

**Preparação e caracterização de nanotransportadores  
(nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos  
nanoestruturados) sem substância ativa**

**Jorge Miguel Ferreira Delgado**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**  
Para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho realizado sob orientação de:

**Eliana Martins Lima**  
**Joana Andréa Soares Amaral**

Dezembro de 2013



**Preparação e caracterização de nanotransportadores  
(nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos  
nanoestruturados) sem substância ativa.**

**Jorge Miguel Ferreira Delgado**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**  
Para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

O trabalho experimental descrito nesta dissertação foi integralmente realizado nos Laboratórios de Farmacologia e Toxicologia Celular e de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.



Dezembro de 2013



## Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, irmã e avó, pelo apoio incondicional, pelo carinho demonstrado, por estarem sempre do meu lado em todos os momentos, por todo o esforço que têm feito para a minha formação profissional e pelo orgulho que sentem a cada vitória minha.

Agradeço à minha orientadora Prof. Eliana Martins do Farmatec, por todos os ensinamentos concedidos, pela bela recepção/disponibilidade durante os 5 meses de estadia no Brasil, pela confiança em mim depositada e pela amizade demonstrada. Muito obrigado.

À minha orientadora Prof. Joana Amaral, pela ajuda demonstrada em todos os momentos ao longo da minha escrita, por todas as críticas e sugestões demonstradas, pelo carinho, pela amizade e pela confiança que depositou em mim ao longo desta caminhada. Muito Obrigado.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular e de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, obrigada por todos os ensinamentos demonstrados, pela disponibilidade sempre que necessária, por todo o auxílio técnico, pela bela recepção, por todos os conselhos dados, pela força, pela amizade e pelo carinho.

Aos meus amigos, por todos os conselhos dados, por todo o incentivo e força, pelas belas palavras de carinho e pelo apoio emocional. Obrigada por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

A todos os familiares que de alguma maneira me apoiaram e incentivaram, pela palavra amiga e pelo carinho demonstrado. Muito obrigado.

Por último, mas não menos importante, à minha amiga e namorada Daniela Costa, pelo apoio dado ao longo deste percurso, por todo o companheirismo e dedicação demonstrado e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.



## Resumo

A nanotecnologia é uma área transversal a vários domínios científicos englobando conceitos da biologia, química, engenharia, matemática, computação entre outros. A nanotecnologia aplicada às ciências farmacêuticas, e em particular ao encapsulamento de fármacos, surgiu há relativamente pouco tempo, mas devido aos recentes e rápidos avanços tecnológicos permitiu a descoberta de novas oportunidades de diagnóstico e terapêutica para diversas doenças.

Os nanotransportadores são sistemas desenvolvidos à escala nanométrica ( $< 1\ \mu\text{m}$ ) podendo ser usados como veículo de substâncias ativas para libertação controlada. São vários os materiais que podem ser usados para a sua obtenção, incluindo materiais biodegradáveis tais como polímeros (naturais ou sintéticos) e lipídios. Atualmente a maioria dos trabalhos realizados foca o encapsulamento de fármacos e caracterização dos nanotransportadores obtidos, sendo escassos os dados relativos a nanotransportadores (NT) sem substância ativa, os quais são de grande importância aquando da realização de estudos subsequentes, tais como ensaios *in vitro*.

Este trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de diferentes tipos de NT sem substância ativa: lipossomas (Lip), nanocápsulas (NC), nanoesferas (NE) e transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC), os quais foram preparados, respetivamente, pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão mecânica, por nanoprecipitação (NC e NE) e por homogeneização a alta pressão a quente. Cada nanotransportador foi preparado mediante a realização de 5 ensaios independentes e caracterizados no que respeita (i) a sua concentração, por análise de localização de nanopartículas, (ii) diâmetro hidrodinâmico médio e (iii) índice de polidispersão (Pdi) ambos por dispersão dinâmica de luz, (iv) potencial Zeta e (v) pH.

Os NT que apresentaram maior concentração (número de partículas em dispersão) foram os lipossomas (média de  $6,27 \times 10^{13}$  part/ml). O diâmetro hidrodinâmico médio dos nanotransportadores variou entre  $126,3 \pm 3,7$  nm (NE) e  $174,2 \pm 4,2$  nm (NC) e o potencial zeta entre  $-6,86 \pm 4,0$  mV (lipossomas) e  $-19,48 \pm 2,8$  mV (NLC). Em todas as

amostras, não se verificou alterações consideráveis de pH. As NC e NE apresentaram Pdi <0,1 sugerindo uma distribuição de tamanho de partículas unimodal e monodispersa, pelo contrário as NLC e Lip apresentaram índices de polidispersão elevados. Dos quatro tipos de nanotransportadores estudados, as NC e NE foram aqueles que apresentaram uma menor variabilidade de resultados (tamanho e Pdi) entre os diferentes ensaios sugerindo uma maior repetibilidade do método de preparação e da formulação destas partículas.

**Palavras-chave:** Caracterização físico-química; Carregadores lipídicos nanoestruturados; Lipossomas; Nanocápsulas; Nanoesferas; Nanotransportadores sem substância ativa.

## Abstract

Nanotechnology is a cross-cutting area to various scientific domains encompassing concepts of biology, chemistry, engineering, mathematics, computing, among others. Nanotechnology applied to pharmaceutical sciences, in particular to the encapsulation of drugs, is relatively recent. Nevertheless, due to recent and fast technological advances, it allowed the discovery of new diagnostic and therapeutics opportunities for various diseases.

Nanocarriers are systems developed at the nanoscale ( $<1\mu\text{m}$ ) that can be used as a vehicle for the controlled release of active substances.. There are several materials that can be used for its preparation, including biodegradable materials such as polymers (natural or synthetic) and lipids. Currently, most research work focuses on the encapsulation of drugs and the characterization of the obtained nanocarriers. Thus, there are still few data regarding nanocarriers without active substance, which are of great importance when carrying out subsequent studies such as *in vitro* assays.

The objective of this study consisted on the preparation and characterization of different types of nanocarriers without active substance: liposomes (Lip), nanocapsules (NC), nanospheres (NS) and nanostructured lipid carriers (NLC), which were prepared, respectively, by the method of lipidic film hydration followed by mechanical extrusion, by nanoprecipitation (NC and NE) and by hot high pressure homogenization. Each nanocarrier was prepared by carrying out 5 independent assays and characterized in terms of (i) its concentration, by nanoparticles tracking analysis, (ii) average hydrodynamic size and (iii) polydispersity index (Pdi) both by dynamic light scattering technique (iv) Zeta potential (v) pH.

The nanocarriers that showed a higher concentration (number of particle in dispersion) were liposomes (mean value  $6.27 \times 10^{13}$  part/mL). The mean hydrodynamic diameter of nanocarriers varied between  $126.3 \pm 3.7$  nm (NE) and  $174.2 \pm 4.2$  nm (NC) and the zeta potential was between  $-6.86 \pm 4.0$  mV (Lip) and  $-19.48 \pm 2.8$  mV (NLC). In all samples, there was no significant pH changes.

The NC and NE had a Pdi  $<0.1$  suggesting a unimodal size distribution and monodisperse particles. By the contrary, NLC and Lip showed a high polydispersity index value. From the four types of nanocarriers studied, the NC and NE were those who showed lower variability of results (size and Pdi) between different trials suggesting a greater repeatability of the preparation method and formulation of these particles.

**Keywords:** Physico-chemical characterization; nanostructured lipid carriers, liposomes, nanocapsules, nanospheres, nanocarriers without active substance.

# Índice

Agradecimentos .....	III
Resumo .....	V
Abstract .....	VII
Índice .....	IX
Índice de Figuras .....	XIII
Índice de Tabelas .....	XVII
Lista de Abreviaturas .....	XIX
Capítulo 1 – Introdução .....	1
1. Motivação .....	1
2. Disposição do trabalho .....	3
Capítulo 2 - Revisão da Literatura .....	5
2. Nanotecnologia .....	5
2.1. Nanotransportadores .....	6
2.1.1. Nanopartículas Poliméricas .....	9
Métodos de preparação de Nanopartículas Poliméricas .....	11
Método de Nanoprecipitação .....	12
Componentes utilizados em formulação de Nanopartículas Poliméricas .	14
Polímero .....	15
Tensioativos .....	16
Óleo .....	18
Aplicações das Nanopartículas Poliméricas .....	18
2.1.2. Lipossomas .....	19

Métodos de preparação de Lipossomas .....	23
Hidratação do filme Lipídico (HFL).....	24
Processo mecânico de extrusão.....	25
Aplicações dos Lipossomas .....	26
2.1.3.    Transportadores Lipídicos Nanoestruturados.....	26
Métodos de preparação de Nanotransportadores Lipídicos Sólidos .....	29
Homogeneização a alta pressão a Quente (HPH Quente).....	30
Homogeneização a alta pressão a Frio (HPH Frio) .....	31
Componentes da formulação dos NLC .....	32
Lípidos .....	32
Tensioativos .....	33
Aplicações dos Transportadores Lipídicos Nanoestruturados .....	34
2.2.    Métodos de Caracterização dos Nanotransportadores.....	35
2.2.1.    Dispersão dinâmica de luz (DLS) .....	35
2.2.2.    Análise de localização de partículas (NTA).....	37
2.2.3.    Potencial Zeta.....	38
2.2.4.    pH.....	40
Capítulo 3 - Materiais e Métodos .....	41
3.1.    Materiais (Reagentes): .....	41
3.2.    Equipamentos: .....	42
3.3.    Metodologia:.....	42
3.3.1.    Métodos de obtenção de Nanotransportadores sem Substância Ativa:	
42	

Preparação de Nanocápsulas de Policaprolactona .....	43
Preparação de Nanoesferas de Policaprolactona.....	44
Preparação de Transportadores Lipídicos Nanoestruturados.....	45
Preparação de Lipossomas 80 mM .....	47
3.3.2. Caracterização dos Nanotransportadores .....	48
Análise de localização de partículas (NTA - Nanoparticle Tracking Analysis).....	48
Determinação do pH .....	49
Determinação do índice de polidispersão e do diâmetro médio dos nanotransportadores.....	50
Determinação da carga superficial dos nanotransportadores (Potencial Zeta).....	51
3.3.3. Análise estatística .....	52
Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	53
4. Análise e Discussão de Resultados.....	53
4.1. Preparação dos Nanotransportadores sem substância ativa.....	53
4.2. Análise de localização de partículas (NTA).....	55
4.3. Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) .....	60
4.4. Potencial Zeta .....	75
4.5. Controle de pH .....	82
Capítulo 5 – Conclusão.....	83
Referências.....	85



# Índice de Figuras

Figura 1: Diferentes tipos de nanotransportadores. ....	7
Figura 2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: 1) Nanocápsula com fármaco dissolvido no seu núcleo; 2) Nanocápsula com o fármaco adsorvido na membrana polimérica; 3) Nanoesfera com fármaco retido na sua matriz polimérica; 4) Nanoesfera com fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica ..	10
Figura 3: Representação do método de nanoprecipitação. * O óleo é usado apenas aquando da formação de nanocápsulas, na formação de nanoesferas este componente está ausente .....	14
Figura 4: Representação esquemática da síntese do polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) através da polimerização pela abertura do anel de $\epsilon$ -caprolactona.....	16
Figura 5: Estrutura química do monoestearato de sorbitano ou Span 60 (Sigma-Aldrich, 2013b).....	17
Figura 6: Características estruturais dos lipossomas. ....	21
Figura 7: Representação dos vários tipos de interações entre os lipossomas e as células do organismo .....	22
Figura 8: Classificação dos lipossomas quanto ao número de bicamadas e tamanho. ....	23
Figura 9: Representação esquemática da preparação de MLVs através do método de hidratação do filme lipídico.....	25
Figura 10: Representação esquemática da preparação de LUVs através de extrusão .....	26
Figura 11: Representação esquemática das diferenças entre a) estrutura da matriz cristalina perfeita das SLN, b) estrutura da matriz imperfeita das NLC. ....	28
Figura 12: Representação esquemática dos 3 diferentes tipos de NLC, a) NLC imperfeita, b) NLC amorfa, c) NLC múltipla.....	29

Figura 13: Representação esquemática do método de homogeneização a alta pressão a quente.....	30
Figura 14: Representação esquemática da fórmula estrutural do copolímero Poloxamer.....	34
Figura 15: Equipamento Nanosight NS500 (esquerda), imagem retirada do software <i>NTA Software Suite</i> referente à visualização da população de nanopartículas da amostra em análise (direita) .....	38
Figura 16: Representação esquemática do Potencial Zeta.....	40
Figura 17: Representação esquemática do método utilizado para a preparação de Nanocápsulas.....	44
Figura 18: Representação esquemática do método de preparação de Nanoesferas. .	45
Figura 19: Representação esquemática da preparação de NLC através do método de homogeneização a alta pressão a quente. ....	46
Figura 20: Representação esquemática da preparação de lipossomas através do método hidratação do filme lipídico seguido de extrusão. ....	48
Figura 21: Imagem do equipamento NS500 (Nanosight) utilizado neste trabalho...	49
Figura 22: pHmetro digital com eletrodo de vidro utilizado neste trabalho. ....	50
Figura 23: Imagem do equipamento Zetasizer Nano-S utilizado neste trabalho. ....	51
Figura 24: Imagem do equipamento ZetaPlus utilizado neste trabalho.....	51
Figura 25: Gráficos resultantes da análise feita pelo software NTA a uma amostra de NE. A imagem da esquerda, representa o gráfico que relaciona tamanho e a concentração das partículas presentes na amostra e a imagem da direita, representa o gráfico que relaciona o tamanho, a intensidade e a concentração das partículas. ....	56
Figura 26: Distribuição média do tamanho por intensidade das NE, (----) Amostras diluídas e (----) Amostras iniciais.....	63
Figura 27: Distribuição média do tamanho por percentagem de volume das NE. ...	63

Figura 28: Distribuição média do tamanho por intensidade das NC, (----) Amostras diluídas e (----) Amostras iniciais.....	66
Figura 29: Distribuição média do tamanho por percentagem de volume das NC. ...	66
Figura 30: Distribuição média do tamanho por intensidade das Lipossomas, (----) Amostras diluídas e (----) Amostras iniciais.....	68
Figura 31: Distribuição média do tamanho por percentagem de volume dos lipossomas. ....	68
Figura 32: Distribuição média do tamanho por intensidade dos NLC presentes na amostra diluída. ....	71
Figura 33: Distribuição média do tamanho por percentagem de volume dos NLC..	71



## Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações.....	8
Tabela 2: Algumas aplicações das nanopartículas poliméricas. ....	19
Tabela 3: Concentração inicial e diâmetro médio das 5 amostras de cada um dos 4 nanotransportadores em estudo. ....	57
Tabela 4: Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das amostras de Nanoesferas (NE) de PCL. ....	62
Tabela 5: Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das 5 amostras de Nanocápsulas (NC) de PCL. ....	65
Tabela 6: Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das 4 amostras Lipossomas.....	67
Tabela 7: Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das 5 amostras de Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (NLC).. ....	70
Tabela 8: Exemplos de NT descritos na literatura, respectivas formulações, método de preparação, diâmetro hidrodinâmico médio e Pdi. ....	74
Tabela 9: Potencial Zeta das 5 amostras de cada um dos nanotransportadores em estudo.....	76
Tabela 10: Formulações e potencial zeta de algumas nanopartículas poliméricas (NC e NE) preparadas através do método de nanoprecipitação presentes na literatura. ....	79
Tabela 11: Formulações, métodos de preparação e potencial zeta de alguns lipossomas presentes na literatura. ....	79
Tabela 12: Formulações, métodos de preparação e potencial zeta de alguns NCL presentes na literatura. ....	81
Tabela 13: Valores de pH dos 4 nanotransportadores em estudo, medidos durante 3 dias.....	82



## Lista de Abreviaturas

- A.O – Ácido oleico
- ATRA - Ácido trans retinóico
- BVC – Bupivacaine
- CCD - Dispositivo de Carga Acoplada (*Charge-Coupled Device*)
- CCM – Mistura de triacilgliceróis cáprico/caprílico
- DLS – Análise por Dispersão Dinâmica de Luz (*Dynamic Light Scattering*)
- DS - Desoxicolato de Sódio
- E.M – Extrusão Mecânica
- GMS - Monoestearato de Glicerol
- HFL – Hidratação do Filme Lipídico
- HLB - Balanço hidrófilo-lipófilo (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*)
- HPH – Homogeneização a Alta Pressão (*High Pressure Homogenization*)
- Lip - Lipossomas
- LUV – Vesículas Unilamelares Grandes (*Large Unilamellar vesicles*)
- MCT - Triacilglicerol de cadeia média
- MLV – Vesículas Multilamelares (*Multilamellar vesicles*)
- NC- Nanocápsulas
- NE- Nanoesferas
- NLC – Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*)
- NTA – Análise de Localização de Partículas (*Nanoparticles Tracking Analysis*)
- PC - Fosfatidilcolina
- PCL - Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)

Pdi – Índice de polidispersão

PLA - Ácido poli-lático

PLGA - Ácido poli-lático-co-glicólico

PVA - Poli (álcool vinílico)

S.A – Substância ativa

SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento (*Scanning electronic microscopy*)

SFO – Óleo de sementes de girassol

SLN – Nanopartículas Lipídicas Sólidas (*Solid Lipid Nanoparticles*)

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

SUV – Vesículas Unilamelares Pequenas (*Small Unilamellar vesicles*)

ULV – Vesículas Unilamelares (*Unilamellar vesicles*)

# Capítulo 1 – Introdução

## 1. Motivação

---

Esta dissertação descreve o trabalho efetuado durante o segundo ano do curso de Mestrado em Tecnologia Biomédica do Instituto Politécnico de Bragança. O trabalho realizado dividiu-se em duas fases: a primeira correspondeu à realização da parte prática/experimental que decorreu no Laboratório Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos – FarmaTec da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Brasil, tendo sido o estágio financiado pelo programa de Intercambio com uma duração de 5 meses; a segunda fase correspondeu ao período de elaboração do trabalho escrito e respetiva apresentação que decorreu no Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

A nanotecnologia é uma ciência que manipula a matéria à escala atômica e molecular, criando novos materiais e desenvolvendo novos produtos à escala nanométrica. Esta ciência é transversal a vários domínios científicos como biologia, química, engenharia, entre outros. Assim sendo, pode ser considerada como uma tecnologia de convergência, devido à inter-relação de todas as ciências nela envolvidas. No que respeita a área das ciências farmacêuticas, em particular o encapsulamento de fármacos, nas últimas décadas são vários os estudos realizados por diferentes grupos de investigação em todo o mundo com o objetivo de desenvolver sistemas que permitam direcionar e controlar a libertação de fármacos. Atualmente são desenvolvidos sistemas à escala nanométrica e micrométrica cujo objetivo consiste em possibilitar a libertação de princípios ativos de uma forma controlada, contribuindo para a melhoria da biodisponibilidade de alguns fármacos bem como para a redução da respetiva dose terapêutica e toxicidade. São já vários os trabalhos realizados que focam o encapsulamento de fármacos e a caracterização dos nanotransportadores obtidos.

Contudo são escassos os dados relativos a nanotransportadores sem substância ativa, os quais são de grande importância aquando da realização de estudos subsequentes, tais como ensaios *in vitro*.

De facto, até à presente data, a maioria dos trabalhos realizados no âmbito da avaliação da citotoxicidade de fármacos nanoencapsulados, foca sobretudo a avaliação da citotoxicidade do fármaco *versus* a citotoxicidade do nanotransportador com o fármaco, sendo escassos os estudos publicados que incidem na avaliação da citotoxicidade que o próprio nanotransportador sem substância ativa pode provocar nas células. Para a prossecução de tais estudos é então fundamental proceder à caracterização do nanotransportador sem substância ativa. Por outro lado, considerando que alguns parâmetros tais como o tamanho da partícula e respetiva carga podem influenciar o destino biológico das nanopartículas, interferindo por exemplo no seu *uptake* celular, é ainda importante proceder a estudos que permitam averiguar se a preparação de nanotransportadores em diferentes ensaios independentes, utilizando um mesmo método, permite obter, ou não, partículas semelhantes no que respeita às suas características físico-químicas. Sendo assim, importa desenvolver trabalhos de investigação que visam aprofundar esta temática já que são escassos os estudos científicos que a analisam.

Desta forma, objetivo desta dissertação consistiu na preparação de diferentes tipos de nanotransportadores sem substância ativa, nomeadamente lipossomas, nanocápsulas, nanoesferas e transportadores lipídicos nanoestruturados, e respetiva caracterização no que respeita à sua concentração na amostra (número de partículas/mL), o seu tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH. Cada tipo de nanotransportador foi preparado em diferentes dias, mediante a realização de ensaios independentes, tendo-se procedido de seguida à caracterização de cada uma das amostras obtidas.

## **2. Disposição do trabalho**

---

De forma a proporcionar uma melhor compreensão da disposição dos conteúdos que serão abordados ao longo da presente dissertação, segue-se a descrição dos vários capítulos desta.

No **primeiro capítulo**, apresenta-se a motivação que levou à realização da presente dissertação, os objetivos fundamentais da mesma e uma breve e sucinta descrição da disposição dos seus conteúdos.

No **segundo capítulo**, encontra-se a revisão de literatura onde se refere, entre outras informações, os diferentes tipos de nanotransportadores avaliados neste trabalho, diferentes métodos de preparação e os métodos de caracterização utilizados.

No **terceiro capítulo**, apresenta-se a secção de material e métodos onde são descritos os equipamentos e reagentes utilizados, bem como todo o protocolo experimental envolvido na preparação e caracterização dos nanotransportadores em estudo.

No **quarto capítulo**, por sua vez, são apresentados os resultados referentes à parte experimental do trabalho e a discussão dos mesmos.

No **quinto capítulo**, apresenta-se a conclusão do presente trabalho e uma abordagem de possíveis trabalhos futuros.

Por último, segue-se a bibliografia utilizada na escrita desta dissertação.



# Capítulo 2 - Revisão da Literatura

## 2. Nanotecnologia

---

No final da década de 50, o físico Richard Feynman numa palestra realizada no Instituto de Tecnologia da Califórnia (Caltech), intitulada “There’s Plenty of Room at the Bottom”, sugeriu a possibilidade de manipulação dos átomos de forma a construir novos materiais, afirmando “Os princípios da física não mencionam algo contra a possibilidade de se manipular as coisas átomo por átomo”, referindo também que a principal barreira para a manipulação à escala nanométrica seria a sua visualização (Feynman, 1992). Esta palestra é por muitos considerada como sendo o ponto inicial da nanotecnologia.

A nanotecnologia é uma ciência capaz de manipular a matéria à escala atômica e molecular, criando novos materiais e desenvolvendo novos produtos à escala nanométrica (Cao, 2004). Esta ciência aborda sobretudo a caracterização, manipulação, fabricação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas à escala referida. O prefixo “nano” relaciona-se diretamente com uma escala de medida nanométrica, onde um nanómetro representa um bilionésimo metro. Materiais e produtos com tamanhos desta ordem de grandeza geralmente exibem características funcionais únicas, não encontradas em matérias similares à escala macro (Cao, 2004; Sahoo et al., 2007; Chau et al., 2007).

A Nanotecnologia é uma área transversal a vários domínios científicos, uma vez que requer conhecimentos multidisciplinares, englobando conceitos a nível da biologia, química, engenharia, matemática e computação. Assim sendo, a nanotecnologia pode ser considerada como uma tecnologia de convergência, devido à dependência de todas as ciências nela envolvidas (Fortunato, 2005).

Um dos principais vetores na área da nanotecnologia é a Nanobiotecnologia, a qual combina a biologia com a engenharia à nanoescala de forma a manipular sistemas vivos ou construir materiais biologicamente inspirados a nível molecular (Fortunato, 2005).

A Nanobiotecnologia pode definir-se como sendo o desenvolvimento, o estudo e produção de nanomateriais (dispositivos orgânicos) utilizados para fins biológicos ou biomateriais em que pelo menos um componente possui tamanho nanométrico. Dentro da Nanobiotecnologia pode-se destacar áreas que incluem a nanomedicina (diagnóstico, monitorização e controlo de sistemas biológicos), nanofármacos (encapsulamento de fármacos), física-médica (diagnóstico) e nanocosmética (ingredientes ativos com fins dermocosméticos) (Silva, 2004; Marques, 2009).

