



**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
DA BIOCAMPATIBILIDADE E DO POTENCIAL  
IRRITATIVO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS À BASE  
DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS**

DISSERTAÇÃO DO 2º CICLO DE ESTUDOS CONDUCENTE AO GRAU DE  
MESTRE EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Filipa Rosa Lopes Eiras

Trabalho realizado sob a orientação de:

**Professora Doutora Ana Catarina da Cruz Rodrigues da Silva**  
(Orientadora)

**Professora Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues Amaral**  
(Co-orientadora)

Setembro, 2016



É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.



## **Agradecimentos**

Foram diversas as pessoas que me ajudaram ao longo desta caminhada e que contribuíram para que esta experiência se tornasse enriquecedora, tanto ao nível científico como pessoal. Deste modo, não posso deixar de agradecer com muito carinho a todos os que tornaram este trabalho possível.

À Professora Doutora Ana Catarina Silva, minha orientadora, agradeço a orientação científica, o interesse com que acompanhou as diversas fases deste trabalho, a amizade, sabedoria e disponibilidade com que sempre me orientou.

À Professora Doutora Maria Helena Amaral, co-orientadora deste trabalho, agradeço a orientação científica, amabilidade, amizade e disponibilidade demonstrados.

Ao Professor Doutor José Manuel Sousa Lobo, Diretor da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço a disponibilidade, apoio, a oportunidade de realizar este curso de Mestrado e o privilégio de voltar a ser sua aluna.

À Professora Doutora Renata Silva agradeço pelo excelente trabalho realizado nos ensaios de toxicidade.

Ao Professor Doutor José Catita reconheço a ajuda fundamental e esclarecimentos muito úteis relativamente à utilização e interpretação dos resultados do Mastersizer e DSC.

Aos restantes Professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço por todas as competências e todo o conhecimento científico que me transmitiram.

Aos colegas de Mestrado que comigo partilharam este percurso, agradeço todo o apoio que me deram e os alegres momentos de convívio proporcionados.

Aos meus amigos, em especial à Sandra Silva Ribeiro pela ajuda prestada na formatação da dissertação e adaptação de imagens.

Aos meus pais, irmã e namorado, pela paciência e apoio.

Aos meus sobrinhos, Henrique e Diogo, por me alegrarem todos os dias.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, tornaram possível a execução deste projeto, o meu profundo reconhecimento.



## Resumo

As nanopartículas lipídicas possuem características que contribuem para o aumento da biocompatibilidade dos compostos, proteção de moléculas instáveis e melhoria da hidratação da pele, sendo adequadas à encapsulação de ingredientes cosméticos. No entanto, as dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas têm baixa viscosidade, o que dificulta a sua aplicação cutânea. Para contornar este problema, estes sistemas podem ser incorporados em sistemas semissólidos, aumentando a consistência da formulação final.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas, designadamente de nanopartículas de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e de vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC). Para o efeito, foram desenvolvidas uma dispersão de SLN e três dispersões de NLC (contendo vitamina E, óleo de rosa mosqueta e cetil dimeticone como lípidos líquidos). Posteriormente, essas dispersões foram gelificadas, adquirindo consistência semissólida adequada à aplicação cutânea. Todas as formulações desenvolvidas foram caracterizadas, tendo sido realizados os seguintes ensaios: análise organoléptica, estabilidade acelerada por centrifugação, tamanho das partículas, calorimetria diferencial de varrimento, morfologia, pH, textura, reologia e cor. Os resultados obtidos permitiram concluir que a nanodispersão gelificada à base de vitamina E demonstrou ser a mais promissora. Por fim, a nanodispersão gelificada de NLC com vitamina E foi submetida a ensaios *in vitro* para avaliação da biocompatibilidade (em culturas celulares de queratinócitos) e do potencial irritativo (teste HET-CAM), de forma a estimar a sua toxicidade para aplicação cutânea. A formulação demonstrou ser biocompatível e não irritante, apresentando grande potencial para aplicação cutânea. Os resultados dos estudos *in vitro* permitem prever o comportamento *in vivo* da formulação, evitando a realização de um elevado número de ensaios em voluntários, seguindo, deste modo, os princípios da declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Pelas propriedades da vitamina E, e de acordo com os resultados obtidos, espera-se que a nanodispersão gelificada desenvolvida tenha aplicação na área cosmética, em produtos hidratantes e antienvhecimento, não sendo de descartar a hipótese de utilização na área farmacêutica para o tratamento de afeções do estrato córneo, como xerose, dermatite atópica ou eczemas. Tanto ao nível cosmético como farmacêutico, os efeitos da vitamina E podem ser potenciados, através da associação com outros ingredientes cosméticos ou fármacos, solubilizando as respetivas moléculas neste óleo.

Palavras-chave: Nanopartículas lipídicas; produtos cosméticos; aplicação cutânea; biocompatibilidade, irritação.



## Abstract

Lipid nanoparticles have characteristics that allow to increase the biocompatibility of compounds, protect unstable molecules and improve skin hydration, being good candidates for the encapsulation of cosmetic ingredients. However, these systems present low viscosity, which hinders its cutaneous application. To solve this problem, lipid nanoparticles can be incorporated into semisolid systems, increasing the final formulation consistency.

The aim of this study was the development of semisolid formulations based on lipid nanoparticles, such as Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). For this purpose, one SLN dispersion and three NLC dispersions (containing vitamin E, rosehip oil and cetyl dimethicone as liquid lipids) were developed. Then these dispersions were gelled to acquire semisolid consistency suitable for cutaneous application. All formulations were characterized performing the following tests: organoleptic analysis, accelerated stability by centrifugation, particle size measurement, differential scanning calorimetry, morphology, pH, texture, rheology and color. The results showed that the gelled nanodispersion containing vitamin E proved to be the most promising formulation. Finally, the gelled nanodispersion containing vitamin E was submitted to *in vitro* experiments to evaluate its biocompatibility (in keratinocytes cells) and irritative potential (HET-CAM test), in order to estimate the toxicity of these system for cutaneous application. The results showed that the tested formulation is biocompatible and non-irritant for cutaneous application, which can predict its *in vivo* behavior, avoiding the use of a high number of tests on human volunteers according to the principles of the Declaration of Helsinki (World Medical Association).

Regarding vitamin E properties, and according to the results of this study, it was concluded that the developed formulation could be used in cosmetics, such as moisturizers and anti-aging products. Furthermore, it can also be anticipated that this formulation might be employed in the pharmaceutical field, for the treatment of stratum corneum disorders, such as xerosis, atopic dermatitis or eczema. Furthermore, the effects of vitamin E might be enhanced by combination with other cosmetic ingredients or drugs, by solubilizing the respective molecules in this oil.

Keywords: Lipid nanoparticles; cosmetic products; cutaneous application; biocompatibility, irritation.



## Índice

Agradecimentos.....	VII
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
Índice de figuras .....	XVII
Índice de tabelas.....	XXI
Lista de abreviaturas e símbolos .....	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1. A pele .....	1
1.2. Nanopartículas lipídicas .....	6
1.2.1. Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN).....	8
1.2.2. Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC).....	11
1.3. Lípidos líquidos utilizados na preparação dos NLC .....	14
1.4. Preparações semissólidas cutâneas .....	15
1.5. Aplicações cosméticas de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas .....	16
1.6. Toxicidade, biocompatibilidade e potencial irritativo de formulações semissólidas cosméticas à base de nanopartículas lipídicas .....	21
1.6.1. Biocompatibilidade .....	22
1.6.2. Potencial irritativo .....	22
1.7. Objetivo do trabalho .....	24
2. Matérias-primas e métodos.....	25
2.1. Matérias-primas.....	25
2.2. Desenvolvimento de dispersões de nanopartículas lipídicas .....	26
2.2.1. Estudo da compatibilidade lípido sólido – lípido líquido .....	26
2.2.2. Preparação de nanopartículas lipídicas .....	26
2.3. Desenvolvimento de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas .....	29
2.4. Caracterização das dispersões de nanopartículas lipídicas .....	30

2.4.1. Análise organolética .....	30
2.4.2. Tamanho .....	30
2.4.3. Estabilidade acelerada por centrifugação .....	32
2.4.4. pH.....	33
2.4.5. Calorimetria diferencial de varrimento.....	34
2.4.6. Morfologia .....	35
2.5. Caracterização das preparações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas .....	37
2.5.1. Análise organolética .....	37
2.5.2. Estabilidade acelerada por centrifugação .....	37
2.5.3. pH.....	37
2.5.4. Morfologia .....	38
2.5.5. Reologia .....	38
2.5.6. Textura .....	42
2.5.7. Cor.....	43
2.6. Avaliação da biocompatibilidade.....	45
2.6.1. Ensaio de redução do MTT .....	45
2.6.2. Ensaio de incorporação do vermelho neutro .....	45
2.7. Avaliação do potencial irritativo .....	47
2.8. Análise estatística .....	49
3. Resultados e discussão.....	51
3.1. Compatibilidade lípido sólido – lípido líquido.....	51
3.2. Caracterização das dispersões de nanopartículas lipídicas .....	52
3.2.1. Análise organolética .....	52
3.2.2. Tamanho .....	54
3.2.3. Estabilidade acelerada por centrifugação .....	62
3.2.4. pH.....	63
3.2.5. Calorimetria diferencial de varrimento.....	65
3.2.6. Morfologia .....	70

3.3. Caracterização das preparações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas .....	72
3.3.1. Análise organolética .....	72
3.3.2. Estabilidade acelerada por centrifugação.....	73
3.3.3. pH.....	74
3.3.4. Morfologia .....	75
3.3.5. Reologia.....	76
3.3.6. Textura .....	78
3.3.7. Cor .....	81
3.4. Avaliação da biocompatibilidade .....	84
3.5. Avaliação do potencial irritativo .....	87
4. Conclusões e perspectivas futuras .....	89
5. Bibliografia .....	91



## Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura da pele humana (adaptado de (2)).....	1
Figura 2 – Camadas da epiderme (adaptado de (1, 3)).....	2
Figura 3 – Representação esquemática do estrato córneo (adaptado de (3)).....	3
Figura 4 – Diferentes tipos de células da epiderme (adaptado de (7)).....	3
Figura 5 – Representação esquemática da pele mostrando as diferentes vias de penetração de substâncias (adaptado de (12)). .....	5
Figura 6 – Modelos teóricos para a incorporação de ingredientes ativos nas SLN (adaptado de (31)). .....	9
Figura 7 – Diferenças entre a estrutura das SLN (a) e dos NLC (b) (adaptado de (22)). .....	11
Figura 8 – Principais diferenças entre as SLN e os NLC (adaptado de (28)). .....	12
Figura 9 – Modelos teóricos para a incorporação de ingredientes ativos nos NLC (adaptado de (31)). .....	12
Figura 10 – Ultra-Turrax <sup>®</sup> T25 (esquerda) e sonda de sonicação (direita). .....	28
Figura 11 – Mastersizer 3000, Malvern. ....	31
Figura 12 – Centrífuga, Eppendorf AG 5804.....	33
Figura 13 – Potenciômetro, Basic 20.....	34
Figura 14 – DSC 200 F3, Netzsch, Maia <sup>®</sup> . .....	35
Figura 15 – Viscosímetro, Thermo Haake VT-550.....	41
Figura 16 – Representação esquemática de um gráfico força exercida <i>versus</i> distância.....	42
Figura 17 – Texturómetro, Stable Micro Systems TA-XT2i.....	43
Figura 18 – Colorímetro, Chroma Meter CR-500 (esquerda) e Espaço L*a*b* (direita). .....	44
Figura 19 – Aspeto das dispersões de nanopartículas lipídicas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após a preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento, a diferentes temperaturas.....	52
Figura 20 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho das SLN, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.....	55
Figura 21 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho dos NLC preparados com óleo de rosa mosqueta, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C. ....	57

Figura 22 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho dos NLC preparados com cetil dimeticone, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . .....	59
Figura 23 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho dos NLC preparados com vitamina E, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . .....	61
Figura 24 – Aspeto das dispersões de nanopartículas lipídicas submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E. ....	63
Figura 25 – Representação gráfica da variação de pH das dispersões de nanopartículas lipídicas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, em função do tempo e da temperatura de armazenamento. ....	64
Figura 26 – Termograma do lípido sólido isolado (Precirol <sup>®</sup> ATO 5) e das SLN, no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . ...	66
Figura 27 – Termograma do lípido sólido (Precirol <sup>®</sup> ATO 5) e lípido líquido (RM – óleo de rosa mosqueta) isolados, da mistura lípido sólido com lípido líquido ( $P_{70}RM_{30}$ ) e dos $NLC_{RM}$ , no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . ....	67
Figura 28 – Termograma do lípido sólido (Precirol <sup>®</sup> ATO 5) e lípido líquido (CD – cetil dimeticone) isolados, da mistura lípido sólido com lípido líquido ( $P_{70}CD_{30}$ ) e dos $NLC_{CD}$ , no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . ....	68
Figura 29 – Termograma do lípido sólido (Precirol <sup>®</sup> ATO 5) e lípido líquido (VE – vitamina E) isolados, da mistura lípido sólido com lípido líquido ( $P_{70}VE_{30}$ ) e dos $NLC_{VE}$ , no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . ....	69
Figura 30 – Imagens de cryoSEM das nanopartículas lipídicas, indicadas pelas setas (ampliação x35000). A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E. ....	71
Figura 31 – Aspeto das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente. ....	72

- Figura 32 – Aspeto das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.73
- Figura 33 – Representação gráfica da variação de pH das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E ao longo do tempo de armazenamento a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . .....74
- Figura 34 – Imagens de cryoSEM das nanodispersões gelificadas contendo (nanopartículas lipídicas indicadas pelas setas): A - SLN (ampliação x3000), B - NLC com óleo de rosa mosqueta (ampliação x7000), C - NLC com cetil dimeticone (ampliação x3000) e D - NLC com vitamina E (ampliação x7000). ....76
- Figura 35 – Reogramas das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após 2 dias, 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . .....77
- Figura 36 – Representação gráfica da variação da força máxima (firmeza) das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após 2 dias, 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . .....79
- Figura 37 – Representação gráfica da variação da área negativa (adesividade) das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após 2 dias, 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . .....80
- Figura 38 – Representação gráfica da variação do parâmetro Chroma das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, ao longo do tempo de armazenamento. ....82
- Figura 39 – Citotoxicidade das formulações  $\text{NLC}_{\text{VE}}$  (NLC com vitamina E) **(A)** e  $\text{NLC}_{\text{VE-HG}}$  (nanodispersão gelificada de  $\text{NLC}_{\text{VE}}$ ) **(B)** (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em células HaCat, 24h após a exposição, avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SD de 3 experiências independentes (realizada em triplicado). As comparações estatísticas foram estimadas utilizando o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn [ $*p<0,05$ ;  $**P<0,01$ ;  $***P<0,001$ ;  $****P<0,0001$  vs. controlo (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )]. .....85
- Figura 40 – Citotoxicidade das formulações  $\text{NLC}_{\text{VE}}$  (NLC com vitamina E) **(A)** e  $\text{NLC}_{\text{VE-HG}}$  (nanodispersão gelificada de  $\text{NLC}_{\text{VE}}$ ) **(B)** (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em células HaCat, 24h após a exposição, avaliada pelo ensaio de incorporação do corante

vermelho neutro. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SD de 4 experiências independentes (realizada em triplicado). As comparações estatísticas foram estimadas utilizando o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn [ $*p < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ;  $****P < 0,0001$  vs. controlo ( $0\mu\text{g/mL}$ )]. .....85

Figura 41 – Fotografias dos ovos onde foi aplicada a amostra (nanodispersão gelificada contendo NLC com vitamina E) e os controlos, antes e no final do ensaio.....88

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Resumo de alguns dos produtos cosméticos contendo nanopartículas lipídicas introduzidos no mercado desde outubro de 2005 até à atualidade (adaptado de (22)).	20
Tabela 2 – Matérias-primas utilizadas na preparação de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas.	25
Tabela 3 – Composição (% m/m) das dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas.	27
Tabela 4 – Composição (% m/m) das nanodispersões gelificadas.	29
Tabela 5 – Condições do método da difratometria de laser (LD).	31
Tabela 6 – Pontuações a atribuir nos tempos definidos do ensaio HET-CAM.	47
Tabela 7 – Resultados da consistência das misturas obtidas entre Precirol® ATO 5 (LS) e os lípidos líquidos (LL) testados.	51
Tabela 8 – Avaliação das características organolépticas das dispersões de nanopartículas lipídicas, ao longo do tempo e a diferentes temperaturas de armazenamento.	53
Tabela 9 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos ( $D_{90}$ e $D_{50}$ ) das SLN preparadas, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.	56
Tabela 10 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos ( $D_{90}$ e $D_{50}$ ) dos NLC preparados com óleo de rosa mosqueta, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.	58
Tabela 11 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos ( $D_{90}$ e $D_{50}$ ) dos NLC preparados com cetil dimeticone, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.	60
Tabela 12 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos ( $D_{90}$ e $D_{50}$ ) dos NLC preparados com vitamina E, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.	62
Tabela 13 – Níveis de significância da análise estatística do pH das várias dispersões de nanopartículas lipídicas, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.	65
Tabela 14 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado e as SLN, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.	66

Tabela 15 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado, a mistura lípido sólido com lípido líquido e as dispersões coloidais de NLC <sub>RM</sub> , no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas. .67	
Tabela 16 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado, a mistura lípido sólido com lípido líquido e as dispersões coloidais de NLC <sub>CD</sub> , no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas. .68	
Tabela 17 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado, a mistura lípido sólido com lípido líquido e as dispersões coloidais de NLC <sub>VE</sub> , no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas. .69	
Tabela 18 – Avaliação das características organoléticas das nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento. ....72	72
Tabela 19 – Níveis de significância da análise estatística do pH das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento a 20±1°C. ....75	75
Tabela 20 – Níveis de significância da análise estatística da textura das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento a 20±1°C. ....81	81
Tabela 21 – Níveis de significância da análise estatística da variação do parâmetro Chroma das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento a 20±1°C.....83	83
Tabela 22 – Resultados obtidos nos controlos do ensaio (n=3). ....87	87
Tabela 23 – Resultados do ensaio <i>in vitro</i> de irritabilidade (HET-CAM) das nanodispersões gelificadas contendo NLC <sub>VE</sub> .....87	87

## Lista de abreviaturas e símbolos

A/O/A – Água / Óleo / Água

C\* – parâmetro Chroma

CAM – Membrana CorioAlantónica

CCSC – Comité Científico da Segurança dos Consumidores

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

cryoSEM – *cryo Scanning Electron Microscopy* (crio-microscopia eletrónica de varrimento diferencial)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (calorimetria diferencial de varrimento)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

GRAS – *Generally Recognized As Safe*

HET-CAM – *Hen's Egg Test – ChorioAllantoic Membrane* (ensaio *in vitro* de irritabilidade com membranas corioalantónicas)

IR – Índice de Recristalização

LD – *Laser Diffractometry* (difratometria de laser)

LS:LL – Lípido Sólido : Lípido Líquido

LSS – Laurilsulfato de sódio

MTT – (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NLC – *Nanostructured Lipid Carriers* (vetores lipídicos nanoestruturados)

NLC<sub>RM</sub> – *Nanostructured Lipid Carriers* (vetores lipídicos nanoestruturados) contendo óleo de rosa mosqueta

NLC<sub>CD</sub> – *Nanostructured Lipid Carriers* (vetores lipídicos nanoestruturados) contendo cetil dimeticone

NLC<sub>VE</sub> – *Nanostructured Lipid Carriers* (vetores lipídicos nanoestruturados) contendo vitamina E

NR – *Neutral Red* (vermelho neutro)

O/A – Óleo / Água

O/LS/A – Óleo / Lípido Sólido / Água

rpm – rotações por minuto

SBF – Soro Bovino Fetal

SD – Desvio padrão

SEM – *Scanning Electron Microscopy* (microscopia eletrônica de varrimento diferencial)

SLN – *Solid Lipid Nanoparticles* (nanopartículas de lípidos sólidos)

TEM – *Transmission Electron Microscopy* (microscopia eletrônica de transmissão)

UV – Ultravioleta

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, pesando entre 3 a 4kg e apresentando uma superfície de quase 2m<sup>2</sup>. A sua espessura varia desde aproximadamente 0,5mm, em zonas delicadas como as pálpebras, até 5mm ou mais, em zonas de desgaste, como as plantas dos pés (1).

