mucosa oral tem-se demonstrado adequada e vantajosa para a administração de fármacos.

Enquadrado na área da veiculação de fármacos por meio de sistemas coloidais, o presente trabalho possibilitou a compreensão dos diferentes processos de preparação e caracterização de sistemas de nanopartículas lipídicas. Adicionalmente, com base nos vários parâmetros avaliados e nos estudos *in vitro* realizados, este trabalho sugere que os sistemas de NLC apresentam um elevado potencial para aplicação oral do miconazol. No entanto, no futuro, seria importante avaliar a citotoxicidade destes sistemas e averiguar a sua eficácia na mucosa oral, recorrendo a estudos *ex vivo* e *in vivo*, por forma a viabilizar a realização de ensaios clínicos em humanos.

Referências bibliográficas

1. Santamaria, A., *Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology*, in *Nanotoxicity: Methods and Protocols*, J. Reineke, Editor 2012, Humana Press. p. 1-12.
2. Balbus, J., et al., *Getting Nanotechnology Right the First Time*, in *Nanotechnology: "Risk, Ethics and Law"*, G. Hunt and M. Mehta, Editors. 2006, Routledge.
3. Hunt, W., Jr., *Nanomaterials: Nomenclature, novelty, and necessity*. Journal of the Minerals, metals, and Materials Society, 2004. **56**(10): p. 13-18.
4. Sozer, N. and J.L. Kokini, *The Applications of Nanotechnology*, in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Y. Pico, Editor 2012, Academic Press.
5. Feynman, R., *There's Plenty of Room at the Bottom*, in *American Physical Society* 1959: California Institute of Technology.
6. Sahoo, S.K., S. Parveen, and J.J. Panda, *The present and future of nanotechnology in human health care*. Nanomedicine, 2007. **3**(1): p. 20-31.
7. Scholz, O.A., et al., *Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device*. Drug Discovery Today, 2008. **13**(5-6): p. 247-53.
8. Akpan, A. and R. Morgan, *Oral candidiasis*. Postgraduate Medical Journal, 2002. **78**(922): p. 455-9.
9. Amerongen, A.V. and E.C. Veerman, *Saliva--the defender of the oral cavity*. Oral Diseases, 2002. **8**(1): p. 12-22.
10. Isham, N. and M.A. Ghannoum, *Antifungal activity of miconazole against recent Candida strains*. Mycoses, 2010. **53**(5): p. 434-7.
11. Niimi, M., N. Firth, and R. Cannon, *Antifungal drug resistance of oral fungi*. Odontology, 2010. **98**(1): p. 15-25.
12. Gonsalves, W.C., A.C. Chi, and B.W. Neville, *Common oral lesions: Part I. Superficial mucosal lesions*. American Family Physician, 2007. **75**(4): p. 501-7.
13. Bensadoun, R.J., et al., *Comparison of the efficacy and safety of miconazole 50-mg mucoadhesive buccal tablets with miconazole 500-mg gel in the treatment of oropharyngeal candidiasis: a prospective, randomized, single-blind, multicenter, comparative, phase III trial in patients treated with radiotherapy for head and neck cancer*. Cancer, 2008. **112**(1): p. 204-11.
14. Barasch, A. and A.V. Griffin, *Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials*. Future Microbiology, 2008. **3**(3): p. 265-9.
15. Meis, J.F. and P.E. Verweij, *Current management of fungal infections*. Drugs, 2001. **61 Suppl 1**: p. 13-25.
16. Harrison, T.S. and A.E. Brouwer, *Systemic fungal infections*. Medicine, 2009. **37**(12): p. 660-664.
17. Brennan, B. and J.J. Leyden, *Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents*. Journal of the American Academy of Dermatology 1997. **36**(2): p. S3-S8.
18. Van Roey, J., et al., *Comparative efficacy of topical therapy with a slow-release mucoadhesive buccal tablet containing miconazole nitrate versus systemic therapy with ketoconazole in HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2004. **35**(2): p. 144-50.