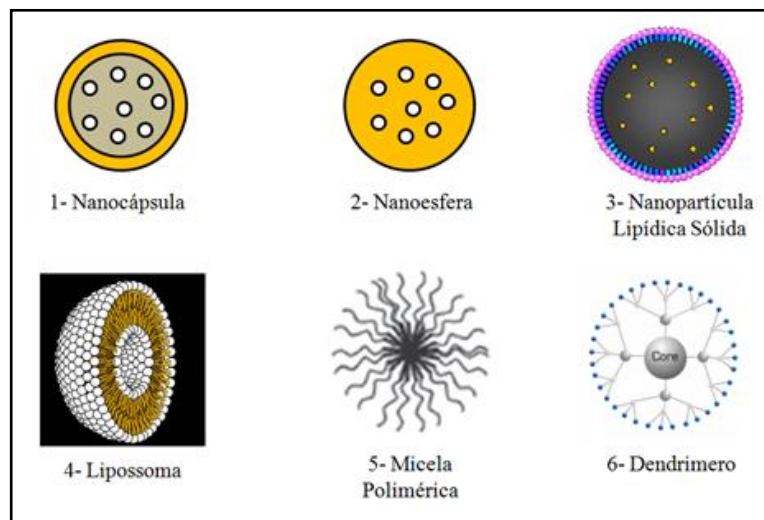
No que respeita a área das ciências farmacêuticas, e em particular o encapsulamento de fármacos, nas últimas décadas são vários os estudos realizados em todo o mundo com o objetivo de desenvolver sistemas que permitam direcionar e controlar a libertação de fármacos. O desenvolvimento da microencapsulação nos anos 60 foi um marco importante na área farmacêutica e cosmética uma vez que possibilitou realizar a libertação de princípios ativos de uma forma controlada, contribuindo para a melhoria da biodisponibilidade de alguns fármacos bem como para a redução da respetiva dose terapêutica e toxicidade. Posteriormente a microencapsulação serviu de modelo para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, em escala nanométrica, levando à criação de nanopartículas que possibilitavam a produção de sistemas de libertação controlada através da vectorização de fármacos (Lasic, 1998a; Pimentel et al., 2007; Marques et al., 2009). Atualmente, a nanotecnologia aplicada à área das ciências farmacêuticas é um setor que se encontra em grande desenvolvimento, debruçando-se sobretudo no desenho, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos à escala nanométrica (Pimentel et al., 2007; Marques et al., 2009). Assim, nos dias de hoje são desenvolvidos sistemas à escala nanométrica e micrométrica, tais como lipossomas, nanopartículas, microemulsões, entre outros.

## **2.1. Nanotransportadores**

---

Inicialmente, o desenvolvimento de sistemas com vista à libertação controlada incidiu sobretudo no desenvolvimento de microcápsulas com tamanhos compreendidos entre 5 a 2000  $\mu\text{m}$ . Hoje em dia, particular atenção é dada ao desenvolvimento de sistemas à escala nanométrica com o objetivo de transportar fármacos bem como direcioná-los para órgãos ou tecidos específicos (Donbrow, 1991; Park, 2007).

Os nanotransportadores são sistemas, desenvolvidos à escala nanométrica (abaixo de 1µm), podendo ser constituídos por diferentes materiais, incluindo materiais biodegradáveis tais como polímeros naturais ou sintéticos, lípidos (como por exemplo fosfolipídeos) e por vezes por compostos organometálicos, que servem de veículo para fármacos ou outras substâncias (Rawat, 2006). Atualmente, existem diferentes tipos de nanotransportadores tais como nanopartículas, complexos lipídicos, dendrímeros e micelas poliméricas, entre outros (Rawat, 2006; Park, 2007; Couvreur et al., 1995). Na Figura 1 apresentam-se vários tipos de nanotransportadores disponíveis atualmente.



**Figura 1:** Diferentes tipos de nanotransportadores.

De uma forma geral, os nanotransportadores são considerados como sendo excelentes veículos para o transporte e libertação de fármacos pelas inúmeras vantagens que oferecem. Entre estas destaca-se uma maior eficiência terapêutica (alcançada através da libertação controlada de fármaco), a possibilidade de direcionamento a alvos específicos, a diminuição da toxicidade, a superação da resistência oferecida pelas barreiras biológicas do corpo (devido ao reduzido tamanho que possuem) e a capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e lipofílicas aumentando consequentemente a biodisponibilidade de substâncias pouco solúveis (Rawat, 2006). Embora estas vantagens sejam significativas, existem desvantagens que devem ser levadas em consideração, entre elas, uma possível toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e o elevado custo de obtenção dos nanotransportadores comparados

com as formulações farmacêuticas convencionais (Verma & Garg, 2001; Dunne et al., 2003; Tao & Desai, 2003).

Na presente tese, encontram-se referidos apenas as nanopartículas produzidas à base de polímeros e alguns complexos lipídicos como, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados. A Tabela 1 apresenta algumas nanopartículas, aplicações vantagens e desvantagens apresentadas por estas.

**Tabela 1:** Diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações.

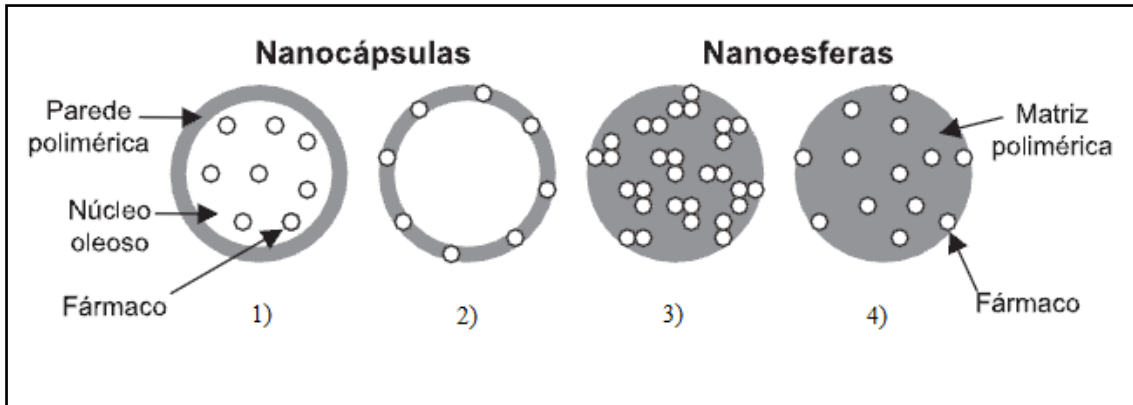
NT	Vantagens	Desvantagens	SA	Aplicação	Referência
NP	Capacidade de encapsular diferentes tipos de substâncias / Proteção da substância ativa	Citotoxicidade de alguns polímeros	Griseofulvina	Antifúngica	Zili et al., 2005
			Tretinoína	Tratamento Dérmico	Ourique et al., 2008
			$\beta$ -caroteno	Antioxidante	Ribeiro et al., 2008
			Docetaxel	Anti-tumoral	Torrecilla et al., 2013
Lip	Baixa citotoxicidade / Biocompatibilidade / Encapsulação de SA hidrofílicas e hidrofóbicas/ Não-imunogénicos	Estabilidade	2-Metoxiestradiol	Anti-tumoral	Du et al., 2010
			5-Fluoruracilo/ Metotrexano	Anti-tumoral	Conceição et al., 2009
			Diclofenac de sódio	Anti-inflamatório	Lima & Oliveira, 2002
NLC	Melhor capacidade de encapsulamento / Eficácia na incorporação da SA durante o armazenamento	Não referidas	Luteína	Dérmica	Mitri et al., 2011
			ATRA	Anti-tumoral	Chinsriwongkul et al., 2011
			Vimopocetina	Tratamento neurológico	Zhuang et al., 2010

NT- Nanotransportadores; NP- Nanopartículas Poliméricas (Nanocápsulas/Nanoesferas); Lip- Lipossomas; NLC- Carregadores lipídicos nanoestruturados. ATRA - Ácido trans retinóico.

### 2.1.1. Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais compostos por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos. Estes sistemas poliméricos são amplamente utilizados para a libertação de fármacos, uma vez que para além de permitirem realizar a libertação dos mesmos de uma forma controlada, também os podem direccionar para sítios específicos (Rawat, 2006).

O termo “nanopartícula” engloba dois tipos de estruturas diferentes, nomeadamente nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a sua composição e organização estrutural, como se pode visualizar na Figura 2. As nanocápsulas constituem sistemas reservatórios onde é possível identificar-se um núcleo líquido diferenciado (óleo ou água) rodeado por material sólido (invólucro polimérico). Neste caso a substância ativa pode encontrar-se dissolvida no núcleo e/ou incluída ou adsorvida na parede polimérica. As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas que, contrariamente às nanocápsulas não apresentam um núcleo diferenciado. As substâncias ativas neste tipo de nanopartículas encontram-se frequentemente distribuídas/encapsuladas de forma homogénea no interior da matriz, sendo libertadas por difusão, podendo ainda encontrar-se adsorvidas à superfície da nanoesfera (Couvreur et al., 1995, 2002; Schaffazick et al., 2003; Guterres, 2007, Steichen et al., 2013) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: 1) Nanocápsula com fármaco dissolvido no seu núcleo; 2) Nanocápsula com o fármaco adsorvido na membrana polimérica; 3) Nanoesfera com fármaco retido na sua matriz polimérica; 4) Nanoesfera com fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica (Adaptado de Schaffazick, et al., 2003).

A libertação da substância ativa por parte das nanopartículas poliméricas para o sistema biológico é condicionada pela dissolução e desintegração do polímero da nanopartícula e também por fenómenos de difusão dessa mesma substância na partícula polimérica. As propriedades do fármaco, bem como do polímero (perfil de biodegradação, distribuição da massa molecular e hidrofobicidade) têm uma forte influência na libertação da substância ativa e, por conseguinte, uma elevada importância na elaboração de sistemas nanoparticulados com fins de libertação controlada de fármaco (Rieux et al., 2006; Torchilin, 2006). Relativamente à seleção de um polímero, para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados de libertação controlada de fármacos, os principais critérios a ter em conta são, a biocompatibilidade, a sua velocidade de degradação e a facilidade de obtenção/produção do polímero (Rieux et al., 2006).

Considerando os diferentes polímeros existentes atualmente, aqueles que se apresentam como sendo biodegradáveis são de uma forma geral os preferidos para o desenvolvimento de nanopartículas devido ao facto de serem facilmente eliminados do organismo e possibilitarem um maior controlo e manutenção da libertação de fármacos, uma vez que, dependendo da formulação escolhida, podem decompor-se em poucas

horas ou podem resistir à degradação pelo organismo durante dias ou até mesmo semanas. Os polímeros biodegradáveis podem ser naturais, tais como a albumina, celulose, alginatos, colagénio e quitosano, ou sintéticos, como são exemplos o ácido polilático (PLA), a poli ( $\epsilon$ -caprolactona)(PCL) e o poli(metil-metacrilato) (PMMA) (Rieux, et al., 2006). Como referido anteriormente, a natureza do polímero influencia de forma significativa o perfil de libertação da substância ativa, sendo que os polímeros naturais, por natureza biodegradáveis, geralmente proporcionam à nanopartícula uma libertação relativamente rápida do fármaco, ao passo que os polímeros sintéticos possibilitam uma libertação mais prolongada do fármaco, podendo demorar entre dias a várias semanas (Schaffazick et al, 2003; Rieux et al., 2006; Torchilin, 2006).

### **Métodos de preparação de Nanopartículas Poliméricas**

São vários os métodos desenvolvidos para a preparação de nanopartículas poliméricas que se encontram descritos na literatura. De uma maneira geral estes podem ser classificados em duas grandes categorias, dependendo se as nanopartículas são preparadas diretamente através de reações de polimerização de monómeros ou através de polímeros, sintéticos ou naturais, pré-formados (Couvreur et al., 1995). Os métodos que envolvem reações de polimerização de monómeros, tais como polimerização interfacial e polimerização por meio de emulsões (aquosas ou orgânicas), frequentemente requerem a realização de processos adicionais de purificação do material coloidal obtido de forma a eliminar moléculas residuais do meio de polimerização, que podem ser eventualmente tóxicas, tais como monómeros, oligómeros ou surfactantes (Couvreur et al., 1995; Reis et al., 2006). A utilização de métodos baseados em macromoléculas ou polímeros pré-formados tem a vantagem de permitir obviar estes passos/problemas. De uma forma geral, neste tipo de metodologia as nanopartículas formam-se por precipitação dos polímeros sintéticos ou pela desnaturação e/ou solidificação de moléculas naturais (geralmente proteínas ou lípidos) (Couvreur et al., 1995).

São vários os métodos descritos de preparação de nanopartículas poliméricas com base em polímeros pré-formados, em particular polímeros sintéticos, podendo-se destacar o método de Emulsificação/evaporação do solvente, Nanoprecipitação,

Emulsificação/difusão do solvente e Salting-out (Reis et al., 2006, Mora-Huertas et al., 2010). A escolha do método de preparação de nanopartículas poliméricas realiza-se com base em vários fatores, tais como o tipo de sistema polimérico, área de aplicação (biomédica, ambiental, etc.), tamanho pretendido, entre outros (Rao & Geckeler, 2011).

Seguidamente, o método de nanoprecipitação pelo uso de polímeros pré-formados é referido de forma mais detalhada, uma vez que foi o método utilizado na parte experimental do presente trabalho para a preparação de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas utilizadas na parte experimental do mesmo.

### ***Método de Nanoprecipitação***

O método de nanoprecipitação com base na utilização de polímeros pré-formados, também denominado deslocamento do solvente ou deposição interfacial foi descrito inicialmente por Fessi e colaboradores em 1989 e permite obter a formação de nanoesferas ou de nanocápsulas (neste último caso se for utilizado um pequeno volume de óleo na fase orgânica) (Reis et al., 2006). Este método necessita de uma fase orgânica (fase solvente) e de uma fase aquosa (fase não-solvente) e baseia-se na emulsificação espontânea da fase interna (orgânica) contendo o polímero dissolvido, na fase externa (aquosa) (Fessi et al., 1989; Reis et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010; Rao & Geckeler, 2011).

A fase orgânica é composta por um solvente orgânico (etanol, acetona, hexano, cloreto de metileno entre outros) que seja miscível em água e facilmente removido por evaporação, por um polímero (sintético ou natural), tensioativo lipofílico, substância ativa (fármaco) e óleo (no caso das nanocápsulas, uma vez que as nanoesfera não têm óleo na sua constituição) miscível no solvente orgânico. A fase aquosa por sua vez é constituída por um não-solvente, ou um conjunto de não-solventes do polímero (geralmente água) e por um tensioativo (Reis et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010; Rao & Geckeler, 2011).

Este método envolve a precipitação do polímero pré-formado dissolvido na fase orgânica e a difusão do solvente orgânico na fase aquosa. A preparação de nanoesferas através deste método inicia-se pela dissolução do polímero, do tensioativo e da substância ativa no solvente orgânico, obtendo-se assim a fase orgânica (de realçar a

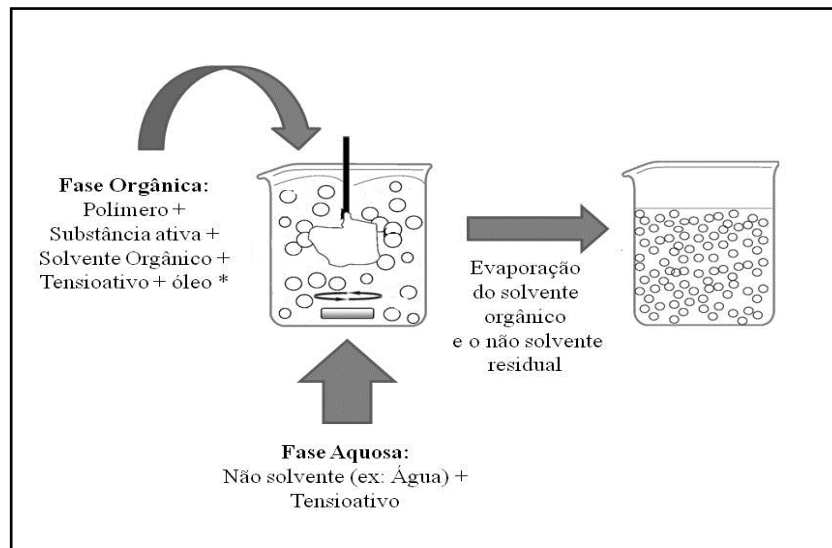
ausência de óleo, uma vez que se trata de nanoesferas). Esta fase é vertida lentamente na fase aquosa sob agitação, provocando uma difusão rápida do solvente e levando à formação instantânea de uma suspensão coloidal. Durante a evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida (Roto-evaporação), ocorre a formação da matriz polimérica (Sinha et al., 2004; Reis et al., 2006; Rao & Geckeler, 2011). Ao ser eliminado, o solvente provoca uma turbulência interfacial durante o seu deslocamento, devido à mútua miscibilidade entre este e a água. O tensioativo confere estabilidade ao sistema polímero-tensioativo durante o processo de difusão do solvente orgânico na água, provocando assim a agregação do polímero e consequente formação de nanoesferas (Fessi et al., 1989; Puisieux et al., 1994).

Para a produção de nanocápsulas, é introduzido óleo na fase orgânica. A formação das nanocápsulas baseia-se na mistura da fase orgânica com a fase aquosa sob agitação, levando à formação de uma emulsão espontânea da solução oleosa na forma de nanogotículas devido à difusão do solvente no não-solvente. Ao rotoevaporar o solvente orgânico sob pressão reduzida, o polímero (insolúvel no óleo e no não-solvente) deposita-se na interface óleo/água, formando assim o invólucro da nanocápsula (Fessi, et al., 1989; Puisieux, et al., 1994; Reis *et al*, 2006; Mora-Huertas, et al., 2010).

O óleo utilizado na fase orgânica é escolhido segundo alguns critérios, entre eles pode-se destacar, ausência de toxicidade, a elevada solubilidade da substância ativa nesse óleo, baixa solubilidade do óleo no polímero e vice-versa, ser miscível no solvente orgânico mas imiscível na mistura final, bem como a inexistência de risco de degradação do polímero (Limayem, et al., 2006).

Pelo apresentado, pode concluir-se que esta metodologia destina-se preferencialmente ao encapsulamento de substâncias lipofílicas devido à miscibilidade do solvente com a fase aquosa, o que diminui a eficiência do encapsulamento de fármacos hidrossolúveis.

A Figura 3 representa de forma esquemática o processo de preparação de nanopartículas poliméricas com base no método de deposição interfacial do polímero pré-formado.



**Figura 3:** Representação do método de nanoprecipitação. \* O óleo é usado apenas aquando da formação de nanocápsulas, na formação de nanoesferas este componente está ausente (Adaptado de Reis et al, 2006).

### Componentes utilizados em formulação de Nanopartículas Poliméricas

De uma forma geral, a preparação de nanopartículas poliméricas requer a utilização de um polímero, de um ou vários solventes, de um não-solvente, de um ou mais tensoativos e de óleo no caso particular de se tratar de nanocápsulas. Os componentes das formulações das nanopartículas poliméricas usados na parte experimental do presente trabalho para a preparação de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas incluíram o polímero, poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), Span 60 e Tween 80 usados como tensoativos nas formulações e Captex, sendo este último usado como óleo na formulação de nanocápsulas poliméricas. Seguidamente serão referidos de uma forma mais detalhada os principais componentes presentes nas formulações deste tipo de nanotransportadores.

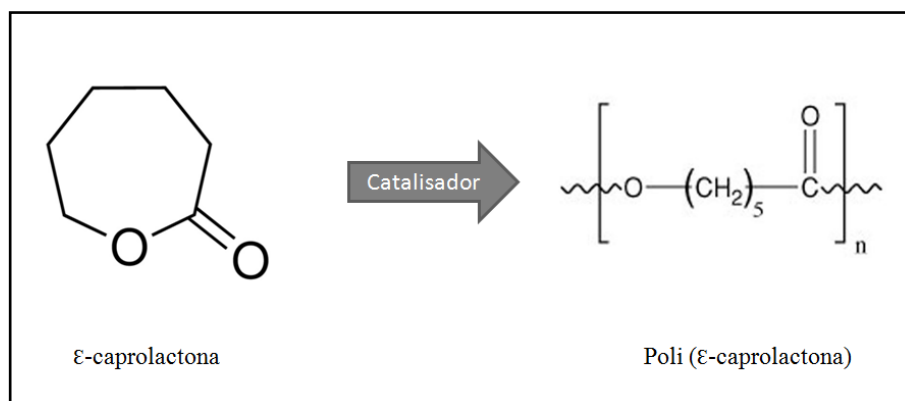
## ***Polímero***

As propriedades físico-químicas do polímero utilizado na formulação das nanopartículas têm uma grande importância e podem influenciar a elaboração de sistemas nanoparticulados. A natureza do polímero bem como as suas propriedades físico-químicas influenciam significativamente o tamanho das nanopartículas e o seu perfil de liberação (Rieux et al., 2006). Como referido, os critérios que mais influenciam a escolha dos polímeros para a obtenção de sistemas de nanopartículas para liberação controlada englobam a biodisponibilidade, biocompatibilidade, taxa de degradação e a facilidade de produção do polímero.

Os polímeros pré-formados biodegradáveis mais utilizados na produção de nanopartículas são os poliésteres de ácidos, como o ácido poli-lático (PLA) e o ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), entre outros (Domb et al., 2002; Rieux et al., 2006).

O polímero PCL, utilizado neste trabalho para a preparação de nanocápsulas e nanoesferas, é um polímero não-tóxico, hidrofóbico, semi-cristalino (apresenta uma temperatura de transição vítrea-  $T_g$  de  $-60^\circ\text{C}$ ) e a sua cristalinidade tende a aumentar com o aumento do seu peso molecular. Apresenta uma boa solubilidade em clorofórmio, benzeno, tolueno e di-clorometano entre outros, um ponto de fusão compreendido entre  $59^\circ\text{C}$  e  $64^\circ\text{C}$  permitindo a sua moldagem a temperaturas relativamente baixas e uma massa molecular média compreendida entre 3000 e 80000 (Sinha et al., 2004; Woodruff et al., 2010).

Este polímero pode ser preparado por polimerização por abertura do anel do monómero de  $\epsilon$ -caprolactona, usando uma variedade de catalisadores aniônicos, catiónicos ou de coordenação (Woodruff et al., 2010). A Figura 4 representa a síntese do polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) através da polimerização pela abertura do anel de  $\epsilon$ -caprolactona.



**Figura 4:** Representação esquemática da síntese do polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) através da polimerização pela abertura do anel de  $\epsilon$ -caprolactona (Adaptado de Sigma-Aldrich, 2013a)

A biodegradação do polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) ocorre através da hidrólise das suas ligações éster. Este tipo de reação permite, numa primeira fase da degradação do polímero, diminuir o peso molecular do mesmo. Numa segunda fase, quando o polímero apresenta baixo peso molecular e baixa cristalinidade sofre fagocitose ou solubilização nos fluidos corporais. A sua taxa de degradação pode ser aumentada adicionando aditivos que se comportam como catalisadores no processo de hidrólise dos grupos éster (Woodward et al., 1985).

O polímero PCL tem-se mostrado adequado e, como tal, muito utilizado para sistemas de libertação controlada de fármaco uma vez que apresenta uma elevada permeabilidade para diversas moléculas e não apresenta toxicidade. Ao apresentar uma biodegradação lenta comparativamente a outros polímeros torna-se ideal para a libertação controlada a longo prazo (Sinha et al., 2004).

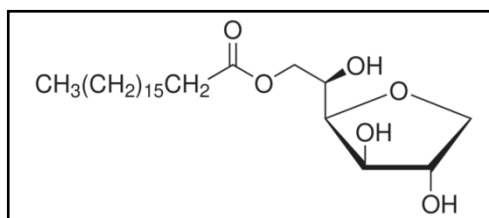
### ***Tensioativos***

Os tensioativos são moléculas anfifílicas que apresentam apetência para água e óleo por possuírem na sua estrutura duas regiões com polaridades opostas, uma hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar). Devido à sua estrutura ser composta por duas regiões distintas, os tensioativos promovem a estabilidade de uma emulsão reduzindo a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis (Lachman, 2001).

Em 1947 Griffin, desenvolveu o sistema Balanço Hidrófilo-Lipófilo (“Hydrophilic-Lipophilic Balance” - HLB) que permite classificar numericamente um composto segundo as suas características hidrófilas e lipofílicas. Esta escala permite assim correlacionar a estrutura química da molécula tensioativa com a sua atividade superficial (Lachman, 2001). O sistema HLB de Griffin, apresenta valores entre 0 e 20. Quando os valores de HLB estão compreendidos entre 3 e 8, o tensioativo apresenta predominantemente características lipofílicas, logo comporta-se como agente de emulsão água/óleo (A/O). Por outro lado, quando o tensioativo tem valores de HLB na gama de 8-18, apresenta predominantemente características hidrofílicas, comportando-se assim como agente de emulsão óleo/ água (O/A) (Griffin, 1949).

Neste trabalho, os tensioativos usados para a produção de nanopartículas poliméricas presentes nesta tese foram o Span 60<sup>®</sup> e o Tween 80<sup>®</sup>.

O Span 60 ou monoestearato de sorbitano, cuja estrutura química se apresenta na Figura 5, é um éster obtido pela reação de sorbitano (derivado do sorbitol) com o ácido esteárico. Este é um tensioativo não iónico que segundo Griffin apresenta um valor de HLB de 4,7 (Griffin, 1954).



**Figura 5:** Estrutura química do monoestearato de sorbitano ou Span 60 (Sigma-Aldrich, 2013b).

O tween 80 ou monooleato de polioxietileno sorbitano, é um éster de sorbitano etoxilado, resultante da reação de um éster de sorbitano com o óxido de eteno. Trata-se de um tensioativo não iónico, solúvel em água e com um valor de HLB de 15,0 (Griffin, 1954; Tadros, 2005).

