



**Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas**

*Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles*

**Priscyla D. Marcato<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, Unicamp,  
CEP: 13084-862, C.P. 6154-Campinas-SP-Brasil,

Autor para correspondência: priscyla@iqm.unicamp.br

*Recebido em 08/01/2009 - Aceito em 19/01/2009*

**RESUMO:** Carreadores nanoparticulados como lipossomas, emulsões (óleo em água), nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas são extensivamente investigados por promoverem muitas vantagens em relação às formulações tradicionais como, por exemplo, a liberação sustentada de ativos, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar a estabilidade física e química moléculas lábeis, minimizar os efeitos colaterais entre outras. Dentre estes carreadores destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas que apresentam várias vantagens em relação aos demais carreadores como, por exemplo, menor toxicidade, facilidade de produção em larga escala, maior estabilidade durante a estocagem e maior estabilidade durante o processo de esterilização. Este carreador foi desenvolvido nos anos 90 apresentando diversos métodos de preparação, assim como diferentes estruturas, tendo aplicação tanto na área farmacêutica quanto na área cosmética. Neste trabalho, serão abordados os métodos de preparação e caracterização de diferentes estruturas de nanopartículas lipídicas sólidas, assim como possíveis aplicações deste carreador.

**PALAVRAS-CHAVES:** Nanotecnologia, Nanopartículas, Fármacos, Cosméticos.

**ABSTRACT:** Nanoparticulated carriers as liposomas, emulsions (oil in water), polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles are extensively investigated since they exhibit many advantages regarding the traditional formulations, such as, active sustained release, solubilize lipophilic active, increase the physical and chemical stability of

unstable molecules, minimize the collateral effects etc. Among these carries highlight the solid lipid nanoparticles present several advantages in relation to others carries as, for example, smaller toxicity, easily production on scale up, larger stability during the stock and larger stability during the sterilization process. This carries was developed in the 90's presenting several preparation methods, as well as different structures, having application in the pharmaceutical and as in the cosmetic areas. In this work, will be boarded the preparation methods and characterization of different structures of solid lipid nanoparticles, as well as possible applications of these carries.

**KEYWORDS:** Nanotechnology, Nanoparticles, Drugs, Cosmetics.

## 1. INTRODUÇÃO

Sistemas carreadores coloidais, como nanopartículas, nanoemulsões, lipossomas, nanosuspensões e micelas têm atraído à atenção nos últimos anos por diminuírem a toxicidade de ativos, solubilizarem ativos lipofílicos e manterem o efeito do ativo no tecido alvo, entre outras vantagens (MEHNERT E MADER, 2001).

Uns dos primeiros carreadores desenvolvidos foram os lipossomas que são vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidios. A adição de compostos naturais como polietilenoglicol (PEG) na superfície dos lipossomas possibilita o aumento do tempo de permanência deste carreador na corrente sanguínea por minimizar a sua captura por macrófagos. No mercado já existe um produto composto por lipossoma PEGlado, que contém o ativo anfotericina B encapsulado, vendido como Ambisome®. Entretanto, os lipossomas apresentam problemas de estabilidade físico-química. Desta forma, os lipossomas podem se agregar durante o processo de estocagem (MARCATO E DURÁN, 2008).

Posteriormente foram desenvolvidos os nanocarreadores poliméricos, que são constituídos de polímeros naturais ou sintéticos. Uma das vantagens deste sistema é a variabilidade de polímeros biodegradáveis que podem ser utilizados como material de cobertura das partículas. Além disto, é possível modificar quimicamente a estrutura do

polímero, incluindo a síntese de copolímeros. Esta modificação pode diminuir a toxicidade dos polímeros e pode direcionar as partículas para alvos específicos. Entretanto, este sistema nanoestruturado apresenta desvantagens como, por exemplo, presença de solvente orgânico residual usado no processo de produção destas partículas, citotoxicidade dos polímeros e escalonamento do processo de produção (MARCATO E DURÁN, 2008).

Outro tipo de nanocarreador são as nanoemulsões lipídicas que foram introduzidas nos anos 50 em produtos de nutrição parenteral. Nos últimos anos, este carreador passou a ser utilizado no transporte de fármacos lipofílicos como, por exemplo, o diazepam, vendido como Diazepam-Lipuro® injetável, para aplicação intravenosa e intramuscular. As vantagens das nanoemulsões incluem segurança toxicológica e o fácil escalonamento da produção deste carreador por homogeneização à alta pressão. Porém, a possibilidade do uso de nanoemulsões como sistema de liberação sustentada é limitado devido o seu reduzido diâmetro e o seu estado líquido o que promove, em muitos casos, uma rápida liberação do ativo. Para minimizar este efeito, as nanoemulsões são utilizadas no transporte de ativos muito hidrofóbicos com um coeficiente de partição octanol/água maior que 1000.000:1 (MEHNERT E MADER, 2001). Para minimizar esta rápida liberação do ativo, sistemas de liberação

sustentada têm sido produzidos com lipídios sólidos. Lipídios sólidos têm sido usados por vários anos na forma de peletes para retardar a liberação de ativos após a administração oral como, por exemplo, no caso do produto Mucosolvan® Retard Capsules (MEHNERT E MADER, 2001). Nesta linha, esta revisão

## **2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)**

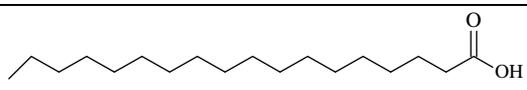
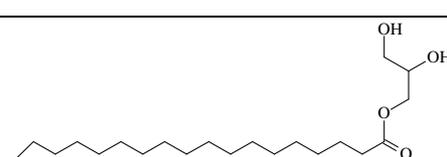
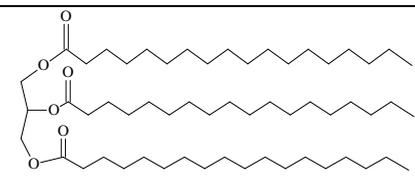
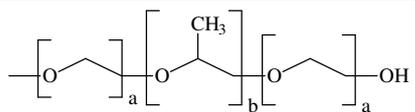
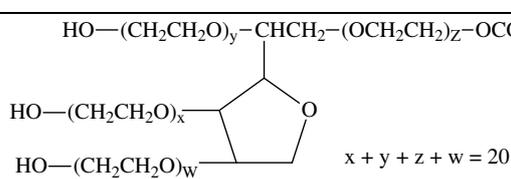
Em 1996, Müller e Lucks introduziram o termo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) ao patentarem um método de produção de NLS por homogeneização à alta pressão (MÜLLER E LUCKS, 1996). As NLS usualmente consistem de ingredientes bem toleráveis fisiologicamente e já aprovados para aplicações farmacêuticas em humanos, apresentando 10-100 vezes menos toxicidade do que as partículas poliméricas. Além disto, as NLS podem ser facilmente produzidas em larga escala, têm boa capacidade de estocagem, - apresentando estabilidade de até 3 anos - podem ser esterilizadas em autoclave sem perderem a forma esférica e sem um significativo aumento no tamanho das partículas e têm um largo espectro de vias de administração que incluem parenteral, oral, oftálmica e tópica (PEDERSEN et al., 2006; CAVALLI et al., 1997). A tabela 1 mostra exemplos de lipídios e estabilizantes utilizados em preparação de NLS.

As nanopartículas lipídicas podem ser classificadas em três diferentes

tem como objetivo mostrar o desenvolvimento das partículas lipídicas sólidas assim como os métodos de produção e caracterização destas partículas e a sua aplicação nas áreas farmacológicas e cosméticas. Para isto, foi realizada uma busca dos principais artigos nesta área incluindo artigos de revisão.

estruturas: nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e conjugado fármaco-lipídio (CFL). As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal, e estabilizadas por tensoativos. Os lipídios utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, mistura de glicerídeos ou ceras. A desvantagem dessa estrutura é a sua baixa capacidade de encapsulamento que varia de 25-50% dependendo da solubilidade do ativo na matriz lipídica, do método utilizado e do estado polimórfico da matriz lipídica. A utilização de lipídios muito semelhantes gera cristais perfeitos. Como o fármaco se localiza entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais diminui a eficiência de encapsulamento (Figura 1A). Para minimizar este efeito, utilizam-se lipídios complexos como mono-di-triglicerídeos (Tabela 1). Entretanto, o ativo pode ser expulso da partícula após a transição polimórfica da forma  $\alpha$  para a modificação mais estável  $\beta$ . Este processo pode ocorrer durante a estocagem da dispersão (Figura 1B) (MÜLLER et al., 2007; MÜLLER et al., 2000).

**Tabela 1:** Lipídios e estabilizantes utilizados na preparação de nanopartículas lipídicas sólidas.

LIPÍDIO	ESTRUTURA
Ácido Esteárico	
Monoestearato de Glicerila	
Triestearina	
SURFACTANTE	ESTRUTURA
Poloxamer F68	 <p>a = 30 unidades b = 75 unidades</p>
Polissorbato 80	 <p><math>x + y + z + w = 20</math></p>

Para melhorar a eficiência de encapsulamento e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, no final dos anos 90, surgiram os CLN (carreadores lipídicos nanoestruturados) que apresentam 3 diferentes estruturas (WISSING et al., 2004). O primeiro modelo consiste na mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos. Esta mistura aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos

ocasionando imperfeições no cristal. Estas imperfeições geram mais espaço para acomodar mais ativo aumento, desta maneira, a eficiência de encapsulamento. Este modelo é conhecido como "CLN imperfeito" (Figura 1C). O segundo modelo é a mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos (óleo) como, por exemplo, Migliol (triglicérido cáprico/caprílico). Este modelo é chamado de "CLN amorfo" no qual, a alta quantidade de óleo misturado

com o lipídio sólido gera partículas em um estado sólido amorfo (Figura 1D). Esta estrutura evita a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, já que o processo de cristalização do lipídio para a forma  $\beta$  não ocorre nessas condições. O terceiro modelo é chamado de "múltiplo CLN" que pode ser considerado um análogo da emulsão água em óleo em

água, isto é, uma dispersão de óleo em lipídio sólido em água (Figura 1E). Neste modelo, a solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida (ÜNER et al., 2007; JENNING et al., 2000).

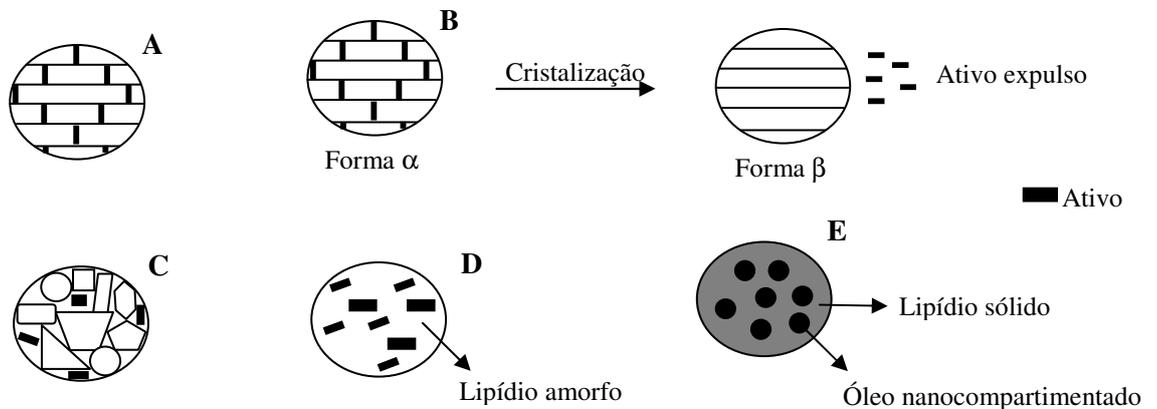


Figura 1: A) NLS, B) Modelo de liberação de ativo durante a estocagem controlada pela transformação da forma  $\alpha$  para  $\beta$ , C) CLN imperfeito, D) CLN amorfo, E) Múltiplo CLN.