Trata-se de um órgão complexo formado por duas camadas principais, epiderme e derme, que contém vários tipos de células diferentes. A Figura 1 representa esquematicamente a estrutura da pele humana (1, 2).

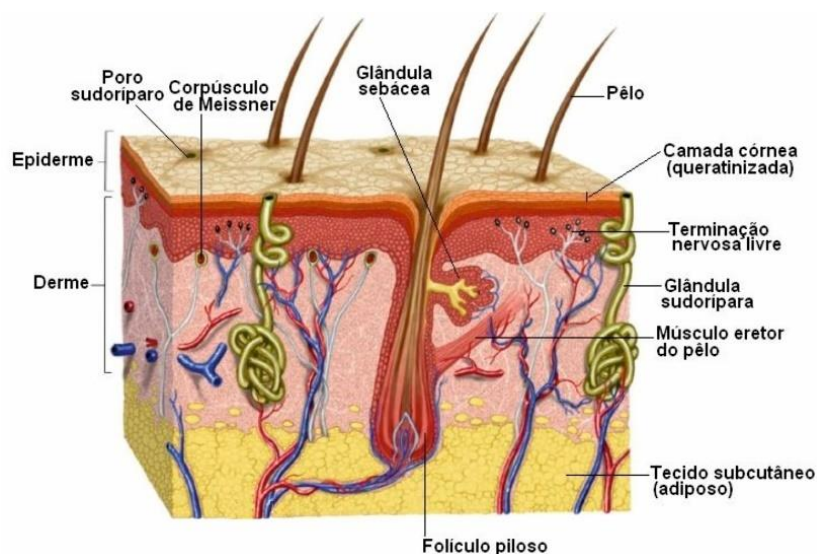


Figura 1 – Estrutura da pele humana (adaptado de (2)).

A epiderme é a camada mais extensa e exterior da pele. É essencialmente protetora, renovando-se e substituindo-se continuamente. É irrigada indiretamente através da derme, uma vez que não contém nenhum vaso sanguíneo. Em contrapartida, tem numerosas terminações nervosas que a tornam extremamente sensível ao toque. Esta camada possui centenas de poros por centímetro quadrado, pelos quais é libertado o suor e o sebo. Estas duas substâncias juntam-se à superfície para formar o filme hidrolipídico, que hidrata e protege a pele (1, 3).

Em termos histológicos, a epiderme é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado, que se divide em quatro ou cinco camadas de células, segundo a região do corpo, conforme ilustrado na Figura 2 (1, 3, 4).

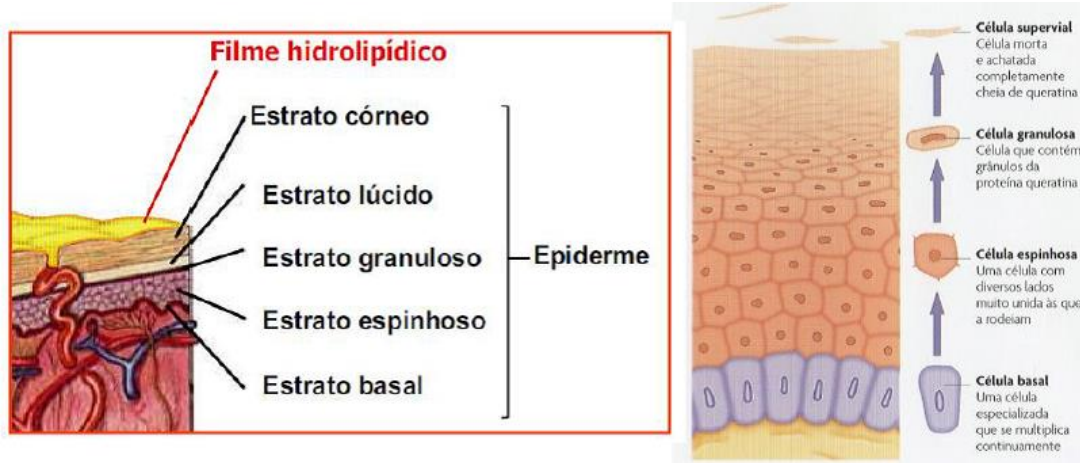


Figura 2 – Camadas da epiderme (adaptado de (1, 3)).

O estrato ou camada basal é a camada de células mais profunda da epiderme. É formado por células que se multiplicam rapidamente e se movem gradualmente para a superfície, sendo empurradas pelas novas células que estão por baixo, conforme esquematizado Figura 2. À medida que as células vão subindo começam a achatam e a encher-se com uma proteína impermeabilizante, a queratina. Por fim, as células morrem e atingem a superfície completamente queratinizadas, formando a camada córnea também designada de estrato córneo. Com o desgaste diário, estas células descamam e são substituídas por novas células. Todos os meses a camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, é completamente renovada, a um ritmo de aproximadamente 30000 células mortas escamosas por minuto. A perda de células da superfície do estrato córneo (descamação) está em equilíbrio com a divisão celular e diferenciação nas suas camadas mais inferiores (1, 3). As células achatadas, desidratadas, queratinizadas e sem núcleo que predominam neste estrato denominam-se corneócitos e encontram-se unidas por desmossomas. Esta estrutura é muitas vezes comparada à de um muro de tijolos (Figura 3), o que confere estabilidade e resistência estrutural à pele. São estas características que fazem com que o estrato córneo seja o principal responsável pela função barreira da pele, evitando a entrada de microrganismos e outras substâncias estranhas ao organismo. É também a presença desta barreira natural que muitas vezes dificulta a ação das formulações dermatológicas e cosméticas aplicadas na pele, uma vez que pode impedir que os respectivos fármacos ou ingredientes ativos veiculados exerçam o efeito pretendido (3, 5, 6).

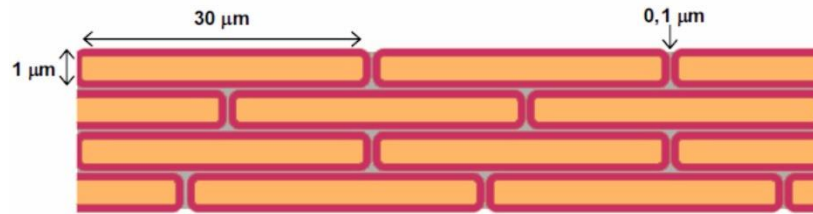


Figura 3 – Representação esquemática do estrato córneo (adaptado de (3)).

A epiderme contém vários tipos de células, conforme esquematizado na Figura 4. É composta por aproximadamente 85% de queratinócitos (células epiteliais). Os restantes 15% dividem-se entre (3):

- a) Melanócitos: existentes na camada basal, produzem melanina, um pigmento natural responsável pelo tom da pele e que confere alguma proteção contra a radiação ultravioleta (UV);
- b) Células de Langerhans: provenientes da medula óssea, detectam e capturam os corpos estranhos que penetram na epiderme (produtos químicos, bactérias, vírus, etc);
- c) Células de Merkel: possuem recetores sensoriais implicados no sentido do tato.

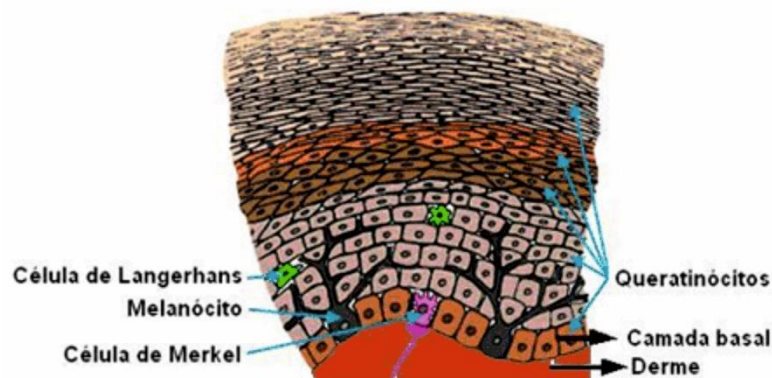


Figura 4 – Diferentes tipos de células da epiderme (adaptado de (7)).

A membrana basal é uma membrana que separa a epiderme da derme. Tem a função de barreira e de filtro e permite a passagem dos nutrientes, provenientes da derme, para as restantes células da epiderme (1).

A derme tem uma constituição bastante diferente da epiderme. Encontra-se subjacente à epiderme e é irrigada por numerosos vasos sanguíneos, que permitem fornecer à epiderme os elementos nutritivos que lhe são necessários. Contém ainda milhares de microssensores, responsáveis pelo sentido do tato, as glândulas sebáceas e sudoríparas, responsáveis pela secreção do sebo, e do suor, respetivamente, assim

como os folículos pilosos. As glândulas sudoríparas também contribuem para a regulação da temperatura corporal (1, 3).

As principais células da derme são os fibroblastos, que sintetizam dois tipos de fibras proteicas, o colagénio e a elastina. A elastina proporciona flexibilidade e extensibilidade à pele, enquanto o colagénio confere resistência e permite a cicatrização de tecidos danificados (1, 3).

Sob a derme existe a hipoderme, que é considerada por alguns autores como sendo parte integrante da pele (1).

A hipoderme é um tecido rico em tecido adiposo, de espessura variável, segundo a localização, sobre a qual repousa a derme. É essencialmente composta por adipócitos, que isolam o organismo das variações de temperatura e formam um manto protector contra as pressões externas a que a pele é submetida, protegendo os órgãos internos. Metade da gordura armazenada no organismo encontra-se na hipoderme e a sua quantidade e localização variam com a idade, o sexo e a alimentação. É também da hipoderme que provêm os anexos cutâneos, como os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas, que se estendem até à superfície da pele, como ilustrado anteriormente na Figura 1 (1, 6).

Tendo em conta a sua constituição, a pele desempenha inúmeras funções relevantes para o nosso organismo, tais como (1, 3, 8, 9): termorregulação que ocorre quando a temperatura do corpo aumenta ou diminui, o organismo tende a repor a homeostasia, fazendo libertar ou conservar o calor; manutenção da água e do equilíbrio electrolítico, evitando a perda por evaporação; função sensorial, conferida pelos recetores sensoriais; proteção contra as agressões do meio externo. Apresenta ainda um papel importante na função reprodutora (características sexuais secundárias e produção de feromonas), função endócrina (síntese de vitamina D) e de comunicação (expressão de emoções) (3, 6).

Dependendo das propriedades físico-químicas das substâncias, a sua penetração através da pele pode ocorrer por diferentes vias (10): (i) intercelular (entre as células); (ii) transcelular (por dentro das células); (iii) através dos folículos pilosos (iv) ou através das glândulas sebáceas (Figura 5). Uma vez que os folículos pilosos e as glândulas ocupam uma área muito pequena, esta via é a menos significativa sob condições normais. No entanto, esta via é importante para compostos ionizados, de peso molecular mais elevado ou com um coeficiente de partilha óleo em água (O/A) mais baixo (11).

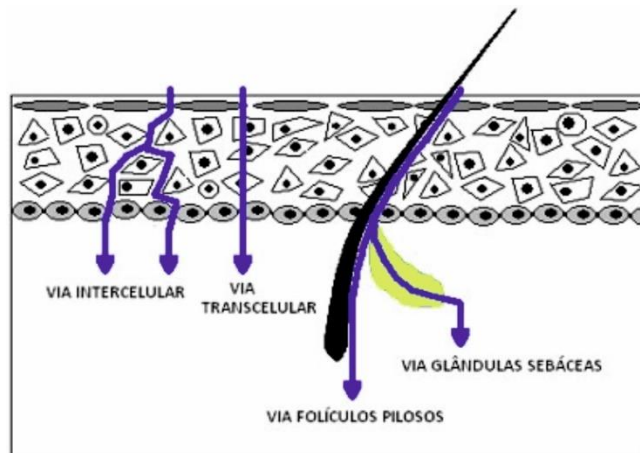


Figura 5 – Representação esquemática da pele mostrando as diferentes vias de penetração de substâncias (adaptado de (12)).

A facilidade de penetração de compostos na pele também varia em função da zona do corpo, sendo de notar uma natural diminuição nas zonas de espessura mais elevada, tais como as palmas das mãos ou a planta dos pés. Por outro lado, as desordens de epitelização também afetam a permeabilidade da pele, na medida em que ocorre uma renovação celular mais rápida, formando-se um estrato córneo com reduzida capacidade de barreira (3).

## 1.2. Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas surgem como sistemas transportadores promissores e alternativos aos sistemas coloidais tradicionais. Estas nanopartículas são formadas por uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, que possibilita a proteção e o controlo da libertação das substâncias encapsuladas. A temperatura de fusão da matriz lipídica sólida pode ser manipulada com a seleção de diferentes lípidos. Estes lípidos são semelhantes aos fisiológicos, prevendo-se, por isso, que sejam bem tolerados pelo organismo. Além destes, estão habitualmente presentes nas formulações à base de nanopartículas lipídicas, tensioativos GRAS (*Generally Recognised As Safe*), o que proporciona uma elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade e diminui ou elimina o risco de toxicidade aguda e crónica. Adicionalmente, estas nanopartículas podem ser preparadas na ausência de solventes orgânicos potencialmente tóxicos. Deste modo, o risco toxicológico inerente à sua aplicação cutânea é mínimo (10, 13-20).

Existem dois tipos de nanopartículas lipídicas, as nanopartículas de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e os vetores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC).

As SLN e os NLC apresentam vantagens importantes para a aplicação cutânea de produtos cosméticos e farmacêuticos e distinguem-se pela composição da matriz lipídica (5, 21, 22).

Comparativamente aos sistemas coloidais tradicionais, as nanopartículas lipídicas apresentam as seguintes vantagens (5, 13, 17, 19, 21, 23-28):

- a) Elevada estabilidade físico-química, sem recorrer a processos de liofilização ou de secagem por atomização;
- b) Redução e/ou ausência de toxicidade aguda ou crónica, uma vez que são utilizadas substâncias GRAS, tanto no que diz respeito aos lípidos, como aos agentes tensioativos;
- c) Possuem uma matriz sólida à temperatura ambiente e corporal, permitindo desenvolver sistemas de libertação modificada, bem como a proteção química dos compostos incorporados;
- d) Baixo custo de manufatura, no que diz respeito ao preço das matérias-primas e às linhas de produção;
- e) Facilidade de transposição dos métodos de produção para a escala industrial;
- f) Ausência de utilização de solventes orgânicos potencialmente tóxicos durante o processo de produção;

- g) Possibilidade de direcionar as substâncias encapsuladas para locais-alvo de ação.

Apesar dos benefícios descritos anteriormente, as nanopartículas lipídicas apresentam algumas desvantagens que podem influenciar a sua estabilidade ao longo do tempo. As transformações polimórficas da matriz lipídica, a gelificação ou formação de creme e ainda a existência de *supercooled melts*, são fenómenos que podem ocorrer nas nanopartículas lipídicas (23, 29, 30).

No final do processo de produção das nanopartículas lipídicas, para que ocorra a solidificação do lípido e a consequente formação das nanopartículas, a nanoemulsão óleo em água (O/A) obtida deve ser arrefecida a uma temperatura inferior ao ponto crítico de cristalização do lípido sólido. A temperatura de recristalização depende não só da composição da matriz lipídica, como também do tipo de fármaco ou ingrediente ativo e dos agentes tensioativos utilizados. A temperatura de recristalização é inferior à temperatura de fusão, sendo a diferença entre estas temperaturas denominada de *supercooling*. Formam-se *supercooled melts* quando a nanoemulsão O/A, depois de formada, não é sujeita a uma temperatura inferior ao ponto crítico de cristalização, ou quando ocorrem alterações irreversíveis no estado cristalino do lípido, permanecendo as gotículas lipídicas no estado líquido. Quando isto acontece não se obtêm nanopartículas (23, 29, 31-34).

É importante referir o facto de poderem existir alterações na estrutura cristalina da matriz lipídica das nanopartículas ao longo do período de armazenamento, denominadas transformações polimórficas. Estes rearranjos na estrutura cristalina têm por objetivo aumentar a estabilidade da estrutura lipídica, mas podem ter como consequência a expulsão do fármaco (23, 29, 31, 33).

Outra limitação da utilização destes sistemas coloidais prende-se com o facto de estes poderem sofrer fenómenos de gelificação ou formação de creme. Este fenómeno é irreversível, sendo provocado pela alteração da forma das nanopartículas, que passam da forma esférica à forma de plaquetas, levando à sua agregação, aumento de tamanho e de viscosidade da formulação. Estas alterações de forma e tamanho das nanopartículas levam a que o tensioativo presente à sua volta, e que lhes confere estabilidade, deixe de o fazer com eficácia, tendo como consequência a sua agregação. Este tipo de fenómeno pode ser evitado ou limitado através da seleção de agentes tensioativos adequados e na quantidade apropriada, ou armazenando a dispersão coloidal a baixas temperaturas (5, 23, 29, 31).

### 1.2.1. Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN)

As SLN constituem a primeira geração de nanopartículas lipídicas, desenvolvidas na década de 90 do século XX. Nessa altura, os grupos de investigadores de *R. H. Müller* e *J. S. Lucks* (Berlim, Alemanha) e de *M. R. Gasco* (Turim, Itália) patentearam as SLN usando técnicas de produção distintas. Desde então, vários grupos de investigação têm focado a sua pesquisa na área das nanopartículas lipídicas, visando o seu potencial de aplicação através de diversas vias de administração, nomeadamente a oral, a parentérica, a cutânea, a oftálmica e a pulmonar (18, 21, 22, 24, 27, 28, 35).

As SLN constituem dispersões aquosas de nanopartículas sólidas, derivadas das nanoemulsões O/A, por substituição do lípido líquido por um lípido que é sólido à temperatura ambiente e corporal, ou seja, com ponto de fusão igual ou superior a 40°C. A matriz lipídica, dispersa em água, é constituída por lípidos fisiológicos (entre 5 e 30%, m/m), estabilizada por um ou dois agentes tensioativos (entre 0,5 e 5%, m/m) e apresenta um tamanho médio que varia entre 50 e 1000nm (5, 16, 21, 22, 27, 28, 36, 37). Como exemplos de tensioativos habitualmente usados na preparação de nanopartículas lipídicas, temos os poloxâmeros 188 e 407, o polissorbato 80, o tyloxapol, os sais biliares (por exemplo, colato de sódio) e os fosfolípidos (por exemplo, fosfatidilcolina) (38-40). Os lípidos sólidos mais utilizados nas SLN são triglicerídeos (por exemplo, triestearina, trimiristina, tripalmitina e trilaurina), ácidos gordos (por exemplo, ácido esteárico e ácido palmítico), ésteres de ácidos gordos (por exemplo, monoestearato de glicerilo, behenato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo), misturas de glicerídeos usadas como bases de supositórios (por exemplo, as bases Witepsol<sup>®</sup> e Softisan<sup>®</sup>) ou ceras (por exemplo, palmitato de cetilo) (23, 41). A aplicação de diferentes lípidos para a preparação de nanopartículas lipídicas origina diferenças em diversos parâmetros críticos como a velocidade de cristalização do lípido, a solubilidade e a estrutura tridimensional (42).

Para a incorporação de ingredientes ativos nas SLN, foram propostos três modelos, que diferem entre si na posição e distribuição das moléculas no interior do núcleo sólido. O tipo de SLN depende da natureza química da molécula, do lípido e da sua solubilidade no lípido fundido. A Figura 6 ilustra os três modelos de incorporação das SLN: o modelo da matriz homogénea (SLN do tipo I); o modelo da parede enriquecida em ingrediente ativo (SLN do tipo II); e o modelo do núcleo enriquecido em ingrediente ativo (SLN do tipo III) (16, 27, 31, 35, 39, 43-45).