## **Óleo**

De entre os vários óleos utilizados nas formulações de nanocápsulas, salienta-se os diferentes tipos de triacilgliceróis constituídos pelos ácidos cáprico/ caprílico como sendo os mais utilizados devido à sua ampla solubilidade para inúmeras substâncias ativas. Além destes, outros óleos tais como o benzoato de benzilo, álcool benzílico, ácido oleico, oleato de etilo, óleo de semente de girassol e óleo de soja, apesar de não serem usados com frequência, podem também gerar bons resultados quando incluídos nas formulações de nanocápsulas (Mora-Huertas et al., 2010).

O óleo usado na preparação de nanocápsulas poliméricas na presente tese, foi o Captex<sup>®</sup> 355. O captex<sup>®</sup> 355 ou triacilgliceróis cáprico/caprílico é um triacilglicerol de cadeia média e produzido através da esterificação da glicerina e de ácidos gordos (ácido cáprico e caprílico) derivados do óleo de coco (Abitec, 2013).

## **Aplicações das Nanopartículas Poliméricas**

Nos últimos anos as nanopartículas poliméricas têm sido intensivamente estudadas na área farmacêutica e médica como partículas transportadoras de substâncias ativas, uma vez que contêm propriedades de libertação sustentada e controlada, tamanho adequado (nanoescala) e apresentam grande biocompatibilidade com os tecidos e células (Reis et al., 2006).

A título de exemplo, a Tabela 2 apresenta, várias aplicações de nanopartículas poliméricas na área farmacêutica e médica.

**Tabela 2:** Algumas aplicações das nanopartículas poliméricas.

<b>Aplicações de Nanopartículas Poliméricas</b>	<b>Referência</b>
Tratamento da Malária	Date et al., 2007
Tratamento da Leishmaniose	Date et al., 2007
Tratamento da Tripanossomíase	Date et al., 2007
Tratamento da Tuberculose	Sosnik et al., 2010
Anti tumoral	Puri et al., 2007; Acharya & Sahoo, 2011
Antioxidante	Ribeiro et al., 2008
Adjuvantes Vacinas	Panyam & Labhasetwar, 2003
Diagnostico médico (Agente de contraste)	Acharya & Sahoo, 2011; Panyam et al., 2003
Terapias genéticas	Panyam & Labhasetwar, 2003

### *2.1.2. Lipossomas*

Descobertos nos anos 60 por Alec Bangham, os lipossomas têm vindo a ser investigados intensivamente, com vista à sua utilização como transportadores de substâncias terapêuticas para diversas aplicações clínicas (Gregoriadis, 1995; Torchilin, 2005).

Os lipossomas são estruturas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas fosfolípídicas em forma de vesículas que rodeiam uma fase aquosa (Figura 6) e apresentam um tamanho que varia entre nanómetros e micrómetros de diâmetro. Os lipossomas são compostos por fosfolípidos (de origem natural ou sintética) podendo conter esteróis (colesterol) e antioxidantes. A formação destas vesículas ocorre

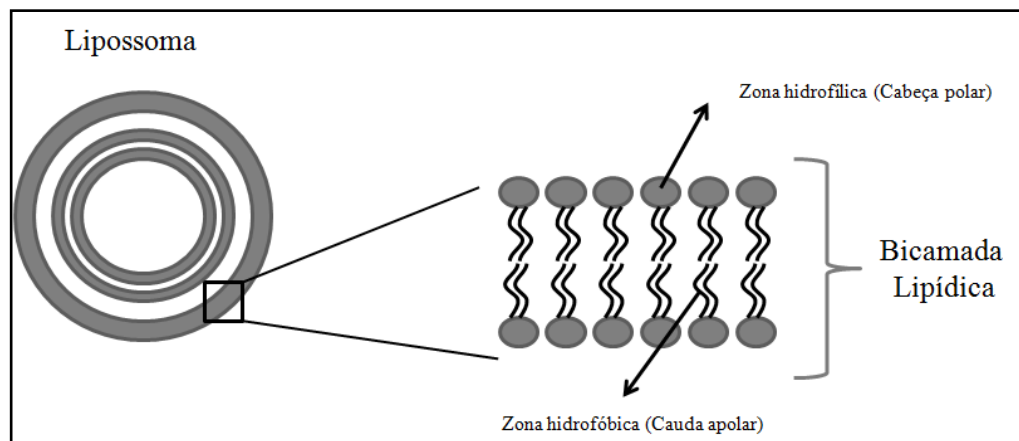
espontaneamente quando os fosfolípidos são colocados no meio aquoso, devido à interação hidrofílica da cabeça polar do fosfolípido com a água levando assim à formação de estruturas unilamelares e multilamelares (Gregoriadis, 1995; Vemuri et al., 1995; Sharma & Sharma, 1997; Edwards et al., 2006). Os fosfolípidos podem ser de natureza sintética ou natural, sendo que os naturais aumentam a biocompatibilidade dos lipossomas. Os mais usados nas formulações de lipossomas são os fosfolípidos que apresentam forma cilíndrica e que se organizam em bicamadas estáveis numa solução aquosa, tais como as fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline (Vemuri et al., 1995; Sharma & Sharma, 1997; Batista et al., 2007).

Os fosfolípidos são os componentes estruturais mais abundantes das membranas naturais podendo ser divididos em esfingolípidos e fosfoglicerídeos (New, 1990). Estes são compostos por uma molécula de glicerol na sua parte central e duas partes adicionais, sendo uma hidrofóbica e outra hidrofílica. A parte hidrofóbica é constituída por duas cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos, que ocupam a posição 1 e 2 da molécula de glicerol. Por sua vez a parte hidrofílica está ligada ao terceiro hidroxilo do glicerol e é constituída por uma molécula de ácido fosfórico ligada covalentemente a uma molécula hidrossolúvel, nomeadamente um álcool aminado sendo os mais comuns nos fosfolípidos de origem natural a colina, a serina, entre outros (New, 1990; Lasic, 1993).

Como foi atrás referido, um dos fosfolípidos mais usados para a preparação de lipossomas, são aqueles que contêm moléculas de colina, as fosfatidilcolinas também denominadas de lecitinas. A fosfatidilcolina (quimicamente denominada 1,2 diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) de origem natural pode ser extraída da gema de ovo ou da soja (Lasic, 1993; Vemuri et al., 1995).

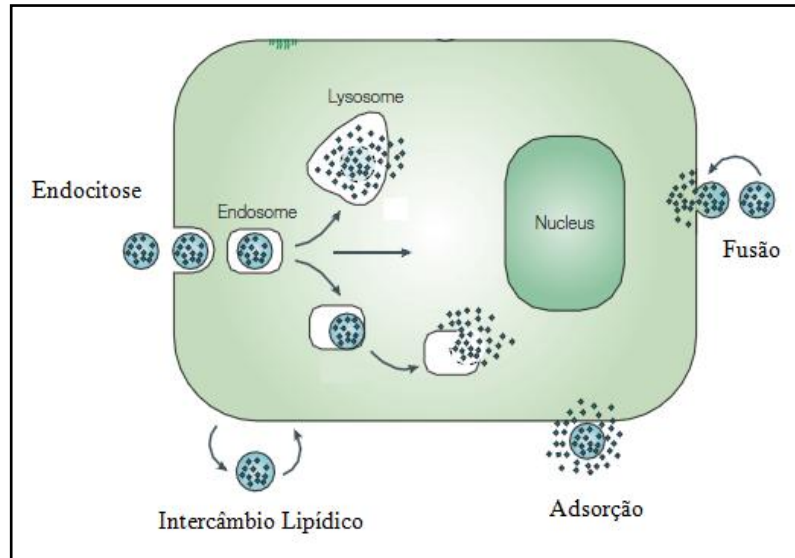
Para além de fosfolípidos os lipossomas podem também conter outros componentes, tais como esteróis. O esterol mais frequentemente usado na preparação de lipossomas, com vista a melhorar as características de bicamada dos mesmos, é o colesterol. Este proporciona uma melhor fluidez da bicamada, reduz a permeabilidade de moléculas através da bicamada e estabiliza-a na presença de fluidos biológicos (Vemuri, et al., 1995).

Devido às suas características estruturais (Figura 6), os lipossomas podem ter como objetivo a encapsulação quer de substâncias hidrofílicas como lipofílicas, sendo que as hidrofílicas se encontram incorporadas no compartimento aquoso e as lipofílicas ficam inseridas ou adsorvidas na bicamada lipídica (Gregoriadis, 1995; Sharma & Sharma, 1997).



**Figura 6:** Características estruturais dos lipossomas.

Devido à semelhança entre a estrutura dos lipossomas (bicamada lipídica) e a estrutura das membranas celulares, estes conseguem interagir profundamente com as células do organismo. As interações entre os lipossomas e as células do organismo podem ser divididas em quatro tipos principais, fusão de membranas (membrana do lipossoma com a membrana da célula), adsorção dos lipossomas à superfície das células, intercâmbio entre a membrana do lipossoma e a membrana da célula (troca molecular direta) e endocitose, como se pode verificar na Figura 7 (Vemuri et al., 1995; Torchilin, 2005).

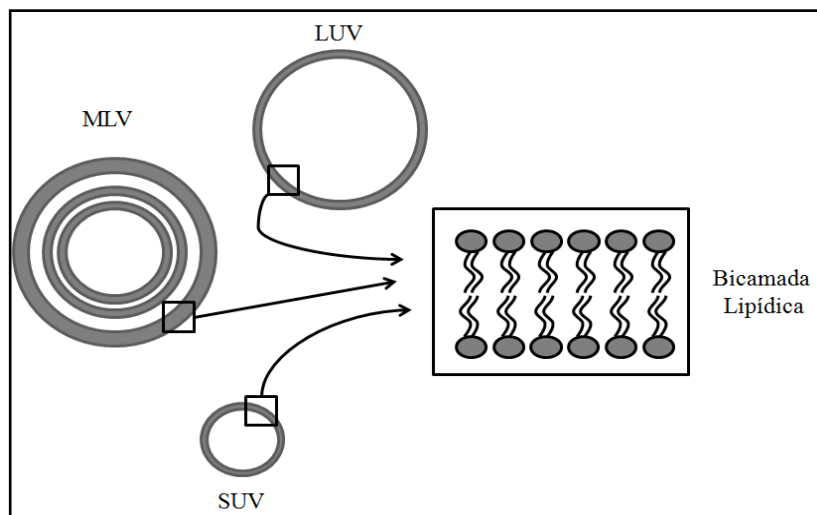


**Figura 7:** Representação dos vários tipos de interações entre os lipossomas e as células do organismo (Adaptado de Torchilin, 2005).

De uma forma genérica, pode afirmar-se que este tipo de nanotransportadores são considerados como sendo ótimos sistemas de libertação controlada de fármacos uma vez que apresentam baixa toxicidade, elevada biocompatibilidade, são biodegradáveis, são não-imunogénicos, protegem a substância ativa da diluição e degradação na corrente sanguínea, conseguem libertar a substância ativa em células ou mesmo em compartimentos celulares individuais e, como referido, são capazes de encapsular quer substâncias hidrofílicas quer lipofílicas (Aoki et al., 1997; Torchilin, 2005; Edwards et al., 2006).

Os lipossomas podem ser classificados de formas diversas, por exemplo no que diz respeito ao método de preparação ou pelo tamanho e número de bicamadas presentes na vesícula. Quando se utiliza esta última, os lipossomas podem ser considerados unilamelares (ULV), quando apresentam uma única bicamada lipídica, ou multilamelares (MLV) quando contêm mais de uma bicamada lipídica. Geralmente os lipossomas MLV apresentam um tamanho compreendido entre 500 a 5000 nm. Quanto aos lipossomas do tipo unilamelar, estes podem ser descritos como vesículas unilamelares grandes (LUV) cujo, tamanho varia entre 200 e 800 nm e vesículas unilamelares pequenas (SUV) com aproximadamente 100 nm de tamanho. A Figura 8 apresenta-se diferentes lipossomas segundo a classificação mais comum, nomeadamente

com base no número de bicamadas e tamanho. Ao serem descritos quanto ao método de preparação, os lipossomas podem ser classificados em vesículas obtidas por evaporação reversa (REV), por prensa Francesa (FPV), por injeção de éter (EIV), por hidratação do filme lipídico, entre outros (Vemuri et al., 1995; Sharma & Sharma, 1997; Lasic, 1998a). Posteriormente serão referidos alguns destes métodos de forma mais detalhada.



**Figura 8:** Classificação dos lipossomas quanto ao número de bicamadas e tamanho.

Por último, refira-se que quer o tamanho quer o número de bicamadas lipídicas são considerados como sendo fatores que exercem um grande influência na eficiência de encapsulação de substâncias ativas nos lipossomas. Por outro lado, o tamanho da vesícula é considerado como um parâmetro crítico na determinação do tempo de semi-vida dos lipossomas (Sharma & Sharma, 1997).

### **Métodos de preparação de Lipossomas**

Existem vários métodos de preparação de lipossomas que levam à formação de diferentes tipos de vesículas, as quais diferem no seu tamanho e nas suas características (Vemuri et al., 1995; Sharma & Sharma, 1997). De entre os vários métodos de preparação de lipossomas destacam-se os métodos que requerem a formação de um filme lipídico, como o método de hidratação do filme lipídico, sonicação, extrusão, homogeneização/microfluidização e prensa francesa. Além destes métodos existem

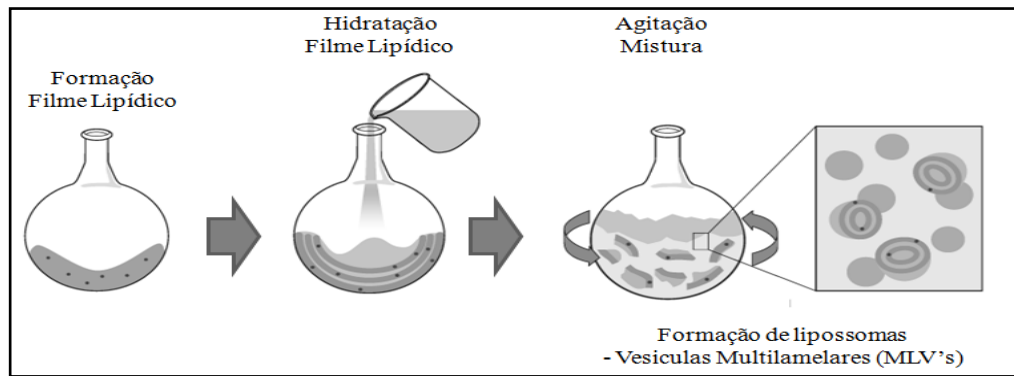
outros, tais como injeção de etanol, injeção de éter, evaporação em fase reversa, entre outros (Lasic, 1993; Vemuri et al., 1995; Sharma & Sharma, 1997; Ferreira, 2006).

Refira-se que a produção do mesmo tipo de lipossomas através de diferentes métodos de produção, pode-lhes conferir diferentes propriedades, tais como capacidade de encapsulação, estabilidade e permeabilidade da bicamada (Ferreira, 2006).

Seguidamente descreve-se o método de preparação de lipossomas por hidratação do filme lipídico seguido de um processo de extrusão, por ter sido este o método usado no presente trabalho.

### ***Hidratação do filme Lipídico (HFL)***

O método de hidratação do filme lipídico é um processo clássico de preparação de lipossomas, proposto na década de 60 por Alec Bangham. Este método inicia-se pela formação de um filme lipídico (camada lipídica fina e homogénea) através da dissolução do lípido num solvente orgânico ou mistura de solventes orgânicos (normalmente clorofórmio), seguido de uma evaporação do solvente através de rotoevaporação ou sob corrente de azoto. Após a formação do filme lipídico, segue-se a hidratação do mesmo com uma solução aquosa (água ou solução tampão) e subsequente agitação da mistura, promovendo assim a formação da dispersão de vesículas multilamelares (MLV's) heterógenas a nível de tamanho e de número de bicamadas (Lasic, 1993; Vemuri et al., 1995; Sharma & Sharma, 1997; Ferreira, 2006). A Figura 9 representa esquematicamente os principais passos do processo de hidratação do filme lipídico na produção de MVL's.

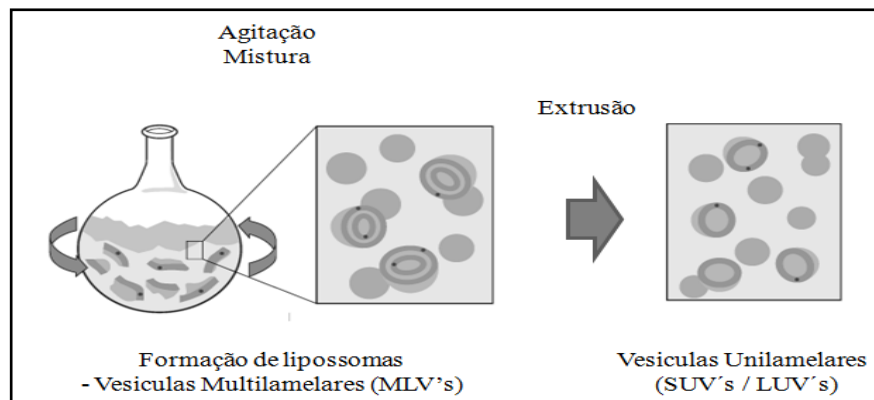


**Figura 9:** Representação esquemática da preparação de MLVs através do método de hidratação do filme lipídico (Adaptado de Lasic, 1997).

Após a produção de MLVs através do método de hidratação do filme lipídico, podem-se obter vesículas homogêneas e de tamanho bem definido, LUVs e SUVs, submetendo as MLVs a processos adicionais (Sharma & Sharma., 1997). Estes processos adicionais incluem métodos mecânicos, químicos ou eletrostáticos. Os mais frequentemente usados são os métodos mecânicos, onde se pode incluir a sonicação, extrusão através de membrana de policarbonato, microfluidização/homogeneização ou a prensa francesa, sendo que os mais difundidos são a sonicação e extrusão (Lasic, 1993).

### ***Processo mecânico de extrusão***

O processo mecânico de extrusão lipídica consiste na passagem forçada da suspensão lipídica (MLVs) através de filtros de policarbonato com um diâmetro de poro bem definido, sob pressão de uma corrente de azoto. Os filtros usados neste processo são membranas de policarbonato com um diâmetro de poro que pode variar entre nanômetros a micrômetros. De forma a diminuir o número de bicamadas lipídicas, tornando os lipossomas em vesículas unilamelares homogêneas (LUVs e SUVs), repete-se o processo de extrusão aproximadamente 10 vezes (10 extrusões). O diâmetro final apresentado pelos lipossomas resultantes deste processo depende diretamente do tamanho de poro da membrana de policarbonato usado (Lasic, 1993; Sharma & Sharma, 1997; Ferreira, 2006). A Figura 10 representa esquematicamente a produção de LUVs através do processo de extrusão.



**Figura 10:** Representação esquemática da preparação de LUVs através de extrusão (Adaptado de Lasic, 1997).

### Aplicações dos Lipossomas

Desde que foram descritos pela primeira vez em 1965 por Bangham, os lipossomas têm vindo a sofrer uma enorme e rápida evolução no sentido de produzir sistemas usados para uma ampla variedade de aplicações (Torchilin, 2005), em particular em áreas científicas como medicina e ciências farmacêuticas (Lasic, 1993).

Como referido, devido a características como biocompatibilidade, capacidade de encapsular fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis, os lipossomas são intensivamente usados como sistemas transportadores de fármacos. Assim sendo, a sua utilização tem sido descrita no tratamento de doenças cancerígenas, doenças infecciosas, inflamações, no desenvolvimento de vacinas, como meios auxiliares ao diagnóstico médico (agentes de contraste), e no desenvolvimento de terapias genéticas (entrega de ácidos nucleicos) (Lasic, 1993; Sharma & Sharma, 1997; Torchilin, 2005; Batista et al., 2007).

Além das várias aplicações terapêuticas referidas, os lipossomas também são usados em áreas como cosmética e nutrição (Lasic, 1998a; Lasic, 1998b).

#### 2.1.3. Transportadores Lipídicos Nanoestruturados

Na década de 90, vários grupos de investigação concentraram-se no desenvolvimento de nanopartículas alternativas às até então existentes tendo produzido

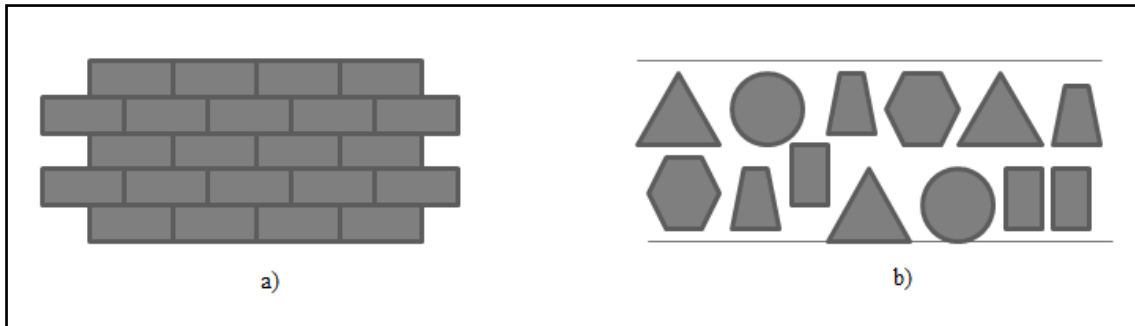
nanopartículas feitas de lípidos sólidos, as quais foram designadas nanopartículas lipídicas sólidas (Müller et al., 2002a; Wissing et al., 2004). As primeiras patentes destes nanotransportadores foram submetidas por Gasco em 1993 e por Müller e Lucks em 1996 (Gasco, 1993; Müller & Lucks, 1996).

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN – *Solid Lipid Nanoparticles*) são constituídas por lípidos sólidos à temperatura ambiente e corporal e estabilizadas por tensoativos. Estas nanopartículas lipídicas sólidas combinam as vantagens de outros nanotransportadores, tais como libertação controlada, excelente tolerabilidade por parte do organismo, estabilidade física e proteção das substâncias ativas encapsuladas (Wissing et al., 2004).

Apesar de oferecerem muitas vantagens, as SLN apresentam algumas desvantagens tais como uma baixa capacidade de encapsulamento de substâncias ativas e dispersão das mesmas durante o período de armazenamento. Estas desvantagens ocorrem principalmente quando se utiliza um único tipo de lípido sólido, o que pode proporcionar o aparecimento de estruturas cristalinas perfeitas. Considerando que neste tipo de nanotransportador a substância ativa fica armazenada entre as cadeias lipídicas bem como nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais provoca uma diminuição da eficiência de encapsulamento (Müller et al 2000; Wissing et al 2004).

No final da década de 90, surgiu uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC – *Nanostructured Lipid Carriers*), com o intuito de minimizar as limitações apresentadas pelas SLN (Müller et al., 2002a; Müller et al., 2002b).

Os transportadores lipídicos nanoestruturados são constituídos por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos (óleos), com cadeias carbonadas diferentes. A matriz resultante apresenta um ponto de fusão mais baixo comparado com o ponto de fusão do lípido sólido original (Müller et al., 2002b). A Figura 11 representa a diferença apresentada entre as matrizes das diferentes nanopartículas lipídicas, SLN e NLC.



**Figura 11:** Representação esquemática das diferenças entre a) estrutura da matriz cristalina perfeita das SLN, b) estrutura da matriz imperfeita das NLC.

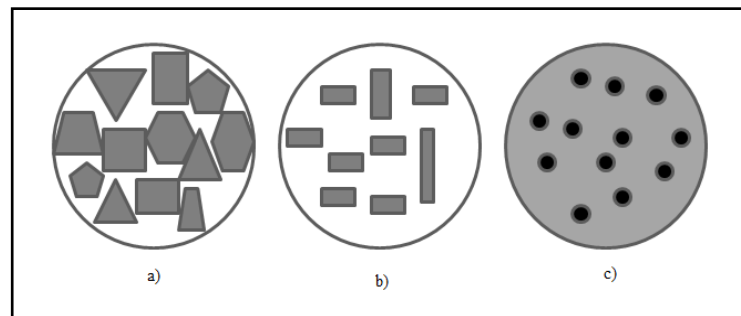
Dependendo do método de produção e da composição da mistura de lípidos, pode-se obter 3 tipos diferentes de NLC, tipo imperfeito, tipo amorfo e tipo múltiplo (Müller et al., 2002b; Wissing et al., 2004; Martins et al., 2007).

O primeiro tipo, denominado “NLC imperfeito” consiste numa mistura de lípidos diferentes (lípidos sólidos e lípidos líquidos à temperatura ambiente), ou seja glicerídeos compostos por ácidos gordos diferentes. Esta mistura proporciona um aumento da distância entre as cadeias dos ácidos gordos dos glicerídeos e conseqüentemente a formação de cristais imperfeitos. Neste modelo, a matriz das nanopartículas não apresenta uma estrutura ordenada, mas sim imperfeita (com “espaços” ou “lacunas”), o que promove maiores espaços para a acomodação das substâncias ativas encapsuladas e conseqüentemente maior eficiência de encapsulamento (Müller et al., 2002a; Müller et al., 2002b; Wissing et al., 2004).