Tanto nos CLN quanto nas NLS, a eficiência de encapsulamento de ativos hidrofílicos é muito baixa, o que pode ser aumentada utilizando baixas concentrações do ativo. Em função disto, foi desenvolvido os CFL (conjugado fármaco-lipídio) que podem ser produzidos por dois métodos. O primeiro método é chamado de formação de sal que consiste em dissolver o ativo (sal) e o lipídio em um solvente que é, em seguida, evaporado à baixa pressão. O segundo método é

chamado de ligação covalente, no qual o ativo (sal) e um álcool graxo reagem em presença de um catalisador formando grandes partículas de CFL que são purificados por cristalização. Estas grandes partículas de CFL são misturadas em uma solução de tensoativo e homogeneizadas à alta pressão formando nanopartículas de CFL. Em geral, os CFL possibilitam encapsular mais de 33% de ativos hidrofílicos (WISSING et al., 2004).

### 3. Métodos de Preparação

Existem 5 métodos de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas que incluem microemulsão à quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, spray-drying e homogeneização à alta pressão.

### 3.1. Método de Microemulsão a Quente

O método de microemulsão a quente foi desenvolvido por Gasco e colaboradores e modificado por diversos grupos. As microemulsões são preparadas por agitação, contendo tipicamente: 10%

de lipídio fundido (exemplo: ácido esteárico-Tabela 1), 15% de surfactante (exemplo: Polisorbato 20 ou 60, fosfatidilcolina de soja etc-Tabela 1), acima de 10% de co-surfactante (exemplo: Poloxamer-Tabela 1) e água. O processo de formação das microemulsões está esquematizado na Figura 2. A última etapa deste método é a adição da microemulsão quente em uma solução de surfactante fria resultando na solidificação das nanopartículas lipídicas sólidas (HOU et al., 2003; CORTESI et al., 2002).

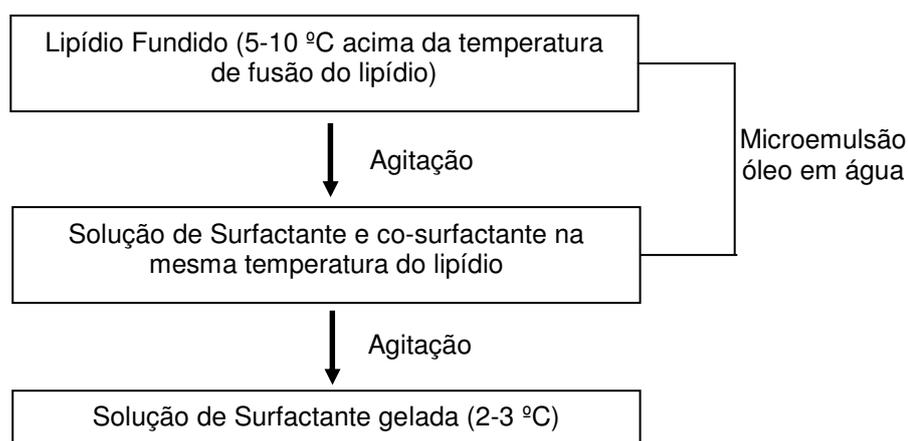


Figura 2: Esquema da preparação de NLS pelo método de microemulsão a quente.

A desvantagem deste método é a remoção do excesso de água – que pode ser retirada por ultracentrifugação, por liofilização ou por diálise - e o uso de altas concentrações de surfactantes (15% m/v) e co-surfactantes (10% m/v) (ÜNER, 2006). HOU et al. (2003) encapsularam mifepristone em NLS pelo método de microemulsão. Foram obtidas partículas de 106 nm e foi verificado por difração de Raio-X e por calorimetria diferencial de varredura (DSC) que as NLS têm um

arranjo cristalino com baixa organização favorecendo a encapsulação do ativo que foi de 87%.

O método de microemulsão é, em geral, utilizado para encapsular ativos lipofílicos, mas ativos hidrofílicos também podem ser encapsulados utilizando emulsão água em óleo em água como esquematizado na Figura 3 (PEDERSEN et al., 2006; HOU et al., 2003; MEHNERT E MADER, 2001). Através deste método, Cortesi et al. (2002) preparam micropartículas lipídicas sólidas de 20 µm

no encapsulamento do ativo hidrofílico cromoglicato de sódio. A eficiência de encapsulamento foi de 50%, e no estudo de liberação *in vitro* em tampão fosfato foi verificado que 100% do ativo foram liberados após de 5 horas.

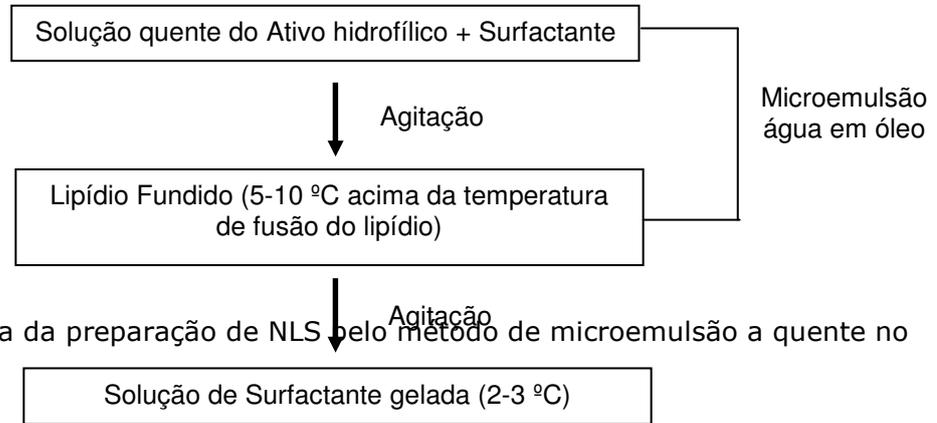


Figura 3: Esquema da preparação de NLS pelo método de microemulsão a quente no

### 3.2. Emulsificação e evaporação de solvente

A Figura 4 mostra o esquema de preparação de NLS pelo método de emulsificação e evaporação de solvente (ÜNER, 2006).

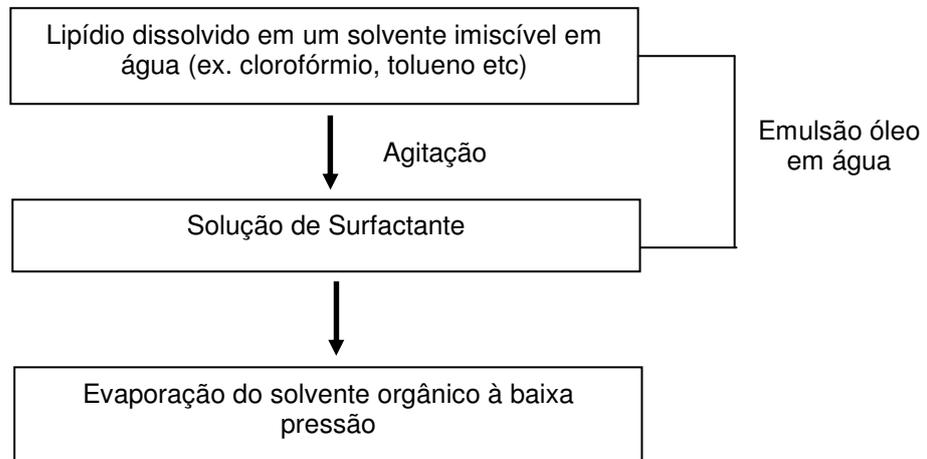


Figura 4: Esquema da preparação de NLS pelo método emulsificação e evaporação de solvente.

Uma das vantagens deste método é o encapsulamento de ativos termosensíveis, pois neste método não é utilizado aquecimento na produção das partículas. Entretanto, apresenta

desvantagens como, por exemplo, solvente residual na dispersão final e o fato das dispersões serem muito diluídas, devido à limitada solubilidade do lipídio no solvente orgânico (WISSING et al., 2004). Outra desvantagem é a produção de

micropartículas lipídicas e não de nanopartículas, o que pode ser revertido utilizando homogeneização à alta pressão ou ultra-som. LUO et al. (2006) utilizando o método de ultra-som/emulsificação e evaporação de solvente prepararam NLS com um diâmetro menor que 100 nm. As partículas foram preparadas dissolvendo o lipídio (monoestearato de glicerila), o ativo e o estabilizante (lecitina de soja) em diclorometano à 50 °C e dispersando esta mistura em água na mesma temperatura. Após a evaporação do diclorometano, a fase aquosa foi adicionada gota à gota à uma fase oleosa à 50 °C sob agitação magnética. Esta emulsão foi sonicada (600W) por 5 minutos utilizando um sonicador de sonda e, em seguida, foi

dispersa em água fria. Partículas de 70 a 200 nm foram obtidas dependendo das condições de preparação encapsulando 98% de ativo (LUO et al., 2006).

### 3.3. Difusão de solvente

O método de difusão e evaporação de solvente foi primeiramente desenvolvido para a preparação de nanopartículas com polímeros sintéticos. Este método é simples e não requer nenhum equipamento especial. Porém, como desvantagens este método inclui o uso de solvente orgânico e a dificuldade de produzir as partículas em larga escala (Figura 5) (CHATTOPADHYAY et al., 2008; HU et al., 2006; HU et al., 2005).

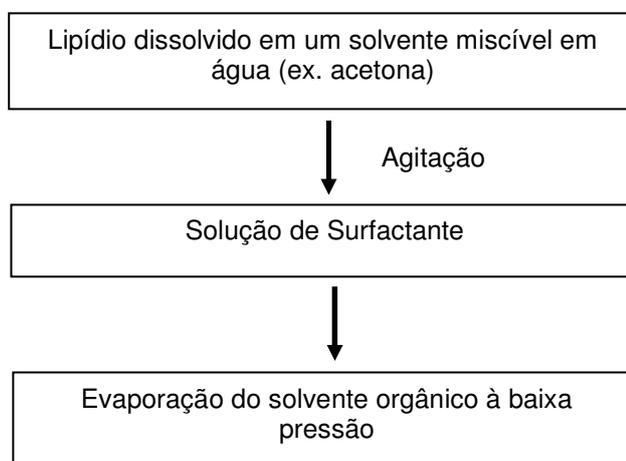


Figura 5: Esquema da preparação de NLS pelo método difusão de solvente.

HU et al. (2006) prepararam, pelo método de difusão de solvente, NLS e CLN, utilizando o lipídio sólido monoestearato de glicerila e o lipídio líquido Migliol. O objetivo deste trabalho foi o

encapsulamento de propionato de clobetasol, um modelo de ativo lipofílico. Neste estudo, os autores observaram que a eficiência de encapsulamento (EE) foi maior nos CLN devido a menor

organização de seu arranjo cristalino. Além disto, a EE aumentou com o aumento da quantidade de lipídio líquido, o que já era esperado, uma vez que a adição de lipídio líquido ocasiona a formação de um cristal imperfeito que pode acomodar mais moléculas de ativo, como discutido anteriormente.