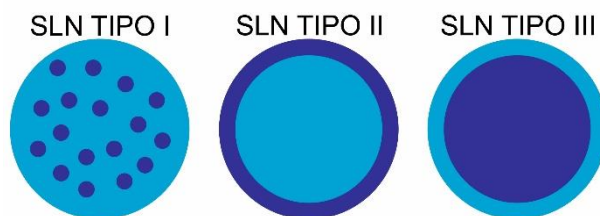


Figura 6 – Modelos teóricos para a incorporação de ingredientes ativos nas SLN (adaptado de (31)).

As SLN do tipo I representam um modelo que é caracterizado por uma matriz homogênea, visto que a substância ativa se encontra molecularmente dispersa no lípido ou está presente na forma de aglomerados amorfos (27). Este modelo é obtido pela técnica da homogeneização a alta pressão, a frio ou a quente, e quando se pretende incorporar moléculas muito lipófilas nas SLN. Pela sua estrutura, as SLN do tipo I possibilitam a libertação controlada da substância por um mecanismo de difusão a partir da matriz lipídica (31, 44).

O modelo das SLN do tipo II traduz-se pela existência de uma parede externa rica em ingrediente ativo que envolve um núcleo lipídico. Ao contrário do modelo anterior, este modelo de incorporação não é adequado quando se pretende obter a libertação controlada do ingrediente ativo, uma vez que este se encontra localizado à superfície das nanopartículas. Em contrapartida, é adequado para a preparação de SLN destinadas à administração tópica, nos casos em que se pretende aumentar a biodisponibilidade do ingrediente ativo, promovendo a sua penetração cutânea através da libertação imediata, obtendo-se simultaneamente um efeito oclusivo resultante do núcleo lipídico (16, 19, 29, 31, 46-48).

Nas SLN do tipo III ou modelo do núcleo enriquecido de ingrediente ativo ocorre um mecanismo oposto ao descrito para as SLN do tipo II. Dado que neste modelo é o ingrediente ativo que precipita em primeiro lugar e não o lípido, temos um núcleo constituído por ingrediente ativo, rodeado por uma parede lipídica. Este modelo, à semelhança do modelo da matriz homogênea, permite a libertação controlada das substâncias (16, 19, 27, 31, 47).

Estes três modelos de incorporação de compostos em SLN representam tipos ideais. No entanto, podem existir tipos mistos, considerados como um quarto modelo, uma vez que a distribuição das moléculas nas SLN depende não só das condições de preparação, mas também da natureza química das substâncias, dos excipientes e da interação entre eles (16, 19).

O interesse da utilização das SLN como transportadores de ingredientes ativos deve-se ao facto destas apresentarem as mesmas vantagens, ao mesmo tempo que minimizam as desvantagens dos sistemas coloidais tradicionais (5, 24, 27). As principais desvantagens que têm sido apontadas aos lipossomas e às nanoemulsões residem no facto de estes sistemas não conseguirem proteger moléculas quimicamente lábeis. Além disso, a libertação das substâncias é imediata (no caso das nanoemulsões) ou relativamente rápida (no caso dos lipossomas). Em contrapartida, como as SLN apresentam uma matriz sólida, são capazes de proteger as substâncias encapsuladas de forma mais eficaz. À semelhança das nanopartículas poliméricas, a matriz sólida das SLN permite modular a cinética de libertação das substâncias, tendo estas últimas a vantagem de não utilizar solventes orgânicos potencialmente tóxicos na sua produção (15, 19, 35).

Contudo, as SLN também apresentam limitações, nomeadamente uma limitada capacidade de encapsulação dos ingredientes ativos no seio da matriz lipídica sólida, devido à baixa solubilidade dos mesmos no lípido. A elevada quantidade de água presente nas formulações faz com que este seja um meio propício à proliferação microbiana e à ocorrência de reações de hidrólise, havendo também o risco de oxidação dos lípidos da matriz sólida (19, 23).

Por outro lado, têm-se verificado alguns problemas de estabilidade das SLN durante o armazenamento, nomeadamente expulsão das substâncias do seu interior e instabilidade física das dispersões aquosas, que resulta na agregação das nanopartículas e formação de gel ou creme (29, 36, 49).

Durante o período de armazenamento da formulação, pode ocorrer a expulsão do ingrediente ativo do interior da matriz sólida, em virtude da ocorrência de transições polimórficas dos lípidos, passando de configurações instáveis (formas  $\alpha$ ) para configurações mais estáveis (formas  $\beta$ ). A utilização de lípidos puros, com estruturas moleculares muito semelhantes, gera cristais perfeitos. Como o ingrediente ativo se localiza entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização destes cristais diminui a eficácia de encapsulação (Figura 7a). Para minimizar este efeito, utilizam-se lípidos complexos como mono, di e triglicerídeos de diferentes comprimentos de cadeia, ou misturas de lípidos sólidos e líquidos (16, 19, 22, 29, 43, 49-53).

Para melhorar a eficácia de encapsulação e minimizar a expulsão das substâncias do interior das SLN, foi criada a segunda geração de nanopartículas lipídicas, os NLC, que combinam as vantagens das SLN, ao mesmo tempo que evitam algumas das suas desvantagens (Figura 7b) (10, 16, 21, 22, 36, 54).

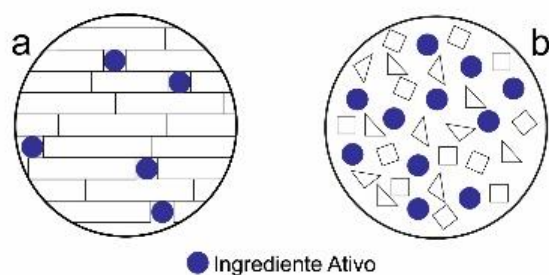


Figura 7 – Diferenças entre a estrutura das SLN (a) e dos NLC (b) (adaptado de (22)).

### 1.2.2. Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC)

Os NLC constituem a segunda geração de nanopartículas lipídicas, que foi criada no início do século, com o objetivo de minimizar os potenciais problemas associados às SLN (15, 16, 19, 21, 22, 46, 55). Estes sistemas são preparados a partir da mistura de lípidos sólidos com lípidos líquidos, cujo ponto de fusão deverá ser igual ou superior a 40°C. A matriz lipídica das nanopartículas resultantes apresenta um ponto de fusão inferior ao do lípido sólido, quando usado isoladamente, embora continue a ser sólida à temperatura ambiente e corporal. Esta mistura origina uma matriz lipídica com muitas imperfeições. Como exemplos de lípidos líquidos habitualmente usados em NLC temos os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (por exemplo, o Miglyol<sup>®</sup> 812), o ácido oleico e o Cetiol<sup>®</sup> V (5, 15, 16, 19, 21, 28, 36, 55, 56). A principal diferença entre as SLN e os NLC reside na característica destes últimos apresentarem uma matriz nanoestruturada, cujo objetivo é aumentar a capacidade de encapsulação dos ingredientes ativos e prevenir a sua expulsão do interior das nanopartículas durante o armazenamento, conferindo maior flexibilidade para modular a sua libertação (Figura 8). Os NLC apresentam uma maior estabilidade física durante o armazenamento, devido à sua estrutura interna mais desorganizada e à menor tendência para a expulsão dos ingredientes ativos (15, 16, 19, 21, 22, 27, 28, 55, 57, 58).

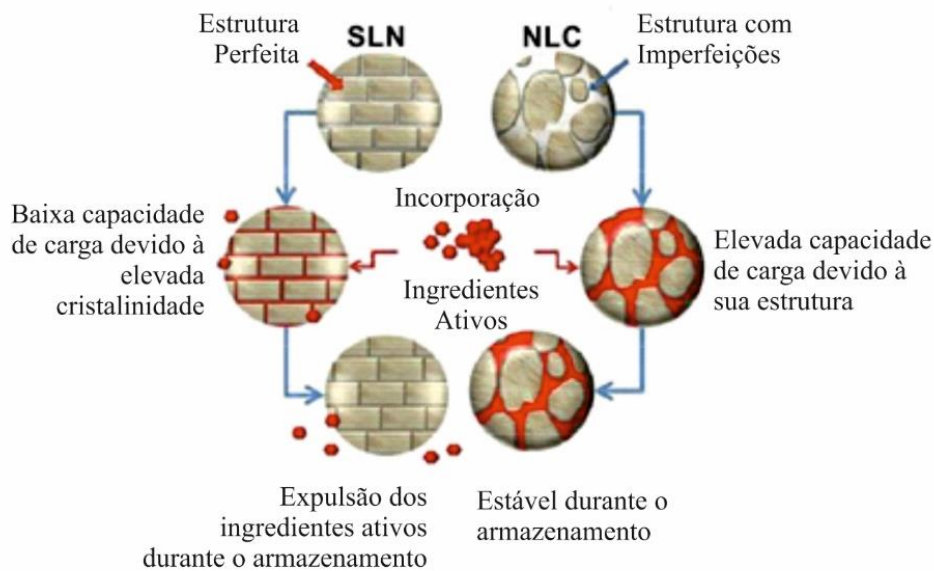


Figura 8 – Principais diferenças entre as SLN e os NLC (adaptado de (28)).

Na Figura 8 estão representadas as estruturas das matrizes lipídicas das SLN e dos NLC, destacando-se as diferenças entre uma estrutura lipídica cristalina “quase perfeita” (SLN) e uma estrutura lipídica com muitas imperfeições (NLC). A matriz resultante da preparação das SLN tende a formar uma estrutura cristalina relativamente perfeita diminuindo o espaço no qual os ingredientes ativos se podem acomodar. Por sua vez, os NLC são constituídos por uma mistura de lípidos estruturalmente diferentes, lípido sólido e lípido líquido, originando uma matriz lipídica com imperfeições (16, 22).

Dependendo do método de produção e da composição da mistura lipídica são obtidos diferentes tipos de NLC. Existem três modelos que descrevem a incorporação de ingredientes ativos nos NLC (Figura 9): o modelo do cristal imperfeito (NLC do tipo I); o modelo amorfo (NLC do tipo II); e o modelo múltiplo (NLC do tipo III) (16, 29, 31, 39, 43, 46, 50, 59).

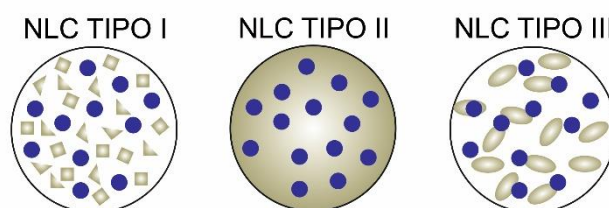


Figura 9 – Modelos teóricos para a incorporação de ingredientes ativos nos NLC (adaptado de (31)).

Os NLC do tipo I, ou modelo de cristal imperfeito, apresentam uma estrutura lipídica desorganizada que permite uma elevada incorporação de ingredientes ativos. Este modelo é obtido quando se misturam lípidos sólidos com pequenas quantidades de óleos. Devido ao uso de lípidos com cadeias de ácidos gordos de diferente comprimento, assim como à estrutura de mono, di e triacilgliceróis, obtém-se uma matriz com muitas imperfeições, porque esta não consegue formar uma estrutura ordenada. Estas imperfeições geram mais espaço para acomodar mais ingrediente ativo, aumentando, desta maneira, a eficácia de encapsulação (16, 31, 43, 46, 50, 59).

Os NLC do tipo II são obtidos a partir da mistura de lípidos sólidos com grandes quantidades de lípidos líquidos especiais, como por exemplo, o miristato de isopropilo ou os triglicérides de cadeia média, que não recristalizam após o processo de homogeneização e arrefecimento. Estes lípidos permitem a preparação de nanopartículas de estrutura amorfa, não cristalina, minimizando a expulsão das substâncias durante o armazenamento, pois evitam a recristalização do lípido para formas mais estáveis (16, 31, 43, 46, 50, 59).

O modelo múltiplo compreende os NLC do tipo III que apresentam pequenos nanocompartimentos oleosos dentro da matriz lipídica sólida, gerados pela separação de fases. Este modelo pode ser comparado às emulsões múltiplas do tipo água em óleo em água (A/O/A) sendo, mais concretamente, uma emulsão do tipo óleo em lípido sólido em água (O/LS/A). Este tipo de NLC é obtido por mistura de lípidos sólidos com lípidos líquidos, numa proporção tal que a solubilidade das moléculas do lípido líquido no lípido sólido seja ultrapassada, levando à separação de fases e à formação de pequenos nanocompartimentos de lípido líquido no seio da matriz lipídica sólida. A vantagem deste modelo é o aumento da capacidade de carga para os ingredientes ativos que mostram geralmente uma solubilidade mais elevada nos lípidos no estado líquido do que nos lípidos no estado sólido (16, 19, 31, 43, 46, 60, 61).

### **1.3. Lípidos líquidos utilizados na preparação dos NLC**

Com o intuito de desenvolver dispersões coloidais de NLC, foram usados como lípidos líquidos a vitamina E, o óleo de rosa mosqueta e o cetil dimeticone, tendo sido selecionados de acordo com as suas propriedades, nomeadamente pelas suas características hidratantes.

O acetato de  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais comum de vitamina E encontrada em produtos cosméticos. Para além de funções antioxidantes, que lhe conferem propriedades antienvhecimento, tem também propriedades emolientes e hidratantes. Contudo, estão descritos na literatura alguns problemas de instabilidade à temperatura, oxigénio e luz (62-64).

O óleo de rosa mosqueta é rico em ácidos gordos poli-insaturados (ácido linoleico, linolénico e oleico) e antioxidantes (vitamina E, C, carotenóides e compostos fenólicos). Estudos indicam que este óleo além de promover a regeneração celular, sendo útil em cicatrizes e queimaduras, também ajuda no tratamento de estrias, desidratação, xerose e combate os primeiros sinais de envelhecimento da pele (14, 65, 66).

O cetil dimeticone, como a maioria dos silicones, tem propriedades emolientes. Sendo um silicone não volátil pode utilizar-se na preparação de nanopartículas lipídicas em que é necessário utilizar temperaturas superiores à temperatura de fusão do lípido sólido. Os silicones são muito utilizados pela indústria cosmética e farmacêutica devido às suas excelentes propriedades sensoriais, baixa oleosidade, fácil aplicação, espalhabilidade e suavidade sobre a pele (65, 67).

#### 1.4. Preparações semissólidas cutâneas

Neste trabalho experimental foram desenvolvidas formulações semissólidas para aplicação cutânea, mediante a adição de um agente gelificante diretamente à fase aquosa de uma dispersão de nanopartículas lipídicas. A preparação de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas permite obter formulações com consistência adequada à aplicação cutânea (16, 21). Neste sentido, é importante referir a definição de preparações semissólidas cutâneas. De acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9 *“as preparações semissólidas cutâneas são formuladas de modo a promoverem a libertação local ou transdérmica das substâncias ativas; são igualmente utilizadas devido à sua ação emoliente ou protetora e apresentam aspeto homogéneo. São constituídas por um excipiente, simples ou composto, no qual são dissolvidas ou dispersas uma ou várias substâncias ativas, sendo que a composição do excipiente pode ter influência na atividade da preparação. Os excipientes utilizados podem ser substâncias de origem natural ou sintética e podem ser monofásicos ou multifásicos. Conforme a natureza do excipiente, a preparação pode ter propriedades hidrófilas ou hidrófobas. A preparação pode ainda conter outros excipientes apropriados, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulsionantes e promotores da absorção”* (68).

A Farmacopeia Portuguesa 9 define vários tipos de preparações semissólidas cutâneas, nomeadamente, pomadas, cremes, geles, pastas, cataplasmas e emplastos medicamentosos (68).

Com efeito, as preparações semissólidas que mais se aproximam da formulação desenvolvida neste trabalho são os geles, designadamente os hidrogéis.

### **1.5. Aplicações cosméticas de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas**

As dispersões de nanopartículas lipídicas apresentam uma consistência baixa (a viscosidade é geralmente 100mPa.s). Geralmente, para se preparar uma formulação apropriada para aplicação cutânea, é necessário incorporar estas nanopartículas em sistemas monofásicos, como hidrogeles, pomadas hidrófilas, ou em sistemas bifásicos, como os cremes O/A, de forma a aumentar a sua consistência (5, 24, 31, 56). Em alternativa, pode ser efetuada a preparação de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas por adição direta do agente gelificante à fase aquosa das dispersões, o que permite obter formulações com maior concentração de nanopartículas lipídicas, sendo por isso mais vantajosa para aplicação cutânea (16, 21).

Tendo em conta as características dos sistemas semissólidos à base de nanopartículas lipídicas (por exemplo, composição lipídica, efeito oclusivo e biocompatibilidade), estes podem ter aplicações ao nível cosmético, sobretudo como hidratantes da pele, e farmacêutico, podendo ser usados em várias vias de administração, tais como: oral, bucal, ocular, cutânea e nasal (19, 69, 70).

A nanotecnologia tem vindo a ser utilizada na indústria cosmética para o desenvolvimento de formulações mais estáveis, eficazes e com sensorial diferenciado. Atualmente o consumidor procura cosméticos que, além de eficazes, sejam o menos irritantes possíveis e sensorialmente agradáveis. Tendo isto em conta, têm sido realizados muitos estudos com o intuito de desenvolver novos sistemas transportadores de ingredientes ativos. Entre estes, a indústria cosmética tem focado a sua atenção para o uso de nanopartículas lipídicas (10, 16, 71, 72).

A barreira cutânea é altamente seletiva em relação às substâncias que conseguem difundir, passivamente, através do estrato córneo. A aplicação de produtos cosméticos na pele apresenta limitações, devido sobretudo à dificuldade dos ingredientes ativos em atravessarem o estrato córneo, sendo igualmente importante garantir que estes não atinjam o sistema circulatório, devendo, portanto, evitar-se que alcancem as camadas mais profundas da derme. Os produtos antienvhecimento são um exemplo dessa limitação, pois os ingredientes ativos nestas formulações devem atuar nas camadas mais profundas da pele, especialmente na camada basal da epiderme, onde as células são diariamente renovadas e onde o efeito rejuvenescedor é mais eficaz. O grau de penetração dos ingredientes ativos nas camadas da pele é um fator muito importante, que deve ser controlado sempre que se desenvolvem produtos cosméticos. Uma

penetração insuficiente não gera efeitos, tornando a formulação ineficaz. Por outro lado, uma penetração excessiva pode originar a absorção sistêmica do ingrediente ativo e exercer efeitos sistêmicos (16).

Tendo como foco o setor cosmético, existem várias vantagens, descritas de seguida, na utilização de nanopartículas lipídicas neste tipo de formulações.

As nanopartículas lipídicas têm propriedades adesivas, formando uma película oclusiva à superfície da pele, que promove a absorção de ingredientes ativos e a prevenção da perda de água por evaporação, resultando num aumento do grau de hidratação e de elasticidade da pele. De acordo com dados publicados na literatura, as partículas de tamanho inferior a 1µm, quando aplicadas na pele, asseguram um contacto íntimo com o estrato córneo, provocando um aumento da quantidade de ingrediente ativo no local de ação (20).

O efeito oclusivo das partículas lipídicas pode ser obtido de forma controlada, mediante a diminuição do tamanho das partículas ou pelo aumento do seu número. Partículas mais pequenas, como as SLN e os NLC, têm maior adesividade e maior poder de hidratação do que partículas maiores, como as micropartículas, que originam espaços maiores entre si, o que permite uma maior perda de água por evaporação. Além disso, o aumento da hidratação da pele resultante do efeito oclusivo das nanopartículas lipídicas é independente da composição da matriz lipídica, tanto no caso das SLN, como dos NLC (5, 15, 21, 22, 27, 28, 36, 46, 47, 56, 61, 73-75).

As dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas têm demonstrado perfis de libertação bifásicos, apresentando uma libertação rápida seguida de uma libertação prolongada. Esta característica tem grande interesse quando se trata da aplicação tópica. A libertação imediata pode ser útil quando se pretende aumentar a penetração cutânea dos ingredientes ativos. Por outro lado, a libertação prolongada é importante para os compostos irritantes em concentrações elevadas, quando se pretende suprir a pele com um ingrediente ativo por um longo período de tempo, e para se reduzir o risco de ocorrer absorção sistêmica (24).

Outra aplicação cosmética das nanopartículas lipídicas é a encapsulação de filtros solares. Os protetores solares convencionais são formulados preferencialmente como emulsões, cremes ou geles, tendo a desvantagem de serem, parcial ou completamente, removidos quando imersos em água ou em contacto com o suor. Isoladamente, quer as SLN quer os NLC vazios atuam como filtros solares físicos, por terem a capacidade de refletir a radiação UV (27, 28, 47, 76, 77). Esta propriedade de dispersão da radiação depende fortemente do grau de cristalinidade da matriz lipídica. Daí que as SLN sejam

um transportador mais indicado para os produtos cosméticos com proteção solar devido ao seu elevado grau de cristalinidade, comparativamente aos NLC (16, 22, 35). A encapsulação, em nanopartículas lipídicas, de filtros solares químicos ou de partículas que atuam como filtros solares físicos, como o óxido de zinco e o dióxido de titânio, tem um efeito sinérgico em protetores solares (10, 27, 28, 36, 47, 77, 78).

Existem vários estudos que se focam na aplicação de nanopartículas lipídicas em produtos antienvhecimento. As alterações fisiológicas, que ocorrem na pele aquando do envelhecimento da derme, surgem, sobretudo, quando esta começa a perder elasticidade. Tem sido descrito que as propriedades de hidratação exercidas pelas nanopartículas lipídicas realçam a elasticidade da pele, suavizam as rugas e aumentam a penetração de compostos com propriedades antienvhecimento (79).

As nanopartículas têm também despertado interesse devido à capacidade de encapsularem moléculas quimicamente lábeis, protegendo-as de degradações. Contrariamente ao que acontece com as nanoemulsões O/A e com os lipossomas, o estado sólido das nanopartículas lipídicas permite trocas muito mais lentas entre a fase interna e a fase externa aquosa, o que aumenta significativamente a estabilidade dos compostos encapsulados. Neste sentido, podem ser encontrados na literatura científica vários estudos que descrevem o aumento da estabilidade química de compostos lábeis como o retinol (22, 80), a coenzima Q10 (16, 25) e derivados de vitamina C (61), utilizando nanopartículas lipídicas.

Também se encontram descritos benefícios na utilização de fragrâncias incorporadas em nanopartículas lipídicas em perfumes e formulações desodorizantes. Este procedimento permite a utilização de menor quantidade de fragrâncias, protegendo-as da degradação oxidativa e obtendo-se uma libertação prolongada das mesmas. A natureza ou a duração da libertação da fragrância depende da sua distribuição na matriz lipídica sólida e também do ponto de fusão dos lípidos (10, 22).

As nanopartículas lipídicas podem igualmente ser utilizadas para mascarar a cor dos ingredientes ativos encapsulados, exercendo assim um efeito pigmentante. A aparência de um produto cosmético é uma característica de extrema importância para que este seja vendido, sendo os produtos de cor branca os preferidos pelos consumidores. No entanto, alguns compostos (por exemplo, coenzima Q10 e vitamina C) apresentam coloração, conferindo uma cor pouco atrativa às formulações. Esta coloração pode ser mascarada pela encapsulação dos ingredientes ativos em nanopartículas lipídicas, o que faz com que a formulação adquira coloração branca (36, 79).

Por todas estas vantagens as nanopartículas lipídicas têm ganho cada vez mais espaço no mercado cosmético mundial, com o lançamento frequente de novos produtos a cada ano. Para este rápido crescimento contribui o facto do tempo que vai desde o desenvolvimento de um produto contendo nanopartículas lipídicas até à sua introdução no mercado cosmético ser relativamente curto, devido às exigências regulamentares menos complexas, em comparação com as dos produtos farmacêuticos. Deste modo, existem já vários cosméticos no mercado que apresentam nanopartículas lipídicas na sua constituição.

A Tabela 1 fornece uma visão geral de alguns dos produtos cosméticos veiculados em formulações à base de nanopartículas lipídicas, que se encontram no mercado desde outubro de 2005 até à atualidade (22).

Tabela 1 – Resumo de alguns dos produtos cosméticos contendo nanopartículas lipídicas introduzidos no mercado desde outubro de 2005 até à atualidade (adaptado de (22)).

<u>Produtor ou Distribuidor</u>	<u>Produto cosmético</u>	<u>Ingredientes ativos principais</u>	<u>Tipo de nanopartícula lipídica</u>
<b>Dr. Rimpler GmbH</b>	Cutanova Cream Nano Repair Q10 <sup>®</sup>	Coenzima Q10, polipéptidos, extrato de hibisco, extrato de gengibre	NLC
	Intensive Serum Nano Repair Q10 <sup>®</sup>	Coenzima Q10, polipéptidos, extrato de mafane	NLC
	Cutanova Cream Nano Vital Q10 <sup>®</sup>	Coenzima Q10, dióxido de titânio, ácido ursólico polipéptido, ácido oleanólico, extracto de girassol	NLC
<b>Isabelle Lancray</b>	Surmer Crème Légère Nano-Protection <sup>®</sup>	Óleo de côco, óleo de monoi, pseudopéptido, extrato de leite de côco, gengibre selvagem, extrato de amoreira indiana	NLC
	Surmer Crème Riche Nano-Restructurante <sup>®</sup>	Óleo de côco, óleo de monoi, extrato de leite de côco, índigo selvagem, pseudopéptido, extrato de tamanu	NLC
	Surmer Elixir du Beauté Nano-Vitalisant <sup>®</sup>	Óleo de côco, óleo de monoi, pseudopéptido, extrato de leite de côco, gengibre selvagem, extrato de amoreira indiana	NLC
	Surmer Masque Crème Nano-Hydratant <sup>®</sup>	Óleo de côco, óleo de monoi, extrato de leite de côco, gengibre selvagem, pseudopéptido, extrato de tamanu	NLC
<b>Chemisches Laboratorium Dr. Kurt Richter, CLR Berlim</b>	Nano Lipid Restore CLR <sup>®</sup>	Coenzima Q10, ácidos gordos insaturados ómega-3 e ómega-6	NLC
	Nano Lipid Q10 CLR <sup>®</sup>	Coenzima Q10, óleo de semente de groselha preta	NLC
	Nano Lipid Basic CLR <sup>®</sup>	NLC vazios, triglicerídeos de cadeia média	NLC
	Nano Lipid Repair CLR <sup>®</sup>	Óleo de semente de groselha preta, óleo de manuka	NLC
<b>Amore Pacific</b>	Super Vital Cream <sup>®</sup>	Coenzima Q10, ácidos gordos insaturados ómega-3 e ómega-6	NLC
	Super Vital Serum <sup>®</sup>	Coenzima Q10, ácidos gordos insaturados ómega-3 e ómega-6	NLC
	Super Vital Extra moist softener <sup>®</sup>	Coenzima Q10, ácidos gordos insaturados ómega-3 e ómega-6	NLC
	Super Vital Extra moist emulsion <sup>®</sup>	Coenzima Q10, ácidos gordos insaturados ómega-3 e ómega-6	NLC
	Super Vital Eye-cream <sup>®</sup>	Coenzima Q10, ácidos gordos insaturados ómega-3 e ómega-6	NLC
<b>Beate Johnen</b>	NLC Deep Effect Eye Serum <sup>®</sup>	Coenzima Q10, oligossacarídeos altamente ativos da coenzima Q10	NLC
	NLC Deep Effect Repair Cream <sup>®</sup>	Coenzima Q10, oligossacarídeos altamente ativos da coenzima Q10, dióxido de titânio	NLC
	NLC Deep Effect Reconstruction Serum <sup>®</sup>	Coenzima Q10	NLC
<b>Scholl</b>	Regeneration Creme Intensiv <sup>®</sup>	Ureia, óleo de abacate, óleo de macadâmia, óleo de semente de groselha preta	NLC
<b>Yamanouchi</b>	Nanobase <sup>®</sup>	Nanopartículas vazias à base de parafina sólida	SLN
<b>Kenzo</b>	Kenzo <sup>®</sup>	Fragrância	NLC
<b>Chanel</b>	Allure <sup>®</sup>	Fragrância	SLN

## **1.6. Toxicidade, biocompatibilidade e potencial irritativo de formulações semissólidas cosméticas à base de nanopartículas lipídicas**

Vários estudos publicados sugerem que não há evidência de aumento da toxicidade cutânea com a diminuição do tamanho da partícula, que as nanopartículas aplicadas na pele se mantêm no estrato córneo, sendo posteriormente eliminadas, e que o uso deste tipo de sistemas coloidais em cosméticos não constitui um potencial risco para a saúde humana (81).

No entanto, alguns autores têm revelado preocupações ao nível da potencial toxicidade que o uso de nanopartículas lipídicas em formulações de aplicação tópica pode exercer quando apenas pretendemos um efeito local e não sistémico. Estas relacionam-se sobretudo com o facto de na pele existirem (81, 82): poros com tamanhos nanométricos, glândulas sebáceas e folículos pilosos, que constituem vias de penetração alternativas para as nanopartículas; poder ocorrer penetração dos ingredientes ativos até às camadas mais profundas e uma conseqüente absorção sistémica; poderem surgir efeitos secundários agudos ou crónicos, ao nível local ou sistémico; ocorrerem agressões diárias, que podem danificar a sua função de barreira (por exemplo, uso excessivo de detergentes, *secura* e exposição solar excessiva).

O óxido de zinco é um exemplo de um ingrediente considerado como uma substância não tóxica pelo Comité Científico da Segurança dos Consumidores (CCSC), quando utilizado em produtos cosméticos, inclusivamente sob a forma de nanopartículas. O CCSC considerou que a utilização de nanopartículas de óxido de zinco, com uma concentração máxima de 25%, como filtro UV em protetores solares, não apresenta um risco de efeitos adversos no ser humano após aplicação cutânea. Além disso, indicou não existirem provas da absorção das nanopartículas de óxido de zinco através da pele ou por via oral, e confirmou que estas nanopartículas podem ser usadas noutros produtos cosméticos destinados a aplicação cutânea, para além dos protetores solares. No entanto, o CCSC considerou recentemente que, com base nas informações atualmente disponíveis, a utilização de nanopartículas de óxido de zinco em produtos que se apresentam sob a forma de aerossol não pode ser considerada segura devido ao potencial de absorção por inalação. Esta decisão foi publicada sob a forma de Regulamento a 21 de Abril de 2016 (83).

Apesar das restrições toxicológicas impostas pelo CCSC não se centrarem nas formulações à base de nanopartículas lipídicas, é importante avaliar a sua segurança. Para o efeito, deve recorrer-se, primeiramente, a ensaios *in vitro*, para testar a

biocompatibilidade e o potencial irritativo resultante do uso cutâneo deste tipo de formulações cosméticas.

Se os resultados dos estudos *in vitro* e de estabilidade forem satisfatórios, devem ser efetuados ensaios *in vivo*, em voluntários, para confirmar a segurança dos produtos para uso humano. No entanto, de acordo com a última revisão da declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial, o número de ensaios em voluntários humanos deve ser reduzido ao mínimo estritamente necessário (84). Neste sentido, os testes de biocompatibilidade e potencial irritativo dos produtos para aplicação cutânea devem restringir-se ao máximo nos ensaios *in vitro*.

### **1.6.1. Biocompatibilidade**

A biocompatibilidade das dispersões de nanopartículas lipídicas e das nanodispersões gelificadas pode ser avaliada recorrendo a ensaios de citotoxicidade (17, 85, 86).

Como referido anteriormente, a epiderme é composta por aproximadamente 85% de queratinócitos (Figura 4). Neste sentido, as culturas celulares de queratinócitos (HaCat) têm sido descritas, por diversos autores, como sendo um bom modelo para a utilização neste tipo de ensaios *in vitro* (87-89).

A citotoxicidade das formulações desenvolvidas foi avaliada em células HaCat, 24h após exposição, pelos ensaios de redução do (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e de incorporação do vermelho neutro (*Neutral Red*, NR) (17, 85, 86).

### **1.6.2. Potencial irritativo**

Um dos aspetos mais relevantes a ter em conta na utilização de determinados produtos cosméticos, e também de muitas matérias-primas, é a sua compatibilidade local com as membranas mucosas. Atualmente a avaliação das propriedades de irritação de produtos químicos e cosméticos é uma exigência fundamental (82, 90, 91).

Anteriormente, os testes *in vivo* para estimar o potencial de irritação de produtos químicos e avaliação dos seus riscos eram aceites pelas autoridades como válidos. No entanto, as polémicas discussões sobre ensaios em animais, particularmente o teste de irritação ocular efetuado em coelhos (*Draize rabbit eye irritation test*), fez aumentar a controvérsia no domínio público e científico. Neste sentido, a indústria cosmética,

responsável pela segurança dos seus produtos, tem feito esforços no sentido de procurar alternativas *in vitro* válidas aos testes de irritação realizados em animais e que lhe possam dar informações importantes acerca da compatibilidade local (82, 90). Um dos mais importantes testes utilizados para este efeito é o método *in vitro* de irritabilidade ocular, que recorre ao uso de membranas corioalantónicas, *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM), e representa uma alternativa aos testes de irritabilidade ocular em animais. A membrana corioalantónica (CAM) é uma membrana muito similar aos tecidos vascularizados existentes no olho do humano (90-93). Este método é o recomendado pela Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM, *NIH Publication No. 10-7553*, 2010) (94).

Para a colocação de produtos cosméticos no mercado é necessária a avaliação da sua segurança. Neste sentido, e de acordo com o referido no início desta secção, este estudo torna-se ainda mais relevante quando se tratam de ingredientes cosméticos nanoparticulados. Estudos recentes indicam que o ensaio *in vitro* do potencial de irritação (HET-CAM) parece ser uma solução preditiva e conveniente para os estudos de segurança pré-clínicos de sistemas coloidais, como as nanopartículas lipídicas (82, 95).

### **1.7. Objetivo do trabalho**

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e do potencial irritativo de formulações cosméticas à base de nanopartículas lipídicas.

## 2. MATÉRIAS-PRIMAS E MÉTODOS

### 2.1. Matérias-primas

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as matérias-primas descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Matérias-primas utilizadas na preparação de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas.

<b>Matéria-prima</b>	<b>Fornecedor</b>
<b>Gliceril diestearato – tipo I (Ph. Eur.) ou Gliceril palmitoestearato (USP) (Precirol® ATO 5)</b>	Gattefossé (França)
<b>Cetrimida</b>	José M. Vaz Pereira, SA (Portugal)
<b>Polissorbato 80 (Tween® 80)</b>	Acofarma (Espanha)
<b>Acetato de <math>\alpha</math>-tocoferol (vitamina E)</b>	Acef (Itália)
<b>Óleo de rosa mosqueta</b>	Fagron (Espanha)
<b>Cetil dimeticone (Microcare® Silicone M1600)</b>	Thor (França)
<b>Trietanolamina</b>	Acofarma (Espanha)
<b>Carbómero 2001 (Gelificante PFC®)</b>	Guinama (Espanha)
<b>Água ultrapura</b>	Direct-Q® Ultrapure Water Systems, Merck Millipore (Alemanha)

## **2.2. Desenvolvimento de dispersões de nanopartículas lipídicas**

Para a preparação de nanopartículas lipídicas do tipo NLC é fundamental a escolha de uma combinação lípido sólido – lípido líquido adequada (17, 49, 92, 96). A composição das várias formulações de NLC foi escolhida com base em trabalhos prévios, sendo as condições de preparação adaptadas dos mesmos (49, 56). Estes estudos revelam que o lípido sólido Precirol® ATO 5 apresenta uma boa compatibilidade com outros lípidos líquidos para preparação de NLC, e que o polissorbato 80 é um bom tensoativo para a preparação destas formulações (49, 56, 60, 97).

### **2.2.1. Estudo da compatibilidade lípido sólido – lípido líquido**

Foram selecionados vários óleos para avaliar a compatibilidade lípido sólido (Precirol® ATO 5) – lípido líquido, nomeadamente o óleo de rosa mosqueta, o cetil dimeticone e a vitamina E, tendo sido testados em proporções que variaram entre 50:50 e 90:10 (lípido sólido (LS): lípido líquido (LL)). As diferentes misturas de lípidos foram aquecidas a 100°C, com agitação de 200rpm (rotações por minuto), durante 1h. Após este período, foram arrefecidas à temperatura ambiente (20±1°C), para solidificação. A existência ou ausência de miscibilidade entre os dois lípidos foi então analisada, colocando uma porção de cada mistura lipídica sobre papel de filtro, seguida da observação visual, para verificar a existência de gotas de óleo no papel de filtro, o que seria indicativo da falta de miscibilidade entre os lípidos (49, 56, 92, 97, 98).

### **2.2.2. Preparação de nanopartículas lipídicas**

A composição das dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas é apresentada na Tabela 3, tendo sido decidida de acordo com os resultados do estudo da compatibilidade lípido sólido – lípido líquido (ver secção 3.1, Tabela 7).

Tabela 3 – Composição (% m/m) das dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas.

<b>Matéria-prima</b> <b>(% m/m)</b>	<b>SLN</b>	<b>NLC<sub>RM</sub></b>	<b>NLC<sub>CD</sub></b>	<b>NLC<sub>VE</sub></b>
<b>Precirol<sup>®</sup> ATO 5</b>	7,0	7,0	7,0	7,0
<b>Óleo de rosa mosqueta</b>	-	3,0	-	-
<b>Cetil dimeticone</b>	-	-	3,0	-
<b>Vitamina E</b>	-	-	-	3,0
<b>Tween<sup>®</sup> 80</b>	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Cetrimida</b>	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Água ultrapura</b>	90,0	87,0	87,0	87,0

RM – Óleo de rosa mosqueta; CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

Para a preparação das dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas utilizou-se a técnica de emulsificação e ultrassonicação. O processo de produção é idêntico para as SLN e os NLC. A fase lipídica e a fase aquosa (contendo tween<sup>®</sup> 80 e cetrimida) são aquecidas à mesma temperatura, aproximadamente 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido. Seguidamente, por agitação mecânica a alta velocidade (13500rpm) procede-se à dispersão da fase lipídica na fase aquosa. A agitação mecânica é efectuada por um período de 5 minutos com um Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha) (Figura 10, esquerda), formando-se uma emulsão O/A (17, 50, 99). De imediato, a emulsão O/A obtida é submetida a uma sonda de sonicação (Vibro Cell VCX 130, sonda de 6 mm, Sonics & Materials, Newtown, CT, EUA), durante 15 minutos com uma amplitude energética de 70%, o que origina uma elevada energia de cavitação, levando à colisão entre as gotículas de óleo, provocando a sua quebra em gotículas de tamanhos nanométricos (Figura 10, direita) (17, 29).

Posteriormente procede-se ao arrefecimento da nanoemulsão O/A produzida, em banho de gelo, para que ocorra a solidificação do lípido sólido e a formação das nanopartículas lipídicas. A dimensão das nanopartículas pode ser regulada alterando a velocidade e o tempo de agitação mecânica, a amplitude energética e o tempo de sonicação (13, 17, 29).