O segundo tipo, “NLC amorfo”, por sua vez, produz-se quando determinados tipos de lípidos não recristalizam mais após o arrefecimento, levando à formação de estruturas amorfas e evitando assim a expulsão das substâncias ativas da matriz devido a processos de cristalização do lípido sólido. (Müller et al., 2002a; Müller et al., 2002b; Wissing et al., 2004).

Por fim o terceiro tipo, “NLC múltiplo”, é composto por uma maior quantidade de lípido líquido (óleo) do que lípido sólido, produzindo assim uma nanoestrutura diferente. Neste modelo, a solubilidade das moléculas de óleo no lípido sólido é ultrapassada, levando à separação de fases e à formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lípido sólido. As substâncias ativas como apresentam maior

solubilidade em óleos do que nos lípidos sólidos, são dissolvidas no óleo e ainda podem ser protegidas pelos lípidos sólidos (Müller et al., 2002a; Müller et al., 2002b; Wissing et al., 2004). A Figura 12 representa esquematicamente os 3 diferentes tipos de nanotransportadores lipídicos sólidos.



**Figura 12:** Representação esquemática dos 3 diferentes tipos de NLC, a) NLC imperfeita, b) NLC amorfa, c) NLC múltipla.

No presente trabalho, foram usados nanotransportadores lipídicos nanoestruturados (NLC) do tipo imperfeito.

### **Métodos de preparação de Nanotransportadores Lipídicos Sólidos**

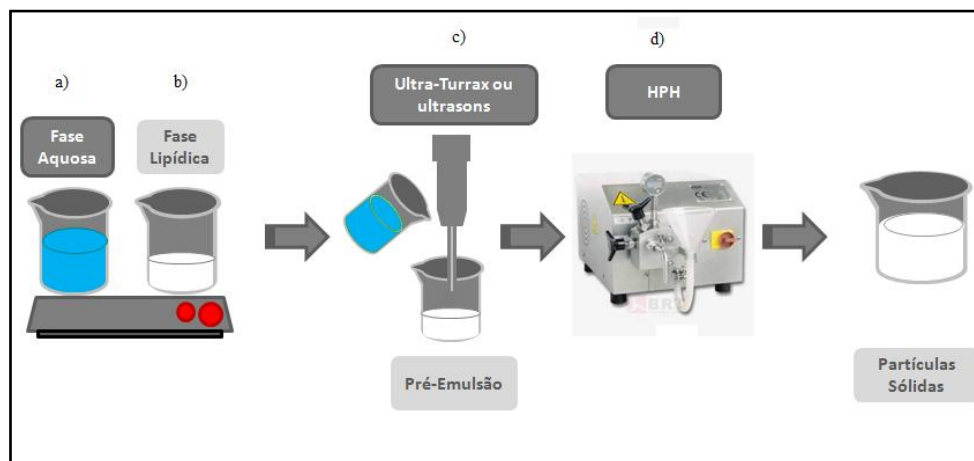
Existem vários métodos de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas, dos quais os principais são: a homogeneização por alta pressão, formação de microemulsões e emulsificação-evaporação do solvente (Müller et al., 2000; Mehnert & Mader, 2001; Wissing et al., 2004).

A homogeneização por alta pressão (HPH- *High pressure homogenization*) foi pela primeira vez descrita para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas por Müller e Lucks em 1996 (Müller & Lucks, 1996). Na homogeneização por alta pressão, uma dispersão de partículas é impulsionada, sob efeito de alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade muito estreita (à escala micrométrica) numa curta distância, permitindo assim que o líquido (dispersão de partículas) atinja altas velocidades (cerca de 1000 Km/h) permitindo assim a obtenção de partículas com dimensões e características desejadas (Mehnert & Mader, 2001).

A técnica de HPH pode ser efetuada a quente ou a frio (Mehnert & Mader, 2001).

### ***Homogeneização a alta pressão a Quente (HPH Quente)***

A homogeneização a alta pressão a quente (HPH Quente) é uma técnica realizada a temperaturas superiores ao ponto de fusão dos lípidos utilizados. A Figura 13 representa esquematicamente o processo de produção de nanopartículas lipídicas sólidas através do método HPH Quente.



**Figura 13:** Representação esquemática do método de homogeneização a alta pressão a quente.

Neste processo a substância ativa e o lípido fundido (Figura 13 b)) são dispersos numa solução aquosa quente de tensoativo à mesma temperatura (cerca de 5 a 10 °C acima da temperatura de fusão dos lípidos utilizados) (Figura 13 a)), sob o efeito de alta agitação (Ultra-turrax ou ultrasons) formando assim uma pré-emulsão (Figura 13 c)). Este processo leva à ocorrência da rotura de estruturas coloidais de grandes dimensões, originando estruturas de menores dimensões. Em seguida esta pré-emulsão é submetida a uma homogeneização a alta pressão com temperatura controlada (Figura 13 d)). O número de ciclos de homogeneização a que a pré-emulsão é submetida está diretamente relacionado com o tamanho médio e a distribuição de tamanho das partículas que se pretende. Em geral, são suficientes três a cinco ciclos de homogeneização com uma pressão variada entre 500 a 1500 bar (Müller et al., 2000; Mehnert & Mader, 2001; Wissing et al., 2004).

O aumento do número de ciclos de homogeneização e de pressão pode levar a um aumento de tamanho das partículas devido à sua aproximação gerada pela elevada energia cinética das mesmas. O produto preliminar à homogeneização a quente é uma dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas, a qual é arrefecida por forma a que ocorra a cristalização da fase lipídica e formação das nanopartículas sólidas à temperatura ambiente (Müller et al., 2000; Mehnert & Mader, 2001; Wissing et al., 2004).

Este método é usado amplamente no encapsulamento de substâncias ativas lipofílicas, no entanto não é apropriado para o encapsulamento de substâncias ativas hidrofílicas, uma vez que estas podem migrar para a fase aquosa durante a homogeneização, resultando numa diminuição de eficiência de encapsulação (Müller et al., 2002b).

### ***Homogeneização a alta pressão a Frio (HPH Frio)***

Neste método, inicialmente a substância ativa é dissolvida no lípido fundido com ou sem tensoativo (a adição do tensoativo aumenta a solubilidade da substância ativa hidrofílica no lípido fundido). Seguidamente, esta mistura é arrefecida em gelo seco ou azoto líquido, de modo a aumentar a fragilidade do lípido e facilitar a etapa de moagem. Após a moagem são obtidas micropartículas com um tamanho de aproximadamente 50-100 µm, que são dispersas numa solução de tensoativo fria, com agitação intensa, obtendo-se uma macrosuspensão. Por fim esta suspensão é submetida a homogeneização a alta pressão realizada à temperatura ambiente ou mais baixa, fazendo com que as macromoléculas sejam “quebradas” em nanopartículas. Esta técnica é recomendada para a encapsulação de substâncias ativas hidrofóbicas (Mehnert & Mader, 2001)

O método de preparação de transportadores lipídicos nanoestruturados usado na presente dissertação foi a homogeneização a alta pressão a quente.

## **Componentes da formulação dos NLC**

### *Lípidos*

No processo de produção de NLC é muito importante fazer uma boa seleção da mistura lipídica, para que as NLC tenham características químicas e físicas adequadas. De forma a poder-se considerar uma combinação de lípidos como adequada, certos critérios têm de ser obedecidos, entre os quais: as substâncias ativas têm que apresentar uma boa solubilidade nas matrizes dos lípidos utilizados, principalmente no lípido líquido (é fundamental, pois pode alterar a capacidade de encapsulamento da partícula), as moléculas dos lípidos líquidos e sólidos têm que apresentar tanto quanto possível incompatibilidade espacial em conjunto, os lípidos devem apresentar perfil toxicológico aceitável e não levar à produção de nenhum resíduo tóxico, devem ser biodegradáveis capazes de produzir partículas à escala nanométrica, entre outros (Müller et al., 2000; Müller et al., 2002a; Müller et al., 2002b; Tamjidi et al., 2013).

Por norma, os lípidos utilizados nas formulações de NLC são monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, ácidos gordos e ceras (Tamjidi et al., 2013).

Os lípidos líquidos mais usados nas formulações de NLC são os triacilgliceróis de cadeia longa e os ácidos gordos (Tamjidi, et al., 2013).

No presente trabalho, o lípido líquido utilizado na formulação de NLC foi o Ácido Oleico e o lípido sólido foi o Monoestearato de Glicerol. O ácido oleico (ácido (Z)-9-octadecenóico) está presente em diversos lípidos naturais comestíveis. É produzido através da hidrólise de vários lípidos de origem animal e vegetal, como por exemplo o azeite. O ácido oleico é muitas vezes aplicado como agente emulsionante na indústria agroalimentar e em formulações farmacêuticas, como auto-emulsionante em sistemas de libertação de fármacos, entre outras aplicações. Apresenta uma temperatura de fusão entre 13°C e 14 °C, apresenta uma viscosidade baixa e é praticamente insolúvel em água (Rowe et al., 2009).

Dos lípidos sólidos mais vulgarmente utilizamos nas formulações de NLC, pode-se destacar o monoestearato de glicerol, o ácido esteárico, o palmitoesterato de glicerol, entre outros (Tamjidi et al., 2013).

O monoestearato de glicerol é preparado através de uma reação entre glicerina (1,2,3-propanotriol) e ácidos gordos provenientes de triacilgliceróis de origem animal ou vegetal. Pode ser utilizado como tensioativo não iônico, agente solubilizante, agente estabilizador, agente de libertação controlada, entre outros, nas áreas da cosmética e farmacêutica. É considerado um material não tóxico (GRAS, *Generally Recognized as Safe*), com uma temperatura de fusão entre 55° e 60°C e um valor de HLB de 3,8 que indica que é pouco solúvel em água e muito solúvel em óleos (Rowe et al., 2009).

### ***Tensioativos***

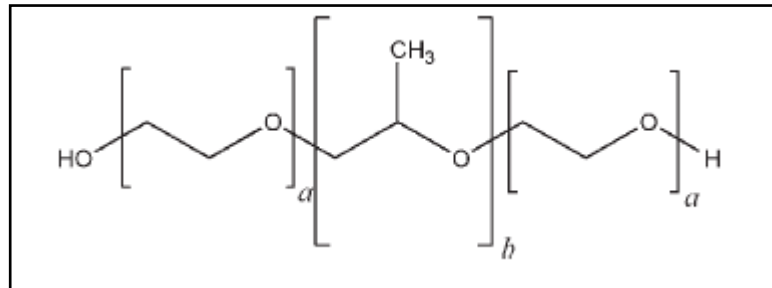
Os tensioativos usados na preparação de transportadores lipídicos nanoestruturados na presente dissertação foram o Span 60<sup>®</sup> e o Poloxamer 188<sup>®</sup>.

O polioxi-etileno-polioxi-propileno, denominado comercialmente de Poloxamer é um copolímero bloco que atua como um agente tensioativo em sistemas nanotransportadores (Cunha et al., 2003; Rowe et al., 2009).

Os “Poloxamers” são copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, compostos por uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica. Os segmentos de polioxi-etileno apresentam carácter hidrofílico e por sua vez os segmentos de polioxi-propileno apresentam um carácter hidrofóbico. As características dos “poloxamers” em termos de aparência, massa molecular, hidrofobicidade e solubilidade são determinados pelo comprimento de cadeia das suas duas partes. Todos os poloxamers têm uma composição química semelhante, diferindo apenas na quantidade relativa de óxidos de propileno e etileno adicionados durante a sua produção (Rowe, et al., 2009), sendo a sua fórmula química  $HO (C_2H_4O)_a (C_3H_6O)_b (C_2H_4O)_a H$ .

O Poloxamer 188, é um copolímero constituído por 27 unidades de polioxi-propileno e 80 de unidades de polioxi-etileno, sendo que na fórmula anterior “a”=80 e “b”=27 (Rowe et al., 2009).

A Figura 14 representa a fórmula estrutural do Poloxamer.



**Figura 14:** Representação esquemática da fórmula estrutural do copolímero Poloxamer (Rowe et al., 2009).

O Poloxamer 188 pode ser usado como agente tensioativo de emulsões oleosas e na preparação de sistemas sólidos de dispersões e como agente solubilizante. Apresenta um valor de balanço hidrófilo-lipófilo (HLB) de 29, é muito solúvel em água e etanol e apresenta um ponto de fusão compreendido entre 52° e 57°C (Rowe et al., 2009).

O tensioativo Span 60, já foi descrito anteriormente no ponto 2.1.1.

### **Aplicações dos Transportadores Lipídicos Nanoestruturados**

Os transportadores lipídicos nanoestruturados têm várias aplicações em diversas áreas, especialmente na área farmacêutica e na área da cosmética. Estes transportadores podem ser utilizados em várias aplicações para administração tópica, oral, parenteral, ocular e pulmonar (Müller et al., 2000; Shidhaye et al., 2008).

Na área da cosmética os transportadores lipídicos nanoestruturados podem ser utilizados como veículos tópicos para protetores solares, formulações anti-acne e anti-envelhecimento, perfumes, fragâncias, repelentes entre outros (Souto & Müller, 2008).

Na área farmacêutica, a utilização de transportadores lipídicos nanoestruturados encontra-se descrita para administração por várias vias. O encapsulamento de fármacos nos NLC proporciona um aumento da biodisponibilidade, prolonga os seus níveis plasmáticos e evita ou diminui a sua degradação, uma vez que alguns fármacos não encapsulados são rapidamente degradados ou expulsos pelo organismo (Gasco, 2007).

## 2.2. Métodos de Caracterização dos Nanotransportadores

---

A caracterização dos nanotransportadores (tamanho, carga de superfície, pH entre outras propriedades) é muito importante para o seu desenvolvimento e aplicação. Estas medidas de caracterização e quantificação de nanotransportadores são um enorme desafio, uma vez que são afetados pelo tamanho e natureza das partículas, pela concentração da amostra, pelas propriedades da solução e pelos princípios fundamentais dos métodos aplicados (Domingos et al., 2009).

De entre os vários métodos existentes de caracterização de nanotransportadores, serão abordados os métodos de dispersão dinâmica de luz (DLS), o qual tem por objetivo a medição do diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão (Pdi) das partículas, o método da análise de localização de nanopartículas (NTA) utilizado para calcular a concentração da população de partículas e o tamanho da partícula, o Potencial Zeta (utilizado para determinar a carga superficial das partículas) e por fim o pH (utilizado para verificar a existência de alteração de pH das soluções em estudo).

### 2.2.1. Dispersão dinâmica de luz (DLS)

---

A dispersão dinâmica de luz (DLS - “*Dynamic Light Scattering*”), é uma técnica bem estabelecida para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de partículas, na região sub-micrométrica. Este método é baseado na capacidade das partículas em suspensão se difundirem em todas as direções e estarem em movimento constante (movimento Browniano das partículas). Este movimento em suspensão faz com que a luz laser incidida nas partículas seja espalhada em diferentes intensidades (Malvern Instruments, 2013a; Malvern Instruments, 2013b).

O princípio deste método consiste em relacionar a velocidade de difusão das partículas provocada pelos seus movimentos Brownianos com o tamanho das mesmas. A intensidade de dispersão da luz detetada está diretamente relacionada com a velocidade de difusão das partículas e conseqüentemente com o tamanho destas, uma vez que quanto maior for a partícula, mais lento será o seu movimento Browniano

(menor velocidade de difusão); contrariamente, as partículas mais pequenas apresentam uma maior velocidade, devido ao facto de estas colidirem com as moléculas do solvente (Malvern Instruments, 2013a; Malvern Instruments, 2013b; Hasselov et al., 2008).

Vários fatores influenciam o cálculo do tamanho das partículas, entre eles inclui-se a temperatura, uma vez que interfere diretamente com a viscosidade do meio causando mais ou menos atrito (Malvern Instruments, 2013a; Malvern Instruments, 2013b).

O cálculo da velocidade de difusão de partículas tem como base a observação das manchas padrão produzidas pelas partículas iluminadas com o laser. A intensidade de dispersão de luz a um ângulo específico tende a variar com o tempo (esta variação é resultado da soma de numerosas ondulações difundidas individualmente através das partículas), sendo que essas variações são detetadas por um fotodíodo e são analisadas por um autocorrelacionador digital que gera uma função correlação que é proporcional ao coeficiente de difusão de partículas ( $D$ ). A partir do coeficiente de difusão de partículas o tamanho da partícula é calculado através da equação de Stokes-Einstein, onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann (equação 1) (Malvern Instruments, 2013a; Malvern Instruments, 2013b; Hasselov et al., 2008).

$$d = \frac{TK_B}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

O diâmetro que é calculado pelo método de dispersão dinâmica de luz é o valor referente ao modo como a partícula se difunde no meio, logo a denominação de diâmetro hidrodinâmico médio ( $d$ ). Ao calcular o diâmetro hidrodinâmico médio considera-se que as partículas são esferas perfeitas (Malvern Instruments, 2013a; Malvern Instruments, 2013b).

O índice de polidispersão (Pdi) é um parâmetro calculado a partir de uma análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz. Nesta análise um único tamanho de partícula é assumido e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação. Os valores de Pdi são utilizados para descrever a largura da distribuição de tamanho das partículas (Malvern Instruments, 2013a; Malvern Instruments, 2013b).

### 2.2.2. Análise de localização de partículas (NTA)

A análise de localização de partículas (NTA – “*Nanoparticle Tracking Analysis*”) é um método usado para a análise e visualização direta e em tempo real de nanotransportadores em meio líquido baseado no movimento Browniano destas e nas suas propriedades de dispersão de luz. Este método permite analisar partículas com uma gama de tamanho entre os 10 nm e os 2000 nm. O movimento Browniano das partículas é analisado em tempo real por uma câmara digital científica, em que cada partícula é simultaneamente mas separadamente visualizada e monitorizada (rastreada) por um software de análise e monitorização de imagem (Carr & Wright, 2012; NanoSight, 2013a).

A visualização das partículas da amostra é possível devido à luz dispersa por esta quando iluminada por um laser. A intensidade de luz dispersa pelos nanotransportadores é captada por uma câmara de vídeo e o movimento das partículas é monitorizado frame por frame. Neste método a taxa de movimento das partículas está relacionada com o raio hidrodinâmico equivalente a uma esfera, calculado através da equação de Stokes-Einstein (NanoSight, 2013a).

Este método permite calcular o tamanho da partícula, a concentração da população de partículas e o potencial zeta. O cálculo do tamanho das partículas é realizado partícula a partícula (Carr & Wright, 2012; NanoSight, 2013a).

A distância média percorrida por cada partícula (no eixo x e y) é calculada automaticamente. A partir deste valor, é possível calcular o coeficiente de difusão de partículas ( $Dt$ ), identificar a viscosidade do solvente ( $\eta$ ) e o diâmetro hidrodinâmico ( $d$ ) e conhecer a temperatura da amostra ( $T$ ). Uma vez que o movimento browniano das partículas é feito em 3 dimensões, o tamanho das partículas é calculado através da análise em 2 dimensões com o uso de uma variação da equação de Stokes-Einstein, equação 2, onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann (Carr & Wright, 2012; NanoSight, 2013b).

$$\frac{\overline{(x,y)^2}}{4} = Dt = \frac{TK_B}{3\pi\eta d} \quad (2)$$

Este software permite visualizar as nanopartículas em tempo real, analisar partícula-a-partícula, contar e medir o tamanho das partículas e fornece histogramas das distribuições de tamanho das partículas analisadas (nomeadamente um ficheiro com os dados retirados da análise e o vídeo dessa mesma análise) (NanoSight, 2013a). A Figura 15 mostra o equipamento e uma imagem exemplo do modo de visualização de nanopartículas em tempo real.



**Figura 15:** Equipamento Nanosight NS500 (esquerda), imagem retirada do software *NTA Software Suite* referente à visualização da população de nanopartículas da amostrar em análise (direita) (Adaptado de <http://www.nanosight.com/products/ns500>).

### 2.2.3. Potencial Zeta

---

A maioria das partículas dispersas em meio aquoso, tende a adquirir uma carga elétrica superficial, principalmente devido a mudanças na interface com o meio dispersante, quer pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iónicas presentes no meio aquoso de dispersão (Malvern Instruments, 2013c; Brookhaven Instruments, 2013).

Esta carga superficial modifica a distribuição de iões envolventes, resultando assim num aumento da concentração de iões à volta da partícula, conferindo-lhe assim uma camada elétrica dupla. Esta camada elétrica dupla é constituída por uma parte interna onde se encontram iões fortemente ligados à superfície da partícula e por uma parte externa variável, onde fatores como a temperatura e forças eletrostáticas determinam a disposição dos iões (Figura 17). Nesta parte externa da camada elétrica dupla, o

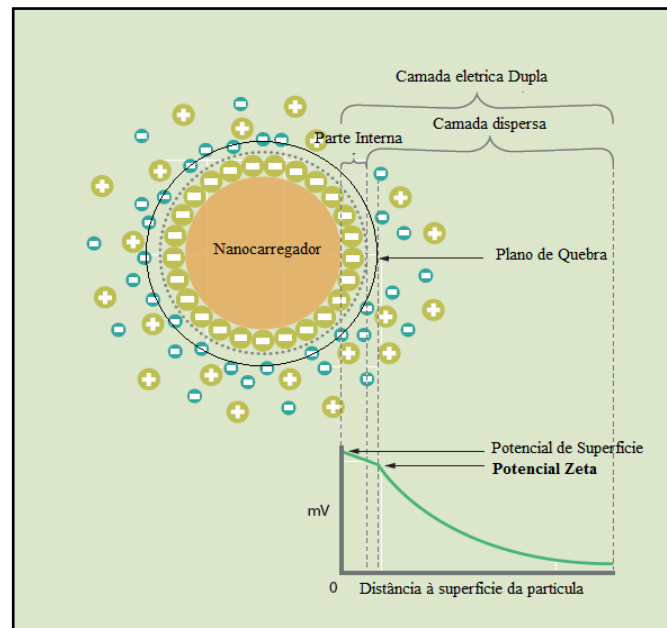
potencial tende em decrescer com o afastamento da partícula até atingir o valor zero (Brookhaven Instruments, 2013).

A partícula e a sua parte interna da camada elétrica dupla movem-se como um só, fazendo com que a parte externa se arraste e provoque o “rompimento” entre as partes das duas partes, interna e externa. A região onde ocorre esta separação de partes denomina-se plano de quebra (Brookhaven Instruments, 2013).

Sendo assim o potencial Zeta pode-se definir como a diferença de potencial elétrico entre o plano de quebra e um ponto no fluido da suspensão, como demonstra a Figura 16 (Malvern Instruments, 2013c; Brookhaven Instruments, 2013).

O potencial Zeta é medido através da aplicação de um campo elétrico na dispersão de partículas. Por aplicação deste, as partículas vão migrar em direção ao eletrodo com carga oposta à sua carga, com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta. Essa velocidade é medida através da dispersão de luz e do método de velocimetria a laser do efeito de Doppler, a partir da qual se determina o potencial zeta. Em suma o potencial zeta é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas (Malvern Instruments, 2013c; Brookhaven Instruments, 2013).

O potencial Zeta é um indicador importante e útil, usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais e emulsões, entre outros. O potencial Zeta ao tomar valores elevados, quer negativos ou positivos, significa que estamos presentes a uma suspensão estável, uma vez que a repulsão entre partículas evita a ocorrência de agregação (Brookhaven Instruments, 2013).



**Figura 16:** Representação esquemática do Potencial Zeta (adaptado de Malvern Instruments, 2013d)

#### 2.2.4. pH

O pH é um parâmetro que nos revela informações importantes sobre a estabilidade dos nanotransportadores e pode ser obtido através da sua monitorização ao longo do tempo (Schaffazick et al., 2003).

Alterações de pH podem ser indicadoras de alterações na estrutura interna dos nanotransportadores. A alteração de pH pode indicar a degradação dos polímeros nas nanopartículas poliméricas, pode favorecer a hidrólise dos lípidos dos lipossomas, entre outras (Guterres et al., 1995; Schaffazick et al., 2003).

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Neste capítulo, inicialmente apresenta-se os reagentes usados para a produção dos 4 nanotransportadores em estudo, bem como os equipamentos envolvidos na sua produção e caracterização. Numa segunda parte serão apresentadas as metodologias utilizadas na preparação e caracterização dos 4 nanotransportadores.

### 3.1. Materiais (Reagentes):

---

- Policaprolactona Mn 80000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA);
- Captex (Abitec, Columbus OH, EUA);
- Monoestearato de Sorbitano - Span 60 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA);
- Polissorbato 80 - Tween 80 (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetona (Quemis, Joinville, Santa Catarina, Brasil);
- Água ultra-purificada Milli-Q;
- Ácido Oleico (Synth, São Paulo, Brasil);
- Monoesterato de Glicerol (Croda, Snaith, Reino Unido);
- Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Clorofórmio (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA);
- Fosfatidilcolina de soja (Lipoid, Ludwigshafen, Alemanha).