Utilizando este método, HU et al. (2004) encapsularam o peptídeo gonadorelina em NLS com um diâmetro de 422 nm. Poucos trabalhos têm relatado o encapsulamento de peptídeos em NLS devido à dificuldade de encapsular ativos hidrofílicos como peptídeos em matrizes lipofílicas. Os autores observaram que a diminuição da temperatura da fase aquosa contendo PVA de 25 °C para 0 °C aumentou a eficiência de encapsulamento da gonadorelina de 50 para 69%. Este aumento da eficiência de encapsulamento foi atribuído à rápida deposição interfacial do lipídio entre a gota formada (constituída pelo lipídio, solvente orgânico e peptídeo) e o meio aquoso, antes da saída do peptídeo para a fase aquosa. No estudo de liberação *in vitro* foi observada uma liberação bifásica, com um burst nas primeiras 2 horas, seguida por uma liberação sustentada, em que foram liberados 4% do peptídeo por dia durante 14 dias.

### 3.4. Secagem por aspersão

Micropartículas lipídicas sólidas podem ser produzidas pelo processo de secagem por aspersão (spray-drying) que consiste na dissolução do lipídio e do ativo

em um solvente orgânico como, por exemplo, clorofórmio. Em seguida, a solução é aspergida em um aparelho (spray-drier), no qual um fluxo contínuo de ar quente evapora rapidamente o solvente das gotas aspergidas obtendo partículas secas. Para evitar a agregação das partículas e para aumentar a propriedade de fluxo do produto pulverizado, utiliza-se, por exemplo, lecitina juntamente com o lipídio. A rápida evaporação do solvente pode influenciar e modificar a estrutura cristalina das substâncias. Por este motivo foi desenvolvido o congelamento por aspersão (spray-congealing) que consiste em aspergir o lipídio fundido no spray-drier à temperatura ambiente, solidificando e formando as micropartículas lipídicas sólidas. O uso de diferentes velocidades de resfriamento pode ocasionar a cristalização do lipídio em diferentes formas polimórficas (ELDEM et al., 1991).

### 3.5. Homogeneização à alta pressão

Na homogeneização à alta pressão uma dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade estreita (poucos micrômetros), e acelerada em uma curta distância, com alta velocidade (cerca de 100 km/h) ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de nanopartículas com reduzido diâmetro (MEHNERT E MADER, 2001). Nanopartículas lipídicas sólidas podem ser preparadas por esta técnica por dois métodos básicos:

homogeneização à quente e um exemplo de homogeneizador de alta pressão utilizados na produção de NLS.



Figura 6: A) Homogeneizador de Alta pressão da Niro-Soavi (Panda 2k).

No processo de homogeneização à quente, inicialmente, o ativo é dissolvido no lipídio fundido. Em seguida, esta mistura é adicionada em uma solução quente de tensoativo sob alta agitação, formando uma pré-emulsão (óleo em água). Esta pré-emulsão é homogeneizada em um homogeneizador de alta pressão (100-1500 bar) (Figura 7). Em geral, são suficientes um a três ciclos para formar as NLS. Em seguida, esta dispersão é resfriada a uma temperatura abaixo da temperatura ambiente ocasionando a cristalização do lipídio e formação das NLS. Este método é utilizado principalmente no encapsulamento de ativos lipofílicos, isto porque, no caso de ativos hidrofílicos, este migra para a fase aquosa durante a homogeneização resultando em uma baixa eficiência de encapsulamento (TEERANACHAIDEKUL et al., 2008a; ATTAMA E MÜLLER-GOYMANN, 2008).

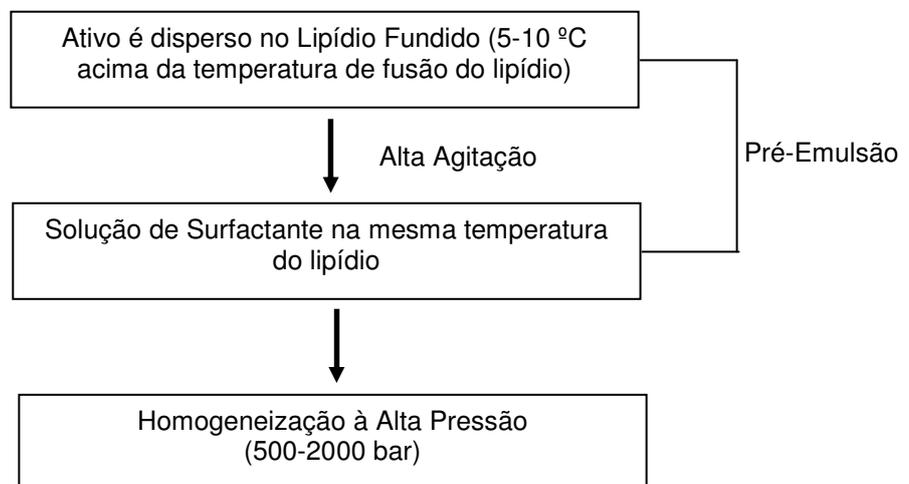


Figura 7: Esquema da preparação de NLS pelo método Homogeneização à Quente.

A Homogeneização à Frio é mais apropriada para ativos hidrofílicos. Neste método, inicialmente, o ativo é dissolvido no lipídio fundido com ou sem surfactante. A adição do surfactante nesta etapa pode aumentar a solubilidade do ativo hidrofílico no lipídio fundido. Em seguida, esta mistura (lipídio+ativo) é solidificada em gelo seco ou nitrogênio líquido para aumentar a fragilidade do lipídio e facilitar o processo de moagem das partículas que é realizado em um moinho de bolas, por exemplo. Após a moagem são obtidas

micropartículas (aproximadamente 50-100  $\mu\text{m}$ ) que são dispersas em uma solução de tensoativo. Em seguida, esta dispersão é homogeneizada a alta pressão à temperatura ambiente ou a 0 °C (Figura 8). O estado sólido da matriz minimiza a migração do ativo hidrofílico para a fase aquosa aumentando a sua eficiência de encapsulação. Ativos termosensíveis podem ser encapsulados por este método, já que o tempo de exposição deste ativo a altas temperaturas é muito curto (DEMIREL et al., 2001).

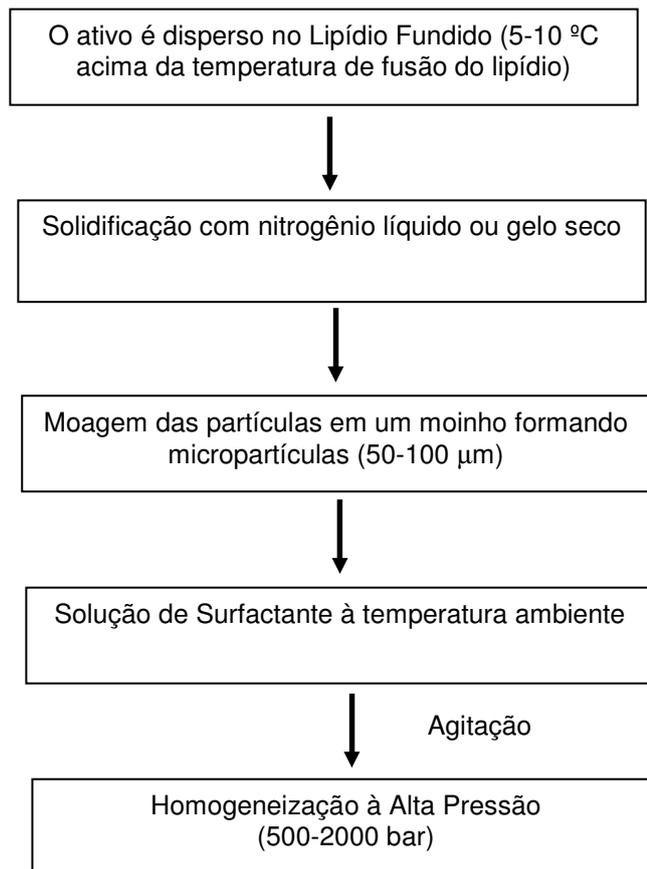


Figura 8: Esquema da preparação de NLS pelo método Homogeneização à Frio.

A maior vantagem da técnica de homogeneização à alta pressão é a possibilidade de produção das

nanopartículas em larga escala, além de produzir estreita faixa de diâmetro de partículas (com baixo número de

micropartículas) e de não utilizar solvente orgânico. Entretanto, a alta temperatura no processo pode aumentar a velocidade de degradação do ativo e do carreador, e modificar a conformação de proteínas, enquanto a alta pressão pode ocasionar a coalescência das partículas (HU et al., 2006).

As nanopartículas lipídicas produzidas por homogeneização à quente produz, em geral, partículas abaixo de 500 nm e poucas micropartículas. Já a homogeneização a frio, produz partículas maiores e com uma distribuição de diâmetro mais larga (ÜNER, 2006). Entretanto, a redução do diâmetro das partículas pode ser obtida aumentando a

pressão de homogeneização e utilizando 3-7 ciclos, tanto na homogeneização à quente quanto à frio. SAKULKHUL et al. (2007) investigaram a influência da pressão e do número de ciclos de homogeneização no diâmetro de NLS produzidas pelo método de homogeneização à quente. Os autores observaram que o aumento da pressão e o aumento do número de ciclos de homogeneização reduziram o diâmetro e o índice de polidispersidade das partículas como mostra a Figura 9. Para este estudo foi escolhida a pressão de 500 bar e 3 ciclos de homogeneização para produzir partículas de 200 nm de diâmetro com índice de polidispersidade de 0,3.

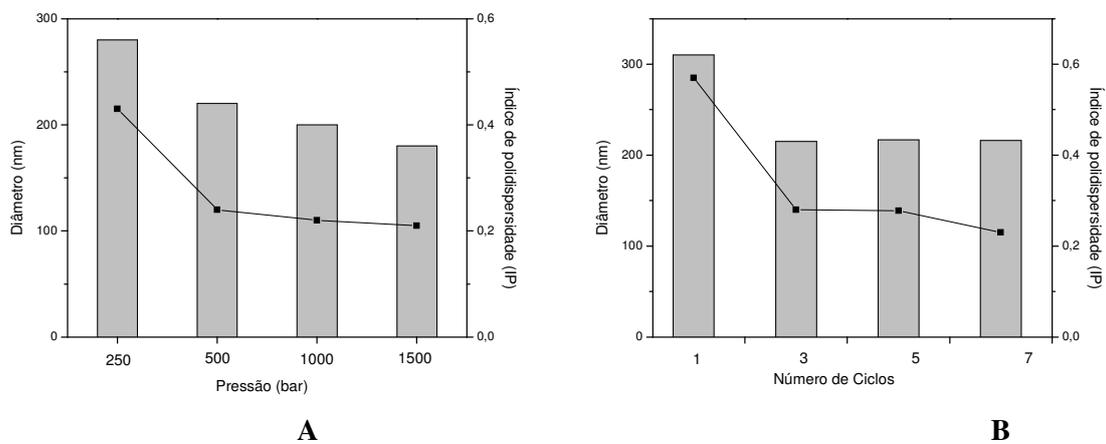


Figura 9: Efeito da: A) Pressão, B) número de ciclos de homogeneização, no diâmetro e no índice de polidispersão (IP) das NLS preparadas pelo método de homogeneização à quente. (Modificada da Ref. SAKULKHUL et al., 2007)

Estudo similar foi realizado por LIU et al. (2007). Neste estudo foi observado que a homogeneização sob pressão de 500 bar produziu partículas de 143 nm, e o aumento do número de ciclos de

homogeneização ocasionou a formação de partículas polidispersas. Entretanto, o aumento da pressão para 1000 bar com um ciclo reduziu o diâmetro das partículas para 37 nm. O aumento do número de

ciclos de homogeneização mantendo a mesma pressão de 1000 bar ocasionou um leve aumento no diâmetro das partículas. Este resultado se deve ao fato de que a homogeneização à alta pressão pode formar pequenas partículas com alta energia cinética que pode levar à sua agregação após o processo de homogeneização. Já para a homogeneização à pressão de 800 bar, os autores obtiveram partículas de 43 nm com uma faixa estreita de diâmetro utilizando 5 ciclos de homogeneização.