19. Pietschmann, S., et al., *Synergistic effects of Miconazole and Polymyxin B on microbial pathogens*. Veterinary Research Communications, 2008.
20. Tsutsumi, S., et al., *Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **421**(2): p. 230-236.
21. *Farmacopeia portuguesa VIII*, Infarmed, Editor 2005: Lisboa.
22. American International Chemical, I., *Material safety data sheet*: Framingham, MA.
23. Lalla, R.V. and R.J. Bensadoun, *Miconazole mucoadhesive tablet for oropharyngeal candidiasis*. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2011. **9**(1): p. 13-7.
24. Cerdeira, A.M., M. Mazzotti, and B. Gander, *Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **396**(1–2): p. 210-218.
25. Jain, S., et al., *Design and development of solid lipid nanoparticles for topical delivery of an anti-fungal agent*. Drug Delivery, 2010. **17**(6): p. 443-51.
26. Pemberton, M.N., R.J. Oliver, and E.D. Theaker, *Miconazole oral gel and drug interactions*. British Dental Journal, 2004. **196**(9): p. 529-31.
27. Kyle, A.A. and M.V. Dahl, *Topical Therapy for Fungal Infections*. American Journal of Clinical Dermatology, 2004. **5**(6): p. 443-451.
28. Sud, I.J. and D.S. Feingold, *Mechanisms of Action of the Antimycotic Imidazoles*. Journal of Investigative Dermatology 1981. **76**: p. 438–441.
29. Kobayashi, D., et al., *Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**(10): p. 3113-3117.
30. Pershing, L.K., J. Corlett, and C. Jorgensen, *In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994. **38**(1): p. 90-5.
31. Vandenbosch, D., et al., *Fungicidal activity of miconazole against Candida spp. biofilms*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. **65**(4): p. 694-700.
32. Francois, I.E.J.A., et al., *Azoles: Mode of Antifungal Action and Resistance Development. Effect of Miconazole on Endogenous Reactive Oxygen Species Production in Candida albicans*. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 2006. **5**(1): p. 3-13.
33. Thevissen, K., et al., *Miconazole Induces Changes in Actin Cytoskeleton prior to Reactive Oxygen Species Induction in Yeast*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(30): p. 21592-21597.
34. Cardot, J.M., et al., *Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2004. **58**(4): p. 345-351.
35. Collins, C.D., S. Cookinham, and J. Smith, *Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: efficacy, safety, and patient acceptability*. Journal of Patient Preference and Adherence 2011. **5**: p. 369-74.
36. Kovac, M., G. Mitic, and Z. Kovac, *Miconazole and nystatin used as topical antifungal drugs interact equally strongly with warfarin*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2012. **37**(1): p. 45-8.
37. Lappin, M.A., et al., *Effect of butoconazole nitrate 2% vaginal cream and miconazole nitrate 2% vaginal cream treatments in patients with vulvovaginal*