### **3.2. Equipamentos:**

---

- Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, Reino Unido);
- NS500 (NanoSight, Reino Unido);
- ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, NY, EUA);
- Rotaevaporador RV 10 control (IKA, Staufen, Alemanha);
- Panda 2K – NS1001L (GEA Niro Soavi, Parma, Itália);
- T-25 digital ULTRA-TURRAX (IKA, Staufen, Alemanha);
- Lipex extruder (Northern Lipids, Burnaby BC, Canadá);
- Agitador magnético com plataforma de aquecimento C-MAG HS 7 IKAMAG(IKA, Staufen, Alemanha);
- Balança Analítica Adventurer AR2140 (OHAUS, Nova Jersey, EUA);
- Ultra-som USC-4800 (UNIQUE, São Paulo, Brasil) ;
- Estufa a vácuo 440/2D (Nova Ética, São Paulo, Brasil);
- pH-metro digital Orion 350 PerpHect (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA);

### **3.3. Metodologia:**

---

#### *3.3.1. Métodos de obtenção de Nanotransportadores sem Substância Ativa:*

---

Para a preparação de nanotransportadores sem substância ativa encapsulada (nanotransportadores brancos ou vazios), utilizaram-se diferentes metodologias conforme o nanotransportador pretendido, nomeadamente:

- Nanoprecipitação para a obtenção de Nanocápsulas e Nanoesferas de polí-caprolactona (PCL);

- Homogeneização a alta pressão a quente para a obtenção de Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (NLC);
- Hidratação do filme lipídico seguido de extrusão para a obtenção de Lipossomas 80Mm.

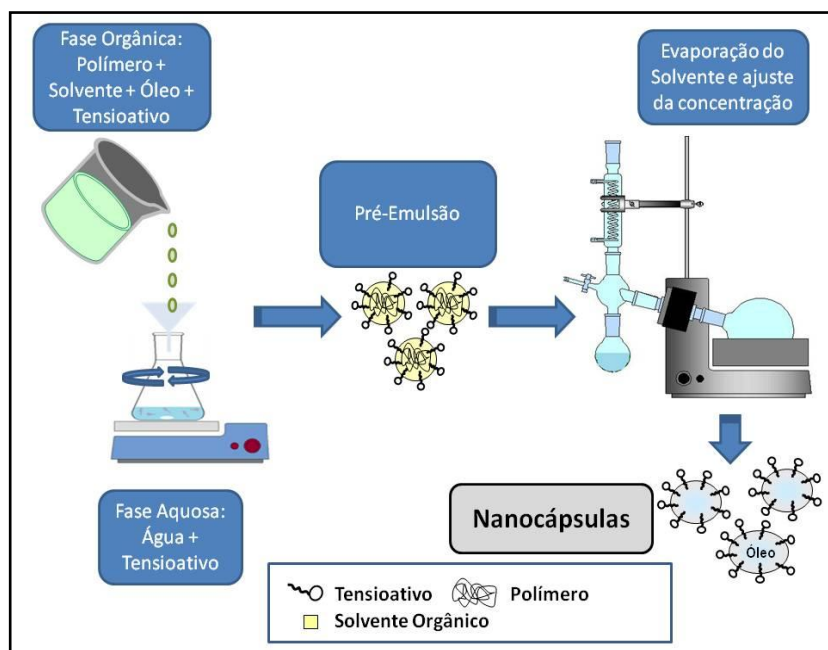
### **Preparação de Nanocápsulas de Policaprolactona**

Como referido, a preparação de nanocápsulas de PCL foi feita através do método de Nanoprecipitação. Este método tem como base a formação de uma pré-emulsão obtida através da junção de uma fase orgânica (contendo o polímero, solvente orgânico e tensioativo) com uma fase aquosa (água e tensioativo) e posterior eliminação do solvente orgânico por agitação, aquecimento ou pressão reduzida.

Inicialmente preparou-se a fase orgânica, a qual era composta por uma mistura de 100 mg de polímero (Poli( $\xi$ -caprolactona)), 160 mg de óleo (Captex), 38mg de tensioativo (Span 60) e 27 mL de solvente orgânico (Acetona). Esta mistura foi mantida no ultra-sons (Unique, Brasil) a uma temperatura de 40°C de forma a proporcionar a dissolução do polímero. A escolha do solvente orgânico teve por base a sua capacidade de dissolução do polímero e a sua miscibilidade em água.

A fase orgânica foi posteriormente vertida lentamente na fase aquosa contendo 53 mL de água ultrapurificada e 77 mg de tensioativo (Tween 80) mantendo-se sob agitação durante 30 minutos a uma temperatura de 40°C, dando assim origem a uma pré-emulsão. Esta pré-emulsão é originada por uma emulsão espontânea em que há formação de vesículas contendo tensioativo, polímero, óleo e solvente orgânico.

Seguidamente a pré-emulsão é submetida a pressão reduzida em Rotaevaporador (IKA, Alemanha), tendo por objetivo a eliminação do solvente orgânico e conseqüente formação de nanocápsulas com núcleo oleoso. A pré-emulsão foi colocada no Rotaevaporador (IKA, Alemanha), com uma temperatura de 40°C, uma rotação de 45 rpm, até ficar reduzida a 10mL de solução. A Figura 17 representa de forma esquemática o método descrito de produção das nanocápsulas.



**Figura 17:** Representação esquemática do método utilizado para a preparação de Nanocápsulas.

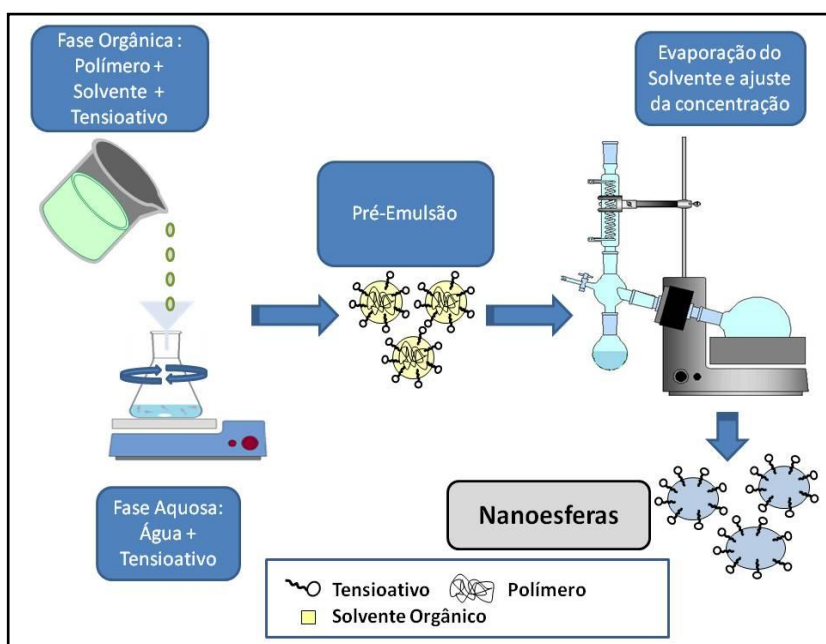
### Preparação de Nanoesferas de Policaprolactona

A preparação de nanoesferas de poli-caprolactona realizou-se através do método de nanoprecipitação, o mesmo usado na produção das nanocápsulas de poli-caprolactona.

A produção de nanoesferas e de nanocápsulas realiza-se de forma similar, diferindo exclusivamente na existência de óleo na fase orgânica. Assim sendo, para a produção de nanoesferas, utilizou-se uma fase orgânica composta por polímero (100mg, Poli( $\xi$ -caprolactona)), tensioativo (38 mg, Span 60) e solvente orgânico (27mL, acetona) e uma fase aquosa composta por água (53mL) e tensioativo (77mg, Tween 80), isto é, em ambos os casos usou-se quantidades idênticas às descritas para a preparação de nanocápsulas. O procedimento foi igualmente idêntico consistindo em verter lentamente a fase orgânica sobre a aquosa, mantendo-se sob agitação durante 30 minutos, a 40 °C, para obtenção da pré-emulsão, a qual foi seguidamente colocada no Rotaevaporador (IKA, Alemanha), sob pressão reduzida a 45 rpm e 40 °C, até ficar reduzida a um volume de 10mL.

A ausência ou a presença de óleo provoca uma diferença significativa nas características da nanopartículas: o uso de óleo neste método provoca a formação de nanopartículas com núcleo diferenciado (óleo) revestido por uma cápsula polimérica (NC), por outro lado a ausência deste provoca a formação de nanopartículas do tipo matriz polimérica (NE).

A Figura 18 representa de forma esquemática o processo de preparação de nanoesferas com base no método nanoprecipitação do polímero pré-formado.



**Figura 18:** Representação esquemática do método de preparação de Nanoesferas.

## **Preparação de Transportadores Lipídicos Nanoestruturados**

Para a preparação de Transportadores lipídicos nanoestruturados recorreu-se à técnica de homogeneização a alta pressão a quente.

A fase lipídica utilizada para a preparação de NLC foi composta por 14g de lípido sólido (Monoesterado de glicerol), 6g de lípido líquido (Ácido oleico) e 3g de tensioativo (Span 60), tendo sido aquecida até 80 °C (temperatura superior ao ponto de fusão do lípido sólido), numa placa de agitação com aquecimento.

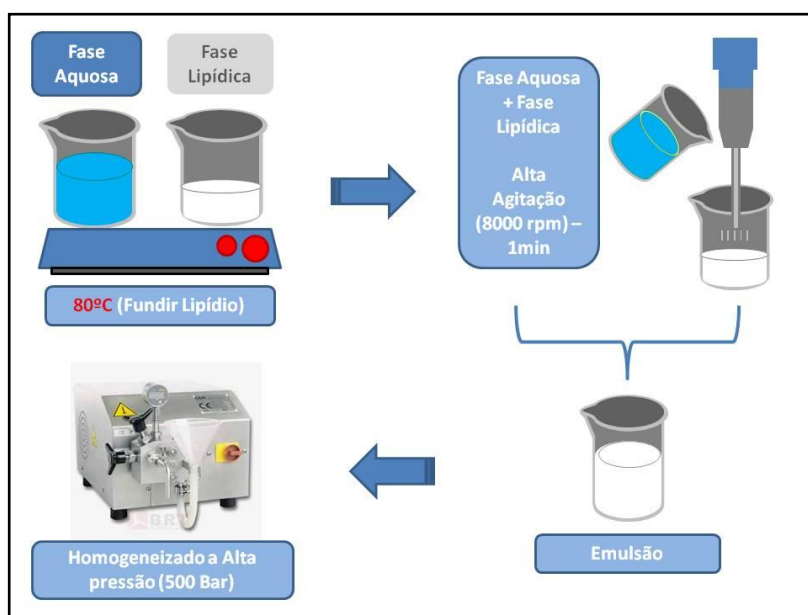
A fase aquosa, composta por 200 mL de água ultrapurificada e 5g de tensioativo (Poloxamer 188), foi mantida em banho-maria a uma temperatura de 60°C, de forma a

proporcionar a dissolução do tensoativo na água. Seguidamente, esta fase foi colocada numa placa de agitação com aquecimento, de forma a tingir a mesma temperatura da fase lipídica, 80 °C.

Para obtenção da emulsão, verteu-se a fase aquosa sobre a fase lipídica, ambas à mesma temperatura, sob elevada agitação, utilizando um Ultra-Turrax (IKA, Alemanha) durante 1 min a 8000 rpm.

A emulsão obtida foi colocada no homogeneizador, Panda (GEA Niro Soavi, Itália), a alta pressão (500 Bar) durante 6 ciclos. Ao ser submetida à homogeneização a alta pressão, a pré-emulsão contendo micropartículas, sofre uma alta tensão de cisalhamento, resultando assim na rutura das micropartículas até uma faixa nanométrica.

A Figura 19 representa esquematicamente o processo de preparação de NLC através do método de homogeneização a alta pressão a quente.



**Figura 19:** Representação esquemática da preparação de NLC através do método de homogeneização a alta pressão a quente.

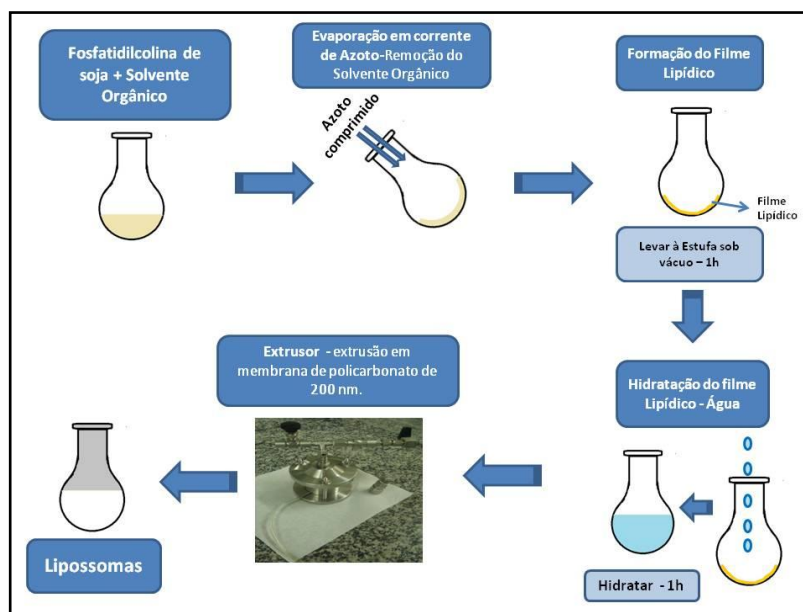
Após homogeneização, a solução resultante foi guardada à temperatura ambiente, de forma a proporcionar a mudança do estado físico do lípido, isto é, permitir que o lípido fundido volte ao seu estado sólido, obtendo-se assim os transportadores lipídicos nanoestruturados.

### **Preparação de Lipossomas 80 mM**

Como referido, os lipossomas foram obtidos através do método de hidratação do filme lipídico (HFL) seguido de extrusão.

Na preparação de lipossomas, utilizou-se uma fase orgânica constituída por fosfatidilcolina na concentração de 80 mM (60mg/ml), 300 mg, dissolvida em 2 mL de solvente orgânico (clorofórmio) que foi colocada num balão de fundo redondo. Em seguida procedeu-se à evaporação do solvente orgânico em corrente de azoto levando assim à formação de um filme lipídico. O filme foi hidratado por uma fase aquosa, composta por 5 mL de água ultrapurificada durante 1 hora levando-o ocasionalmente ao agitador tipo vórtex. Após a hidratação do filme lipídico obteve-se uma solução de aspeto leitoso, formada por vesículas multilamelares e fragmentos de bicamada, a qual foi submetida a 10 ciclos de extrusão em membrana de policarbonato com uma porosidade de 200 nm originando uma solução semitransparente constituída por vesículas unilamelares pequenas.

A Figura 20 apresenta o esquema da produção de lipossomas através do método hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.



**Figura 20:** Representação esquemática da preparação de lipossomas através do método hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.

### 3.3.2. Caracterização dos Nanotransportadores

A caracterização englobou a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão (Pdi), do pH, da concentração e da carga superficial dos nanotransportadores.

A caracterização foi realizada para os quatro tipos de nanotransportadores em estudo. Para cada tipo, foram produzidas 5 amostras, de forma independente em diferentes ensaios.

### **Análise de localização de partículas (NTA - Nanoparticle Tracking Analysis)**

A avaliação da concentração e diâmetro médio das partículas foi realizada pela técnica de análise de localização de partículas (NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis*) através da utilização do equipamento NS500 (Nanosight, Reino Unido) (Figura 21).

Este equipamento inclui uma câmara CCD (captação de 30 frames por segundo), um laser com 40 mW de potência contínua e um comprimento de onda de 638 nm e o software “NTA Software Suite” (Figura 22). Em cada análise o software identifica e monitoriza o centro de cada partícula em cada frame captado pela camara CCD durante 30 a 60 segundos (900 a 1800 frames por análise) (NanoSight, 2013b).

A utilização desta técnica teve como objetivo principal a determinação da concentração inicial dos nanotransportadores em estudo, permitido ainda a obtenção de dados relativos ao diâmetro médio das partículas. Para a realização desta análise, introduziu-se num ependorff do equipamento NS500 uma alíquota de 10 $\mu$ L de amostra previamente diluída (1/100 em água milli-Q ultrapurificada) e 2 mL de água milli-Q ultrapurificada, procedendo-se em seguida à sua homogeneização por inversão. Esta análise foi realizada em triplicado para cada uma das 5 amostras independentes de cada um dos quatro tipos de nanotransportadores em estudo.



**Figura 21:** Imagem do equipamento NS500 (Nanosight) utilizado neste trabalho.

### **Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada à temperatura ambiente com um leitor de pH digital (pHmetro, USA, Figura 22) com eléctrodo de vidro, previamente calibrado com tampões de pH 4,0, 7,0 e 10,0. O pH das preparações de cada nanotransportador foi medido logo após a sua obtenção e durante os três dias que se seguiram.

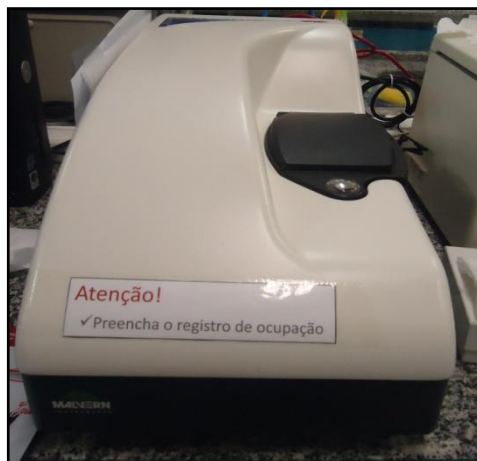


**Figura 22:** pHmetro digital com eletrodo de vidro utilizado neste trabalho.

### **Determinação do índice de polidispersão e do diâmetro médio dos nanotransportadores**

A análise do índice de polidispersão (Pdi) e do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas foi realizada pela técnica de Dispersão Dinâmica da Luz, realizada a 25°C no equipamento Zetasizer Nano-S (Malvern, Reino Unido) com um laser de Hélio-Neon de 5 mW de potência contínua e um comprimento de onda de 633nm (Figura 23).

De forma a determinar o diâmetro hidrodinâmico médio e o Pdi das amostras iniciais dos 4 nanotransportadores, optou-se por realizar 2 medições independentes para cada amostra de nanotransportador. Para a primeira medição, utilizou-se 1ml de solução de nanotransportador (diretamente da suspensão obtida na etapa de preparação). Para a segunda medição, utilizou-se uma amostra de nanotransportador diluída (1:100) em água Milli-Q ultrapurificada (como descrito na literatura, a fim de evitar eventos de *multiscattering* (Eidi et al., 2010)). Assim sendo foram realizadas 2 medições no Zetasizer Nano-S para cada nanotransportador, sendo estas realizadas em duplicado.

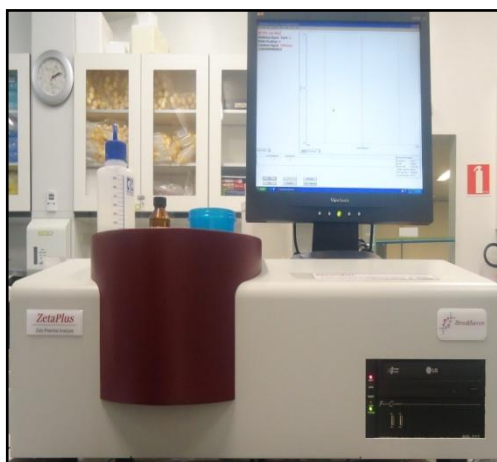


**Figura 23:** Imagem do equipamento Zetasizer Nano-S utilizado neste trabalho.

### **Determinação da carga superficial dos nanotransportadores (Potencial Zeta)**

O potencial zeta quantifica a carga superficial das partículas através da medição da mobilidade electroforética e foi medido através do equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, USA) (Figura 24).

Para a determinação do potencial zeta das amostras originalmente obtidas dos 4 nanotransportadores brancos em estudo, utilizaram-se alíquotas diluídas cerca de 15 vezes (100  $\mu\text{L}$  de amostra de nanotransportadores diluída em 1500  $\mu\text{L}$  de água ultrapurificada Milli-Q). Esta medição foi realizada a uma temperatura de 25°C sendo os resultados expressos em mV.



**Figura 24:** Imagem do equipamento ZetaPlus utilizado neste trabalho.

### *3.3.3. Análise estatística*

---

Para uma melhor análise dos dados resultantes da técnica de Dispersão Dinâmica da Luz utilizada para o cálculo do índice de polidispersão (Pdi) e do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas foi realizado uma análise estatística utilizando o software de análise estatística IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> versão 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*). Os dados relativos ao diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das amostras dos 4 tipos de nanotransportadores diluídas foram submetidas a uma análise de variância através do teste “ANOVA” com um nível de significância de  $p < 0,05$  (5%).

# Capítulo 4 - Resultados e Discussão

## 4. Análise e Discussão de Resultados

---

Neste capítulo, apresenta-se os resultados relativos aos ao tamanho médio das partículas, Pdi, potencial zeta, concentração e pH, obtidas para 5 amostras independentes de cada um dos 4 nanotransportadores em estudo.

Atualmente, são inúmeros os estudos realizados com nanotransportadores para encapsulação de fármacos com o objetivo de liberação controlada e/ou em regiões específicas do organismo humano. Nestes estudos é de enorme importância realizar a caracterização físico-química dos nanotransportadores, uma vez que quando realizados testes de citotoxicidade, a informação proveniente da caracterização é de enorme importância para a compreensão desses testes.

### 4.1. Preparação dos Nanotransportadores sem substância ativa

---

Como referido anteriormente, foram produzidos 4 tipos de nanotransportadores diferentes sem substância ativa (NC, NE, LIP, NLC), tendo-se utilizado metodologias descritas na bibliografia como sendo adequadas à preparação de cada um desses tipos. Para a seleção do tipo de nanotransportadores e respectivas metodologias de obtenção, contribuiu também a experiência existente no laboratório FarmaTec (Universidade de Goiás) proveniente de trabalhos anteriores de encapsulação de fármacos em nanotransportadores.

Sendo ambas consideradas nanopartículas poliméricas, as Nanocápsulas e Nanoesferas foram obtidas pela utilização do mesmo método, nanoprecipitação.

No caso das Nanocápsulas, após a preparação de uma pré-emulsão resultado da junção da fase orgânica à fase aquosa, esta é rotoevaporada a pressão reduzida, fazendo com que a acetona que inicialmente está presente nas vesículas comece a ser eliminada para fora destas, arrastando o polímero para a interface óleo/ água, onde este se precipita, uma vez que é insolúvel em água e também como em óleo. Todas as amostras de nanocápsulas foram rotoevaporadas até um volume de aproximadamente para 10 mL, apresentando um aspeto final branco / Leitoso.

Por sua vez, as Nanoesferas em estudo também foram preparadas pelo método de nanoprecipitação de forma similar ao descrito para as nanocápsulas. Neste caso, a acetona ao ser eliminado por rotoevaporação, provoca a produção da matriz polimérica da nanoesfera, pois como há ausência de óleo na formulação o polímero precipita de forma uniforme formando uma matriz polimérica. As amostras de nanoesferas foram igualmente rotoevaporadas para obtenção de aproximadamente 10 mL e apresentavam um aspeto esbranquiçado.

Os NLC foram preparados através do processo de homogeneização a alta pressão a quente, uma técnica realizada com temperaturas superiores ao ponto de fusão dos lípidos em uso. Esta consistiu em fundir a fase orgânica e adicioná-la à fase aquosa à mesma temperatura sob elevada agitação de forma a formar uma emulsão. Esta emulsão é homogeneizada através de uma homogeneizador de alta pressão de forma a obter partículas com dimensões e características desejadas. As amostras obtidas apresentavam um aspeto branco com reflexos azulados.

Por último os lipossomas usados no presente trabalho foram preparados através do método da hidratação do filme lipídico seguido de extrusão, método esse que tem como base a formação de um filme lipídico seguido de uma hidratação de forma a haver a produção de lipossomas multilamelares que posteriormente são tratados mecanicamente, por extrusão, tornando-os vesículas unilamelares. As amostras de lipossomas resultantes apresentavam um volume final de aproximadamente 5 mL e tinham um aspeto leitoso.

## **4.2. Análise de localização de partículas (NTA)**

---

Como foi referido no capítulo anterior (ponto 3.3.2), a Análise de localização de partículas (NTA) foi realizada de forma a calcular a concentração inicial de cada uma das amostras preparadas dos 4 nanotransportadores em estudo.

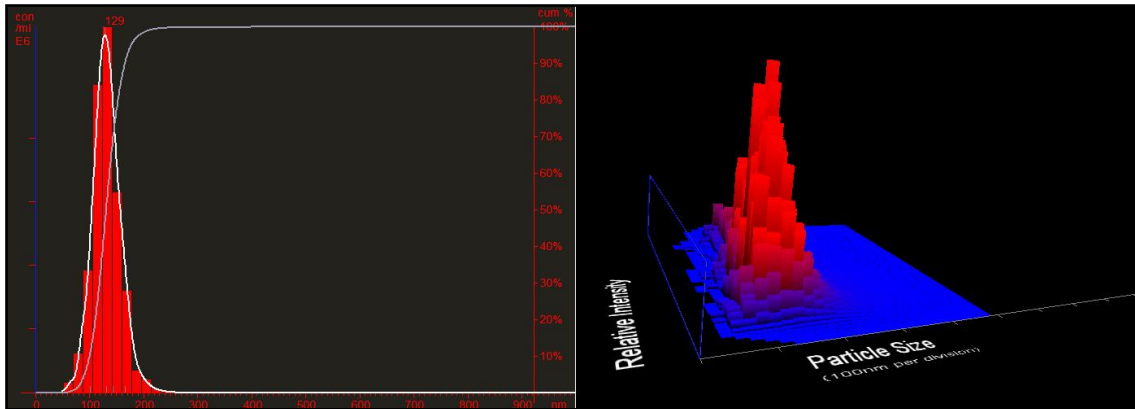
Cada amostra de nanotransportadores analisada foi diluída cerca de 2000×, sendo primeiramente diluída (1:100) e depois diluída (1:200) em água milli-Q ultrapurificada.