Com o método de homogeneização à alta pressão, vários ativos têm sido encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas apresentando grande potencial de incorporação como no encapsulamento da coenzima Q10 (WISSING et al., 2004b), prednisolona (MÜHLEN et al., 1998), mifepristone (HOU et al., 2003), clotrimazole (SOUTO E MÜLLER, 2006).

Dependendo do método de homogeneização (à frio ou à quente) utilizado e das condições de preparação das NLS, o ativo será incorporado de diferentes maneiras dentro das partículas, o que influenciará diretamente na sua liberação. Além disto, o tipo de NLS depende da natureza química do ativo e do lipídio e da solubilidade do ativo no lipídio fundido. A Figura 10 mostra 3 modelos de incorporação. O primeiro modelo é o de matriz homogênea (solução sólida) (Figura 10A). Esta estrutura é obtida na produção de NLS por homogeneização à frio. Neste método, o ativo está molecularmente

disperso no lipídio fundido formando uma mistura. Em seguida, esta mistura é congelada, minimizando o enriquecimento do ativo em diferentes partes da partícula lipídica. O segundo e o terceiro modelo são, respectivamente, o de parede rica em ativo e núcleo rico em ativo (Figura 10 B e C). Estas estruturas são obtidas na produção de NLS pelo método de homogeneização à quente. O modelo de parede rica em ativo é obtido quando se utiliza baixa concentração do ativo no lipídio. Neste caso, durante o processo de resfriamento da nanoemulsão (óleo em água), o lipídio precipita primeiro ocasionando um contínuo aumento da concentração do ativo no lipídio fundido restante. O modelo de núcleo rico em ativo é obtido quando a concentração do ativo no lipídio fundido é alta, atingindo a saturação. No processo de resfriamento das gotas quentes de óleo ocorre, na maioria dos casos, uma redução da solubilidade do ativo no lipídio. Quando a solubilidade excede a saturação, o ativo precipita levando a formação de um núcleo rico em ativo (ÜNER et al., 2007; SOUTO et al., 2004).

A liberação do ativo das NLS está diretamente relacionada com a estrutura das nanopartículas. A liberação do ativo no modelo de parede rica em ativo é mais rápida do que no caso do modelo de núcleo rico em ativo, apresentando um grande burst (rápida liberação inicial do ativo) como mostra a Figura 11 (ÜNER et al., 2007; SOUTO et al., 2004).

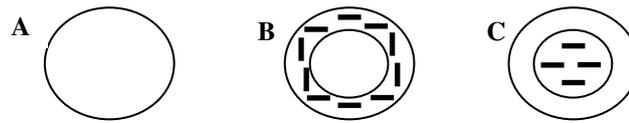


Figura 10: Modelo de incorporação de ativos em NLS: A) Matriz homogênea (solução sólida), B) Parede rica em ativo, C) Núcleo rico em ativo.

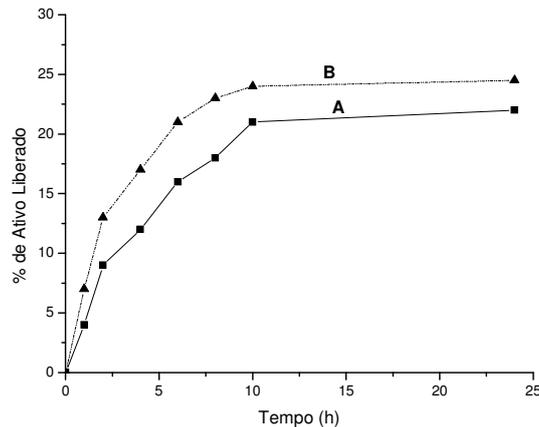


Figura 11: Liberação *in vitro* de ativo encapsulado em NLS: A) Núcleo rico em ativo, B) Parede rica em ativo. (Modificada da Ref. SOUTO et al., 2004).

#### 4. Técnicas de Caracterização

Técnicas microscópicas, Espectroscópicas, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons têm sido utilizadas na caracterização e elucidação da estrutura das nanopartículas lipídicas sólidas. Neste trabalho, serão abordadas as informações que cada uma destas técnicas pode fornecer no estudo de nanopartículas lipídicas sólidas e exemplos destas caracterizações citados na literatura.

##### 4.1. Difração de Raio-X

Os lípidios podem apresentar diferentes formas polimórficas. O polimorfismo é observado devido à

organização das cadeias de alcano nos empacotamentos  $\alpha$  (hexagonal),  $\beta'$  (ortorrômbica) e  $\beta$  (triclínica). O empacotamento hexagonal  $\alpha$  é a forma mais desordenada, a ortorrômbica  $\beta'$  é menos desordenada e o empacotamento triclínico  $\beta$  é o mais organizado. Desta forma, para uma aplicação industrial das partículas lipídicas sólidas é necessário controlar este polimorfismo (BUNJES et al., 2007; ALLAIS, 2003).

A estrutura polimórfica tem influência direta na eficiência de encapsulamento e na expulsão do ativo durante o processo de estocagem sendo, portanto, muito importante a sua caracterização. Uma das técnicas empregadas para caracterizar a estrutura

polimórfica das NLS é a difração de Raio-X, que determina o comprimento dos espaçamentos longos e curtos do retículo lipídico. Além disto, a difração de Raio-X permite diferenciar entre um material amorfo e um material cristalino e serve para avaliar a influência do constituinte óleo nos espaçamentos longos dos nanocristais dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Entretanto, é importante a associação desta técnica com a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), visto que, o DSC permite diferenciar sólidos amorfos e líquidos (RUKTANONCHAI et al., 2008; MEHNERT E MADER, 2001; MÜLLER et al., 2000).

Através da técnica de Difração de Raio-X é possível calcular o espaçamento longo (correspondente a deflexão  $d_{001}$ ) derivado do pequeno ângulo da difração de Raio-X. BUNJES et al. (2007) realizaram este estudo em nanopartículas de

triestearina, e observaram que o espaçamento longo na modificação  $\alpha$  foi de 5,1 nm e 4,5 nm nas amostras contendo nanopartículas na forma  $\beta$ . Resultados similares foram obtidos por Attama et al. (2006) no estudo de CLN de cera de abelha com óleo de teobroma.

A Figura 12 mostra exemplos de padrões de difração de Raio-X do ativo podofilotoxina (POD), do lipídio tripalmitato, de NLS de tripalmitato sem ativo e do POD encapsulado em NLS de tripalmitato (CHEN et al., 2006) Nesta figura pode-se observar que o pico de difração do ativo POD desapareceu quando este foi encapsulado em NLS. Este resultado demonstra que o POD está no estado amorfo nas NLS. Além disto, os autores concluíram que o lipídio tripalmitato estava parcialmente cristalizado devido ao fraco e largo pico de difração.

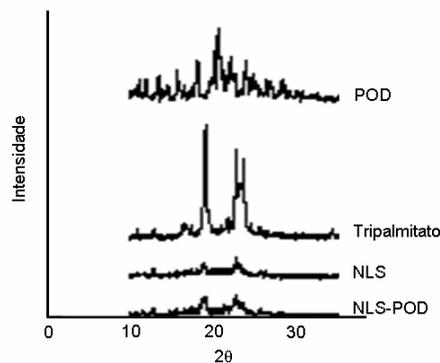


Figura 12: Padrão de difração de Raio-X. (Modificada da Ref CHEN et al., 2006)

#### 4.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é muito importante na caracterização de

nanopartículas lipídicas sólidas, pois fornece informações sobre a cristalinidade das mesmas. O grau de cristalinidade de uma partícula é extremamente importante, porque influencia na eficiência de encapsulamento, na velocidade de liberação do ativo e na expulsão do ativo durante o processo de estocagem. A análise de DSC fornece ainda a temperatura e a entalpia de fusão das partículas. Um valor alto de entalpia de fusão sugere alta organização no retículo cristalino, isto porque a fusão de um cristal altamente organizado (cristal perfeito) requer mais energia para superar as forças de coesão do retículo cristalino do que um cristal pouco ordenado ou amorfo. Além disto, com essa técnica é possível observar o comportamento de cristalização das partículas, que influencia na expulsão ou não do ativo, uma vez que, durante o processo de estocagem o lipídio pode passar da forma  $\alpha$  para a modificação  $\beta'$ , que é convertida rapidamente para a forma  $\beta$ . Com o aumento da formação da modificação mais estável ( $\beta'/\beta$ ), o retículo cristalino torna-se mais perfeito, promovendo a expulsão do ativo das partículas como mostrado na Figura 1B (ATTAMA et al., 2006). Em geral, essa transformação é lenta para triglicerídeos de cadeia longa do que para triglicerídeos de cadeia curta. Fatores que levam a transformação da forma  $\alpha$  para a forma  $\beta$  são: a temperatura, a exposição à luz e a perda de água da dispersão de NLS. Por exemplo, quando as partículas são aplicadas na pele ou no corpo humano, a

alteração da temperatura e a perda de água da dispersão iniciam a transformação da forma  $\alpha$  para a modificação  $\beta$ , liberando o ativo das partículas. Portanto, o controle do ativador da transformação da forma  $\alpha$  para a forma  $\beta$  possibilita a criação de um carreador de ativos inteligente (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008b).

CASTELLI et al. (2005) investigaram, por DSC, a organização e distribuição de lipídios em NLS (nanopartículas lipídicas sólidas) e em CLN (carreadores lipídicos sólidos), assim como a dispersão do ativo lipofílico indometacina nas partículas. As partículas foram preparadas pela técnica de microemulsão, utilizando o lipídio sólido behenato de glicerila e o lipídio líquido Migliol. Os autores observaram que os CLN preparados eram constituídos por nanocompartimentos oleosos dentro da matriz sólida ("múltiplo CLN"). Além disto, foi observado que o ativo possui maior solubilidade no óleo do que na matriz lipídica. Isto porque as curvas de DSC do Migliol sozinho e do Migliol com o ativo não mostraram nenhum pico calorimétrico, implicando na completa dissolução do ativo no óleo. Este resultado também foi observado nos ensaios de liberação cinética, que avalia se um composto em contato com o sistema lipídico em meio aquoso é capaz de migrar ou se difundir através das NLS e se dissolver dentro da fase lipídica. Este teste é realizado incubando o composto com as NLS na mesma temperatura de preparação das partículas. Se a migração ocorrer, ela será

detectada pela mudança da forma do pico calorimétrico, que é devido ao aumento da quantidade do composto dentro das partículas. Neste ensaio, não se observou alteração na forma do pico calorimétrico quando as NLS foram incubadas com o ativo a 80 °C. Entretanto, quando os CLN foram incubados com o ativo na mesma temperatura foi observada uma alteração na forma do pico calorimétrico sugerindo a migração do ativo para dentro das NLS. Este resultado demonstra a alta solubilidade do ativo na fase oleosa (Miglioli).