- candidiasis*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 1996. **4**(6): p. 323-8.
38. Chien, J.Y. and R.J. Ho, *Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(7): p. 2543-7.
 39. Patel, V.F., F. Liu, and M.B. Brown, *Advances in oral transmucosal drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2011. **153**(2): p. 106-16.
 40. Sudhakar, Y., K. Kuotsu, and A.K. Bandyopadhyay, *Buccal bioadhesive drug delivery--a promising option for orally less efficient drugs*. Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 15-40.
 41. Salamat-Miller, N., M. Chittchang, and T.P. Johnston, *The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(11): p. 1666-91.
 42. Rossi, S., G. Sandri, and C.M. Caramella, *Buccal drug delivery: A challenge already won?* Drug Discovery Today: Technologies, 2005. **2**(1): p. 59-65.
 43. Senel, S. and A.A. Hincal, *Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations*. Journal of Controlled Release 2001. **72**(1-3): p. 133-44.
 44. Sankar, V., et al., *Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities*. Oral Diseases, 2011. **17 Suppl 1**: p. 73-84.
 45. Squier, C.A. and M.J. Kremer, *Biology of oral mucosa and esophagus*. Journal of the National Cancer Institute Monographs, 2001(29): p. 7-15.
 46. Hearnden, V., et al., *New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**(1): p. 16-28.
 47. Harris, D. and J.R. Robinson, *Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1992. **81**(1): p. 1-10.
 48. Madhav, N.V., et al., *Orotransmucosal drug delivery systems: a review*. Journal of Controlled Release, 2009. **140**(1): p. 2-11.
 49. Silva, A.C., et al., *Lipid-Based Nanocarriers as an Alternative for Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs: Peroral and Mucosal Routes*. Current Medicinal Chemistry, 2012.
 50. Shojaei, A.H., *Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery: A Review*. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 1998. **1**(1): p. 15-30.
 51. Sohi, H., et al., *Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2010. **36**(3): p. 254-82.
 52. Khairnar, G.A. and F.J. Sayyad, *Development of buccal drug delivery system based on mucoadhesive polymers*. International Journal of PharmTech Research, 2010. **2**(1): p. 719-735.
 53. Hao, J. and P.W. Heng, *Buccal delivery systems*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2003. **29**(8): p. 821-32.
 54. Junginger, H.E., J.A. Hoogstraate, and J.C. Verhoef, *Recent advances in buccal drug delivery and absorption--in vitro and in vivo studies*. Journal of Controlled Release, 1999. **62**(1-2): p. 149-59.
 55. Veuillez, F., et al., *Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001. **51**(2): p. 93-109.
 56. Corbo, D.C., J.C. Liu, and Y.W. Chien, *Drug Absorption through Mucosal Membranes - Effect of Mucosal Route and Penetrant Hydrophilicity*. Pharmaceutical Research, 1989. **6**(10): p. 848-852.

57. Goldberg, M. and I. Gomez-Orellana, *Challenges for the oral delivery of macromolecules*. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(4): p. 289-95.
58. Silva, C., et al., *Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2002. **38**(2): p. 125-140.
59. Vauthier, C. and P. Couvreur, *Developing nanoparticle drug carriers*. Pharmaceutical Technology Europe, 2007. **19**(1).
60. Bhati, R. and R.K. Nagrajan, *A detail review on oral mucosa of drug delivery system*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2012. **3**(1): p. 659 -681.
61. Venuganti, V.V. and O.P. Perumal, *Nanosystems for Dermal and Transdermal Drug Delivery*, in *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, Y. Pathak and D. Thassu, Editors. 2009, Informa Healthcare: New York. p. 126-155.
62. Mehnert, W. and K. Mader, *Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(2-3): p. 165-196.
63. Puri, A., et al., *Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2009. **26**(6): p. 523-580.
64. Patidar, A., et al., *A review on novel lipid based nanocarriers*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2010. **2**(4): p. 30-35.
65. Almeida, A.J. and E. Souto, *Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 478-490.
66. Silva, A.C., et al., *Nanopartículas lipídicas*. p. 297-334.
67. Rai, S., et al., *Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) as a Rising Tool in Drug Delivery Science: One Step Up in Nanotechnology*. Current Nanoscience, 2008. **4**(1): p. 30-44.
68. Chattopadhyay, P., et al., *Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 444-453.
69. Singhal, G.B., et al., *Solid lipid nanoparticles and nano lipid carriers: as novel solid lipid based drug carrier*. International Research Journal of Pharmacy, 2011. **2**(2): p. 40-52.
70. Müller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs*. Int J Pharm, 2002. **242**(1-2): p. 121-128.
71. Hommoss, A., *Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations*, in *Department of Biology, Chemistry and Pharmacy of the Freie Universität Berlin 2008*, Freie Universität Berlin: Berlin. p. 202.
72. Müller, R.H., et al., *Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 522-530.
73. Müller, R.H., K. Mäder, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 161-177.
74. Schafer-Korting, M., W. Mehnert, and H.C. Korting, *Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 427-43.