Esta técnica possibilita a identificação/deteção de partículas num estado líquido, permitindo efetuar o cálculo do diâmetro hidrodinâmico médio e a concentração de partículas presentes na amostra em estudo. Como referido na secção Material e Métodos, esta análise foi realizada em triplicado para cada amostra dos 4 nanotransportadores em estudo. Considerando que os resultados das concentrações apresentados pelo software NTA, eram relativos às amostras diluídas, de forma a calcular a concentração inicial de cada amostra utilizou-se a seguinte (equação 3):

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (3)$$

Na Tabela 3 apresenta-se os resultados da avaliação por NTA relativamente às 5 amostras de NE em estudo.

A título de exemplo, a Figura 25, apresenta os gráficos fornecidos pelo software NTA após a realização da caracterização a uma amostra de NE. O software produz este tipo de gráficos de forma ao operador conseguir estabelecer uma relação entre o tamanho das partículas, a percentagem de intensidade de luz por elas refletida e a sua concentração.



**Figura 25:** Gráficos resultantes da análise feita pelo software NTA a uma amostra de NE. A imagem da esquerda, representa o gráfico que relaciona tamanho e a concentração das partículas presentes na amostra e a imagem da direita, representa o gráfico que relaciona o tamanho, a intensidade e a concentração das partículas.

**Tabela 3:** Concentração inicial e diâmetro médio das 5 amostras de cada um dos 4 nanotransportadores em estudo.

Amostras	Concentração Inicial [part/ml]	Tamanho [d.nm]
NE1	$(5,08 \pm 0,57) \times 10^{12}$	$135,00 \pm 2,65$
NE2	$(6,02 \pm 0,34) \times 10^{12}$	$146,00 \pm 4,36$
NE3	$(6,73 \pm 0,11) \times 10^{12}$	$135,67 \pm 2,52$
NE4	$(5,82 \pm 0,33) \times 10^{12}$	$129,66 \pm 4,16$
NE5	$(7,47 \pm 0,23) \times 10^{12}$	$133,67 \pm 3,21$
<b>Média</b>	$(6,22 \pm 0,91) \times 10^{12}$	$136,00 \pm 6,05$ (CV%=4,4)
NC1	$(3,70 \pm 0,27) \times 10^{12}$	$230,33 \pm 5,77$
NC2	$(8,09 \pm 0,18) \times 10^{12}$	$210,00 \pm 2,52$
NC3	$(6,24 \pm 0,26) \times 10^{12}$	$202,00 \pm 2,00$
NC4	$(3,12 \pm 0,15) \times 10^{12}$	$194,00 \pm 2,65$
NC5	$(2,73 \pm 0,36) \times 10^{12}$	$229,00 \pm 3,60$
<b>Média</b>	$(4,77 \pm 2,30) \times 10^{12}$	$214,00 \pm 16,09$ (CV%=7,5)
Lip1	$(5,71 \pm 0,50) \times 10^{13}$	$172,67 \pm 6,03$
Lip2	$(5,29 \pm 0,32) \times 10^{13}$	$159,00 \pm 8,54$
Lip3	$(7,80 \pm 0,37) \times 10^{13}$	$160,67 \pm 4,73$
Lip4	$(9,12 \pm 0,25) \times 10^{13}$	$172,33 \pm 2,08$
<b>Média</b>	$(6,98 \pm 1,80) \times 10^{13}$	$166,17 \pm 7,35$ (CV%=4,4)
NLC1	$(5,45 \pm 0,33) \times 10^{12}$	$206,33 \pm 9,00$
NLC2	$(7,02 \pm 0,15) \times 10^{12}$	$192,00 \pm 3,54$
NLC3	$(4,96 \pm 0,20) \times 10^{12}$	$178,00 \pm 14,00$
NLC4	$(2,10 \pm 0,23) \times 10^{12}$	$199,00 \pm 26,66$
NLC5	$(3,08 \pm 0,46) \times 10^{12}$	$200,33 \pm 12,74$
<b>Média</b>	$(4,96 \pm 1,95) \times 10^{12}$	$195,07 \pm 10,76$ (CV%=5,5)

Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n=3$ ) a Média é expressa como média  $\pm$  DP das 5 experiências independentes ( $n=5$ ). NE: nanoesferas; NC: nanocápsulas; Lip: Lipossomas; NLC: Carregadores lipídicos nanoestruturados.

A determinação da concentração de nanotransportadores é de grande importância aquando da realização de estudos com culturas celulares *in vitro* pois permite normalizar amostras de diferentes nanotransportadores para o mesmo número inicial de partículas/mL. Apenas com a obtenção destes valores se podem realizar estudos que permitam avaliar a citotoxicidade de nanotransportadores em função do número de partículas (de tamanho conhecido) e não da sua concentração (m/v), por forma a verificar a influência deste fator na viabilidade de células expostas a estas partículas.

Como se pode verificar na Tabela 3, verificou-se a existência de alguma variação dos valores de concentração obtidos segundo o tipo de nanotransportador, sendo que estes valores variaram entre  $2,1 \times 10^{12}$  part/ml (NLC) e  $9,2 \times 10^{13}$  part/ml (Lip). Verifica-se igualmente que, no que respeita à concentração em particular, existe uma maior similaridade de resultados obtidos entre os diferentes ensaios para o caso das Nanoesferas (coeficiente de variação (CV%) = 14,6%) comparativamente aos restantes nanotransportadores (CV% de 25,8%, 43,2% e 48,3% para o caso de LIP, NLC e NC, respetivamente).

Como referido, os resultados apresentados na Tabela 3, demonstram que as 5 amostras de NE em estudo apresentam concentrações muito próximas entre si. Relativamente ao tamanho apresentado pelas NE, igualmente se verifica que os resultados são de maneira geral muito próximos (CV% = 4,4%,  $n=15$ ). Estes resultados sugerem assim uma elevada repetibilidade do método de preparação e da formulação de NE.

No que respeita as 5 amostras de NC, ao analisarmos a Tabela 3, pode-se verificar que as amostras NC2 e NC3 apresentam uma concentração de partículas muito superior às apresentadas pelas restantes amostras de NC. Esta diferença de concentração deve-se possivelmente ao facto de estas terem sido mais rotoevaporadas que as outras amostras, apresentando um menor volume final de amostra. Tal acontecimento pode facilmente ocorrer, pois aquando da rotoevaporação o volume final de aproximadamente 10 mL é controlado visualmente pelo operador. Assim, as amostras finais ficam mais concentradas, uma vez que lhes é retirada mais água, ficando assim com mais partículas por mililitro. A concentração das amostras NC1, NC4 e NC5 apresentam valores mais similares entre si. Face aos resultados obtidos, denota-se a influência do operador,

ficando patente a importância da realização da análise por NTA para obtenção da concentração de amostras provenientes de uma mesma metodologia. Já no que diz respeito ao diâmetro hidrodinâmico médio apresentado pelas 5 amostras de NC, os resultados apresentam valores próximos ( $CV\% = 7,5\%$ ,  $n=15$ ), correspondendo a um tamanho médio de  $214,0 \pm 16,1$  nm. Ao contrário do que aconteceu nos resultados relativos às concentrações, as amostras NC2 e NC3 não apresentaram resultados discrepantes no tamanho médio, podendo-se assim concluir que apesar de ambas as amostras referidas apresentarem mais partículas/mL do que as outras amostras, o tamanho das partículas manteve-se similar.

Uma vez que nanoesferas e nanocápsulas foram obtidas pelo mesmo método de preparação, tendo sido utilizadas formulações idênticas (com a diferença da inclusão de óleo (captex) na formulação das NC), torna-se lógica a comparação de resultados entre estes dois nanotransportadores. Neste seguimento, pode-se verificar que os resultados provenientes da análise por NTA mostram que as NE são partículas mais pequenas (tamanho médio  $136,00 \pm 6,05$  nm) do que as NC ( $214,00 \pm 16,09$  nm), diferença esta que pode ser devida à inclusão de óleo na formulação de NC, tornando-as assim maiores do que as NE.

Comparativamente aos restantes nanotransportadores, os lipossomas foram aqueles que apresentaram um valor médio de concentração superior ( $6,98 \pm 1,80$ ) $\times 10^{13}$ ). Tal facto pode ser justificado devido ao volume final das amostras ser aproximadamente 5 mL, levando assim a existência de um maior número de partículas por mililitro. A elevada concentração destas amostras (partículas/mL), poderá também relacionar-se com a elevada razão fosfolípido: água utilizada. Relativamente às concentrações determinadas para as diferentes amostras de lipossomas (Tabela 3), os valores obtidos demonstram a existência de alguma discrepância ( $CV\% = 25,8\%$ ,  $n=12$ ). As amostras Lip1 e Lip 2 foram as que apresentaram concentrações similares, sendo que as amostras Lip3 e Lip4 apresentaram valores discrepantes. Estas diferenças poderão ser explicadas pela ocorrência de alguma perda de amostra associada ao processo mecânico de extrusão. No que diz respeito aos valores de diâmetro médio das partículas, as 4 amostras de Lipossomas apresentaram valores muito similares ( $CV\% = 4,42\%$ ,  $n=12$ ), com uma média de 166,17 nm. Contrariamente ao que se verificou nos valores de

concentração, as amostras Lip3 e Lip4 apresentaram valores muito próximos aos apresentados pelas restantes amostras, denotando-se assim que apesar das discrepâncias de valores na concentração das amostras, as partículas apresentaram diâmetros médios similares.

Refira-se que, no caso particular dos lipossomas, apenas se apresentam resultados para 4 amostras, devido à ocorrência de problemas técnicos durante a caracterização da quinta amostra.

Por último, no que respeita as 5 amostras de NLC, ao analisarmos a Tabela 3, pode-se denotar a existência de uma elevada variabilidade entre os resultados das concentrações das amostras ( $CV\% = 43,2\%$ ,  $n=15$ ), sendo as amostras NLC2, NLC4 e NLC5 as que apresentaram maiores diferenças. Esta variabilidade pode ser explicada pelo método de preparação das NLC, uma vez que durante os 6 ciclos de HPH a quente correm perdas variáveis de amostra. Relativamente aos resultados dos diâmetros médios, tal como para os outros nanotransportadores, as diferentes amostras apresentaram valores próximos entre si, evidenciados pelo baixo coeficiente de variabilidade calculado ( $CV\% = 5,5\%$ ,  $n=15$ ), com uma média de 195,07 nm. Por último, refira-se que com base na análise por NTA, as partículas com menor dimensão foram as NE, seguidas pelos LIP, NLC e finalmente as NC (com tamanhos médios de 136,0 nm, 166,2 nm, 195,1 nm e 214,0 nm, respetivamente).

### **4.3. Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)**

---

Esta técnica de caracterização possibilita o cálculo de 2 parâmetros, o diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (Pdi) de forma a obter dados sobre o tamanho médio dos nanotransportadores em estudo e sobre a sua distribuição de tamanho, respetivamente. A distribuição de tamanho pode apresentar-se, como sendo unimodal (apresenta uma população), multimodal (apresenta várias populações), monodispersa ou polidispersa, contendo uma distribuição de tamanhos estreita, ou larga, respetivamente (Gaumet et al., 2008). Uma vez usado uma escala compreendida entre 0 e 1, considera-se um “bom” índice de polidispersão aquele que apresenta um valor

inferior a 0,1 representando uma população de partículas com elevada homogeneidade. Pelo contrário, um índice de polidispersão elevado sugere uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo a existência de várias populações (Gaumet et al., 2008).

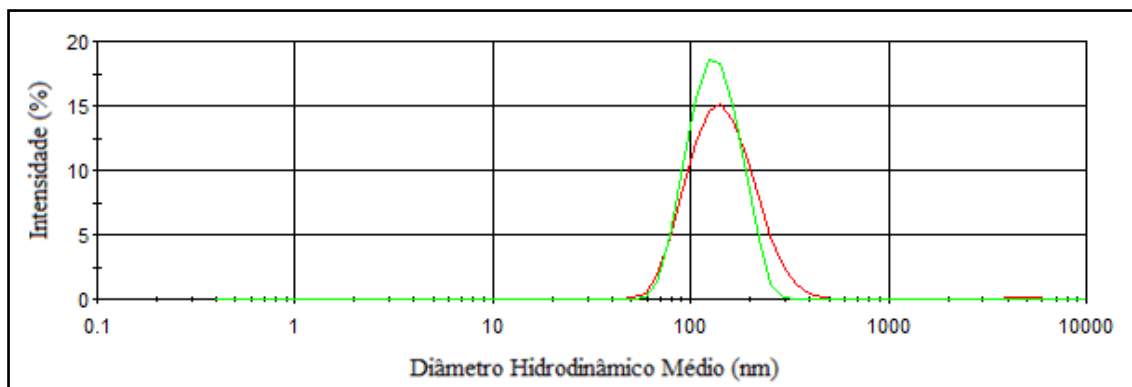
Para a elaboração desta caracterização optou-se por fazer 2 medidas independentes, cada em duplicado, para cada um dos 4 nanotransportadores em estudo, como foi referido no ponto 3.3.2. Analisou-se então uma Amostra diluída, tal como realizado na maioria dos trabalhos descritos na literatura, e determinou-se adicionalmente os mesmos parâmetros para a amostra inicial de cada um dos nanotransportadores (amostra obtida segundo as metodologias descritas na secção de Material e Métodos e doravante designada como Amostra inicial). De uma forma geral, verificou-se que as amostras iniciais apresentaram tamanhos similares ou ligeiramente superiores comparativamente com as amostras diluídas (à exceção dos NLC os quais apresentaram valores muito superiores, como será referido posteriormente) (Tabelas 8-11). Mais ainda, os valores de Pdi determinados para as Amostras iniciais foram geralmente  $> 0,1$  (variando entre 0,095 nas NE e 0,675 nos NLC), provavelmente devido à elevada concentração de nanotransportadores nestas amostras, o que poderá levar à ocorrência de fenómenos de *multiscattering* e até mesmo de agregação de partículas (Eidi et al., 2010). Assim, ambos os resultados são apresentados (para amostras iniciais e diluídas) tendo-se procedido à análise estatística apenas para os dados obtidos para as amostras diluídas.

Seguidamente, apresentam-se os resultados do diâmetro médio e do Pdi relativos às 5 amostras de nanoesferas (Tabela 4) bem como os gráficos da análise por DLS (provenientes do software Zetasizer) relativos à distribuição de tamanho por intensidade (%) e por volume (%) (Figuras 26 e 27).

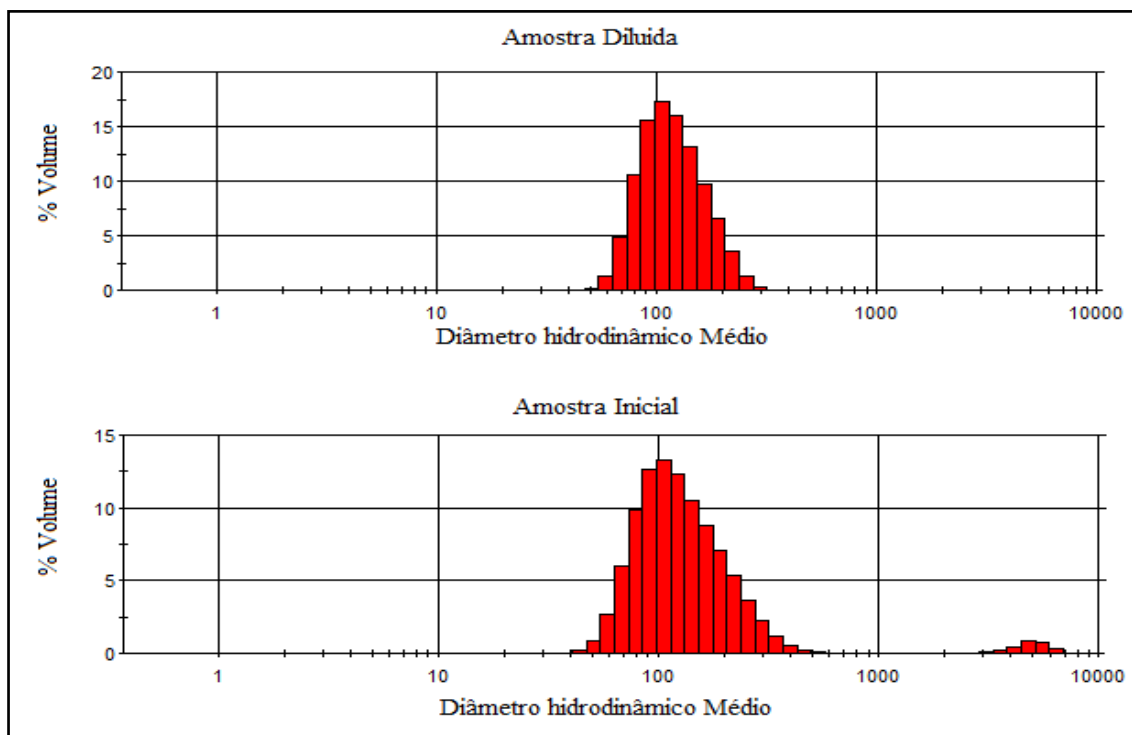
**Tabela 4:** Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das amostras de Nanoesferas (NE) de PCL.

Amostra Inicial	Tamanho [d.nm]	Pdi
NE 1	138,30 ± 0,28	0,123 ± 0,001
NE 2	134,20 ± 1,84	0,095 ± 0,002
NE 3	133,65 ± 1,06	0,098 ± 0,009
NE 4	140,45 ± 0,77	0,210 ± 0,009
NE 5	143,75 ± 0,21	0,190 ± 0,011
Média	138,07 ± 4,25	0,142 ± 0,050
Amostra Diluída	Tamanho [d.nm]	Pdi
NE 1	128,50 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,053 ± 0,001 <sup>a,b</sup>
NE 2	126,20 ± 2,55 <sup>a,b</sup>	0,080 ± 0,005 <sup>a,b</sup>
NE 3	128,95 ± 2,33 <sup>a,b</sup>	0,040 ± 0,005 <sup>a</sup>
NE 4	120,00 ± 1,41 <sup>b</sup>	0,075 ± 0,006 <sup>a,b</sup>
NE 5	128,00 ± 2,83 <sup>a</sup>	0,068 ± 0,021 <sup>b</sup>
Média	126,33 ± 3,69	0,064 ± 0,017

Os resultados são expressos como Média ± DP de 2 medidas realizadas pelo equipamento à mesma amostra de NE; a Média é expressa como Média ± DP das 5 experiências independentes ( $n=10$ ). Os valores seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).



**Figura 26:** Distribuição média do tamanho por intensidade das NE, (---) Amostras diluídas e (---) Amostras iniciais.



**Figura 27:** Distribuição média do tamanho por percentagem de volume das NE.

Os tamanhos apresentados pelas diferentes amostras de nanoesferas são muito próximos entre si, verificando-se que apenas uma das amostras (NE 4) apresenta diferenças estatisticamente significativas de tamanho ( $p < 0,05$ ) quando comparada com outras amostras de NE (NE1 e NE 5). Todas as amostras apresentam um valor de Pdi baixo ( $< 0,1$ ), indicando uma distribuição de tamanho de partículas homogênea. Tal é igualmente verificado pela análise dos gráficos fornecidos pelo software Zetasizer

(Figuras 26 e 27), onde se pode observar que as partículas se distribuem num curto intervalo de tamanhos verificando-se uma distribuição de tamanho homogénea, aproximando-se de uma distribuição unimodal e monodispersa.

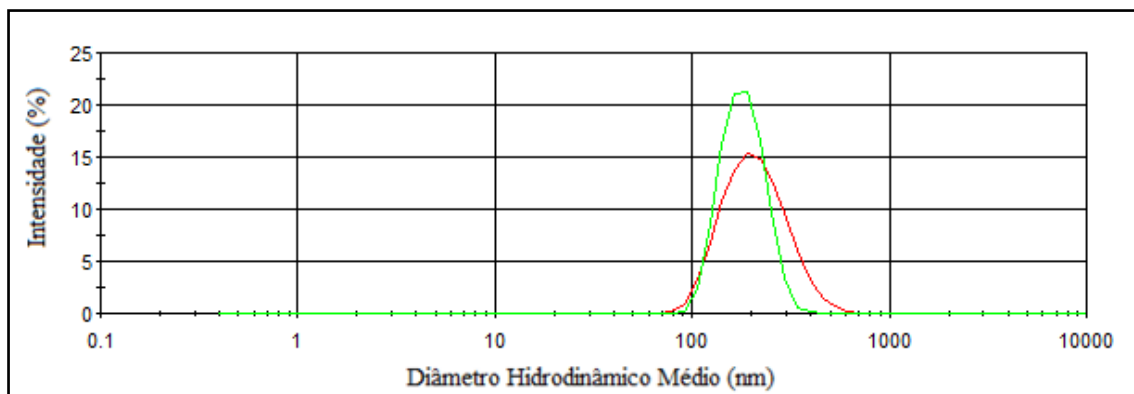
No caso das NE iniciais, os valores de tamanho obtidos não foram muito distantes dos da amostra diluída, apresentado contudo um valor superior de Pdi (valor médio de 0,142). De facto, nos gráficos de distribuição média do tamanho por percentagem de intensidade e por percentagem de volume respetivamente (Figuras 27 e 28) constata-se que a distribuição é multimodal com a presença de um pequeno número de partículas de elevado tamanho (valor médio de 4800 nm), tal poder-se-á dever à elevada concentração de partículas nesta amostra e subsequente ocorrência de fenómenos de agregação.

Os resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico médio e do Pdi das 5 amostras de nanocápsulas e respetivos gráficos provenientes da análise por DLS, apresentam-se na Tabela 5 e Figuras 28 e 29.

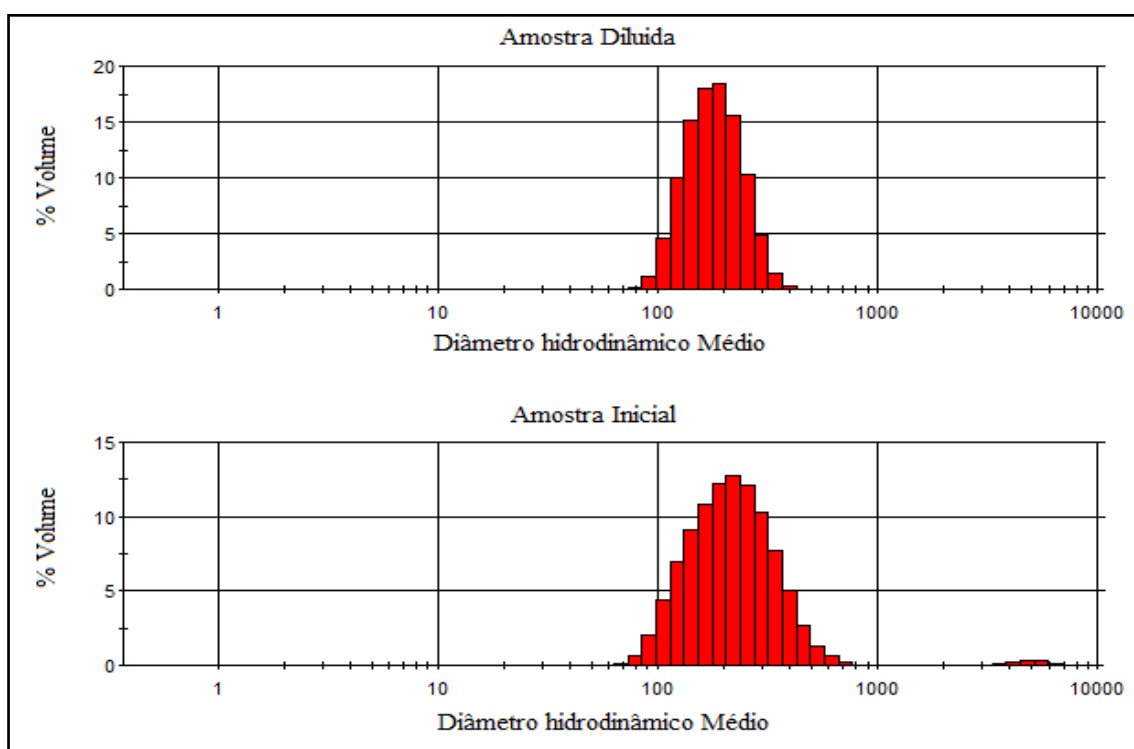
**Tabela 5:** Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das 5 amostras de Nanocápsulas (NC) de PCL.