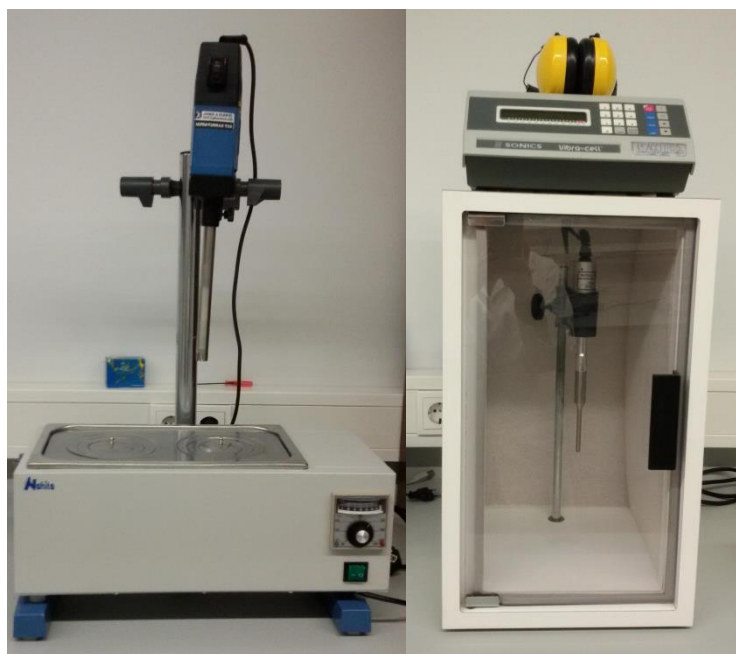


Figura 10 – Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 (esquerda) e sonda de sonicação (direita).

### 2.3. Desenvolvimento de formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas

Após preparação das nanopartículas lipídicas e de efetuados os respectivos ensaios de caracterização foi adicionado o Gelificante PFC<sup>®</sup> diretamente a estas dispersões. Este polímero é neutralizado a pH próximo de 7, por adição de trietanolamina, levando à formação das nanodispersões gelificadas.

A composição das nanodispersões gelificadas preparadas é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição (% m/m) das nanodispersões gelificadas.

<u>Matéria-prima</u> <u>(% m/m)</u>	<u>SLN</u>	<u>NLC<sub>RM</sub></u>	<u>NLC<sub>CD</sub></u>	<u>NLC<sub>VE</sub></u>
<b>Nanodispersão de SLN</b>	99,50	-	-	-
<b>Nanodispersão de NLC<sub>RM</sub></b>	-	99,50	-	-
<b>Nanodispersão de NLC<sub>CD</sub></b>	-	-	99,50	-
<b>Nanodispersão de NLC<sub>VE</sub></b>	-	-	-	99,50
<b>Gelificante PFC<sup>®</sup></b>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>Trietanolamina</b>	q.b.p. pH7	q.b.p. pH7	q.b.p. pH7	q.b.p. pH7

RM – Óleo de rosa mosqueta; CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

## **2.4. Caracterização das dispersões de nanopartículas lipídicas**

### **2.4.1. Análise organolética**

As características organoléticas são as propriedades que podem ser percebidas pelos sentidos humanos e que, quando bem aceites pelos consumidores, podem levar a uma maior adesão ao tratamento ou à escolha de um produto cosmético em detrimento de outro.

A análise das características organoléticas permite obter uma primeira noção da qualidade da preparação. Apesar da simplicidade desta avaliação, problemas no aspeto e/ou homogeneidade das preparações são indicativos imediatos, acessíveis e quase sempre seguros de problemas nas matérias-primas ou durante o processo de produção das formulações (100, 101).

Qualquer indivíduo, após a aplicação de uma formulação semissólida na pele, submete-a, involuntariamente a uma análise visual, olfativa e táctil. A cor e o odor são dois índices seguros para elucidar quanto ao estado de conservação da preparação, pelo que uma mudança da cor ou um cheiro diferente, mais ou menos pronunciado, são indícios de que houve alteração (101, 102). Neste sentido, é importante proceder à caracterização organolética das dispersões coloidais das nanopartículas lipídicas, com o objetivo de detetar alterações ou problemas que possam afetar a qualidade e a estabilidade da preparação final. A análise organolética consiste numa avaliação visual da cor e da homogeneidade das preparações, bem como do odor (100, 101).

Esta avaliação foi efetuada imediatamente após a preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas e ao fim de 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) e no frigorífico ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **2.4.2. Tamanho**

O tamanho das nanopartículas tem um impacto direto sobre a estabilidade física das dispersões coloidais, sendo também um parâmetro muito importante durante a optimização das formulações (17, 23).

A medição do tamanho das partículas foi realizada por difratometria de laser (*Laser Diffraction, LD*) utilizando o aparelho Mastersizer 3000 (Malvern, Reino Unido), ilustrado na Figura 11.



Figura 11 – Mastersizer 3000, Malvern.

A LD é um método rápido, fácil de usar, flexível e que pode ser adaptado para medir amostras em diferentes formas físicas. Esta técnica baseia-se no fenómeno das partículas em suspensão dispersarem a luz, em todas as direções, com um padrão de intensidade que é dependente do tamanho das partículas (100). Assim, as partículas de maiores dimensões dispersam a luz em pequenos ângulos em relação ao feixe de laser, enquanto as partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. Os sinais do fluxo de luz recebidos pelo fotodetector são convertidos em corrente elétrica, que é digitalizada e processada em dados de distribuição de tamanho, com base na teoria da difusão da luz de Mie, sendo o tamanho das partículas indicado como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente (103).

As condições definidas para a determinação do tamanho de partícula, por LD estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições do método da difratometria de laser (LD).

<b>Material (partícula)</b>	Lípido
<b>Índice de Refração da partícula</b>	1,4
<b>Índice de Absorção da partícula</b>	0,001
<b>Dispersante</b>	Água
<b>Índice de Refração do dispersante</b>	1,33
<b>Modelo</b>	Modelo de Mie

O resultado da avaliação do tamanho das partículas é geralmente apresentado na forma de uma distribuição estatística. Os tamanhos das partículas são apresentados em percentis, obtendo-se o volume de distribuição de 10, 50 e 90% ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  respetivamente), que se refere às partículas com diâmetros iguais ou inferiores aos

valores obtidos. Por cada amostra, o aparelho faz 5 leituras do tamanho e apresenta a média, o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade, ao longo do tempo, das dispersões de nanopartículas lipídicas preparadas mediu-se o seu tamanho após 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) e no frigorífico ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **2.4.3. Estabilidade acelerada por centrifugação**

As técnicas de envelhecimento utilizadas para avaliar a estabilidade dos produtos cosméticos têm de ser, muitas vezes, adaptadas ao tipo de amostra, para que seja possível detetar quaisquer alterações nas características da preparação. Interessa, por isso, realizar ensaios de estabilidade num curto espaço de tempo, para prever eventuais alterações que possam ocorrer na preparação durante o seu armazenamento, pelo que se efetuam ensaios de estabilidade acelerada. Estes ensaios permitem aumentar a velocidade das alterações físicas e/ou químicas do produto e podem recorrer a diferentes métodos, tais como os testes mecânicos ou os que utilizam condições de temperatura e humidade exageradas (100, 104).

De acordo com o referido, é importante efetuar este tipo de ensaios nas dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas, de forma a antecipar problemas de estabilidade. Se uma dispersão coloidal de nanopartículas lipídicas apresentar alterações após o ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação, significa que esta dificilmente será estável durante o período de armazenamento, pelo que deve ser descartada a sua utilização (104).

Neste método é aplicada uma condição extrema de força gravítica que produz *stress* na amostra, devido à força gravitacional que atua nas nanopartículas dentro do tubo de centrífuga, permitindo observar possíveis alterações e prever a estabilidade das formulações ao longo do tempo. Estas alterações podem ser observadas sob a forma de precipitados, sedimentos compactos (*caking*), ocorrência de separação de fases, coalescência, entre outros (104, 105).

O teste foi realizado numa centrífuga Eppendorf AG 5804 (Alemanha) (Figura 12), na qual foram colocados aproximadamente 6mL de dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas. A amostra foi submetida a 2 ciclos de 3000rpm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Só é efetuado o 2º ciclo de centrifugação nas amostras que se mantiverem estáveis no final do 1º ciclo.



Figura 12 – Centrífuga, Eppendorf AG 5804.

No final do ensaio, as amostras são analisadas visualmente para verificar a existência/ausência de separação de fases, precipitação e presença de grumos, que seriam indicativos de problemas na estabilidade (104, 105).

Ao contrário dos restantes estudos de estabilidade, os ensaios de centrifugação não foram efetuados ao longo do tempo. Foram realizadas poucas horas ou dias após efetuadas as respetivas preparações e foram feitos apenas uma vez para cada preparação. Os ensaios de centrifugação dão resultados muito mais cedo que qualquer outro ensaio de estabilidade (100).

#### **2.4.4. pH**

O pH das dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas não é representativo do pH da preparação final correspondente. Contudo, tal como na análise organolética e nos ensaios de estabilidade acelerada, esta avaliação é relevante para a avaliação da estabilidade das preparações. É, por isso, importante medir o pH logo após a preparação assim como ao longo de um período de tempo mais alargado, de forma a detetar possíveis alterações na estabilidade das preparações.

A medição do pH foi realizada com o Potenciómetro Basic 20 (Crison Instruments, Espanha) da Figura 13 e os resultados apresentados são valores médios de 3 medições  $\pm$  o valor do desvio padrão.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade destes sistemas ao longo do tempo, mediu-se o pH após 1 e 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) e no frigorífico ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ).



Figura 13 – Potenciômetro, Basic 20.

#### 2.4.5. Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) é uma técnica de análise térmica utilizada em estudos de pré-formulação para medir a energia calorífica absorvida ou libertada durante o aquecimento ou arrefecimento de uma substância ou mistura, em relação a uma amostra de referência (17). A medição dessa energia fornece dados qualitativos e quantitativos dos processos endotérmicos (absorção de energia calorífica) e exotérmicos (libertação de energia calorífica), permitindo inferir se existiram ou não alterações das propriedades físicas e/ou químicas das substâncias e/ou misturas. A fusão é típica de um processo endotérmico e a cristalização é identificada como um processo exotérmico (106).

A utilização desta técnica é importante para investigar o grau de pureza dos lípidos, bem como a sua capacidade de recristalizar depois da fusão, formando nanopartículas lipídicas, e para pesquisar a formação de *supercooled melts*, que impedem a formação dessas nanopartículas. Nos casos em que existem substâncias dissolvidas nos lípidos, os resultados do DSC demonstram a existência/ausência de miscibilidade entre estas substâncias, o que permite inferir acerca da eficiência de encapsulação dessa substância nas nanopartículas lipídicas (107).

O aparelho utilizado para efetuar as análises de DSC foi o DSC 200 F3 Maia<sup>®</sup> (NETZSCH, Alemanha) (Figura 14). É constituído por um duplo forno com duas posições, uma para o cadinho da amostra a analisar e outra para o cadinho de referência, que normalmente se encontra vazio. As amostras são pesadas (entre 2 e 3 mg) num cadinho

de alumínio, que é posteriormente fechado e colocado no forno. As amostras analisadas são o lípido sólido, os lípidos líquidos, a mistura lípido sólido com os vários lípidos líquidos e as dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas recentemente preparadas e após armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$  e  $5\pm 1^\circ\text{C}$  durante 7 meses. As amostras são submetidas a um programa de temperatura entre  $20^\circ\text{C}$  e  $90^\circ\text{C}$  (temperatura máxima acima do ponto de fusão do lípido), a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . O resultado da análise traduz-se num termograma, sendo a determinação dos parâmetros (entalpia, temperatura de início de fusão e ponto de fusão) feita com o programa informático NETZSCH Proteus Thermal Analysis. A entalpia corresponde à área do pico, obtida por integração deste. O índice de recristalização (IR) é um parâmetro frequentemente usado para comparar o grau de cristalinidade entre formulações, sendo calculado com base na variação de entalpia da formulação, através da seguinte fórmula (17, 107-110):

$$IR (\%) = \frac{\text{Entalpia da formulação (SLN ou NLC)} (J/g)}{\text{Entalpia do bulk } (J/g) \times \text{concentração da fase lipídica}} \times 100$$



Figura 14 – DSC 200 F3, Netzsch, Maia®.

#### 2.4.6. Morfologia

A microscopia eletrónica permite obter informação adicional sobre o tamanho, forma e superfície das nanopartículas lipídicas. Podem ser usadas diferentes técnicas de microscopia eletrónica, como por exemplo, a microscopia eletrónica de varrimento diferencial (*scanning electron microscopy*, SEM), crio-microscopia eletrónica de varrimento diferencial (*cryo scanning electron microscopy*, cryoSEM) e a microscopia eletrónica de transmissão (*transmission electron microscopy*, TEM), cujas imagens são

bastante distintas. No entanto, o aspeto típico das nanopartículas lipídicas apresenta um formato quase esférico e uma superfície lisa (17, 56, 96).

A morfologia das nanopartículas lipídicas foi analisada por cryoSEM.

A análise foi realizada utilizando o microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução, com microanálise por raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500), no laboratório de microscopia eletrónica de varrimento e microanálise por raios X do Centro de Materiais da Universidade do Porto.

Uma amostra sujeita a cryoSEM necessita de uma preparação inicial. Antes da análise, a amostra é rapidamente arrefecida (mergulhada em azoto líquido) e transferida, sob vácuo, para a câmara de preparação da amostra. Este processo de arrefecimento deve ser rápido para reduzir a distorção morfológica da amostra. A montagem e a transferência da amostra, após fixação térmica, devem ser feitas sob vácuo, uma vez que o contacto com a atmosfera pode resultar em humidade na amostra (111, 112). Posteriormente, as amostras são fraturadas, sublimadas durante 120s a  $-90^{\circ}\text{C}$ , e revestidas com uma mistura de ouro e paládio, por pulverização iónica, durante 35s e com uma corrente elétrica de 12mA. As amostras são depois transferidas para a câmara do SEM e a observação é realizada a uma temperatura de  $-150^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5. Caracterização das preparações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas**

### **2.5.1. Análise organolética**

As nanodispersões gelificadas preparadas, tal como as dispersões coloidais de nanopartículas lipídicas (secção 2.4.1), foram avaliadas quanto ao aspeto, em particular quanto à cor, odor e homogeneidade. Esta avaliação foi efetuada imediatamente após a sua preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **2.5.2. Estabilidade acelerada por centrifugação**

Tal como nas dispersões de nanopartículas lipídicas (secção 2.4.3), a avaliação deste parâmetro nas formulações semissólidas foi realizada numa centrífuga Eppendorf AG 5804 (Alemanha). A amostra é submetida a 2 ciclos de 3000rpm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Só é efetuado o 2º ciclo nas amostras que se mantiverem estáveis no final do 1º ciclo.

No final do ensaio as amostras são analisadas visualmente quanto à separação de fases, precipitação e presença de grumos, que são indicativos de problemas de estabilidade.

### **2.5.3. pH**

A determinação do pH de uma formulação para aplicação cutânea é extremamente importante, uma vez que cada produto deve apresentar pH compatível com o pH do local de aplicação. Normalmente a pele apresenta um pH de 5.5, embora este valor possa variar ligeiramente consoante as diferentes zonas do corpo. O pH natural da pele provém das secreções das glândulas sudoríparas, sebáceas e da produção de ácido láctico, o que leva à formação de um filme protetor sobre toda a superfície cutânea, designado filme hidrolipídico (100, 101, 113).

A avaliação do pH das preparações tem assim duas implicações importantes. A primeira, de carácter fisiológico, é a obtenção de formulações com um pH próximo do pH cutâneo, e a segunda, de carácter tecnológico, é a avaliação de possíveis alterações das

formulações ao longo do tempo, dado que as alterações de pH são um bom indicador de alterações do estado de conservação das preparações. Para além disso, uma alteração do pH ao longo do tempo representa um risco de este atingir valores não compatíveis com a aplicação cutânea (100).

É importante referir que a medição do pH de preparações semissólidas só pode ser efetuada quando estas contêm água, nomeadamente nos hidrogeles e cremes. Nos primeiros esta medição pode ser feita diretamente na preparação, enquanto nos últimos é necessário proceder à prévia separação da fase aquosa da oleosa. Neste sentido, tal como na análise organolética e nos ensaios de estabilidade acelerada, a medição do pH das nanodispersões gelificadas é relevante para a avaliação da estabilidade das preparações. É, por isso, importante medir o pH logo após a preparação, assim como ao longo de um período de tempo mais alargado, de forma a detetar possíveis alterações na estabilidade das preparações.

A medição do pH das nanodispersões gelificadas foi realizada utilizando a mesma metodologia da medição do pH das dispersões de nanopartículas lipídicas, descrita na secção 2.4.4.

Para se avaliar a estabilidade das formulações ao longo do tempo, mediu-se o pH após 1 e 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ).

#### **2.5.4. Morfologia**

A morfologia das nanodispersões gelificadas foi analisada por cryoSEM, utilizando a mesma metodologia da análise da morfologia das dispersões de nanopartículas lipídicas, descrita na secção 2.4.6.

#### **2.5.5. Reologia**

A reologia é o ramo da Física que estuda as propriedades de escoamento e deformação da matéria. A designação "Reologia" deriva da palavra grega "Rheo" (que significa escoamento) e foi sugerida por *M. Reiner* e *E. C. Bingham*, considerados os fundadores desta área de estudo (114).

As formulações semissólidas constituem uma importante categoria das preparações de uso tópico. No entanto, são materiais difíceis de caracterizar reologicamente, uma vez que combinam, no mesmo material, propriedades

características dos sólidos e dos líquidos. A determinação das propriedades reológicas das formulações semissólidas reveste-se de particular importância na avaliação da sua qualidade e estabilidade. Além disso, permite prever o grau de cedência das substâncias veiculadas, a facilidade de preparação e enchimento das embalagens no processo produtivo industrial e a avaliação da formulação na perspectiva da utilização pelo consumidor, nomeadamente em relação à facilidade de remoção do produto do material de acondicionamento e sua espalhabilidade na pele (100, 114-116).

O estudo reológico de uma preparação semissólida pode ser efetuado através da avaliação das suas propriedades de consistência, que está relacionada com a capacidade dos corpos resistirem às deformações permanentes provocadas por uma dada pressão. Esta propriedade pode ser determinada por penetrometria, espalmabilidade (ou extensibilidade), plasticidade (ou extrusão), viscosimetria e texturometria.

A viscosidade de uma preparação traduz a sua resistência ao fluxo ou ao escoamento, sendo que, quanto maior a viscosidade menor a velocidade com que a preparação escoar (102).

A utilização de nanopartículas lipídicas veiculadas em formulações semissólidas, tem sido apresentada como uma boa alternativa para melhorar as suas propriedades reológicas e, conseqüentemente, a sua aplicação tópica (21, 56, 117).

De acordo com o seu comportamento reológico, podemos classificar os sistemas em Newtonianos e não-Newtonianos.

#### *Sistemas Newtonianos*

Segundo a lei de Newton, para os líquidos ideais a tensão de corte ( $\tau$ ) é diretamente proporcional à velocidade de deformação ( $\dot{\gamma}$ ), como representado na equação ( $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$ ). O coeficiente  $\eta$  é uma medida da resistência do material ao escoamento e é designado viscosidade dinâmica, sendo expresso em Pa.s. De acordo com esta lei, a viscosidade é independente da velocidade de deformação, o que só é verdadeiro para líquidos ideais, como os designados fluidos Newtonianos. A água, a glicerina e os óleos vegetais são alguns exemplos de fluidos Newtonianos (118).

Nos fluidos com comportamento Newtoniano, a viscosidade é constante, independentemente da força aplicada, mas dependente da temperatura, da pressão e da composição do fluido. No entanto, a maioria das preparações farmacêuticas apresentam um comportamento não-Newtoniano (92, 115).

### *Sistemas não-Newtonianos*

Os líquidos complexos e preparações semissólidas apresentam comportamento não-Newtoniano, o qual é caracterizado por variações da viscosidade aparente ( $\eta_{ap}$ ) em função da velocidade de corte ou seja, da pressão, aplicada à amostra (114).

Os sistemas podem ser classificados quanto ao tipo de escoamento em reofluidificantes (ou pseudoplásticos), reofluidificantes com valor de cedência (ou plásticos) e reoessantes (ou dilatantes) (114).

O comportamento pseudoplástico caracteriza-se pela diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação. Em repouso, estes materiais apresentam uma estrutura reticular que pode ser constituída por aglomerados de moléculas que se atraem ou uma rede de cadeias poliméricas emaranhadas. Esta organização molecular é alterada por ação de uma força, resultando um comportamento reofluidificante (114).