BUNJES et al. (2007) investigaram a forma e a estrutura das NLS estabilizadas pelo fosfolípido lecitina de

soja. Fosfolípido foi utilizado como estabilizante para preservar por mais tempo a forma  $\alpha$  aumentando, desta forma, a eficiência de encapsulamento e minimizando a expulsão do ativo das partículas durante o processo de estocagem. O lipídio utilizado neste estudo foi a triestearina. Foi observado que as nanopartículas estabilizadas por lecitina de soja S-100 apresentavam-se completamente transformadas na modificação  $\beta$  (Figura 13A). Entretanto, as partículas estabilizadas por lecitina de soja hidrogenada (S100-3) apresentaram uma predominante fração da forma  $\alpha$  (Figura 13B).

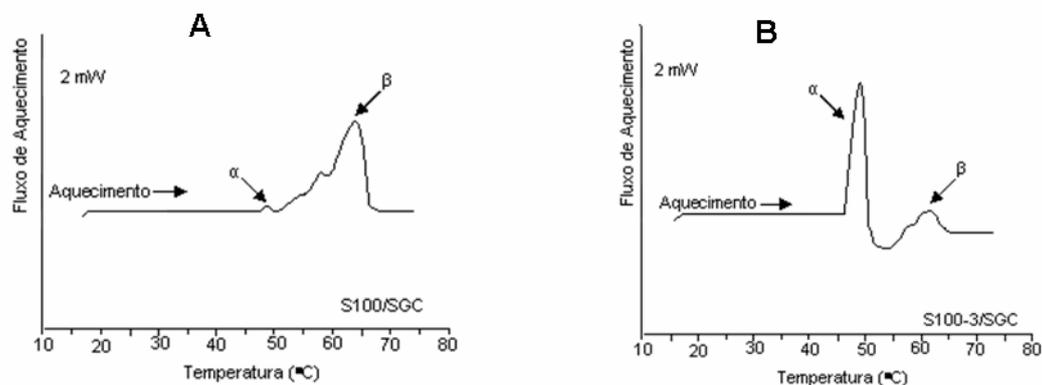


Figura 13: Curva de DSC de aquecimento (10 °C/min) e de resfriamento (5 °C/min) de nanopartículas de triestearina estabilizadas com: A) Lecitina de soja S-100, B) Lecitina de soja hidrogenada S-100-3.(Modificado da Ref. BUNJES et al., 2007)

#### 4.3. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- $H^1$ )

A ressonância magnética nuclear de prótons é uma técnica importante na caracterização de domínios de lipídios líquidos dentro das nanopartículas

lipídicas. Quando o lipídio líquido (óleo) é incorporado na fase lipofílica das NLS, este óleo pode permanecer dentro da partícula no estado líquido mesmo que a partícula esteja no estado sólido. Informações sobre a mobilidade e arranjo das moléculas de

óleo podem ser obtidas pela técnica de espectroscopia de RMN- $H^1$ . Através da técnica de RMN- $H^1$  é possível verificar se um lipídio está no estado líquido ou semi-sólido/sólido através da diferença do tempo de relaxação de prótons no estado líquido e no estado semi-sólido/sólido. Prótons em estado líquido têm um sinal fino e com alta amplitude, enquanto que prótons no estado semi-sólido/sólido têm um sinal fraco e largo (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008a; ÜNER, 2006; MEHNERT E MADER, 2001).

JENNING et al. (2000) investigaram através da técnica de RMN- $H^1$  a estrutura do lipídio líquido (Migliol) dentro da matriz lipídica sólida. Para isto, foram realizados espectros de RMN- $H^1$  de NLS de behenato de glicerila, de CLN de behenato de glicerila com Migliol e de nanoemulsão com apenas Migliol. Os autores observaram que as NLS apresentam um fraco e largo pico entre 0,9 e 2,5 ppm referente aos prótons do lipídio. Este sinal fraco e largo corresponde ao lipídio no estado sólido. Já no caso das nanoemulsões foi observado um sinal fino e de alta amplitude entre 0,9 e 2,5 ppm correspondente ao lipídio líquido. Entretanto, nos espectros dos CLN foi observado um sinal com intensidade e largura intermediário entre os sinais da NLS e da nanoemulsão, demonstrando a incorporação do óleo. Através da RMN- $H^1$  é possível verificar se o sinal dos prótons de lipídio líquido se referente ao lipídio sólido fundido ou ao lipídio líquido, pelo cálculo da razão dos prótons de  $CH_2$  (1,25 ppm) e

$CH_3$  (0,9 ppm). O lipídio sólido behenato de glicerila ( $C_{22}$ ) possui alta razão de prótons  $CH_2/CH_3$  (12,2), enquanto que o lipídio líquido ( $C_{8-12}$ ) possui baixa razão  $CH_2/CH_3$  (3,1). A razão  $CH_2/CH_3$  nos CLN foi abaixo de 3,2, indicando apenas as moléculas do lipídio líquido.

#### 4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Dentre as técnicas microscópicas, a microscopia eletrônica de transmissão tem se mostrado a mais adequada na obtenção de imagens diretas de nanopartículas, possibilitando a determinação da sua distribuição de diâmetro, além da determinação da sua estrutura cristalina, no caso do uso de microscópios de alta resolução (HOU et al., 2003). BUJES et al. (2007) investigaram a estrutura cristalina de nanopartículas lipídicas estabilizadas por lecitina de soja por MET em condições criogênicas. Neste método, o vácuo é substituído por um meio criogênico. O diferencial desta técnica consiste na possibilidade de se avaliar, além da morfologia e do diâmetro das partículas, a lamellaridade e a difração de elétrons em estruturas cristalinas. Na figura 14A, observa-se partículas lipídicas esféricas na forma  $\alpha$ . Estas partículas apresentam camadas concêntricas, sendo que as camadas ficam mais distorcidas em direção ao centro das partículas e com uma alta densidade eletrônica (região mais escura dentro das partículas). Isto acontece devido a grande espessura da partícula nesta área. A distância das listras

foi de 5,2 nm. Na figura 14B, observa-se a estrutura de partículas lipídicas com modificação  $\beta$ . Nesta imagem pode-se observar partículas com forma circular e alongada constituídas por camadas orientadas em paralelo. No interior das partículas podem ser observadas listras regulares escuras com uma distância em

torno de 4,6 nm. A partir destes resultados e dos resultados obtidos por medidas de difração de Raio-X e de calorimetria diferencial de varredura, os autores propuseram um modelo do processo de solidificação das partículas de triestearina estabilizadas por lecitina de soja como mostra a figura 14C.

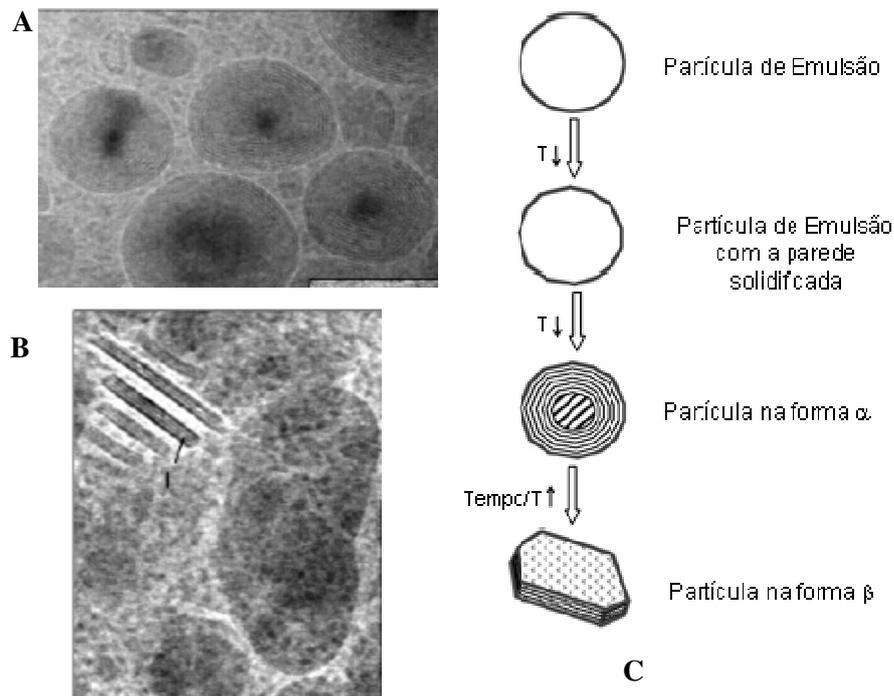


Figura 14: MET criogênica: A) NLS de triestearina na forma  $\alpha$ , B) NLS de triestearina na modificação  $\beta$  e C) Esquema do modelo proposto por Bujes et al. (2007) do processo de solidificação de partículas lipídicas. (Modificada da Ref. BUNJES et al., 2007)

#### 4.5. Microscopia de Força Atômica

O desenvolvimento da técnica de Microscopia de Força Atômica data da década de 1980. Ela envolve o arraste de uma sonda com uma ponta extremamente fina (tip) ao longo da amostra ou muito próxima à sua superfície gerando imagens em 3 dimensões com uma capacidade de resolução de até 0,01 nm. Esta técnica é uma ferramenta chave na obtenção de imagens de materiais moles, sistemas

biológicos e sistemas coloidais. As imagens podem ser obtidas utilizando diferentes modos de análise que são: contato, não-contato e contato intermitente ou dinâmico. A utilização de diferentes modos na aquisição da imagem permite analisar várias propriedades da superfície da amostra, além de detalhar a natureza e o local destas propriedades (SHAHGALDIAN et al., 2003). CHEN et al. (2006) observaram por Microscopia de Força

Atômica as NLS, utilizando o modo de contato intermitente no qual o tip toca periodicamente a superfície do material. Partículas de NLS de tripalmitato com morfologia esférica foram observadas como mostram as imagens de AFM da Figura 15. Nesta imagem, pode ser observada uma pequena diferença entre a largura e altura das partículas, que se deve ao processo de secagem da dispersão

de NLS sobre o suporte de mica. Além disto, não se observa clusters de nanopartículas que é comum em imagens de NLS por Microscopia de Força Atômica. Em geral, clusters de NLS são formados durante a secagem de partículas em alta concentração. Neste estudo, as partículas foram diluídas 80 vezes evitando, desta forma, a formação de clusters.

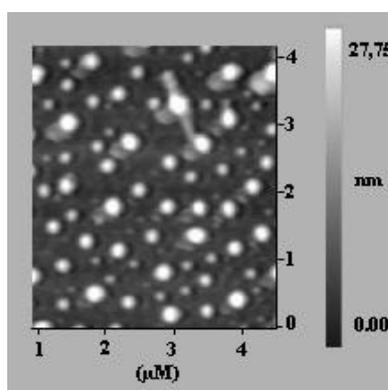


Figura 15: Imagens planar (4x4 $\mu\text{m}$ ) de AFM de NLS (Modificada da Ref. CHEN et al., 2006).