Amostra Pura	Tamanho [d.nm]	Pdi
NC 1	201,60 ± 1,41	0,168 ± 0,008
NC 2	201,25 ± 3,18	0,081 ± 0,097
NC 3	185,25 ± 1,48	0,090 ± 0,027
NC 4	186,50 ± 2,69	0,081 ± 0,015
NC 5	197,90 ± 4,52	0,167 ± 0,002
Média	194,50 ± 8,01	0,118 ± 0,0459
Amostra Diluída	Tamanho [d.nm]	Pdi
NC 1	176,00 ± 0,57 <sup>a,b</sup>	0,0625 ± 0,0233 <sup>a</sup>
NC 2	180,75 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,0160 ± 0,0141 <sup>a</sup>
NC 3	171,25 ± 2,75 <sup>a</sup>	0,0350 ± 0,0250 <sup>a</sup>
NC 4	170,90 ± 2,68 <sup>a</sup>	0,0405 ± 0,0049 <sup>a</sup>
NC 5	172,00 ± 0,85 <sup>a</sup>	0,0630 ± 0,0260 <sup>a</sup>
Média	174,18 ± 4,20	0,0433 ± 0,0190

Os resultados são expressos em Média ± DP de 2 medidas realizadas pelo equipamento à mesma amostra de NC ( $n=2$ ) e a Média é expressa em Média ± DP das 5 experiências independentes ( $n=10$ ). Os valores seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).



**Figura 28:** Distribuição média do tamanho por intensidade das NC, (---) Amostras diluídas e (---) Amostras iniciais.



**Figura 29:** Distribuição média do tamanho por porcentagem de volume das NC.

À semelhança das NE, as 5 amostras de NC apresentam uniformidade nos tamanhos obtidos, com valores próximos entre si, sendo que apenas a amostra NC 2 apresentou diferenças estatisticamente significativas de tamanho ( $p < 0,05$ ) quando comparada com as amostras de NC 3, NC 4 e NC 5. No que respeita o Pdi não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Tal como para as NE, o Pdi para

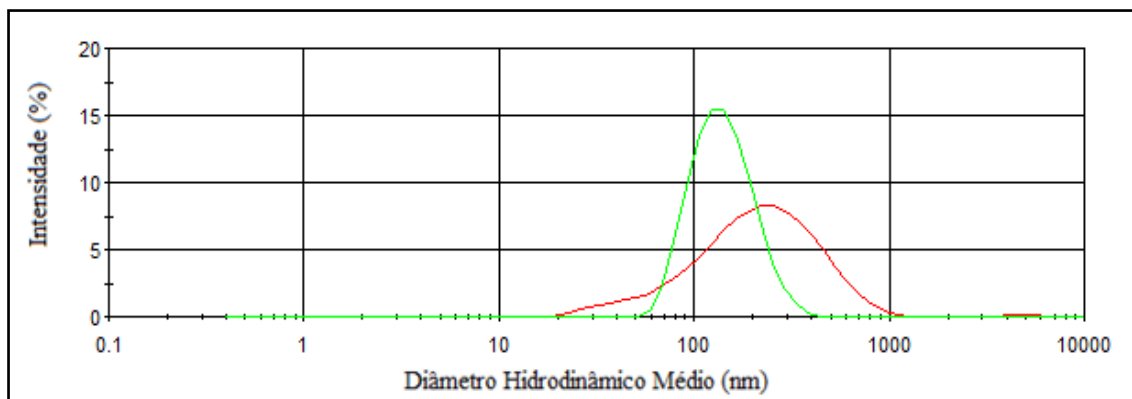
todas as amostras não ultrapassou o valor de 0,1, denotando assim uma distribuição de tamanho de partículas homogênea e unimodal, o que é confirmado pela análise das Figuras 28 e 29.

Os resultados da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio e do Pdi das 4 amostras de Lipossomas podem ser visualizados na Tabela 6 e nas Figuras 30 e 31.

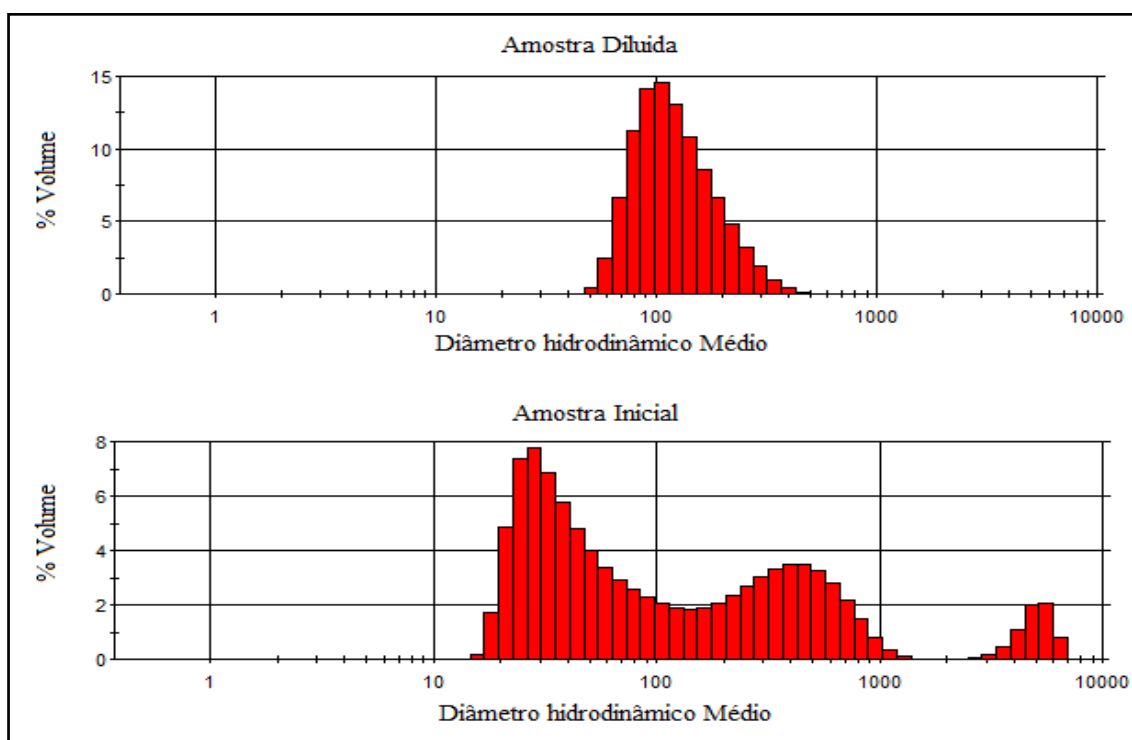
**Tabela 6:** Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das 4 amostras Lipossomas.

Amostra Pura	Tamanho [d.nm]	Pdi
Lip 1	177,45 ± 0,212	0,289 ± 0,006
Lip 2	168,15 ± 3,46	0,320 ± 0,048
Lip 3	142,10 ± 2,97	0,450 ± 0,025
Lip 4	211,10 ± 3,54	0,370 ± 0,016
Média	174,70 ± 28,50	0,350 ± 0,0710
Amostra Diluída	Tamanho [d.nm]	Pdi
Lip 1	124,65 ± 1,20 <sup>a</sup>	0,076 ± 0,013 <sup>a,b</sup>
Lip 2	136,15 ± 4,18 <sup>b</sup>	0,133 ± 0,003 <sup>b</sup>
Lip 3	134,15 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,176 ± 0,026 <sup>c,b</sup>
Lip 4	166,2 ± 0,424 <sup>c</sup>	0,240 ± 0,008 <sup>d</sup>
Média	140,28 ± 17,98	0,150 ± 0,069

Os resultados são expressos em Média ± DP de 2 medidas realizadas pelo equipamento à mesma amostra de Lip ( $n=2$ ) e a Média é expressa em Média ± DP das 4 experiências independentes ( $n=8$ ). Os valores seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).



**Figura 30:** Distribuição média do tamanho por intensidade das Lipossomas, (---) Amostras diluídas e (---) Amostras iniciais.



**Figura 31:** Distribuição média do tamanho por porcentagem de volume dos lipossomas.

Comparativamente às NE e NC, os lipossomas apresentaram alguma variabilidade de tamanhos, variando entre aproximadamente 125 nm e 166 nm, e apresentando um valor de Pdi médio de 0,150. No caso das amostras iniciais verifica-se um valor de Pdi elevado (bastante superior a 0,1) e uma variabilidade de tamanhos ainda maior, obtendo-se inclusivamente um valor superior a 200 nm na amostra Lip 4. Tal poderá dever-se a alguma instabilidade das partículas, devido a baixos valores de potencial Zeta

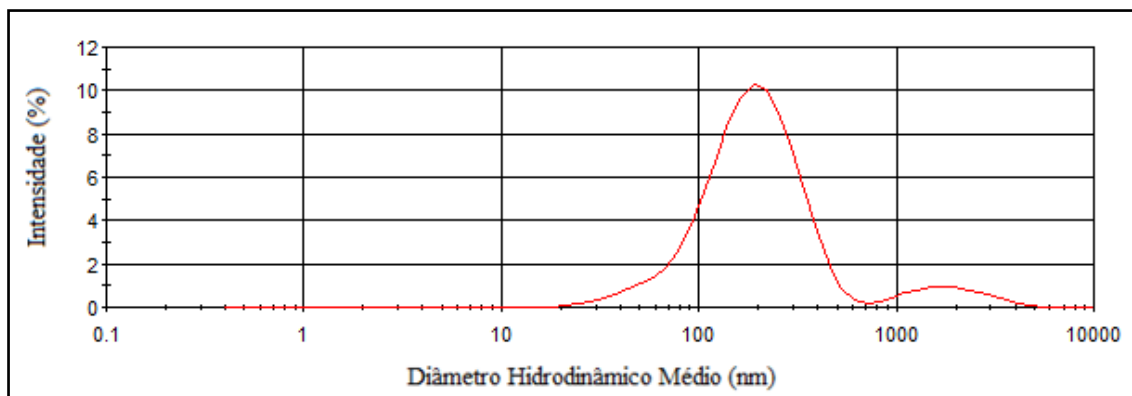
(como será referido posteriormente), levando à ocorrência de fenômenos de agregação, os quais são mais evidentes e pronunciados na amostra inicial, com elevada concentração de partículas. Ao analisar a Figura 30, proveniente do software Zetasizer, observa-se a existência de uma elevada percentagem de partículas com tamanho de aproximadamente 140 nm (amostra após diluição). Já na avaliação da amostra inicial, é possível verificar a existência de uma distribuição heterogênea de tamanhos e multimodal com a presença de partículas de grande dimensão.

Por fim serão apresentados na Tabela 7 e nas Figuras 33 e 34 os resultados relativos ao diâmetro médio hidrodinâmico e pdi das 5 amostras de transportadores lipídicos nanoestruturados.

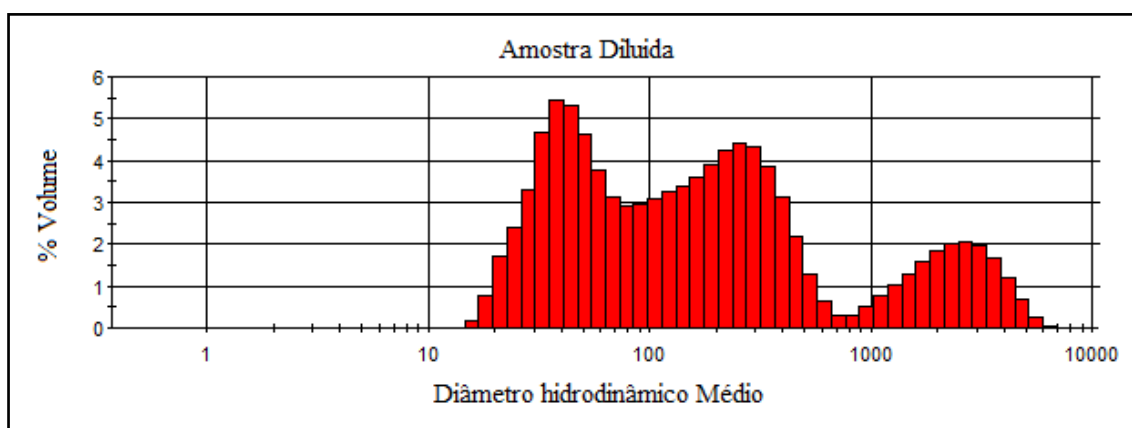
**Tabela 7:** Tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) e índice de polidispersão (Pdi) das 5 amostras de Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (NLC).

Amostra Pura	Tamanho [d.nm]	Pdi
NLC 1*	584,30 ± 8,34	0,527± 0,02
NLC 2*	453,40 ± 8,20	0,500± 0,015
NLC 3*	522,80 ± 11,03	0,490± 0,045
NLC 4*	549,25 ± 18,17	0,675± 0,094
NLC 5*	692,75 ± 7,84	0,601± 0,005
Média	560,5 ± 88,14	0,56± 0,08
Amostra Diluída	Tamanho [d.nm]	Pdi
NLC 1	172,00 ± 3,11 <sup>b,c</sup>	0,266± 0,017 <sup>a,b</sup>
NLC 2	147,65 ± 7,00 <sup>b,d</sup>	0,335± 0,018 <sup>a,b</sup>
NLC 3	166,65 ± 0,92 <sup>b,c,d</sup>	0,423± 0,018 <sup>a</sup>
NLC 4	201,50 ± 5,94 <sup>a</sup>	0,501± 0,129 <sup>a</sup>
NLC 5	161,05 ± 8,34 <sup>b</sup>	0,180± 0,002 <sup>b</sup>
Média	170,07 ± 19,51	0,341 ± 0,126

Os resultados são expressos em Média ± DP de 2 medidas realizadas pelo equipamento à mesma amostra de Lip ( $n=2$ ) e a Média é expressa em Média ± DP das 5 experiências independentes ( $n=10$ ). \* Não apresentaram qualidade de critério no software ZetaSizer. Os valores seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).



**Figura 32:** Distribuição média do tamanho por intensidade dos NLC presentes na amostra diluída.



**Figura 33:** Distribuição média do tamanho por percentagem de volume dos NLC.

Através da análise da Tabela 7, podemos verificar a elevada variabilidade de resultados entre diferentes ensaios, quer no que respeita o diâmetro hidrodinâmico médio (valores entre aproximadamente 148 nm e 202 nm) quer valores de Pdi (valores entre 0,18 e 0,51) o que denota uma alguma heterogeneidade, possivelmente associada ao método de preparação. Todas as amostras apresentaram valores de Pdi  $>0,1$  o que indica uma distribuição de tamanho multimodal e polidispersa (Figuras 32 e 33).

De referir que os resultados apresentados para a amostra inicial são meramente indicativos, uma vez que o software do equipamento Zetasizer forneceu a informação que os resultados eram não satisfatórios devido à elevada polidispersão da amostra, não cumprindo os critérios de qualidade necessários à realização da análise. Este facto poderá ser devido à presença de várias populações de partículas (distribuição

multimodal) nas quais se incluem partículas de grande dimensão, bem como a aglomerados de partículas ou restos de formulação (lípidos) que possam levar à ocorrência de eventos de dispersão múltipla (efeito de multiscattering) intensificados pela elevada concentração da amostra

Por último, ao analisarmos as Tabelas 4-7 relativas aos resultados do tamanho médio e Pdi dos 4 nanotransportadores em estudo, verifica-se que as partículas que apresentam uma média de tamanho menor foram as NE ( $126,22 \pm 3,69$  nm), contrariamente, as maiores foram as amostras de NLC ( $170,07 \pm 19,51$  nm). Embora as NC e NE tenham sido preparadas pelo mesmo método (nanoprecipitação) e com formulações idênticas, as NC apresentam um tamanho superior às NE, permitindo concluir que a inclusão de óleo na formulação das NC provoca um aumento nas partículas resultantes. O mesmo resultado foi previamente descrito por Ameller e colaboradores (2003) aquando da preparação de NE e NC por nanoprecipitação, apenas diferindo na inclusão de óleo na formulação de NC. Relativamente à distribuição de tamanhos, as NC e NE apresentam os menores valores de Pdi ( $0,043 \pm 0,019$  e  $0,064 \pm 0,017$ , respetivamente), já os Lip e as NLC apresentaram valores elevados de Pdi ( $>0,1$ ) o que indica uma menor estabilidade destas partículas.

Na Tabela 8 apresentam-se diferentes trabalhos relativos a nanotransportadores similares aos estudados, tendo-se tentado selecionar partículas cuja preparação tenha sido realizada com o mesmo método e formulações idênticas. De uma forma geral, os resultados obtidos vão de encontro aos valores publicados na literatura, contudo por vezes não sendo diretamente comparáveis devido a diferenças nas formulações (utilização de tensioativos e lípidos diferentes, inclusão de substância ativa, etc). No que respeita os valores de tamanho médios e Pdi de nanoesferas obtidas em estudos prévios (Tabela 8), pode-se constatar que estas apresentam um maior diâmetro médio comparativamente ao tamanho das NE em estudo. Tal pode ser devido a diferenças na formulação, pois apesar de todas apresentarem PCL na sua composição os tensioativos usados são diferentes. Outro fator que pode explicar esta diferença de tamanhos poderá ser a percentagem de polímero utilizado na fase orgânica, como referido por Fessi e colaboradores (1989). De forma idêntica, as NC avaliadas no presente trabalho

apresentaram tamanhos ligeiramente inferiores aos descritos na bibliografia. Contudo, verificou-se uma distribuição restrita e unimodal (Pdi médio de 0,043) contrariamente aos valores reportados na literatura, os quais são superiores 0,1 indicando diferentes populações de partículas nas suspensões coloidais.

Os lipossomas em estudo apresentaram tamanhos similares aos descritos por Conceição *et al.* (2009) e Ferreira (2006), tendo sido utilizada a mesma formulação e método de preparação. Já para as NLC, os trabalhos apresentados na Tabela 8 foram realizados com formulações muito diversas, frequentemente incluindo substância ativa e, alguns deles utilizando metodologias diferentes da usada neste trabalho, pelo que torna-se difícil a comparação de resultados.

Por último, observando a Tabela 8, é de salientar a ausência de valores de Pdi, um importante fator na caracterização de partículas, para vários dos nanotransportadores estudados.

**Tabela 8:** Exemplos de NT descritos na literatura, respectivas formulações, método de preparação, diâmetro hidrodinâmico médio e Pdi.

NT	Formulação			Método	Tamanho [nm]	Pdi	Referência
	Polímero	Tensioativo	Óleo				
NE	PCL	Lipoid S75	-	Nanoprecipitação	194±51	-	Ameller et al., 2003
	PCL	Poloxamer 188	-	Nanoprecipitação	208±2,9	-	Verger et al., 1998
	PCL	Span 80/Tween 80	-	Nanoprecipitação	266±11	0,4632±0,049	Zili et al., 2005
NC	PCL	Lipoid S75	Miglyol 810	Nanoprecipitação	294±95	-	Ameller et al., 2003
	PCL 42500	Montane 60/Montanox 80	Miglyol 810	Nanoprecipitação	285,2±10,1	-	Tewa-Tagne et al., 2006
	PCL	Monoelato de Sorbitano/Tween 80	Captex	Nanoprecipitação	230±20	0,21±0,10	Ourique et al., 2008
	PCL	Span 80/Tween 80	Benzoato de Benzilo	Nanoprecipitação	400±10	0,2527±0,012	Zili et al., 2005
	PCL 65000	Poloxamer 188/Lecitina de Soja	Benzoato de Benzilo	Nanoprecipitação	228±16,1	-	Cauchetier et al., 2003
Lip	Lípido	Antioxidante	Colesterol				
	PC	-	✓	E.M	236,8±33	-	Aoki et al., 1997
	PC	✓	✓	HFL	57,8	0,31±1,3	Lima & Oliveira, 2002
	PC	-	-	HFL + E.M	125±33	0,27	Conceição et al., 2009
	PC	-	-	HFL + E.M	133±5	0,09	Ferreira, 2006
NLC	Lípidos	Tensioativo	S.A				
	Cetilpalmitato AO/Óleo Soja	Tween 80/ Lecitina	Ác. trans-retinóico	Emulsificação	162,68±0,75	0,11±0,04	Chinsriwongkul et al., 2011
	GMS /AO / MCT	Lipoid E-80/ Poloxamer 188/ DS	Bufadienólidos	Emulsificação	104,1±51,2	-	Li et al., 2010
	GMS/ Miglyol	Poloxamer 188/ Lecitina	Vimocetina	HPH Quente	132±6,1	-	Zhuang et al., 2010
	Compritol 888 $\alpha$ -Tocoferol	Poloxamer 188/Desoxicolato de sódio	-	HPH Quente	244,9±11,6	0,282±0,05	Souto & Müller 2005
GMS/MCT	Poloxamer 188/ Lecitina	Silibina	Emulsão Evaporação	232,1±8,3	-	Jia et al., 2010	

E.M.: extrusão mecânica; HFL: hidratação de filme lipídico; HPH: homogeneização a alta pressão; AO: ác. Oleico; GMS: monoestearato de glicerol; MCT: triacilglicerol de cadeia média.

#### **4.4. Potencial Zeta**

---

O potencial Zeta é um potencial elétrico no campo de quebra (plano de corte), que é definido como a distância da superfície da partícula a um ponto no fluido da suspensão, onde íões de carga elétrica oposta permanecem fortemente ligados à partícula quando esta se move num campo elétrico. Este é calculado através da mobilidade eletroforética das partículas num campo elétrico (Brookhaven Instruments, 2013).

O potencial zeta é uma medida indireta da estabilidade física das partículas e que pode influenciar a cinética de libertação e o destino biológico dos nanotransportadores pois, quando as partículas possuem carga positiva tendem a ser atraídas por cargas negativas de superfícies e componentes biológicas, e vice-versa (Tamjidi et al., 2013).

A magnitude do potencial zeta dá-nos a indicação da estabilidade física de um sistema coloidal pois se todas as partículas de uma suspensão apresentarem um potencial zeta elevado (negativa ou positivamente), estas vão-se repelir umas às outras não havendo assim tendência em criar agregados.

Partículas com um potencial zeta superior a 30 mV (valor absoluto) são consideradas fisicamente estáveis, por outro lado se o potencial zeta rondar os 20 mV (negativo ou positivo), geralmente a suspensão coloidal apresenta apenas estabilidade de curto prazo, podendo-se verificar uma rápida agregação de partículas para valores de potencial Zeta na ordem dos -5 mV a +5 mV (Mishra et al., 2009). Contudo, em determinadas situações (por exemplo quando tensioativos de elevado peso molecular são usados ou quando ocorre adsorção de moléculas à superfície das partículas) as suspensões podem ser estáveis, mesmo apresentando valores de potencial Zeta da ordem dos 20 mV, ou até inferiores (Mishra et al., 2009).

Na Tabela 9 apresentam-se os valores de potencial Zeta das 5 amostras de cada um dos nanotransportadores em estudo.

**Tabela 9:** Potencial Zeta das 5 amostras de cada um dos nanotransportadores em estudo.

Amostras	Potencial Zeta [mV]
NE1	-19,25 ± 0,63
NE2	-22,38 ± 0,62
NE3	-15,1 ± 0,66
NE4	-24,97 ± 1,68
NE5	-15,19 ± 0,62
<b>Média</b>	<b>-19,38 ± 4,36</b>
NC1	-13,31 ± 0,65
NC2	-14,36 ± 0,63
NC3	-13,70 ± 0,89
NC4	-10,27 ± 0,36
NC5	-23,49 ± 1,68
<b>Média</b>	<b>-15,02 ± 4,99</b>
Lip1	-3,83 ± 0,78
Lip 2	-9,06 ± 1,22
Lip 3	-7,33 ± 3,47
Lip 4	-7,22 ± 0,53
<b>Média</b>	<b>-6,86 ± 4,01</b>
NLC1	-15,95 ± 0,40
NLC2	-21,55 ± 0,55
NLC3	-17,87 ± 0,70
NLC4	-22,84 ± 0,34
NLC5	-19,20 ± 1,91
<b>Média</b>	<b>-19,48 ± 2,77</b>

Os resultados são expressos como Média ± DP de 2 medidas realizadas pelo equipamento à mesma amostra de NE ( $n=2$ ) e a Média é expressa como Média ± DP das 5 experiências independentes ( $n=5$ ). NE- nanoesferas; NC- nanocápsulas; Lip- Lipossomas; NLC- Carregadores lipídicos nanoestruturados.

A determinação do valor de potencial zeta das amostras de nanotransportadores é de grande importância, pois este é um indicador da estabilidade das partículas.

Como se pode observar na Tabela 9, verifica-se a existência de uma variação de valores de potencial zeta obtidos entre os diferentes nanotransportadores em estudo,

sendo que estes valores variam entre  $-6,86 \pm 4,01$  mV para lipossomas e  $-19,48 \pm 2,77$  mV para os NLC.

De um maneira geral, com exceção dos lipossomas, os valores de potencial Zeta das 5 amostras de cada um dos nanotransportadores em estudo, indicam que estas apresentam uma estabilidade de curto prazo. Contrariamente, os valores apresentados pelas 4 amostras de lipossomas ( $-6,86 \pm 4,01$  mV) indicam que estas são fisicamente instáveis, apresentando tendência a criar agregados devido à baixa de repulsão entre partículas.