75. Shidhaye, S.S., et al., *Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers--innovative generations of solid lipid carriers*. *Current Drug Delivery*, 2008. **5**(4): p. 324-31.
76. Olbrich, C., O. Kayser, and R.H. Müller, *Lipase degradation of Dynasan114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) - effect of surfactants, storage time and crystallinity*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **237**(1-2): p. 119-128.
77. Venkateswarlu, V. and K. Manjunath, *Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **95**(3): p. 627-638.
78. García-Fuentes, M., D. Torres, and M.J. Alonso, *Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002. **27**(2-3): p. 159-168.
79. Garcia-Fuentes, M., D. Torres, and M.J. Alonso, *New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005. **296**(1-2): p. 122-132.
80. Muchow, M., et al., *Production and characterization of testosterone undecanoate-loaded NLC for oral bioavailability enhancement*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2011. **37**(1): p. 8-14.
81. Sarmiento, B., et al., *Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system*. *Carbohydrate Polymers*, 2011. **84**(3): p. 919-925.
82. Yuan, H., et al., *Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification*. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 2007. **60**(2): p. 174-9.
83. Liu, C.H., C.T. Wu, and J.Y. Fang, *Characterization and formulation optimization of solid lipid nanoparticles in vitamin K1 delivery*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2010. **36**(7): p. 751-61.
84. Silva, A.C., et al., *Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012.
85. Muller, R.H., et al., *Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN (R)): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **68**(3): p. 535-544.
86. Abdelbary, G. and R.H. Fahmy, *Diazepam-loaded solid lipid nanoparticles: design and characterization*. *AAPS PharmSciTech*, 2009. **10**(1): p. 211-9.
87. Hu, L., X. Tang, and F. Cui, *Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2004. **56**(12): p. 1527-35.
88. Zhuang, C.Y., et al., *Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **394**(1-2): p. 179-85.
89. Date, A.A., et al., *Lipid nanocarriers (GeluPearl) containing amphiphilic lipid Gelucire 50/13 as a novel stabilizer: fabrication, characterization and evaluation for oral drug delivery*. *Nanotechnology*, 2011. **22**.
90. Chen, C.C., et al., *Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010. **74**(3): p. 474-82.

91. Sarmento, B., et al., *Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, 2007. **2**(4): p. 743-9.
92. Kumar, V.V., et al., *Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **335**(1-2): p. 167-75.
93. Zhang, J. and E. Smith, *Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2011. **100**(3): p. 896-903.
94. Kheradmandnia, S., et al., *Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax*. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 2010. **6**(6): p. 753-759.
95. Ekambaram, P. and H.S. Abdul, *Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril*. Journal of Young Pharmacists, 2011. **3**(3): p. 216-20.
96. Liu, C.H. and C.T. Wu, *Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **353**(2-3): p. 149-156.
97. Luo, Y., et al., *Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability*. Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 53-59.
98. Muller, R.H., et al., *Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN (R)) versus drug nanocrystals*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **317**(1): p. 82-89.
99. Souto, E.B., A.J. Almeida, and R.H. Iler, *Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007. **3**(4): p. 317-331.
100. Freitas, C. and R.H. Mullera, *Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN TM)*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **46**(2): p. 145-51.
101. Gonzalez-Mira, E., et al., *Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery*. Nanotechnology, 2011. **22**(4): p. 045101.
102. Lippacher, A., R.H. Müller, and K. Mäder, *Liquid and semisolid SLNTM dispersions for topical application: rheological characterization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**(3): p. 561-567.
103. Tiyaboonchai, W., W. Tungpradit, and P. Plianbangchang, *Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **337**(1-2): p. 299-306.
104. Schubert, M.A. and C.C. Müller-Goymann, *Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. **61**(1-2): p. 77-86.
105. Sinha, V.R., et al., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting*. International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011. **1**(3): p. 212-238.
106. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **26**(2): p. 211-8.
107. Das, S. and A. Chaudhury, *Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery*. AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(1): p. 62-76.