#### 4.6. Espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e Potencial Zeta

O diâmetro e a distribuição das partículas são parâmetros muito importantes na determinação da qualidade da dispersão. Estes parâmetros podem ser medidos por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também chamado de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O PCS é uma técnica de sonda não evasiva de difusão em fluidos complexos. A principal aplicação desta técnica é a medida de diâmetro de partículas de dispersões coloidais diluídas. O PCS mede o movimento Browniano das partículas, de maneira que as determinações do

diâmetro são influenciadas pelas camadas de surfactantes adsorvidas nas partículas assim como pela camada de hidratação. Uma limitação desta técnica é a faixa de diâmetro possível de medir. O DLS só é capaz de medir diâmetro de partículas menores que 3  $\mu\text{m}$  (HANUS E PLOEHN, 1999).

O tamanho das nanopartículas lipídicas é afetado por vários parâmetros, como a composição da formulação (a concentração de surfactante, tipo de lipídio, propriedades do ativo a ser encapsulado etc), método e condições de produção (tempo, temperatura, pressão, esterilização etc). O crescimento das

partículas durante a estocagem é um indicativo da instabilidade do material e, conseqüentemente, da baixa qualidade do produto. Além disto, o aumento do diâmetro das partículas está diretamente relacionado com o índice de recristalização do lipídio que pode passar da forma polimórfica  $\alpha$  para a modificação  $\beta$ . Quanto maior a recristalização do lipídio, mais rápido será o crescimento das partículas. Entretanto, este processo pode ser retardado por semanas, ou até meses. Além disto, o diâmetro das partículas determina a via de administração da formulação. Por exemplo, para administrações intravenosas o diâmetro máximo das partículas é de 5  $\mu\text{m}$  (SAKULKHUL et al., 2007; FREITAS E MÜLLER, 1999).

FREITAS E MÜLLER (1999) investigaram os efeitos das condições de estocagem, como temperatura e exposição à luz, na estabilidade de nanopartículas lipídicas de behenato de glicerila

produzidas por homogeneização à quente. Para avaliar a estabilidade das partículas durante o processo de estocagem, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de correlação de fótons e calorimetria diferencial de varredura. Foi observado que a redução da concentração das NLS na dispersão aumentou sua estabilidade durante a estocagem (Figura 16). Na dispersão de 10% (m/v) de NLS, o diâmetro das partículas aumentou de 770 nm para 23  $\mu\text{m}$  após 3 dias. Já na dispersão de 2% (m/v) de NLS, o diâmetro das partículas não aumentou significativamente. A baixa concentração das nanopartículas diminui a probabilidade de colisão entre elas, reduzindo a agregação das mesmas durante o processo de estocagem. Além disto, foi observado um crescente aumento da cristalinidade das partículas durante o processo de estocagem principalmente na dispersão contendo 10% (m/v) de NLS, resultando no aumento do diâmetro das partículas.

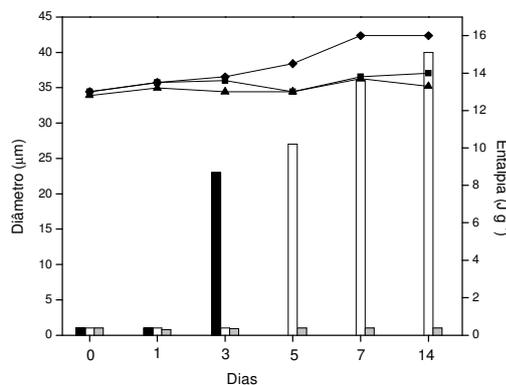


Figura 16: Diâmetro (barras) e entalpia (linhas) de 10%, 5% e 2% (m/v) de NLS: Barra preta (♦) 10%, Barra branca (■) 5% e Barra cinza (▲) 2% estocadas a 20 °C sob agitação por 14 dias. (Modificada da Ref FREITAS E MULLER, 1999).

Além do diâmetro e da distribuição das partículas, o Potencial Zeta (PZ) também é um indicativo da estabilidade das partículas. Em geral, devido à repulsão eletrostática, partículas com carga se agregam menos durante a estocagem. Partículas com PZ maior que  $\pm 30$  mV são requeridas para uma excelente estabilização eletrostática. Entretanto, esta regra não pode ser utilizada em sistemas com estabilizadores estéricos, pois a adsorção destes estabilizadores pode diminuir o PZ (ÜNER et al., 2007).

O aumento da temperatura e a exposição à luz ocasionam o aumento da energia cinética, mudando a cristalinidade das partículas (transformação da forma  $\alpha$  para a modificação  $\beta$ ) ocasionando a agregação das mesmas. A recristalização pode resultar na mudança de carga na superfície e, conseqüentemente, alterar o Potencial Zeta das partículas. A diminuição do Potencial Zeta e, conseqüentemente, na repulsão eletrostática, facilita a agregação das partículas, sendo por isto utilizado como indicativo da estabilidade de uma dispersão (ÜNER et al., 2007; ÜNER, 2006).

LEE et al. (2007) investigaram o efeito da temperatura na estabilidade de NLS de trimiristina estabilizadas por polietilenoglicol (PEG), produzidas através do método de homogeneização à quente. A estabilização foi avaliada através das técnicas de PCS e PZ durante a estocagem

das NLS a 4, 25 e 40 °C. As partículas estocadas a 4 °C não apresentaram mudança significativa de diâmetro e PZ durante 8 semanas. Entretanto, as partículas estocadas a 25 °C tiveram uma significativa alteração do diâmetro após 4 semanas e as partículas estocadas a 40 °C formaram gel dentro de 1-2 semanas. Mas o Potencial Zeta das partículas estocadas a 25 e a 40 °C não sofreu, praticamente, alteração. Este resultado demonstra que a medida de PZ não foi um bom parâmetro, neste caso, para avaliar a estabilidade da dispersão devido, provavelmente, ao fato de que estas partículas foram estabilizadas por um estabilizante estérico (PEG).

## 5. Aplicação

As nanopartículas lipídicas sólidas podem ser utilizadas em aplicações tópicas, intravenosa e em injeções extravasculares (intramuscular, subcutânea e em infiltrações nervosas) (MÜLLER et al., 2000; TOONGSUWAN et al., 2004). Além disto, estas partículas têm sido investigadas no encapsulamento de partículas magnéticas para a detecção de tumores cerebrais (SILVA, 2007). Neste trabalho, será abordado o uso deste carreador na área de cosméticos e fármacos, assim como sua vantagem nestas aplicações.

### 5.1. Cosmético

A via cutânea apresenta-se como uma via de administração bastante

atrativa e acessível para a administração de ativos. Entretanto, a via cutânea é altamente seletiva em relação aos ativos que conseguem difundir passivamente através da camada mais externa da pele, o estrato córneo (GUTERRES et al. 2007; CEVC, 2004). Em vista disto, muitos estudos têm sido realizados no desenvolvimento de carreadores nanoparticulados. Nos últimos 5 anos, a atenção para o uso de nanopartículas lipídicas sólidas na área de cosméticos tem aumentado. Estudos que descrevem o aumento da estabilidade química de compostos cosméticos lábeis utilizando NLS, como retinol (JEE et al., 2006), coenzima Q10 (WISSING et al., 2004b) e derivados de vitamina C (ÜNER et al., 2005) podem ser encontrados na

literatura. Além de aumentar a estabilidade de compostos lábeis, as NLS diminuem a perda de água da pele, aumentando, conseqüentemente, a sua hidratação. Desta forma, as NLS apresentam propriedades oclusivas, mostrando ser mais eficiente, em relação à perda de água, quanto menor for as partículas, como mostra a Figura 17. Além disto, esta propriedade suaviza rugas e aumenta a penetração de compostos em camadas específicas (ÜNER et al., 2007; SOUTO E MULLER, 2008). Outras vantagens deste carreador em cosméticos são: promover liberação sustentada do ativo, reduzir a absorção sistêmica e atuar como um protetor solar físico (ATTAMA et al., 2006)

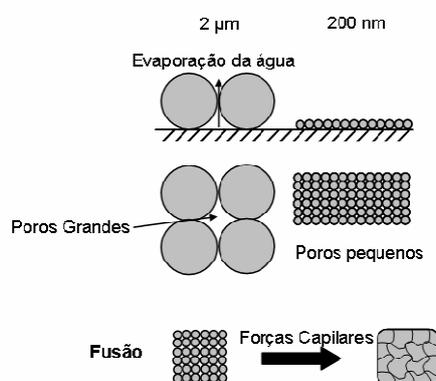


Figura 17: Modelo da formação de filme sobre a pele de partículas lipídicas de 2 µm e de 200 nm e modelo de difusão das nanopartículas para um filme de poucos poros (Modificada da Ref. WISSING E MÜLLER, 2003).

WISSING E MÜLLER (2003) estudaram o aumento da hidratação da pele *in vivo* após 28 dias de tratamento com NLS, comparando-o ao tratamento

com cremes (óleo em água). As partículas foram preparadas pelo método de homogeneização à quente utilizando o lipídio palmitato de cetila. O creme

contendo NLS apresentou maior hidratação do que o creme sem NLS como mostra a Figura 18. Este efeito se deve a formação do filme de NLS. Forças capilares dos poros nanométricos entre as NLS podem promover a fusão das partículas formando um denso filme sobre a pele (Figura 17).

Este estudo demonstra o efeito oclusivo de nanopartículas lipídicas e o possível e eficiente uso deste carreador em cremes cosméticos com o intuito de aumentar a hidratação da pele (SOUTO E MÜLLER, 2008).

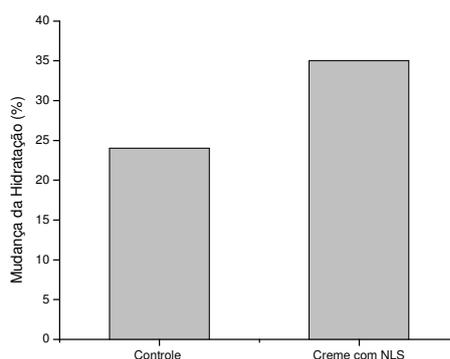


Figura 18: Mudança da hidratação após 28 dias de tratamento (Modificada da Ref. WISSING E MÜLLER, 2003).

BORGI et al. (2005) estudaram a penetração em pele de porco de um corante modelo (vermelho do nilo-VN) em NLS, CLN e nanoemulsões por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. As partículas produzidas pelo método de homogeneização à quente apresentaram diâmetro de 200 nm. A distribuição do corante foi significativamente influenciada pelo tipo de carreador nanoparticulado. Quando o corante encapsulado em NLS foi aplicado, a concentração do corante no estrato córneo, na epiderme e na superfície da derme foi 4 vezes maior em relação ao corante livre em creme. Já no caso dos CLN, foi observado um aumento de 2 vezes em relação ao ativo livre, tanto

para os CLN produzidos com o lipídio líquido ácido oléico, quanto para os produzidos com Migliol. E, no caso das nanoemulsões, não foi observado nenhum aumento da penetração do corante em relação ao ativo livre, ao contrário, após 8 horas de tratamento o nível do corante no estrato córneo foi muito menor do que o corante livre em creme. Este estudo demonstra a eficiência de NLS em aumentar a penetração do corante VN e a possibilidade de acompanhar a penetração de ativos na pele por Microscopia Confocal.

LIU et al. (2007) investigaram o uso de NLS no encapsulamento de isotretinoína, que é um ativo utilizado no tratamento de acne. As NLS foram

preparadas por homogeneização à quente utilizando o lipídio Precirol ATO 5, com o objetivo de diminuir a absorção sistêmica deste ativo e aumentar a sua eficácia no tecido alvo (derme). Foram preparadas partículas de 42 nm e a eficiência de encapsulamento foi de 82%. Para estudar a penetração do ativo, foi utilizado o

sistema de célula de difusão de Franz com pele abdominal de rato (Figura 19). Os autores observaram que o ativo encapsulado evitou a absorção sistêmica, aumentando o tempo de residência do ativo na pele, demonstrando que as NLS são promissores carreadores em aplicações tópicas.