Quando uma preparação apresenta escoamento só a partir de um determinado valor de tensão, diz-se que tem comportamento plástico. Em repouso, estes materiais comportam-se como sólidos devido à associação interpartículas. A força externa tem de ultrapassar estas forças internas e destruir a estrutura do material. A tensão de corte mínima necessária para produzir o escoamento designa-se valor ou tensão de cedência. Acima deste valor, o material passa a exibir comportamento de líquido, fluindo livremente. O valor de cedência tem grande importância, sobretudo em preparações para as quais se pretende que mantenham a sua forma até atingir a tensão suficiente para serem espalhadas sobre a pele ou mucosas (114).

As preparações que apresentam comportamento dilatante são dispersões com uma elevada concentração de partículas. Em repouso, as partículas depositam-se de tal modo que ocupam o mínimo volume possível. Os espaços interpartículas são reduzidos e a quantidade de líquido presente é apenas a necessária para os preencher, exercendo um efeito lubrificante. Quando a preparação é agitada, o volume dos espaços interpartículas aumenta e a quantidade de líquido torna-se insuficiente para assegurar a lubrificação, resultando daí um aumento da resistência ao escoamento, pelo que a viscosidade aumenta com a velocidade de corte (119).

Outro fenómeno importante que não é contemplado pela lei de Newton é a variação da viscosidade com o tempo, quando o fluido é deformado a velocidade constante. Distinguem-se dois tipos de comportamento (114):

- Tixotropia, que se traduz na diminuição da viscosidade com o tempo de deformação;

- Anti-tixotropia, caracterizada pelo aumento da viscosidade com o tempo de deformação.

Se por um lado, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado, para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação, devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura, por outro lado, não se deve ter um valor muito baixo, pois isso pode implicar uma baixa espalhabilidade do produto, não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (116).

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pela área de histerese entre as curvas ascendente e descendente de um gráfico que representa a relação velocidade de corte *versus* tensão de corte. Estes fenómenos são em geral reversíveis, retomando o fluido a sua viscosidade inicial algum tempo após cessar a deformação (114).

O estudo do comportamento reológico foi realizado no viscosímetro de cilindros concêntricos Thermo Haake Viscotester VT-550 (Thermo Scientific, Alemanha) (Figura 15), por análises contínuas de cisalhamento, que foram realizadas a fim de avaliar a razão de corte ( $s^{-1}$ ) em função da tensão de corte (Pa) (21, 115).

Para reduzir a influência da temperatura sobre o comportamento reológico das formulações semissólidas analisadas, utilizou-se um banho de água termostaticado para manter a temperatura da amostra a  $20 \pm 1^\circ C$  durante todos os ensaios (102).

O estudo iniciou-se com uma velocidade de corte de  $1 s^{-1}$  até um valor máximo de  $500 s^{-1}$  (curva ascendente), retornando posteriormente para  $1 s^{-1}$  (curva descendente). As medições reológicas foram realizadas 2 dias após a preparação e ao fim de 1 e 7 meses, com o intuito de avaliar os efeitos do tempo de armazenamento nas propriedades reológicas das nanodispersões gelificadas.

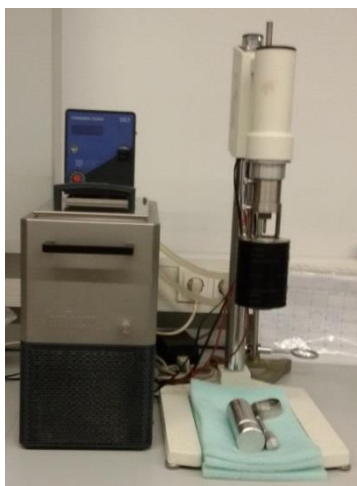


Figura 15 – Viscosímetro, Thermo Haake VT-550.

### 2.5.6. Textura

Segundo *Jackamn et al.*, a textura compreende todas as características físicas percebidas pelo sentido do tato, que estão relacionadas com a deformação sob ação de uma força e são medidas em termos de força, distância e tempo, sendo atributos sensoriais importantes para a aceitabilidade do produto final. A determinação da textura pode ser aplicada no desenvolvimento de formulações e controle da qualidade de diferentes tipos de produtos desde a indústria alimentar, à cosmética e farmacêutica (120).

A determinação da textura pode ser feita por avaliação sensorial, recorrendo a um painel de peritos, ou por avaliação instrumental. O principal objetivo desta última é, de certa forma, substituir a avaliação sensorial humana como ferramenta para avaliar a textura. Na avaliação instrumental utiliza-se uma sonda que penetra na amostra a uma velocidade, profundidade e força definidas (56, 121).

Representando graficamente a força exercida *versus* distância, pode avaliar-se os parâmetros de firmeza e adesividade (Figura 16). A firmeza está relacionada com a facilidade de aplicação do produto e, por conseguinte, com o sucesso da entrega das substâncias no local da ação, sendo determinada pela força máxima exercida durante o primeiro ciclo de compressão. A adesividade é uma medida da força necessária para superar as forças de atração entre as superfícies da amostra e a sonda. A adesividade de uma formulação pode ser obtida através do cálculo da área negativa do primeiro ciclo de compressão, sendo definida como o trabalho necessário para remover a sonda da amostra (56, 99, 121, 122).

De acordo com a Figura 16, a firmeza representa a força máxima atingida, enquanto a adesividade traduz-se no cálculo da área negativa do gráfico força exercida *versus* distância.

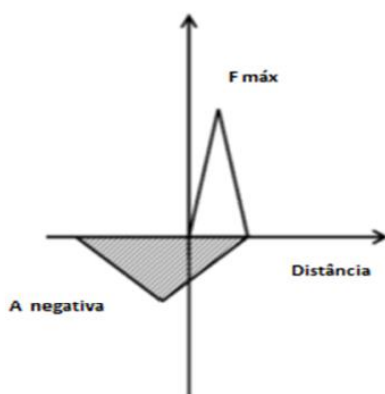


Figura 16 – Representação esquemática de um gráfico força exercida *versus* distância.

As preparações semissólidas devem sair facilmente da embalagem, espalhar-se com facilidade na pele e possuir propriedades adesivas de forma a prolongar o tempo de retenção no local onde são aplicadas (92, 123).

Esta análise foi realizada com o texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido) (Figura 17). Para realizar o teste de penetração aplicou-se o modo de compressão utilizando uma célula de carga de 5kg, uma *trigger force* de 0,049N, uma sonda cilíndrica de 25mm de diâmetro, uma profundidade de penetração de 5mm e uma velocidade de teste de  $3\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Todos os testes foram realizados em triplicado, à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ), 2 dias após a preparação e ao fim de 1 e 7 meses, de forma a estudar a influência do tempo de armazenamento na textura da formulação semissólida e, também, inferir acerca da estabilidade das nanodispersões gelificadas a longo prazo.

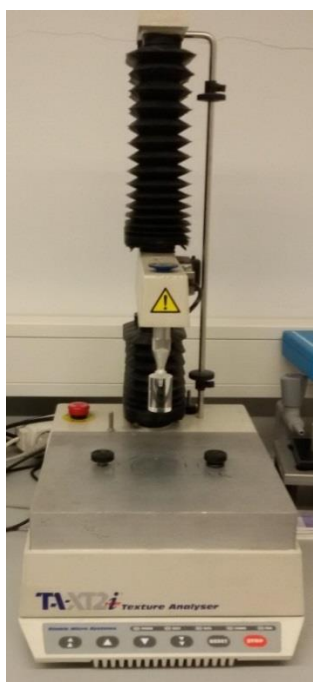


Figura 17 – Texturómetro, Stable Micro Systems TA-XT2i.

### 2.5.7. Cor

A deteção de alterações na cor das formulações semissólidas pode sugerir a ocorrência da degradação dos seus componentes. Além disso, sabe-se que os lípidos podem sofrer degradação resultante de reações de oxidação, que podem ocorrer quer durante o aquecimento necessário para a produção das nanopartículas lipídicas, quer

durante o período de armazenamento. Tipicamente, as reações de oxidação dos lípidos geram compostos coloridos. Assim sendo, a avaliação da ocorrência de alterações de cor nas formulações pode dar informações acerca da estabilidade da formulação durante o período de armazenamento (56, 124).

A determinação da cor baseou-se no espaço de cor  $L^*a^*b^*$  e foi realizada usando um colorímetro (Chroma Meter CR-500; Konica Minolta, Japão), previamente calibrado numa superfície branca de acordo com padrões pré-estabelecidos, com uma fonte de luz D65 e um ângulo de observação de  $2^\circ$  (Figura 18).



Figura 18 – Colorímetro, Chroma Meter CR-500 (esquerda) e Espaço  $L^*a^*b^*$  (direita).

$L^*$  exprime a quantidade de luz que é refletida (luminosidade), e pode variar entre 0 (preto) a 100% (branco);  $a^*$  e  $b^*$  representam, respetivamente, as cores de verde para vermelho ou azul para amarelo, com valores entre -60 (próximo de verde ou azul) e 60 (perto do vermelho ou amarelo) (56).

Através dos valores de  $a^*$  e  $b^*$ , pode calcular-se o parâmetro Chroma ( $C^*$ ), que representa a cor da formulação e permite a deteção de alterações de cor.  $C^*$  pode ser obtido através da aplicação da equação  $C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$  (56).

As determinações da cor são realizadas à temperatura ambiente ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 2 dias após a preparação e ao fim de 1 e 7 meses, de forma a estudar a influência do tempo de armazenamento na cor da preparação e, também, inferir acerca da estabilidade das nanodispersões gelificadas a longo prazo. Todas estas determinações foram realizadas em triplicado e os resultados apresentados em termos de valor médio e desvio padrão.

## **2.6. Avaliação da biocompatibilidade**

As células HaCat foram rotineiramente cultivadas em balão de vidro de 75cm<sup>2</sup>, utilizando meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado pelo calor, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> – 95% ar atmosférico, a 37°C e o meio de cultura foi mudado a cada 2 dias. As culturas foram subcultivadas semanalmente por tratamento com tripsina (tripsina a 25% / EDTA 1mM).

### **2.6.1. Ensaio de redução do MTT**

O ensaio de redução do MTT, no qual a atividade mitocondrial é utilizada para estimar a viabilidade celular, foi utilizado para avaliar a citotoxicidade das formulações desenvolvidas. Este teste permite a detecção de células mortas antes de estas perderem a sua integridade e forma (17, 125, 126).

Para o efeito, as células foram tratadas com tripsina, ressuspensas em meio de cultura celular, contadas e semeadas em placas de 96 poços, após diluição apropriada, a 10000 células/poço. Passadas 24h da sementeira, as células foram expostas às formulações em estudo (0-100µg/mL), na presença de meio de cultura celular fresco, durante 24h. Após este período, o meio de cultura celular foi removido, seguido da adição de meio de cultura celular fresco contendo 0,5mg/mL de MTT e incubação a 37°C, numa atmosfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> – 95% de ar, durante 1h. Após a incubação, o meio de cultura celular foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100%. A absorvância foi medida a 550nm num leitor de placas multi-poços (BioTek Instruments, Vermont, EUA). A percentagem de redução de MTT em relação à das células controlo foi utilizada como medida da citotoxicidade.

### **2.6.2. Ensaio de incorporação do vermelho neutro**

O ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR) baseia-se na capacidade das células viáveis para incorporar e ligar o corante vermelho neutro nos lisossomas, proporcionando uma estimativa quantitativa do número de células viáveis numa cultura (127).

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5000 células/poço, e expostas, 24h após a sementeira, às formulações em estudo (0-100µg/mL) em meio de cultura celular fresco. Passadas 24h da exposição, as células foram incubadas com vermelho neutro (50µg/mL em meio de cultura celular) a 37°C, numa atmosfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> – 95% de ar, durante 1h. Após este período de incubação, o meio de cultura celular foi removido e o corante absorvido apenas pelas células viáveis foi extraído (com álcool etílico absoluto/água destilada (1:1) contendo ácido acético a 5%). A absorvância foi medida a 540nm num leitor de placas multi-poços (PowerWaveX BioTek Instruments). A percentagem de absorção de vermelho neutro em relação à das células controlo foi utilizada como medida da citotoxicidade.

## 2.7. Avaliação do potencial irritativo

A avaliação do potencial irritativo das nanodispersões gelificadas foi feita através do ensaio de HET-CAM. Neste ensaio utilizam-se ovos fecundados de galinha Leghorn, incubados em laboratório durante nove dias. Ao nono dia, o ensaio de irritabilidade é executado sobre a membrana corioalantónica do ovo já formada. Depois de expostas as membranas corioalantónicas por remoção da casca dos ovos, foram colocados na sua superfície 0,3mL das substâncias em estudo, procedendo-se à observação do aparecimento das lesões indicadas para o ensaio.

A extensa rede de vasos sanguíneos visíveis nesta membrana, permitem observar alterações macroscópicas na sua estrutura, sendo especificamente registado o aparecimento de lise, hemorragia e/ou coagulação, durante o tempo de contacto com a amostra em estudo. O tempo, em minutos (0,5; 2 ou 5), a que cada uma das lesões surge, após o início de contacto com a amostra, é registado, sendo atribuída uma pontuação numérica a cada um deles (Tabela 6). De acordo com o valor final obtido, pelo somatório das pontuações atribuídas a cada lesão, é atribuída à amostra uma pontuação geral, até um máximo de 21 valores, indicativa do seu grau de irritabilidade (94).

Tabela 6 – Pontuações a atribuir nos tempos definidos do ensaio HET-CAM.

<b>Efeito</b>	<b>Pontuação a atribuir</b>		
	0,5 min	2 min	5 min
<b>Lise</b>	5	3	1
<b>Hemorragia</b>	7	5	3
<b>Coagulação</b>	9	7	5

A validação das condições de ensaio foi realizada pela inclusão de controlos. Estes consistem em soluções de concentrações conhecidas de substâncias para as quais o grau de irritabilidade ocular pelo método adoptado foi previamente caracterizado, tendo sido calculado o valor de pontuação geral de cada uma delas. O controlo negativo incluído no ensaio foi a solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, também utilizada como solução de hidratação. Os controlos positivos foram as soluções aquosas de laurilsulfato de sódio (LSS) 1% e de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N.

Os ensaios foram realizados em triplicado (n=3), tanto para a formulação em análise, como para os controlos positivos e negativo. As substâncias são classificadas como irritantes severas se o valor resultante for superior a 9.

O ensaio é considerado válido se os controlos positivos e negativo induzirem uma resposta que se enquadre na classificação de severamente irritante e de não irritante, respetivamente.

## **2.8. Análise estatística**

Todos os valores são apresentados como valores médios  $\pm$  desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo aos testes F (para comparação de variâncias), seguido do teste t-student (bicaudal) para avaliar a significância estatística de quaisquer diferenças nos valores médios apresentados. As amostras foram analisadas usando um nível de significância de 95% ( $\alpha= 0,05$ ).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Compatibilidade lípido sólido – lípido líquido

Os resultados dos testes de compatibilidade lipídica demonstraram que os diferentes lípidos são miscíveis nas várias proporções testadas.

Para além disso, foi analisada a consistência, sólida ou semissólida, das misturas finais após arrefecimento, uma vez que a presença de elevada quantidade de lípido líquido pode fazer com que a mistura adquira consistência semissólida, e não sólida, inadequada à preparação de nanopartículas lipídicas.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da consistência das misturas obtidas entre Precirol<sup>®</sup> ATO 5 (LS) e os lípidos líquidos (LL) testados.

<b>LS:LL (% m/m)</b>	<b>Óleo de rosa mosqueta</b>	<b>Cetil dimeticone</b>	<b>Vitamina E</b>
<b>50:50</b>	SS	SS	SS
<b>60:40</b>	S	S	SS
<b>70:30</b>	S	S	S
<b>80:20</b>	S	S	S
<b>90:10</b>	S	S	S

(S) Consistência Sólida; (SS) Consistência Semissólida

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7 escolheu-se a proporção 70:30 (LS:LL) para a preparação das nanopartículas lipídicas, pois é a proporção com maior quantidade de lípido líquido em que as diferentes misturas permanecem com uma consistência sólida, indicada para manter a viabilidade das nanopartículas. Para além disso, vários artigos científicos suportam estes resultados, demonstrando a eficácia dos NLC preparados nesta proporção (56).

## 3.2. Caracterização das dispersões de nanopartículas lipídicas

### 3.2.1. Análise organolética

Para a avaliação das características organoléticas das dispersões de nanopartículas lipídicas observou-se a sua cor, aspeto e odor, no momento da preparação e após 7 meses de armazenamento, à temperatura ambiente ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) e no frigorífico ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Os resultados da análise organolética das dispersões de nanopartículas lipídicas encontram-se ilustrados na Figura 19 e na Tabela 8.

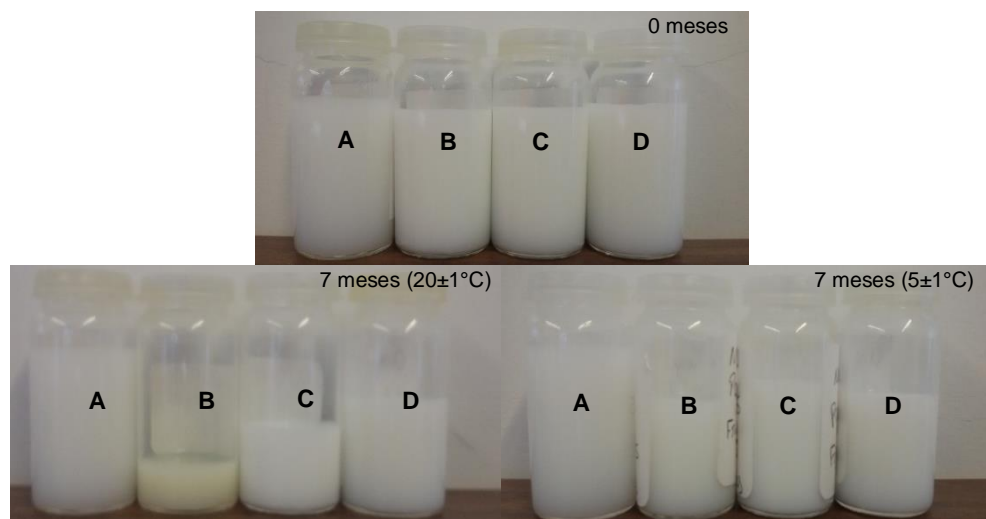


Figura 19 – Aspeto das dispersões de nanopartículas lipídicas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após a preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento, a diferentes temperaturas.

Tabela 8 – Avaliação das características organoléticas das dispersões de nanopartículas lipídicas, ao longo do tempo e a diferentes temperaturas de armazenamento.

<u>Tempo e condições de armazenamento</u>	<u>Dispersões de nanopartículas lipídicas</u>	<u>Cor</u>	<u>Aspeto</u>	<u>Odor</u>
		Branco	Leitoso	Inodoro
<b>0 dias</b>	SLN	✓	✓	✓
	NLC <sub>RM</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>CD</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>VE</sub>	✓	✓	✓
<b>7 meses (20±1°C)</b>	SLN	✓	✓	✓
	NLC <sub>RM</sub>	✗	✗	✗
	NLC <sub>CD</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>VE</sub>	✓	✓	✓
<b>7 meses (5±1°C)</b>	SLN	✓	✓	✓
	NLC <sub>RM</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>CD</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>VE</sub>	✓	✓	✓

RM – Óleo de rosa mosqueta; CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

✓ Conforme; ✗ Não Conforme

Todas as preparações finais são líquidas, inodoras, de aspeto branco leitoso, homogéneo e sem qualquer tipo de separação de fases, não sendo possível distinguir as várias preparações entre si no momento da preparação. Esse aspeto manteve-se igual durante os 7 meses em que ocorreram os ensaios para todas as preparações, à excepção das dispersões de nanopartículas lipídicas contendo óleo de rosa mosqueta armazenadas a 20±1°C. Apesar das dispersões coloidais não representarem as formulações finais, uma vez que foram gelificadas, estas alterações nos NLC contendo óleo de rosa mosqueta fazem prever problemas de estabilidade da preparação final ao longo do tempo de armazenamento. A oxidação lipídica manifesta-se pela coloração amarela e pelo cheiro a “ranço” que a formulação adquiriu.