108. Saupé, A. and T. Rades, *Solid Lipid Nanoparticles*, in *Nanocarrier Technologies*, M.R. Mozafari, Editor 2006, Springer Netherlands. p. 41-50.
109. Parashar, A.K., et al., *A review on Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled and targeted delivery of medicinal agents*. *Current Research in Pharmaceutical Sciences*, 2011. **02**: p. 37-47.
110. Dingler, A. and S. Gohla, *Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities*. *Journal of Microencapsulation*, 2002. **19**(1): p. 11-6.
111. Lippacher, A., R.H. Müller, and K. Mäder, *Semisolid SLN™ dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002. **53**(2): p. 155-160.
112. Zhang, J., et al., *Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011. **63**(6): p. 441-55.
113. Müller, R.H., C. Jacobs, and O. Kayser, *Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **47**(1): p. 3-19.
114. Mishra, B., B.B. Patel, and S. Tiwari, *Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010. **6**(1): p. 9-24.
115. Wissing, S.A., O. Kayser, and R.H. Müller, *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**(9): p. 1257-1272.
116. Jenning, V., A. Lippacher, and S.H. Gohla, *Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization*. *Journal of Microencapsulation*, 2002. **19**(1): p. 1-10.
117. Souto, E.B., et al., *Nanopartículas de lípidos sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial*. *Química Nova*, 2011. **34**: p. 1762-1769.
118. Gasco, M.R., *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution*, U.S. Patent, Editor 1993: United States of America.
119. Swathi, G., et al., *Solid lipid nanoparticles: colloidal carrier systems for drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2010. **1**(12): p. 01-16.
120. Hou, D., et al., *The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs)*. *Biomaterials*, 2003. **24**(10): p. 1781-1785.
121. Silva, A.C., et al., *Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound*. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 2011. **86**(1): p. 158-65.
122. Mukherjee, S., S. Ray, and R.S. Thakur, *Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009. **71**(4): p. 349-58.
123. Trotta, M., F. Debernardi, and O. Caputo, *Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003. **257**(1-2): p. 153-60.
124. Meng, F.T., et al., *W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **91**(3): p. 407-416.
125. Fessi, C., et al., *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles*, 1992, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France: France.

126. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **188**(2): p. 155-64.
127. Trotta, M., et al., *Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions*. Journal of Controlled Release, 2001. **76**(1-2): p. 119-28.
128. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharmaceutical Research, 2002. **19**(6): p. 875-80.
129. Charcosset, C., A. El-Harati, and H. Fessi, *Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor*. Journal of Controlled Release, 2005. **108**(1): p. 112-20.
130. Salmaso, S., et al., *Production of solid lipid submicron particles for protein delivery using a novel supercritical gas-assisted melting atomization process*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(2): p. 640-650.
131. Tsai, M.J., et al., *Oral Apomorphine Delivery from Solid Lipid Nanoparticles with Different Monostearate Emulsifiers: Pharmacokinetic and Behavioral Evaluations*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **100**(2): p. 547-557.
132. Sanjula, B., et al., *Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement*. Journal of Drug Targeting, 2009. **17**(3): p. 249-256.
133. Kakkar, V., et al., *Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin*. Molecular Nutrition & Food Research, 2011. **55**(3): p. 495-503.
134. Zhang, Z.H., H.X. Lv, and J.P. Zhou, *Novel solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin*. Pharmazie, 2009. **64**(9): p. 574-578.
135. Pandey, R., S. Sharma, and G.K. Khuller, *Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy*. Tuberculosis, 2005. **85**(5-6): p. 415-420.
136. Dong, Z., et al., *Preparation and in vitro, in vivo evaluations of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery*. Drug Delivery, 2011. **18**(6): p. 441-450.
137. Yang, L., et al., *Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles*. Pharmazie, 2009. **64**(2): p. 86-89.
138. Li, H.L., et al., *Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2009. **133**(3): p. 238-244.
139. He, J., et al., *Preparation, pharmacokinetics and body distribution of silymarin-loaded solid lipid nanoparticles after oral administration*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007. **3**(2): p. 195-202.
140. Zhang, Z., et al., *The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **394**(1-2): p. 147-53.
141. Zhou, L., et al., *Preparation of tripterine nanostructured lipid carriers and their absorption in rat intestine*. Pharmazie, 2012. **67**(4): p. 304-310.
142. Hu, F.-Q., et al., *Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **314**(1): p. 83-89.
143. Muchow, M., P. Maincent, and R.H. Muller, *Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery*. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2008. **34**(12): p. 1394-1405.