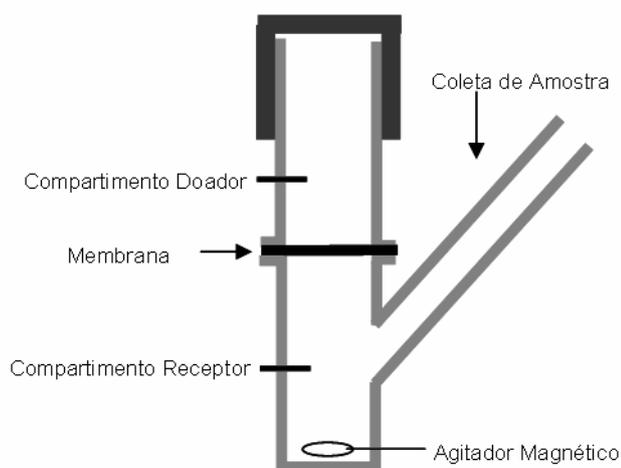


Figura 19: Célula de difusão de Franz.

As NLS são também utilizadas para aumentar a estabilidade de compostos lábeis. JEE et al. (2006) investigaram o uso de NLS no aumento da estabilidade de trans-retinol (AR) que é um composto hidrofóbico da vitamina A. Este composto protege a pele contra radicais livres que causam o envelhecimento precoce e até câncer de pele. Em vistas destas propriedades, o trans-retinol vem sendo estudado em aplicações na área de cosméticos. Entretanto, o seu uso é limitado devido a sua baixa estabilidade química quando exposto ao ar, água ou luz. Desta forma, sistemas nanoparticulados como NLS podem aumentar a sua estabilidade. Neste trabalho de JEE et al. (2006), as NLS foram preparadas pelo método de homogeneização à quente obtendo partículas com diâmetro de 96 nm e com um Potencial Zeta (PZ) de -28 mV. Foi observado que as NLS não foram capazes de estabilizar o ativo AR contra a degradação por exposição à luz. Após 48h, apenas 1% de AR estava intacto sendo que o restante foi oxidado. Esta baixa proteção das NLS contra degradação do ativo AR pode estar relacionada ao tipo de lipídio utilizado, já que em outros estudos foi demonstrado que NLS podem aumentar significativamente a estabilidade de AR. O lipídio utilizado neste estudo (DS-CBS) pode estar se auto-oxidando e o AR encapsulado nas NLS pode estar atuando como um anti-oxidante,

removendo os radicais lipoperoxil, resultando na degradação do AR. Para aumentar a sua estabilidade, foi encapsulado antioxidantes juntamente com o AR em NLS, como Vitamina C, tocoferol e mistura de BHT-BHA (butilato hidroxitolueno-butilato hidroxianisol). Os anti-oxidantes protegeram o AR da degradação sendo que, após 72 horas até 89% do AR estava intacto. O anti-oxidante mais eficiente foi a mistura de BHT-BHA, por ter maior interação com ativo AR e por ser lipofílico, o que aumentou a sua eficiência de encapsulação.

Outra aplicação das NLS é no encapsulamento de protetores solares. O interesse em protetores solares mais eficientes tem aumentando devido à redução da camada de ozônio, que resulta em um aumento do número de casos de câncer de pele. Sendo assim, protetores solares são utilizados regularmente por milhões de pessoas e o conhecimento dos efeitos nocivos destes agentes se faz muito importante. Muitos protetores solares penetram na pele causando efeitos adversos como fotoalergias, reações fototóxicas e irritações na pele (XIA et al., 2007). O desenvolvimento de formulações que diminuem ou evitam a penetração destes ativos na pele, diminui os seus efeitos adversos. Isto é possível com nanopartículas lipídicas sólidas que atuam como protetores solares físicos por espalhar e refletir a radiação UV (SIMEONI et al., 2006). Esta propriedade de espalhamento de luz depende fortemente do grau de cristalinidade da matriz lipídica. WISSING E MÜLLER (2002a) encapsularam o fotoprotetor químico oxibenzofenona em CLN pelo método de homogeneização à quente utilizando o lipídio líquido Migliol. Em estudo *in vivo* foi observado que este ativo tem absorção sistêmica, gerando efeitos adversos. Neste estudo, foi observado que as partículas sem ativo apresentaram um efeito de espalhamento de luz, e a encapsulação da oxibenzofenona no CLN levou a um efeito de fotoproteção sinérgico. Além disto, foi observado que CLN com 5% de oxibenzofenona apresentou o mesmo valor de absorção que CLN com 10% do ativo. Portanto, o mesmo fator de proteção pode ser obtido utilizando menos ativo e, conseqüentemente, isto diminuirá os efeitos adversos do fotoprotetor químico. Em estudo de liberação *in vitro* do ativo foi observado que após 4 horas de experimento, apenas 3% do ativo foram liberados dos CLN, mantendo uma liberação sustentada por 24 horas (WISSING E MÜLLER (2002b).

## 5.2. Fármacos

As nanopartículas lipídicas podem ser administradas por diversas vias que incluem oral, parenteral, oftálmica e dérmica.

### 5.2.1. Oral

A rota oral continua sendo a via de administração de fármacos mais atrativa, devido ao seu grande potencial comercial. A incorporação de fármacos em NLS abre perspectivas de aumentar a biodisponibilidade e prolongar os níveis plasmáticos de fármacos. Além disto, as NLS podem oferecer maior flexibilidade na modulação da liberação de fármacos dentro do trato gastrointestinal e evitar ou diminuir a degradação química de moléculas lábeis como peptídeos (GASCO, 2007).

PANDEY et al. (2005) estudaram o uso de NLS no encapsulamento de antibióticos utilizados no tratamento da tuberculose. As partículas foram preparadas pelo método de difusão de solvente utilizando o lipídio ácido esteárico. A eficiência de encapsulamento foi de 51%, 45% e 41% para, respectivamente, rifampicina, isoniazida e pirazinamida. Estas partículas foram administradas oralmente a ratos e a farmacocinética desses fármacos foi avaliada. Um dia após a administração dos fármacos livres, estes não foram mais detectados na corrente sanguínea, enquanto que, no caso dos fármacos encapsulados em NLS, só após 9 dias, esses não foram mais detectados. Além disto, os fármacos foram detectados no pulmão, fígado e baço após o décimo dia da administração oral das NLS contendo os fármacos. Já na administração dos fármacos livres, após 48 horas não se detectou mais os fármacos nestes órgãos. Estes resultados mostram o efeito de liberação sustentada do ativo que aumentou de 10-29 vezes o tempo de residência dos fármacos quando estes foram encapsulados em NLS em relação aos ativos livres. No estudo da atividade quimioterápica, foi verificado que o uso de NLS no encapsulamento dos fármacos pode reduzir o número de dosagem de 46 para 5 devido ao efeito de liberação sustentada que é obtido com NLS. Este resultado demonstra que o encapsulamento destes ativos em NLS poderia evitar que os pacientes interrompessem o tratamento no meio, por ser muito longo, diminuindo os índices de tuberculose.

LUO et al. (2006) estudaram a administração oral em ratos de NLS contendo vinpocetina. Este ativo é utilizado no tratamento de desordens circulatórias cerebrovasculares, entretanto, apresenta baixa absorção oral sendo rapidamente metabolizada e eliminada do corpo. Para aumentar a sua biodisponibilidade, este ativo foi encapsulado em NLS pelo método de emulsificação e evaporação de solvente. Estas partículas (70 a 200 nm) foram administradas oralmente em ratos para o estudo de farmacocinética. Neste estudo, os autores observaram que o reduzido diâmetro das NLS possibilitou sua bioadesão no trato gastrointestinal aumentando assim o seu tempo de residência. Como consequência, houve um aumento da biodisponibilidade do ativo vinpocetina encapsulado comparado com este ativo livre. Além disto, observaram que a quantidade de estabilizante também aumentou significativamente a absorção oral do ativo em NLS. O estabilizante pode ter contribuído no aumento da permeabilidade da membrana intestinal ou no aumento da afinidade entre a partícula lipídica e a membrana intestinal.

### 5.2.2. Parenteral

Muitos fármacos, como peptídeos, têm baixa estabilidade física e química no trato gastrointestinal, sendo por isto, administrados pela via parenteral. Entretanto, pela via intravenosa estas moléculas também podem ser rapidamente degradadas. Por este motivo o encapsulamento destas moléculas é uma grande vantagem. NLS são geralmente injetadas intravenosamente, intramuscularmente ou subcutaneamente. Devido reduzido diâmetro das NLS (menor que 1  $\mu\text{m}$ ), estas podem ser usadas em administração sistêmica com um risco mínimo de agregação nos vasos sanguíneos (ALMEIDA E SOUTO, 2007).

LU et al. (2006) estudaram a administração subcutânea de NLS no tratamento de câncer de mama. As partículas foram preparadas pelo método de microemulsão utilizando o lipídio behenato de glicerila. Partículas de 61 nm foram obtidas com eficiência de encapsulamento do ativo mitroxantrona (MTO) de 87%. Foi observado que uma menor concentração (50% menor) do ativo MTO encapsulado em NLS apresentou a mesma porcentagem de inibição do tumor do que o ativo livre em maior concentração. Este fato se deve a alta afinidade das NLS pelo tumor, verificada por Microscopia Eletrônica de Varredura, na qual NLS foram observadas na superfície do tumor. Este resultado demonstra que partículas lipídicas sólidas pode ser um promissor sistema carreador de ativos antitumorais contra câncer de mama.

### 5.2.3. Dérmica

CHEN et al. (2006) investigaram o uso de NLS no encapsulamento de podofilotoxina (POD) que inibi o crescimento de células epiteliais infectadas pelo vírus papiloma humano (HPV) na epiderme, e é utilizado como um fármaco de primeira-linha no tratamento de verrugas vaginais. Entretanto, este ativo apesar de ser aplicado topicamente é absorvido sistemicamente gerando severos efeitos adversos sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de uma formulação que reduza a sua absorção sistêmica e aumente o seu tempo de residência na epiderme o que é possível através do encapsulamento do POD em nanoestruturas. O POD foi encapsulado em NLS preparadas pelo método de microemulsão utilizando o lipídio tripalmitato. Foram realizados estudos de permeação cutânea em célula de difusão de Franz utilizando pele de porco. Neste estudo foram obtidas partículas com diâmetro de 73 nm e com PZ de -48 mV. No estudo de permeação cutânea, não foi observado a presença do ativo na célula receptora de Franz após 8 horas da aplicação de POD encapsulado em NLS indicando que o ativo encapsulado não penetrou através da pele de porco. Entretanto um constante aumento da concentração do ativo na célula receptora foi observado para ativo livre. Desta forma, o encapsulamento do ativo em NLS pode evitar a absorção sistêmica deste ativo em

aplicações tópicas quando comparado com o ativo livre. Além disto, foi observada uma acumulação 4 vezes maior do ativo na pele de porco no caso do ativo encapsulado em NLS em relação ao ativo livre. A profundidade de penetração na pele de porco do POD livre e encapsulado foi avaliada por Microscópio Confocal de Varredura a Laser. Os autores observaram que o POD encapsulado em NLS se localizou principalmente na epiderme e na área do folículo capilar. Este resultado demonstra que o ativo encapsulado pode penetrar na pele através de dois caminhos que incluem o estrato córneo e os folículos capilares. Já o ativo (POD) livre foi distribuído tanto na derme quanto na epiderme. Além disto, foi observado no caso das NLS-POD que a maior parte do ativo se localizou no estrato córneo devido à alta fluorescência na seção horizontal da pele (10 µm de profundidade). Mas o ativo POD também foi encontrado na epiderme nas profundidades de 75, 135 e 275 µm, porém em menor quantidade. Na profundidade de 275 µm o ativo só aparece ao redor dos folículos capilares que é uma das vias de penetração do ativo encapsulado. Os folículos capilares têm um diâmetro de aproximadamente 40 µm sendo que partículas pequenas podem penetrar dentro da epiderme e da derme, principalmente, através desta via.