Todas as amostras analisadas apresentam valores negativos de potencial Zeta. Tal facto pode ser explicado pela composição de cada um dos nanotransportadores.

No caso das nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) o potencial Zeta depende principalmente da natureza química do polímero e do tensioativo utilizado nas suas formulações. Quando utilizados tensioativos não-iónicos, os valores de potencial zeta obtidos irão ser de acordo a natureza do polímero, apresentando carga positiva ou negativa conforme se trate de um polímero catiónico ou aniónico (Mora-Huertas et al., 2010). Por outro lado quando as nanopartículas são preparadas com polímeros e tensioativos com carga negativa, os valores de potencial zeta serão negativos e com um valor absoluto maior, do que quando utilizado tensioativos não-iónicos. Similarmente quando utilizado tensioativos com carga positiva, serão obtidos valor de potencial zeta positivos (Mora-Huertas et al., 2010).

As nanoesferas e nanocápsulas preparadas neste trabalho, apresentam potencial Zeta negativo devido à presença de um polímero do tipo poliéster, PCL, na sua formulação, uma vez que este confere um potencial negativo à interface das partículas devido à presença de cadeias carboxílicas na sua composição (Mora-Huertas et al., 2010). Como os tensioativos usados na formulação destas nanopartículas poliméricas são não-iónicos, estes não interferem no potencial apresentado pelas partículas.

No caso dos lipossomas, o potencial zeta pode ser alterado consoante a composição do fosfolípido presente na sua formulação. Neste trabalho utilizou-se a fosfatidilcolina (PC), considerado um fosfolípido zwitteriónico ou seja com carga igual a zero, apresentando um grupo positivo (colina) e um grupo negativo (fosfato). Neste caso, o

valor negativo do potencial zeta deve pode ser atribuído à presença de ácido fosfatídico na fosfatidilcolina de soja usada na preparação dos lipossomas.

Por sua vez, o potencial zeta dos transportadores lipídicos nanoestruturados apresentam valores negativos devido à natureza química da matriz das NLC, nomeadamente à presença de ácido oleico uma vez que os tensioativos utilizados da formulação destas NLC são não iónicos.

No que respeita os valores obtidos, de uma forma geral, estes encontram-se dentro da gama de valores descrita na bibliografia (Tabelas 10 a 12). No caso das nanopartículas poliméricas, estudos realizados com partículas similares, isto é, que incluem PCL na sua composição, sem substância ativa e sendo obtidas pelo mesmo método utilizado neste trabalho (nanoprecipitação), encontram-se descritos na literatura valores de potencial Zeta negativos entre -4,45 e -62,3 mV (Tabela 10). Apesar dos tensioativos utilizados serem diferentes, podendo daí advir uma diferença de valores, é de salientar que as NC e NE obtidas neste trabalho apresentaram valores de potencial Zeta negativos de forma similar aos descritos na bibliografia.

**Tabela 10:** Formulações e potencial zeta de algumas nanopartículas poliméricas (NC e NE) preparadas através do método de nanoprecipitação presentes na literatura.

NT	Polímero	Tensioativo	Óleo	P. Zeta [mV]	Referência
NE	PCL	Lipoid S75	-	-20	Ameller et al., 2003
	PCL	Poloxamer 188	-	-29,0±1.1	Verger et al., 1998
NC	PCL	Lipoid S75	Miglyol 810	-62,3±1,3	Ameller et al., 2003
	PCL (42500)	Montane 60/Montanox 80	Miglyol 810	-27,9±1,0	Tewa-Tagne et al., 2006
	PCL	Monooleato de Sorbitano/Tween 80	CCM	-4,45±0,48	Ourique et al., 2008
	PCL	Monoelato de Sorbitano/Tween 80	SFO	-8,38±3,0	Ourique et al., 2008

NT- nanotransportadores; NE- nanoesferas; NC- nanocápsulas. PCL :Poli ( $\epsilon$ -caprolactona); PLGA :Ácido poli-láctico-co-glicólico; SFO :Óleo de sementes de girassol; CCM :Mistura de triacilgliceróis cáprico/caprílico.

A Tabela 11 apresenta exemplos de resultados descritos na literatura relativos ao potencial zeta de lipossomas.

**Tabela 11:** Formulações, métodos de preparação e potencial zeta de alguns lipossomas presentes na literatura.

Fosfolípido	S.A	Método	P. Zeta [mV]	Referência
PC	-	HFL + E.M	-16,1	Gu et al., 2003
PC	5-fluorauracilo / Metotrexano	HFL + E.M	-7,2 ± 1,6	Conceição et al., 2009
PC*	-	E.M.	-4,3 ± 0,6	Aoki et al., 1997
PC	-	HFL + E.M	-1,4 ± 0,1	Ferreira, 2006

\*Preparado com PC e Colesterol; PC :Fosfatidilcolina; S.A :Susbtância Ativa; HFL: Hidratação do filme lipídico; E.M: Extrusão mecânica.

Também para os lipossomas, os resultados do potencial zeta obtidos (-3,83 a -9,06 mV) vão de encontro aos reportados na literatura (tabela 11). Em ambos os casos todos os valores de potencial zeta são negativos e inferiores a 20 mV, apresentando em alguns casos valores muito baixos em alguns casos, o que indica uma possibilidade elevada de ocorrência de agregação de partículas. Refira-se que, à semelhança deste trabalho, todos os lipossomas presentes na Tabela 11 contêm fosfatidilcolina, o que pode induzir uma pequena carga superficial negativa.

Na Tabela 12, apresentam-se exemplos de valores de potencial zeta de NLC descritos na literatura.

Apesar destes não apresentarem uma formulação igual à usada no presente estudo e nem sempre utilizarem a mesma técnica de preparação, verifica-se que todos eles apresentam potencial Zeta negativo. Contudo, tal pode ser induzido quer pelos lípidos negativos presentes na formulação das NLC em estudo, tal como o ácido oleico (Chinsriwongkul et al., 2011) quer devido ao facto da maioria dos NLC presentes na Tabela 15 apresentarem substância ativa.

**Tabela 12:** Formulações, métodos de preparação e potencial zeta de alguns NCL presentes na literatura.

Lip. Sólido	Lip Líquido	S.A	Tensioativo	Método	P. Zeta [mV]	Referência
Cetil palmilato	Á.Oleico/ Óleo Soja	ATRA	Tween 80/ Lecitina	Emulsificação	-57,02±1,55	Chinsriwongkul et al., 2011
GMS	Á.Oleico/ Estasan	Hesperetina	Tween 80	Corte mecânico	-5,42±0,34	Fathi et al., 2013
GMS	Á.Oleico / MCT	Bufadienolides	Lipoid E-80/ Poloxamer 188/ DS	Emulsificação	-17,5±2,5	Li et al., 2010
GMS	Miglyol	Vimpoetina	Poloxamer 188/ Lecitina	HPH Quente	-23,5±0,7	Zhuang et al., 2010
Comprito 1888	α-Tocoferol	-	Poloxamer 188/ DS	HPH Quente	-14,4±0,8	Souto & Müller 2005
GMS	MCT	Silibina	Poloxamer 188/ Lecitina	Emulsão Evaporação	-20,7±1,5	Jia et al., 2010

S.A: Substância Ativa; MCT: Triacilglicerol de cadeia média; GMS: Monoestearato de glicerol; ATRA: Ácido trans retinóico; DS: Desoxicolato de Sódio.

## 4.5. Controlo de pH

O controlo de pH das amostras de nanotransportadores em estudo é importante uma vez que pode ser indicador de alterações na estabilidade dos nanotransportadores (Schaffazick et al., 2003).

O valor de pH foi medido durante 3 dias consecutivos após a produção dos nanotransportadores. A Tabela 13 apresenta os valores de pH dos 4 nanotransportadores em estudo.

**Tabela 13:** Valores de pH dos 4 nanotransportadores em estudo, medidos durante 3 dias.

Amostras de nanotransportadores	Dia 1	Dia 2	Dia 3
NE	6,27 ± 0,26	6,23 ± 0,25	6,1 ± 0,21
NC	5,78 ± 0,94	5,78 ± 0,95	5,73 ± 0,91
NLC	4,74 ± 0,06	4,73 ± 0,05	4,79 ± 0,07
Lip *	7,24 ± 0,50	6,76 ± 0,26	6,52 ± 0,39

Os resultados são expressos em média ± DP de 5 experiências independentes ( $n=5$ ). \* Os resultados são expressos em média ± DP de 4 experiências independentes ( $n=4$ ).

Para cada nanotransportador, os valores de pH foram similares entre si durante os 3 dias de controlo, indicando assim que estas partículas possivelmente não sofreram alterações nas suas estruturas.

## Capítulo 5 – Conclusão

Neste trabalho, foram preparados 4 tipos de nanotransportadores, nomeadamente nanoesferas e nanocápsulas (pelo método de nanoprecipitação), lipossomas (pelo método de Hidratação do filme lipídico seguido de extrusão mecânica) e Transportadores lipídicos nanoestruturados (pelo método de homogeneização a alta pressão a quente). Para cada nanotransportador foram realizados diferentes ensaios, independentes em diferentes dias, e efetuada a respetiva caracterização físico-química no que respeita a concentração final da amostra (partículas/mL) (através da técnica NTA), tamanho hidrodinâmico médio e índice de polidispersão (através da técnica DLS), potencial Zeta e pH. Verificou-se que para as formulações e métodos selecionados, os nanotransportadores que apresentaram maior concentração foram os Lipossomas. Apesar dos valores de concentração serem por vezes discrepantes entre os diferentes ensaios para o mesmo nanotransportador, os tamanhos de partícula obtidos foram semelhantes. Os nanotransportadores mais pequenos foram as NE, sendo as NC e os NLC os de maior dimensão. As NC e NE apresentaram Pdi  $<0,1$  sugerindo uma distribuição de tamanho de partículas unimodal e monodispersa. As NC e NE foram os nanotransportadores que apresentaram uma menor variabilidade intra-grupo (tamanho e Pdi) sugerindo uma maior repetibilidade do método de preparação e da formulação destas partículas. Comparativamente aos resultados obtidos pela técnica NTA, verificou-se que os resultados obtidos por DLS foram de uma maneira geral muito similares e concordantes no que respeita o tamanho médio das partículas das amostras em estudo.

O valor absoluto de Potencial Zeta foi  $< 25$  mV para todas as amostras, o que poderá indicar estabilidade física de curto prazo e alguma tendência em formar agregados, especialmente no caso dos lipossomas, os quais apresentaram o valor médio mais baixo entre todos os NT estudados (-6,9 mV).

Também se pode verificar que todos os nanotransportadores apresentaram potencial Zeta negativo, o qual se deve à composição de cada um dos nanotransportadores em estudo, isto é, a componentes das formulações com carga negativa.

No que respeita o pH, verificaram-se valores similares durante os 3 dias de controlo, sugerindo a inexistência de alterações nas estruturas dos nanotransportadores.

Como sugestão de trabalhos futuros, propõe-se realizar a medição do tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta das partículas ao longo do tempo de forma a verificar a sua estabilidade a curto, médio e longo prazo. Seria também importante proceder-se à caracterização dos nanotransportadores em estudo recorrendo a outras técnicas, como a microscopia eletrónica de varrimento (SEM), a fim de comparar e consolidar os resultados obtidos, uma vez que esta técnica permite a visualização das partículas (aspeto tridimensional) e permite obter informações quanto à forma, tamanho e a diferenciação dos nanotransportadores. Outro aspeto que seria interessante estudar no futuro, seria a otimização da formulação de NLC uma vez que estas foram os nanotransportadores que apresentaram resultados menos satisfatórios no que respeita a repetibilidade de tamanho e Pdi.

## Referências

Abitec. (2013). URL: [http://www.abiteccorp.com/wp-content/files\\_mf/1363119852355EPNFI5.pdf](http://www.abiteccorp.com/wp-content/files_mf/1363119852355EPNFI5.pdf), consultado a 20 de Julho de 2013.

Acharya S., Sahoo S.K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63:170–183.

Ameller T., Marsaud V., Legrand P., Gref R., Barratt G., Renoir J. (2003). Polyester–Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with the Pure Antiestrogen RU 58668: Physicochemical and Opsonization Properties. *Pharmaceutical Research*. 20:1063-1070.

Aoki H., Tottori T., Sakurai F., Fuji K., Miyajima K. (1997). Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats. *International Journal of Pharmaceutics*,156:163-174.

Batista C.M., Carvalho C.M.B., Magalhães N.S.S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado de arte. *Revista de Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43:167-179.

Brookhaven Instruments Corporation. (2013). URL: [http://www.brookhaveninstruments.com/products/zeta\\_potential/p\\_ZP\\_overview.html](http://www.brookhaveninstruments.com/products/zeta_potential/p_ZP_overview.html), consultado a 31 de Julho de 2013.

Carr B., Wright M. (2012). Nanoparticle Tracking Analysis. A Review of Applications and Usage 2010 – 2012. *NanoSight Ltd*. 5-27.

Cauchetier E., Deniau M., Fessi H., Astier A., Paul M. (2003). Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 250:273-281.

Chau C.F., Wu S.H., Yen G.C, (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, 18:269-280.

Chinsriwongkul A., Chareanputtakhun P., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Sila-on W., Ruktanonchai U., Opanasopit P. (2011). Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Parenteral Delivery of an Anticancer Drug. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 13:150-158.

Conceição A., Matos C., Moutinho C. (2009). Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, Universidade Fernando Pessoa, 6:50-59.

Couvreur P., Barrat G., Fattal E., Legrand P., Vauthier C. (2002). Nanocapsule technology: a review, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19:99–134.

Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41: 2-13.

Cunha A.S., Ligorio S.F., Carneiro L.B., Orefice F. (2003). Microemulsoes como veiculo de drogas para administração ocular tópica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 66:385-391.

Date A. A., Joshi M.D., Patravale V. B. (2007). Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59:505–521.

Domb A.J., Kumar N., Sherskin T., Betonila A., Stager J., Teomim D. (2002). Biodegradable polymers as drug carrier systems. In: Dimitriu, S. *Polymeric Biomaterials*. 2a Edição, Marcel Dekker. Basel, Switzerland.

Domingos R., Baalousham A., Ju-Nam., Reidm M., Tufenkji N., Lead J., Leppard G.G., Wilkinson K.J. (2009). Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology*. 43:7277–7284.

Donbrow, M. (1991). In: Microcapsules and Nanoparticules in Medicine e Pharmacy. *CRC Press, Boca Raton, USA*, 1-13.

Du B., Li Y., Li X., Youmei A., Chen C., Zhang Z. (2010). Preparation, characterization and in vivo evaluation of 2-methoxyestradiol-loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 384:140-147.

Dunne M., Bibby D.C., Jones J.C., Cudmore S. (2003). Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *Journal of Controlled Release*, 92:209-219.

Edwards K. A., Baeumner A. J. (2006). Liposomes in analyses. *Talanta*, 68: 1432-1441.

Eidi H., Joubert O., Attik G., Duval R. E., Bottin M. C., Hamouia A., Maincent P., Rihm B. H. (2010). Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 396:156-165

Fathi M., Varshosaz J., Mohebbi M., Shahidi F. (2013). Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food Bioprocess Technology*, 6:1464-1475.

Ferreira C.M. (2006). Utilização de lipossomas como modelos de biomembranas na avaliação e quantificação da atividade de anti-inflamatórios. Tese Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P.H., Ammoury N., Benita S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, 55:1-4.

Feynman R.P. (1992). "There's plenty of room at the bottom". *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1:60-64.

Fortunato, E. (2005) As metas da nanotecnologia: Aplicações e Implicações. Departamento de Ciência dos Materiais - Universidade Nova de Lisboa – FCT, Lisboa.

Gasco M.R. (1993). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, US Patent No. 5250236.

- Gasco M.R. (2007). Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 377-378.
- Gaumet M., Vargas A., Gurny R., Delie F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69:1– 9.
- Gregoriadis G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech*, 13:527-537.
- Griffin W.C. (1949). Classification of Surface Active Agents by HLB. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1:311-326.
- Griffin W.C. (1954). Calculation of HLB values of Nonionic Surfactants, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 5:249-256.
- Gu Q., Zou A., Yuan C., Guo R. (2003). Effects of a bolaamphiphile on the structure of phosphatidylcholine liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 266:442-447.
- Guterres S.S., Alves M.P., Pohlmann, A.R. (2007). Polymeric Nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2:147-157.
- Guterres SS., Fessi H., Barratt G., Puisieux F., Devissaguet J-P. (1995). Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Containing Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs - Gastrointestinal Tolerance Following Intravenous And Oral-Administration. *Pharmaceutical Research*, 12: 1-3.
- Hasselov M., Readman J. W., Ranville J. F., Tiede K. (2008). Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17:344–361.
- Hayashi M.C.P.I., Furnival A.C.M., Hayashi M.R.M., Silva M.R. Lima M.Y. (2006) Em direção à construção de indicadores regionais de nanociência e nanotecnologia. *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*, 2:85-127.

- Jia L., Zhang D., Li Z., Duan C., Wang Y., Feng F., Wang F., Liu Y., Zhang Q. (2010). Nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of silybin: Biodistribution and pharmacokinetic studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80:213-218.
- Lachman L., Liederman H.A., Kaning, J.L. (2001). The theory and practice of industrial pharmacy, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal.
- Lasic D. D., Papahadjopoulos D. (1998b). In: Medical Application of Liposomes. *Elsevier Science Publishers B*. 451-453. Amsterdam, Netherlands.
- Lasic D.D. (1993). In: Liposomes: from physics to applications. 1<sup>a</sup> ed. Elsevier Science Publishers, Amesterdam, Netherlands.
- Lasic D.D. (1997). In: Liposomes in Gene Delivery. *CRC Press INC*, Amsterdam, Netherlands.
- Lasic D.D. (1998a). Novel application of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16:307-321.
- Li F., Weng Y., Wang L., He H., Yang J., Tang X. (2010). The efficacy and safety of bufadienolides-loaded nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 393:203-2011.
- Lima E M., Oliveira A G. (2002). Tissue Tolerance of Diclofenac Sodium Encapsulated in Liposomes After Intramuscular Administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28:673-680.
- Limayem I., Charcosset C., Sfar S., Fessi H. (2006). Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, 325:124–131.
- Malvern Instruments. (2013). URL: [http:// www.malvern.com/labeng/technology/dynamic\\_light\\_scattering/dynamic\\_light\\_scattering.htm](http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm), consultado a 31 de Julho de 2013.
- Malvern Instruments. (2013a). URL: [http:// www.malvern.com/labeng/technology/dynamic\\_light\\_scattering/dynamic\\_light\\_scattering.htm](http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm), consultado a 31 de Julho de 2013.

Malvern Instruments. (2013b). Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. URL: [http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01\\_An\\_Introduction\\_to\\_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf), consultado a 31 de Julho de 2013.

Malvern Instruments. (2013c). URL: [http://www.malvern.com/labeng/technology/zeta\\_potential/zeta\\_potential\\_LDE.htm](http://www.malvern.com/labeng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm), consultado a 31 de Julho de 2013.

Malvern Instruments. (2013d). URL: <http://www.malvern.com/common/downloads/MRK1839.pdf>, consultado a 31 de Julho de 2013.

Marques I., Lopes C., Souto B. (2009). Novos sistemas terapêuticos nanotecnológicos. *Revista da Faculdade de ciências da saúde*. 6:60-68.

Marques R.I. (2009). Projeto em Ciências Farmacêuticas. Novos Sistemas Terapêuticos Nanotecnológicos. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde do Porto.

Martins S., Sarmiento B., Ferreira D.C., Souto E.B. (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 4:595-607.

Mehnert W., Mader K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47:165–196.

Mishra P. R., Al Shaal L., Müller R. H., Keck C. M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 371:182–189

Mitria K., Shegokar R., Gohla S., Anselmi C., Müller R. (2011). Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*. 414:267-275.

Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385:113-142.

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

Müller R.H., Mader K., Gohla S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50:161-177.

Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A. (2002a). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242:121–128.

Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A. (2002b) Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:S131-S155.

NanoSight. (2013a). URL: <http://www.nanosight.com/technology/nta-software>. consultado a 31 de Julho de 2013.

NanoSight. (2013b). Applications of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in Nanoparticle Research. URL: <http://www.nanosight.com/appnotes/M110B%20Application%20Review%20NTA%20April%202009.pdf> , consultado a 31 de Julho de 2013.

New R.R.C. (1990). Liposomes - a practical approach. *Oxford University Press*. New York, USA.

Ourique A F., Pohlmann A R., Guterres S S., Beckd R C R. (2008). Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, 352:1-4.

Panyam J., Labhasetwar V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 329-347.

Panyam J., Sahoo S. K., Prabha S, Bargar T., Labhasetwar V. (2003). Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 262:1–11.

Park, K. (2007) Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 120:1-3.

Pimentel L., Júnior A., Mosqueira V., Magalhães N. (2007). Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43:503-514.

Pires P.A.R. (2002). Síntese e propriedades de soluções de tensoativos catiónicos derivados de (3-dimetilaminopropil) amidas de ácidos carboxílicos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Pitt C.G., Gratzel M.M., Kimmel G.L., Surles J., Sohindler A. (1981). Aliphatic polyesters; part 2: The degradation of poly(d,l-lactide), poly( $\epsilon$ -caprolactone) and their copolymers in vivo. *Biomaterials*, 2:215-220.

Puisieux F., Barrat G., Couarraze G., Couvreur P., Devissaguet J. P., Dubernet C., Fattal E., Fessi H., Vauthier C., Benita S. (1994). Polymeric micro and nanoparticles as drug carriers. In: *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker Inc, 749–94. New York, USA.

Puri S., Kallinteri P., Higgins S., Hutcheon G. A., Garnett M. C. (2007). Drug incorporation and release of water soluble drugs from novel functionalised poly(glyceroladipate) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 125:59-67.

Rao J.P., Geckelera K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36:887-917.

Rawat M., Singh D., Saraf S., Saraf S. (2006). Nanocarriers: Promising vehicles for bioactive drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29:1790-1798.

Reis C.P., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2:8-21.

Ribeiro H.S., Chu B.G., Ichikawa S., Nakajima M. (2008). Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloid*, 22: 12-17

Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y., Pr at, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116:1-27.

- Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E. (2009). In: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6<sup>th</sup> Edition. Pharmaceutical Press. , Washington, USA.
- Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3:20-31.
- Sakata S., Uchida K., Kaetsu I., Kita Y. (2007). Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry*, 76:733-737.
- Schaffazick S.R., Guterres S.S., Freitas L.L., Pohlmann A.R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26:726-737.
- Sharma A, Sharma U.S. (1997). Liposome in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154:123-140.
- Shidhaye S., Vaidya R., Sutar S., Patwardhan A., Kadam V. (2008). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers – Innovative Generations of Solid Lipid Carriers. *Current Drug Delivery*, 5:324-331.
- Sigma-Aldrich. (2013a). URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744?lang=pt&region=BR>, consultado a 20 de Julho de 2013.
- Sigma-Aldrich. (2013b). URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s7010?lang=pt&region=BR>, consultado a 20 de Julho de 2013.
- Silva G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61:216-220.
- Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A. (2004). Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278: 1-23.
- Sosnik A., Carcaboso Á. M., Glisoni R. J., Moretton M. A., Chiappetta D. A. (2010). New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:547–559.

Souto E B., Muller R H. (2005). SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *Journal of Microencapsulation*, 22:501:510.

Souto E.B., Müller R.H. (2008). Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>). *International Journal of Cosmetic Science*, 30:157-165.

Steichen S.D., Caldorera-Moore M., Peppas N.A. (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48:416–427.

Tadros T.F. (2005). In: Applied Surfactants Principles and Applications, Wiley-VCH, Berkshire, United Kingdom.

Tamjidi F., Shahedi M., Varshosaz J., Nasirpour A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19:29–43.

Tao, S.L.; Desai, T.A. (2003) Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:315-328.

Tewa-Tagne P., Briançon S., Fessi H. (2006). Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 325:63-74.

Torchilin V. P. (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery*, 58:1532-1555.

Torchilin V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4:145-160.

Torrecilla D., Lozano M., Lallana E., Neissa J., Novoa-Carballal R., Vidal A., Fernandez-Megia E., Torres D., Riguera R., Alonso M., Dominguez F. (2013). Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly(ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83:330-337.

Vemuri S., Rhodes C.T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70:95-111.

Vergera L. M., Fluckigera L., Kimb Y., Hoffmana M., Maincenta P. (1998). Preparation and characterization of nanoparticles containing na antihypertensive agent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48:137-143.

Verma R.K.; Garg S. (2001). Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmacology Technology*. 25:1-4.

Wissing S.A., Kayser O., Müller R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56:1257–1272.

Woodruff M.A., Hutmacher D.W. (2010). The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 35:1217-1256.

Woodward S.C., Brewer P.S., Moatamed F., Schindler A., Pitt C.G.(1985). The intracellular degradation of poly ( $\epsilon$  -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research*, 19:437–444.

Zhuang C., Li N., Wang M., Zhang X., Pan W., Peng J., Pan Y., Tang X. (2010). Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 394:179-185.

Zili Z., Sfar S., Fessi H. (2005). Preparation and characterization of poly-e-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, 294:261-267.