144. Westesen, K., H. Bunjes, and M.H.J. Koch, *Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential*. *Journal of Controlled Release*, 1997. **48**(2-3): p. 223-236.
145. Muller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54 Suppl 1**: p. S131-55.
146. Üner, M. and G. Yener, *Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives*. *International Journal of Nanomedicine*, 2007. **2**(3): p. 289-300.
147. Jennings, V. and S. Gohla, *Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN®)*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000. **196**(2): p. 219-222.
148. Bunjes, H., K. Westesen, and M.H.J. Koch, *Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996. **129**(1-2): p. 159-173.
149. Heike, B., *Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2011. **16**(5): p. 405-411.
150. Heurtault, B., et al., *Physico-chemical stability of colloidal lipid particles*. *Biomaterials*, 2003. **24**(23): p. 4283-4300.
151. Kuntsche, J. and K. Mader, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for drug delivery*, in *Handbook of materials for nanomedicine 2010*, Pan Stanford Publishing. p. 385-442.
152. Ali, H., et al., *Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ((1)H NMR)*. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 2010. **77**(2): p. 286-97.
153. Bunjes, H., M.H. Koch, and K. Westesen, *Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **92**(7): p. 1509-20.
154. Helgason, T., et al., *Influence of Polymorphic Transformations on Gelation of Tripalmitin Solid Lipid Nanoparticle Suspensions*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008. **85**(6): p. 501-511.
155. Freitas, C. and R.H. Müller, *Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1999. **47**(2): p. 125-132.
156. Jones, D.S., A.D. Woolfson, and A.F. Brown, *Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels*. *Pharmaceutical Research*, 1997. **14**(4): p. 450-457.
157. Severino, P., et al., *Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery*. *Journal of Drug Delivery*, 2012. **2012**: p. 10.
158. Muller, R.H., R. Shegokar, and C.M. Keck, *20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications*. *Current Drug Discovery Technologies*, 2011. **8**(3): p. 207-27.
159. Lin, C.C. and A.T. Metters, *Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(12-13): p. 1379-408.