É importante salientar que, apesar dos problemas de estabilidade conhecidos para a vitamina E, esta análise permite-nos prever que a encapsulação da vitamina E permitiu proteger este ingrediente da oxidação, dado que não se verificaram problemas no aspeto visual destas formulações (63, 64).

### 3.2.2. Tamanho

Os resultados da avaliação dos tamanhos das nanopartículas encontram-se apresentados sob a forma de uma distribuição estatística. Após análise das Figuras 20, 21, 22 e 23, verifica-se que todas as dispersões preparadas revelam a presença de 90% de partículas com tamanhos na escala nanométrica, tal como pretendido.

Como se trata de uma aplicação cosmética não há interesse em obter tamanhos muito pequenos, uma vez que se pretende que as nanopartículas lipídicas se concentrem nas camadas superiores da pele, prevenindo a sua absorção e evitando o risco de uma potencial toxicidade decorrente da absorção sistémica de nanopartículas em formulações de aplicação tópica.

A estabilidade física das dispersões preparadas foi avaliada pela análise das alterações de tamanho das nanopartículas lipídicas, após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas ( $20\pm 1^\circ\text{C}$  e  $5\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Os resultados do tamanho das SLN encontram-se ilustrados na Figura 20.

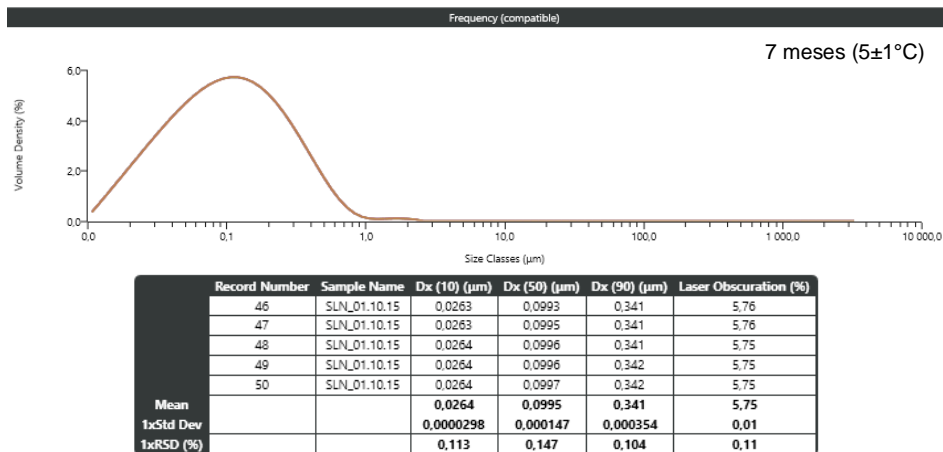
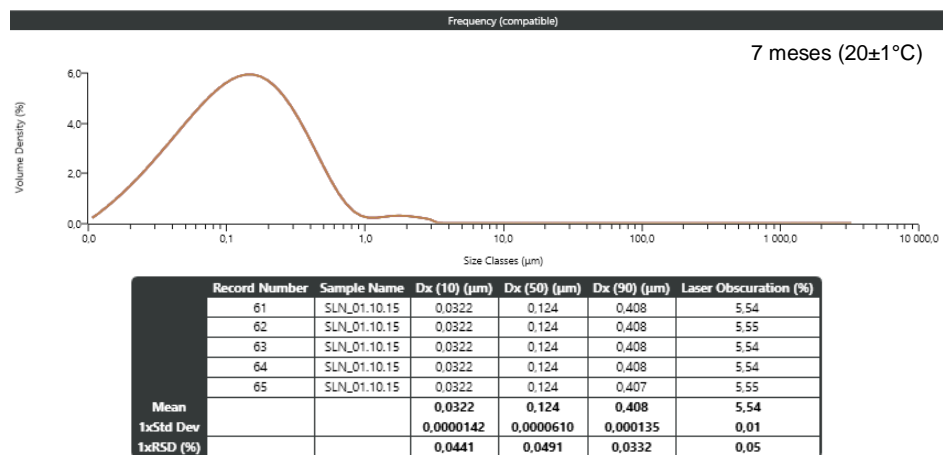
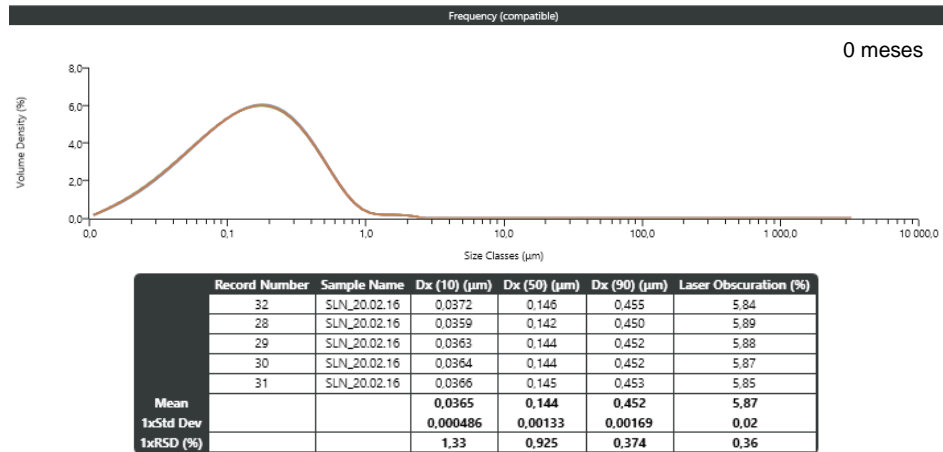


Figura 20 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho das SLN, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que 90% (D<sub>90</sub>) das SLN apresentam um tamanho não superior a 452nm, no momento da preparação, e que o tamanho médio (D<sub>50</sub>) da população de nanopartículas é de 144nm.

A Tabela 9 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada para os tamanhos das SLN.

Tabela 9 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos ( $D_{90}$  e  $D_{50}$ ) das SLN preparadas, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>	
	$D_{90}$	$D_{50}$
<b>0 meses – 7 meses (<math>20\pm 1^\circ\text{C}</math>)</b>	<0,001	<0,001
<b>0 meses – 7 meses (<math>5\pm 1^\circ\text{C}</math>)</b>	<0,001	<0,001
<b>7 meses (<math>20\pm 1^\circ\text{C}</math>) - 7 meses (<math>5\pm 1^\circ\text{C}</math>)</b>	<0,001	<0,001

Após análise estatística foram detetadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) após 7 meses de armazenamento a duas temperaturas distintas ( $20\pm 1^\circ\text{C}$  e  $5\pm 1^\circ\text{C}$ ). Em ambos os casos ocorreu diminuição do tamanho das nanopartículas ao longo do tempo de armazenamento.

Para além do tempo de armazenamento, também a temperatura de armazenamento influencia o tamanho das nanopartículas, uma vez que se verificam diferenças estatisticamente significativas quando se compara o seu tamanho após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

Estes resultados aplicam-se quer quando se analisa o tamanho médio das nanopartículas lipídicas, quer quando se analisa 90% da população.

Os resultados do tamanho dos  $\text{NLC}_{\text{RM}}$  encontram-se ilustrados na Figura 21.

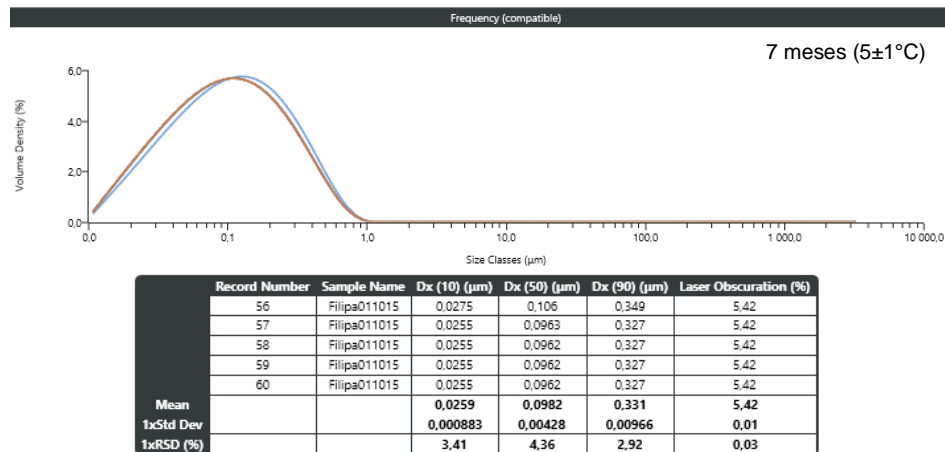
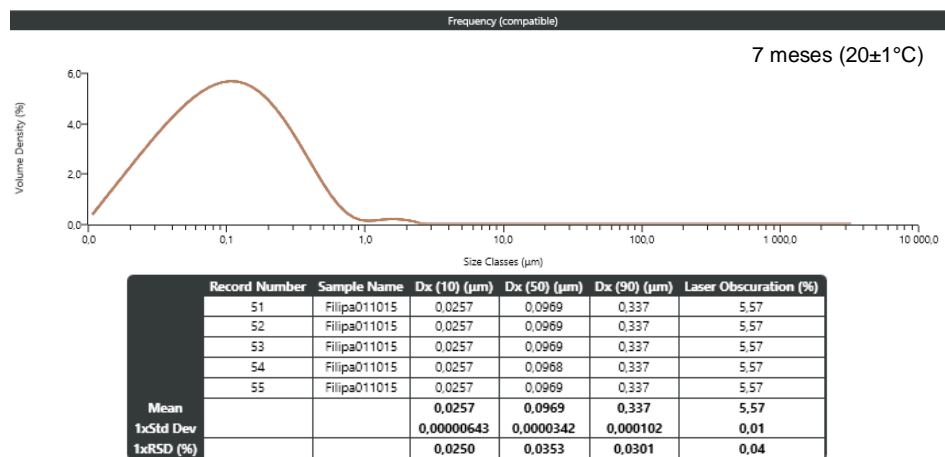
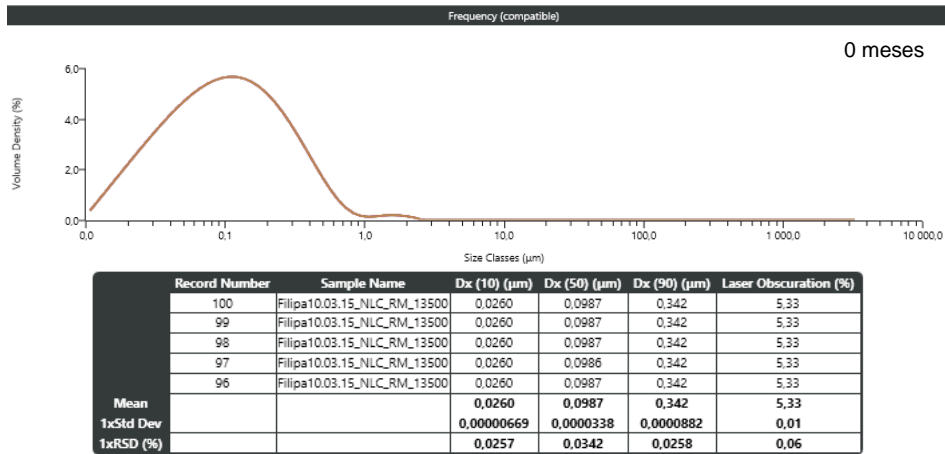


Figura 21 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho dos NLC preparados com óleo de rosa mosqueta, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que 90% (D<sub>90</sub>) dos NLC<sub>RM</sub> apresentam um tamanho não superior a 342nm, no momento da preparação, e que o tamanho médio (D<sub>50</sub>) da população de nanopartículas é de 98,7nm.

A Tabela 10 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada para os tamanhos dos NLC<sub>RM</sub>.

Os resultados destacados a negrito evidenciam os casos em que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) no tamanho das nanopartículas para as condições em análise.

Tabela 10 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos ( $D_{90}$  e  $D_{50}$ ) dos NLC preparados com óleo de rosa mosqueta, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>	
	$D_{90}$	$D_{50}$
<b>0 meses – 7 meses (<math>20 \pm 1^\circ\text{C}</math>)</b>	<0,001	<0,001
<b>0 meses – 7 meses (<math>5 \pm 1^\circ\text{C}</math>)</b>	<b>0,074</b>	<b>0,811</b>
<b>7 meses (<math>20 \pm 1^\circ\text{C}</math>) - 7 meses (<math>5 \pm 1^\circ\text{C}</math>)</b>	<b>0,272</b>	<b>0,542</b>

Após tratamento estatístico conclui-se que não existem diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre os NLC<sub>RM</sub> recentemente preparados e os que foram armazenados durante 7 meses a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . O mesmo acontece para os armazenados durante 7 meses a temperaturas diferentes.

Apenas se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os NLC<sub>RM</sub> recentemente preparados e os que foram armazenados durante 7 meses a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Estes resultados aplicam-se quer quando se analisa o tamanho médio das nanopartículas lipídicas, quer quando se analisa 90% da população.

Os resultados do tamanho dos NLC<sub>CD</sub> encontram-se ilustrados na Figura 22.

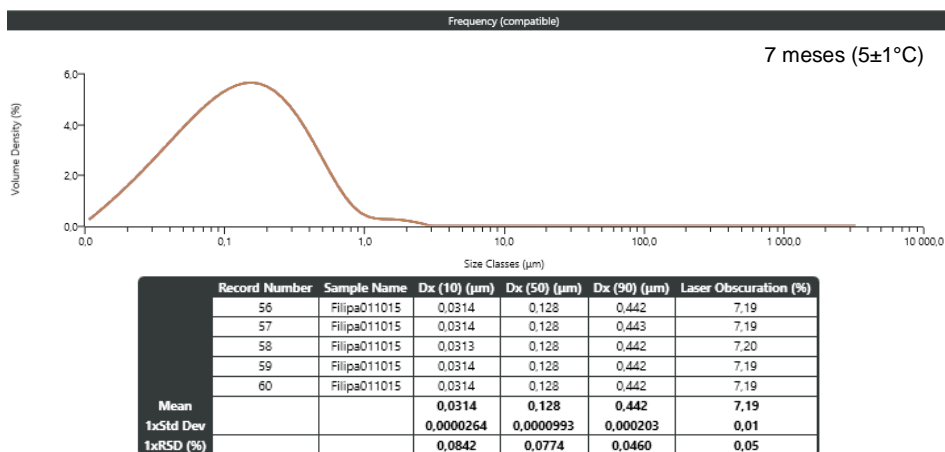
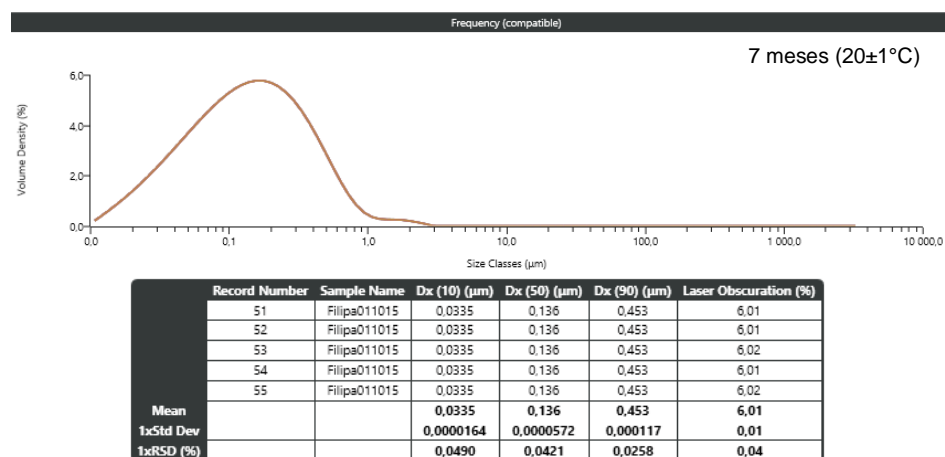
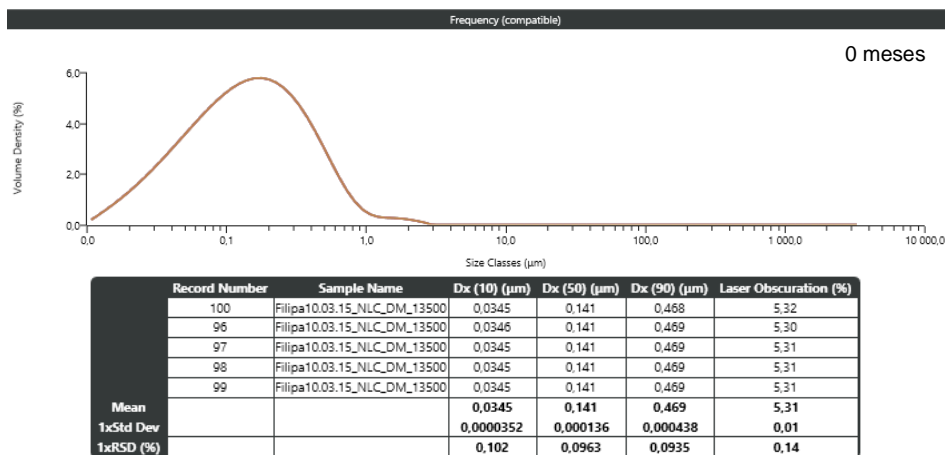


Figura 22 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho dos NLC preparados com cetil dimeticone, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que 90% (D<sub>90</sub>) dos NLC<sub>CD</sub> apresentam um tamanho não superior a 469nm, no momento da preparação, e que o tamanho médio (D<sub>50</sub>) da população de nanopartículas é de 141nm.

A Tabela 11 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada para os tamanhos dos NLC<sub>CD</sub>.

Tabela 11 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos (D<sub>90</sub> e D<sub>50</sub>) dos NLC preparados com cetil dimeticone, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>	
	D <sub>90</sub>	D <sub>50</sub>
<b>0 meses – 7 meses (20±1°C)</b>	<0,001	<0,001
<b>0 meses – 7 meses (5±1°C)</b>	<0,001	<0,001
<b>7 meses (20±1°C) - 7 meses (5±1°C)</b>	<0,001	<0,001

Após análise estatística verificam-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) após 7 meses de armazenamento a duas temperaturas distintas (20±1°C e 5±1°C). Detetou-se diminuição do tamanho das nanopartículas após 7 meses de armazenamento.

Podemos concluir que, para além do tempo de armazenamento, a temperatura também influencia o tamanho das partículas, uma vez que se verificam diferenças estatisticamente significativas quando comparamos o seu tamanho após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

Estes resultados aplicam-se quer quando se analisa o tamanho médio das nanopartículas lipídicas, quer quando se analisa 90% da população.

Os resultados do tamanho dos NLC<sub>VE</sub> encontram-se ilustrados na Figura 23.