### 5.3. Outras Aplicações

MONTANA et al. (2007) estudaram o uso de NLS como carreadores de RNA para transferência de genes. Para isto nanopartículas de NLS catiônicas foram preparadas pelo método de microemulsão com o lipídio behenato de glicerila e o tensoativo catiônico brometo de dimetildioctadecylamônia (DDAB). Partículas de 100 nm com PZ de +41 mV foram obtidas. Estas partículas apresentaram eficiente ligação com moléculas de RNA que foi verificado pela alteração do PZ para -17 mV. Além disto, em estudo *in vitro*, estas partículas conseguiram se difundir através da membrana celular e liberar o RNA demonstrando serem um potencial carreador na terapia genética em humanos.

Outra aplicação das NLS é no encapsulamento de partículas magnéticas para o diagnóstico de câncer cerebral. Nanopartículas magnéticas encapsuladas em NLS foram administradas intravenosamente em ratos e foi observado que estas partículas se concentraram mais no cérebro comparado às partículas magnéticas livres. Este estudo demonstra o potencial das NLS em ultrapassar a barreira hemato-encefálica sendo, portanto, possível o seu uso na administração de ativos que atuem no cérebro e no transporte de partículas magnéticas para o diagnóstico de câncer cerebral (KOO et al., 2006).

## 6. Considerações Finais

As NLS são atrativos carreadores de ativos utilizados em produtos cosméticos e farmacêuticos. Uma das vantagens das NLS é a sua fácil produção em larga escala, o que

aumenta o interesse de indústrias na produção deste carreador. Diferentes métodos podem ser utilizados na produção de NLS, sendo possível em alguns deles não utilizar solventes orgânicos, mas apenas reagentes aprovados por órgãos regulatórios como a FDA (Food Drug Administration). Uma das desvantagens é a baixa eficiência de encapsulamento. Entretanto, isto pode ser melhorado pela produção de diferentes estruturas de nanopartículas lipídicas como os CLN. As NLS e CLN apresentam grande versatilidade no carregamento de diferentes ativos, podendo ser administradas por diversas vias como oral, parenteral, dérmica e oftálmica.

## 7. Agradecimentos

Agradeço o apoio financeiro do CNPq, da Rede de Nanobiotecnologia MCT/CNPq, da Rede de Nanocosméticos MCT/CNPq e as importantes contribuições do Professor Nelson Durán.

## 8. Referencias

ALLAIS, C.; KELLER, G.; LESIEUR, P.; OLLIVON, M.; ARTZNER, F. X-Ray diffraction/calorimetry coupling A tool for polymorphism control. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*. v. 74, n. 3, p. 723–728, 2003.

ALMEIDA, A.J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 59, n. 6, p. 478-490, 2007.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 315, n. 1-3, p. 189–195, 2008.

ATTAMA, A.A.; SCHICKE, B.C.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Further characterization of theobroma oil beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 64, n. 3, p. 294–306, 2006.

BORGIA, S.L.; REGEHLY, M.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C.; DANKER, K.; RÖDER, B.; KRAMER, K.D.; SCHÄFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. *Journal of Controlled Release*. v. 110, n. 1, p. 151– 163, 2005.

BUNJES, H.; STEINIGER, F.; RICHTER, W. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. *Langmuir*. v. 23, n. 7, p. 4005-4011, 2007.

CASTELLI, F.; PUGLIA, C.; SARPIETRO, M.G.; RIZZA, L.; BONINA, F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 304, n. 1-2, p. 231-238, 2005.

CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; CARLOTTI, M.E.; TROTTA, M.; SCARNECCHIA, C.; GASCO, M.R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 148, p. 47-54, 1997.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 56, n. 5, p. 675- 711, 2004.

CHATTOPADHYAY, N.; ZASTRE, J.; WONG, H-L.; WU, X.Y.; BENDAYAN, R. Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line. *Pharmaceutical Research*. v. 25, n. 10, p. 2262-2271, 2008.

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *Journal of Controlled Release*. v. 110, n. 2, p. 296 - 306, 2006.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; LUCA, G.; NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* v. 23, n. 11, p. 2283-2294, 2002.

DEMIREL, M.; YAZAN, Y.; MÜLLER, R.H., KILIÇ, F.; BOZAN, B. Formulation and *in vitro-in vivo* evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, n. 3, p. 359-371, 2001.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharmaceutical Research*. v. 8, n. 1, p. 47-54, 1991.

FREITAS, C.; MULLER, R.H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 47, n. 2, p. 125-132, 1999.

GASCO, M.R. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 59, n. 6, p. 377-378, 2007.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. v. 2, p. 147-157, 2007.

HANUS, L.H.; PLOEHN, H.J. Conversion of Intensity-Averaged Photon Correlation Spectroscopy Measurements to Number-Averaged Particle Size Distributions. 1. Theoretical Development. *Langmuir*. v.15, n. 9, p. 3091-3100, 1999.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*. v. 24, n. 10, p. 1781-1785, 2003.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *International of Journal Pharmaceutics*. v. 314, n. 1, p. 83-89, 2006.

HU, F-Q., JIANG, S-P., DU, Y-Z. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surface B-Biointerfaces*. v. 45, n. 3-4, p. 167-173, 2005.

HU, F.Q.; HONG, Y.; YUAN, H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *International of Journal Pharmaceutics*. v. 273, n.1-2, p. 29-35, 2004.

JEE, J.-P.; LIM, S.-J.; PARK, J.-S.; KIM, C.-K. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 63, n. 2, p. 134-139, 2006.

JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S.H. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a <sup>1</sup>H-NMR study. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 205, n. 1-2, p.15-21, 2000.

KOO, Y-E. L.; REDDY, G.R.; BHOJANI, M.; SCHNEIDER, R.; PHILBERT, M.A.; REHEMTULLA, A.; ROSS, B.D.; KOPELMAN, R. Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 58, n. 14, p. 1556-1577, 2006.

LEE, M.-K., LIM, S.-J.; KIM, C.-K. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxelloaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials*. v. 28, n. 12, p. 2137–2146, 2007.

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 328, n. 2, p. 191–195, 2007.

LU, B.; XIONG, S.-B.; YANG, H.; YIN, X.-D.; CHAO, R.-B. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 28, n. 1-2, p. 86–95, 2006.

LUO, Y.; CHEN, D.; REN, L.; ZHAO, X.; QIN, J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. v. 114, n. 1, p. 53–59, 2006.

MARCATO, P.D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. v. 8, n. 5, p. 2216-2229.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 47, n. 2-3, p.165-196, 2001.

MONTANA, G.; BONDÌ, M.L.; CARROTTA, R.; PICONE, P.; CRAPARO, E.F.; BIAGIO, P.L.S.; GIAMMONA, G.; DI CARLO, M. Employment of Cationic Solid-Lipid Nanoparticles as RNA Carriers. *Bioconjugate Chemistry*. v. 18, n. 2, p. 302-308, 2007.

MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 45, n. 2, p. 149–155, 1998.

MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN). European Patent EP 0605497, 1996.

MÜLLER, R.H.; MAËDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.59, n. 6, p. 522–530, 2007.

PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis*. v. 85, n. 3-6, p. 415–420, 2005.

PEDERSEN, N.; HANSEN, S.; HEYDENREICH, A.V.; KRISTENSEN, H.G.; POULSEN, H.S. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 62, n. 2, p. 155–162, 2006.

RUKTANONCHAI, U.; LIMPAKDEE, S.; MEEJOO, S.; SAKULKHU, U.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. The effect of cetyl palmitate crystallinity on physical properties of gamma-oryzanol encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Nanotechnology*. v. 19, n. 9., 095701, 2008.

SAKULKHUL, U.; JARUPAIBOON, S.; TRITHONG, A.; PRATHONTEPL, S.; JANYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; RUKTANONCHAIL, U. Production and Characterization of Rice bran extract encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Delivery. Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, January 16 - 19, Bangkok, Thailand, 2007.

SHAHGALDIAN, P.; QUATTROCCHI, L.; GUALBERT, J.; COLEMAN, A.W.; GORELOFF, P. AFM imaging of calixarene based solid lipid nanoparticles in gel matrices. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 55, n. 1, p. 107–113, 2003.

SILVA, G.A. Nanotechnology approaches for drug and small molecule delivery across the blood brain barrier. *Surgical Neurology*. v. 67, n. 2, p. 113– 116, 2007.

SIMEONI, S.; SCALIA, S.; TURSILLI, R.; BENSON, H. Influence of Cyclodextrin Complexation on the in vitro Human Skin Penetration and Retention of the Sunscreen Agent, Oxybenzone. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. v. 54, n. 3-4, p. 275–282, 2006.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R. H. Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization. *Journal of Microencapsulation*. v. 23, n. 4, p. 377–388, 2006.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>). *International Journal of Cosmetic Science*. v. 30, n. 3, p. 157–165, 2008.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MULLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 278, n. 1, p. 71–77, 2004.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*. v. 128, n. 2, p. 134–141, 2008a.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *Journal of Microencapsulation*. v. 25, n. 2, p. 111–120, 2008b.

TOONGSUWAN, S.; LI, L.C.; ERICKSON, B.K., CHANG, H.C. Formulation and characterization of bupivacaine lipospheres. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 280, n. 1–2, p. 57–65, 2004.

ÜNER, M.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers. v.10, p. 43–56, 2007.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical proprieties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructure lipid carriers (NCL): Their benefits as colloidal drug carrier system. *Phamazie*. v. 61, n. 5, p. 375–386, 2006.

ÜNER, M.; WISSING, S.A.; YENER, G.; MÜLLER, R.H. Skin moisturizing effect and skin penetration of ascorbyl palmitate entrapped in solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructures lipid carrier (NCL) incorporated into hydrogel. *Phamazie*. v. 60, n.10, p. 751–755, 2005.

WISSING, S.A.; KAYSERB, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 56, n. 9, p. 1257– 1272, 2004a.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H.; MANTHEL, L.; MAYER, C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. *Pharmaceutical Research*. v. 21, n. 3, p. 400–405, 2004b.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity *in vivo* study. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*. v. 56, n. 1, p. 67–72, 2003.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. The development of an improved carrier system for sunscreen formulations based on crystalline lipid nanoparticles. *Internationa Journal of Pharmaceutics*. v. 242, n. 1-2, p. 373–375, 2002a.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *Journal of Controlled Release*. v. 81, n. 3, p. 225-233, 2002b.

XIA, Q.; SAUPE, A.; MÜLLER, R.H.; SOUTO, E.B. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations. *International Journal of Cosmetic Science*. v. 29, n. 6, p. 473–482, 2007.