160. Pardeike, J., A. Hommoss, and R.H. Muller, *Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **366**(1-2): p. 170-84.
161. Bleve, M., F. Pavanetto, and P. Perugini, *Solid Lipid Nanoparticles: Technological Developments and in Vivo Techniques to Evaluate Their Interaction with the Skin*, in *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, A. Carpi, Editor 2011, InTech: Croatia.
162. Muller, R.H., S. Gohla, and C.M. Keck, *State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. **78**(1): p. 1-9.
163. Souto, E.B., et al., *A note on regulatory concerns and toxicity assessment in lipid-based delivery systems (LDS)*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2009. **5**(4): p. 317-22.
164. Duncan, R. and R. Gaspar, *Nanomedicine(s) under the microscope*. Molecular Pharmacology, 2011. **8**(6): p. 2101-41.
165. Müller, R.H., et al., *Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant*. Pharmaceutical Research, 1997. **14**(4): p. 458-462.
166. Rawat, M.K., A. Jain, and S. Singh, *In vivo and cytotoxicity evaluation of repaglinide-loaded binary solid lipid nanoparticles after oral administration to rats*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2011. **100**(6): p. 2406-17.
167. Olbrich, C., et al., *Cytotoxicity studies of Dynasan 114 solid lipid nanoparticles (SLN) on RAW 264.7 macrophages-impact of phagocytosis on viability and cytokine production*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2004. **56**(7): p. 883-91.
168. Chakraborty, S., et al., *Lipid--an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **73**(1): p. 1-15.
169. Kasongo, K.W., et al., *Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **100**(12): p. 5185-96.
170. Silva, A.C., et al., *Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations*. Pharmazie, 2009. **64**(3): p. 177-82.
171. Chauhan, B., et al., *Preparation and evaluation of floating risedronate sodium-Gelucire 43/01 formulations*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005. **31**(9): p. 851-60.
172. Jadhav, N., et al. *Gelucires : Pharmaceutical Applications*. 2008; Disponível em: <http://www.pharmainfo.net/reviews/gelucires-pharmaceutical-applications>. Consultado em 03/08/2012.
173. Müller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **242**(1-2): p. 121-128.
174. Bunjes, H. and T. Unruh, *Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(6): p. 379-402.
175. Müller-Goymann, C.C., *Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and*

- nanoparticles for topical administration*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**(2): p. 343-356.
176. Ribeiro, A., et al., *Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin*. AAPS PharmSciTech, 2008. **9**(4): p. 1102-1109.
 177. Puglia, C., et al., *Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: in vitro percutaneous absorption and photostability studies*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **101**(1): p. 301-311.
 178. Muller, R.H., et al., *Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **68**(3): p. 535-44.
 179. Araujo, J., et al., *Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **393**(1-2): p. 167-75.
 180. Finsy, R. and N. De Jaeger, *Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy. Part II: Average values*. Particle & Particle Systems Characterization, 1991. **8**(1-4): p. 187-193.
 181. Malvern, *Zetasizer Nano Series User Manual*, 2004.
 182. Pathak, P. and M. Nagarsenker, *Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery*. AAPS PharmSciTech, 2009. **10**(3): p. 985-92.
 183. ISO, *ISO 22412:2008 in Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS)2008*: Switzerland.
 184. Lage, O.M., J. Bondoso, and J.A. Catita, *Determination of zeta potential in Planctomycetes and its application in heavy metals toxicity assessment*. Archives of Microbiology, 2012. **194**(10): p. 847-55.
 185. Malvern. *Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis (LDE)*. Disponível em: [http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LD E.htm](http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LD_E.htm). Consultado em 06/08/2012.
 186. Corradini, D., *Buffer additives other than the surfactant sodium dodecyl sulfate for protein separations by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1997. **699**(1-2): p. 221-256.
 187. Puglia, C., et al., *Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **357**(1-2): p. 295-304.
 188. Lim, S.J. and C.K. Kim, *Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **243**(1-2): p. 135-146.
 189. Tadros, T., *Polymeric surfactants in disperse systems*. Advances in Colloid and Interface Science, 2009. **147-48**: p. 281-299.
 190. Oliveira, J.M. and L.H.I. Mei, *Nonionic Reactive Surfactants in Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate - Vinyl Neodecanoate Latexes: Influence on the Water Barrier Properties*. Polimeros-Ciencia E Tecnologia, 2009. **19**(1): p. 22-30.
 191. Zimmermann, E. and R.H. Muller, *Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN (TM)) dispersions in artificial gastrointestinal*

- media*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001. **52**(2): p. 203-210.
192. Tabatt, K., et al., *Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(2): p. 155-62.
 193. Bernstein, I.L., *Is the use of benzalkonium chloride as a preservative for nasal formulations a safety concern? A cautionary note based on compromised mucociliary transport*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000. **105**(1): p. 39-44.
 194. Lv, Q., et al., *Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **372**(1-2): p. 191-8.
 195. Cavalli, R., et al., *Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with beta-cyclodextrins*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **182**(1): p. 59-69.
 196. Neves, A.R., et al., *Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability*. International Journal of Nanomedicine, 2013. **8**: p. 177-87.
 197. Herrera, J.E. and N. Sakulchaicharoen, *Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles*, in *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization*, Y. Pathak and D. Thassu, Editors. 2009, Informa healthcare: New York. p. 239-251.
 198. CLSI, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Second Edition.*, in *CLSI document M27-A2* C.a.L.S.I. (CLSI), Editor 2002: Pennsylvania, USA
 199. Araujo, J., et al., *Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **393**(1-2): p. 167-75.
 200. Joshi, M. and V. Patravale, *Formulation and Evaluation of Nanostructured Lipid Carrier (NLC)-based Gel of Valdecoxib*. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2006. **32**(8): p. 911-918.
 201. Esposito, E., et al., *Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration*. Materials Science and Engineering C, 2012.
 202. Liu, D.H., et al., *Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2011. **85**(2): p. 262-269.
 203. Beck, R., S. Guterres, and A. Pohlmann, *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care* 2011: Springer.
 204. Lee, C.H., V. Moturi, and Y. Lee, *Thixotropic property in pharmaceutical formulations*. Journal of Controlled Release, 2009. **136**(2): p. 88-98.
 205. Costa, P. and J.M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **13**(2): p. 123-33.
 206. Dash, S., et al., *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2010. **67**(3): p. 217-23.
 207. Siepman, J. and F. Siepman, *Mathematical modeling of drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **364**(2): p. 328-43.
 208. Gonzalez-Mira, E., et al., *Improved and safe transcorneal delivery of flurbiprofen by NLC and NLC-based hydrogels*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **101**(2): p. 707-25.

209. Bhaskar, K., et al., *Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies*. *Lipids in Health and Disease*, 2009. **8**.
210. Silva, A.C., et al., *Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **436**(1-2): p. 798-805.
211. Silva, A.C., et al., *Risperidone release from solid lipid nanoparticles (SLN): validated HPLC method and modelling kinetic profile*. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2012. **8**(4): p. 307-316.
212. Ahuja, N., O.P. Katare, and B. Singh, *Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007. **65**(1): p. 26-38.
213. Winnicka, K., et al., *Hydrogel of ketoconazole and PAMAM dendrimers: formulation and antifungal activity*. *Molecules*, 2012. **17**(4): p. 4612-24.
214. Souto, E.B. and R.H. Muller, *The use of SLN (R) and NLC (R) as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents*. *Pharmazie*, 2006. **61**(5): p. 431-437.
215. Perale, G., et al., *Multiple drug delivery hydrogel system for spinal cord injury repair strategies*. *Journal of Controlled Release*, 2012. **159**(2): p. 271-80.
216. Bunjes, H., *Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2011. **16**: p. 405–411.
217. Hoare, T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. *Polymer*, 2008. **49**: p. 1993-2007.
218. Costa, P. and J.M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001. **13**(2): p. 123-33.
219. ICH, *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005.
220. Rumel, D., *Resolução - RE nº 899, A.N.d.V. Sanitária*, Editor 2003: Brasil.
221. Pereira, F.C., N.R. Stradiotto, and M.V. Zanoni, *Voltammetric characteristics of miconazole and its cathodic stripping voltammetric determination*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2002. **74**(3): p. 425-32.
222. Akay, C., et al., *Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC*. *Farmaco*, 2002. **57**(11): p. 953-7.
223. Sarrío, R.V. and L.J. Silvestri, *Validation of Analytical Assays and Test Methods for the Pharmaceutical Laboratory*. *The Regulatory Forum - AccuReg*, 1996.
224. Silva, A.C., et al., *Risperidone release from solid lipid nanoparticles (SLN): validated HPLC method and modelling kinetic profile*. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2012. **8**: p. 00-00.
225. Shah, V.P., et al., *Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress*. *Pharmaceutical Research*, 2000. **17**(12): p. 1551-7.