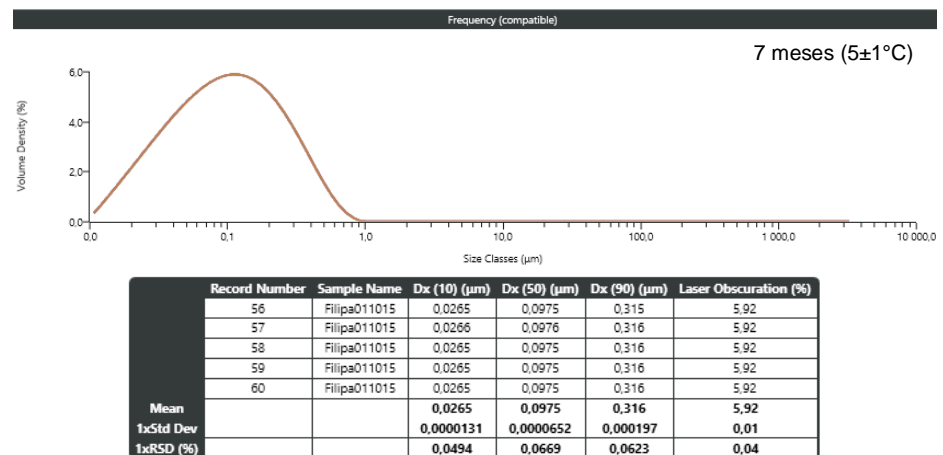
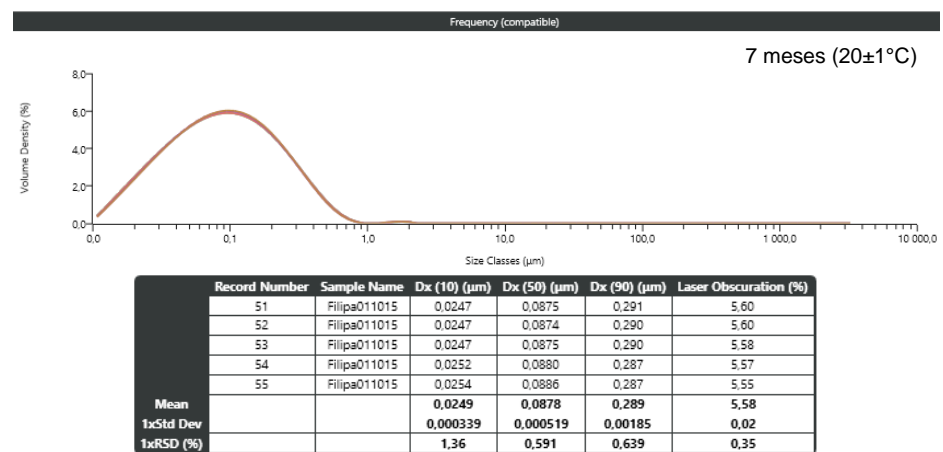
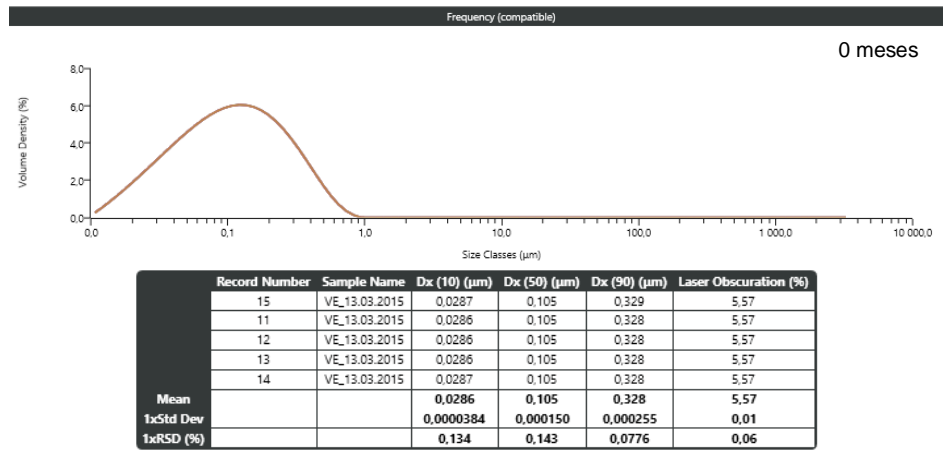


Figura 23 – Representação gráfica da densidade em volume (%) em função do tamanho dos NLC preparados com vitamina E, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Os resultados obtidos permitem-nos verificar que 90% (D<sub>90</sub>) dos NLC<sub>VE</sub> apresentam um tamanho não superior a 328nm, no momento da preparação, e que o tamanho médio (D<sub>50</sub>) da população de nanopartículas é de 105nm.

A Tabela 12 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada para os tamanhos dos NLC<sub>VE</sub>.

Tabela 12 – Níveis de significância da análise estatística efetuada aos tamanhos (D<sub>90</sub> e D<sub>50</sub>) dos NLC preparados com vitamina E, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>	
	D <sub>90</sub>	D <sub>50</sub>
<b>0 meses – 7 meses (20±1°C)</b>	<0,001	<0,001
<b>0 meses – 7 meses (5±1°C)</b>	<0,001	<0,001
<b>7 meses (20±1°C) - 7 meses (5±1°C)</b>	<0,001	<0,001

Após análise estatística detetaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) após 7 meses de armazenamento a duas temperaturas distintas (20±1°C e 5±1°C), ocorrendo em ambos os casos uma diminuição no tamanho das nanopartículas.

Podemos também concluir que a temperatura de armazenamento influencia o tamanho das nanopartículas, uma vez que se verificam diferenças estatisticamente significativas no seu tamanho após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

Estes resultados aplicam-se quer quando se analisa o tamanho médio das nanopartículas lipídicas, quer quando se analisa 90% da população.

No entanto, tendo em conta a aplicação pretendida para as várias formulações semissólidas preparadas (aplicação cutânea), o facto de se verificarem alterações estatisticamente significativas no tamanho das nanopartículas não inviabiliza a sua aplicação. É importante salientar que o tamanho das nanopartículas lipídicas se manteve na escala nanométrica após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas, para todas as formulações preparadas.

### **3.2.3. Estabilidade acelerada por centrifugação**

Na Figura 24 podemos verificar o aspeto final das dispersões de nanopartículas lipídicas, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

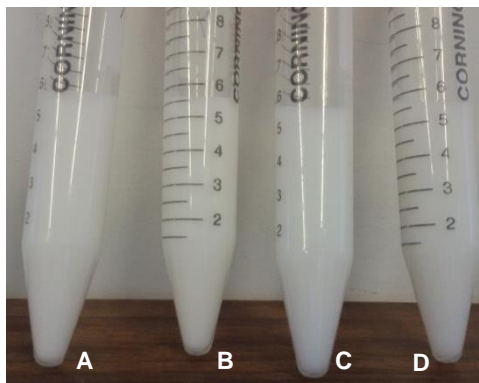


Figura 24 – Aspeto das dispersões de nanopartículas lipídicas submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E.

Verificou-se que nenhuma das amostras submetidas a este teste apresentou instabilidade física, manifestando, no final, o mesmo aspecto homogéneo verificado logo após a sua preparação. Não se observou separação de fases, precipitação, formação de grumos ou quaisquer outros sinais de instabilidade.

Tendo em consideração o facto de nenhuma das amostras apresentar sinais de instabilidade após a realização deste ensaio, procedeu-se à gelificação das 4 dispersões de nanopartículas lipídicas ensaiadas.

#### 3.2.4. pH

A determinação do pH foi efetuada em todas as amostras, imediatamente após a preparação e ao fim de 1 e 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas ( $20\pm 1^\circ\text{C}$  e  $5\pm 1^\circ\text{C}$ ), de forma a avaliar possíveis variações de pH que poderiam ser indicadores de instabilidade. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 25.

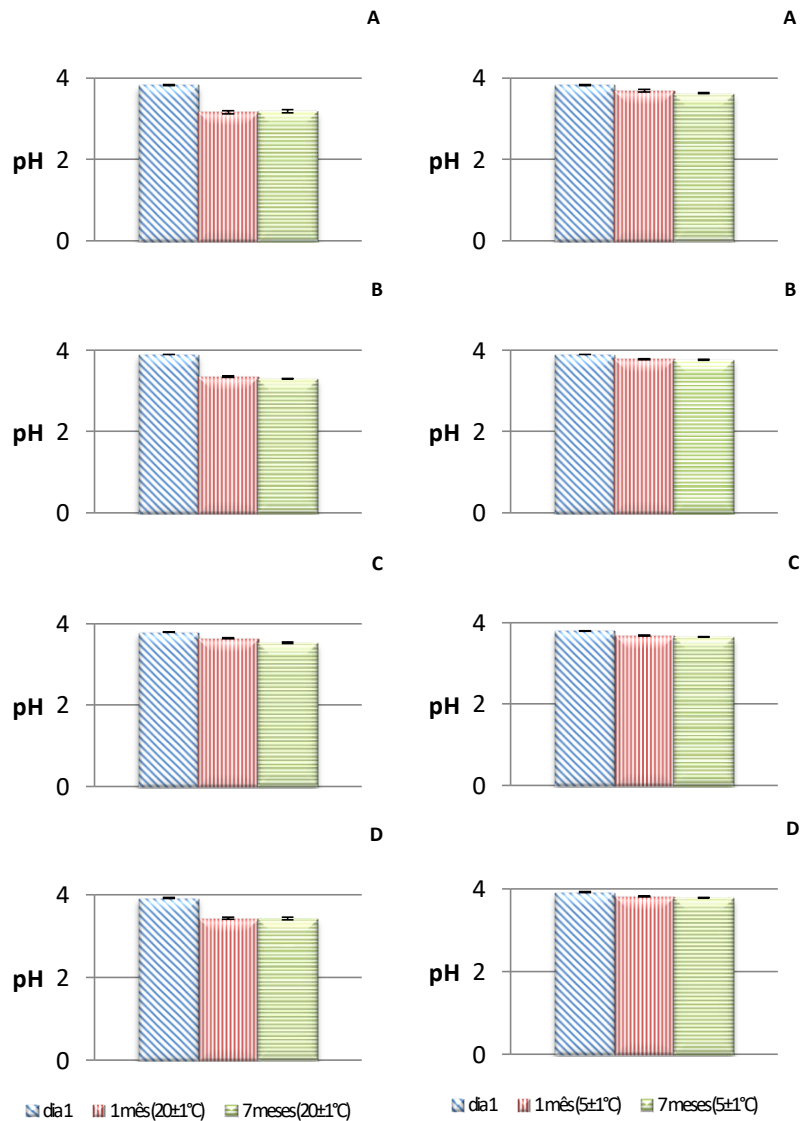


Figura 25 – Representação gráfica da variação de pH das dispersões de nanopartículas lipídicas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

A Tabela 13 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada ao pH das várias dispersões de nanopartículas lipídicas preparadas.

Tabela 13 – Níveis de significância da análise estatística do pH das várias dispersões de nanopartículas lipídicas, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

<u>Dispersões de nanopartículas lipídicas</u>	<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>
<b>SLN</b>	Dia 1 - 7 meses (20±1°C)	<0,001
	Dia 1 - 7 meses (5±1°C)	<0,001
	7 meses (20±1°C) – 7 meses (5±1°C)	<0,001
<b>NLC<sub>RM</sub></b>	Dia 1 - 7 meses (20±1°C)	<0,001
	Dia 1 - 7 meses (5±1°C)	<0,001
	7 meses (20±1°C) – 7 meses (5±1°C)	<0,001
<b>NLC<sub>CD</sub></b>	Dia 1 - 7 meses (20±1°C)	<0,001
	Dia 1 - 7 meses (5±1°C)	<0,001
	7 meses (20±1°C) – 7 meses (5±1°C)	<0,001
<b>NLC<sub>VE</sub></b>	Dia 1 - 7 meses (20±1°C)	<0,001
	Dia 1 - 7 meses (5±1°C)	<0,001
	7 meses (20±1°C) – 7 meses (5±1°C)	0,003

RM – Óleo de rosa mosqueta; CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

Após análise dos resultados obtidos podemos concluir que o pH de todas as dispersões de nanopartículas lipídicas sofreu alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em função do tempo e da temperatura de armazenamento, no entanto, este facto não acarreta problemas para a utilização destas dispersões, uma vez que este pH não é representativo do pH da preparação final correspondente.

### 3.2.5. Calorimetria diferencial de varrimento

A DSC concede-nos uma visão sobre o comportamento de fusão e recristalização dos lípidos sólidos das nanopartículas lipídicas. Este ensaio baseia-se no facto de que as várias modificações que ocorrem nos lípidos originam pontos de fusão e entalpias diferentes (57, 128).

Os óleos constituintes dos NLC foram também sujeitos ao ensaio de DSC. Pela análise dos termogramas (Figuras 27, 28 e 29) podemos verificar que estes não sofrem degradação quando sujeitos a temperaturas até 90°C, uma vez que não se verificam alterações significativas na linearidade do gráfico dos termogramas. Esta informação é de extrema importância porque nos permite comprovar que os óleos não sofrem degradação quando sujeitos às temperaturas utilizadas durante a preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas.

Relativamente ao lípido sólido isolado (*bulk*), obteve-se um pico largo (Figura 26, termograma [1,2]). Este resultado deve-se ao facto de se tratar de um lípido que não é puro, sendo constituído por uma mistura de lípidos, que têm pontos de fusão diferentes. O *bulk* exibe um pico endotérmico por volta dos 65,90°C, com um pequeno ombro que se inicia por volta dos 56,00°C (*onset* ou temperatura de início de fusão), provavelmente devido à fusão da forma polimórfica  $\alpha$ . Resultados semelhantes foram publicados por outros autores, que realizaram trabalhos semelhantes (129, 130).

Os termogramas obtidos são apresentados nas Figuras 26, 27, 28 e 29 e os respetivos parâmetros nas Tabelas 14, 15, 16 e 17.

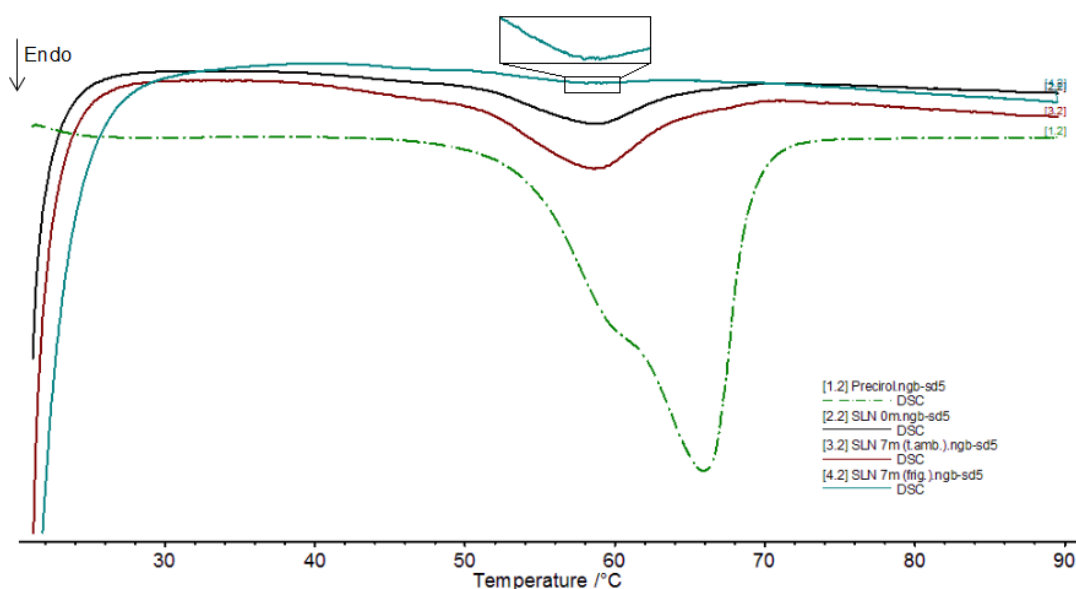


Figura 26 – Termograma do lípido sólido isolado (Precirol® ATO 5) e das SLN, no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Tabela 14 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado e as SLN, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

<u>Constituintes / Dispersões de nanopartículas lipídicas</u>	<u>Onset (°C)</u>	<u>Ponto de fusão (°C)</u>	<u>Entalpia (J/g)</u>	<u>Índice de recristalização, IR (%)</u>
<b>Precirol® ATO 5</b>	56,00	65,90	205,89	100,00
<b>SLN (0 meses)</b>	52,20	58,60	4,32	29,97
<b>SLN (7 meses a 20±1°C)</b>	52,00	58,60	4,39	30,46
<b>SLN (7 meses a 5±1°C)</b>	51,60	58,10	0,97	6,73

Após análise da Tabela 14, verifica-se uma diminuição pronunciada em todos os parâmetros das SLN (*onset*, ponto de fusão, entalpia e IR), comparativamente ao *bulk*.

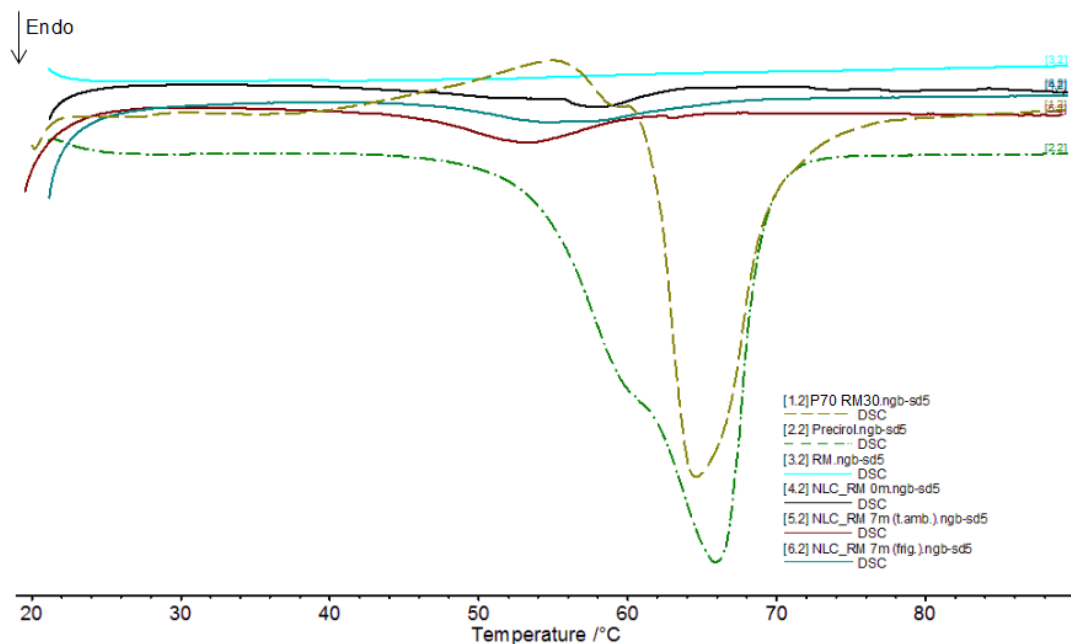


Figura 27 – Termograma do lípido sólido (Precirol® ATO 5) e lípido líquido (RM – óleo de rosa mosqueta) isolados, da mistura lípido sólido com lípido líquido (P<sub>70</sub>RM<sub>30</sub>) e dos NLC<sub>RM</sub>, no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Tabela 15 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado, a mistura lípido sólido com lípido líquido e as dispersões coloidais de NLC<sub>RM</sub>, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

<u>Constituintes / Dispersões de nanopartículas lipídicas</u>	<u>Onset (°C)</u>	<u>Ponto de fusão (°C)</u>	<u>Entalpia (J/g)</u>	<u>Índice de recristalização, IR (%)</u>
<b>Precirol® ATO 5</b>	56,00	65,90	205,89	100,00
<b>P<sub>70</sub> : RM<sub>30</sub></b>	61,40	64,60	127,62	88,55
<b>NLC<sub>RM</sub> (0 meses)</b>	55,70	57,80	3,27	22,69
<b>NLC<sub>RM</sub> (7 meses a 20±1°C)</b>	46,80	53,30	7,07	49,06
<b>NLC<sub>RM</sub> (7 meses a 5±1°C)</b>	48,70	55,00	6,68	46,35

P – Precirol® ATO 5; RM – Óleo de rosa mosqueta

A adição de óleo de rosa mosqueta ao lípido sólido induziu um deslocamento do ponto de fusão para temperaturas mais baixas (de 65,90°C para 64,60°C), a uma redução da entalpia necessária para fundir o lípido (de 205,89J/g para 127,62J/g) e, conseqüentemente, a uma diminuição do IR para 88,55%. Como podemos ver pela análise da Tabela 15, a diminuição do ponto de fusão, da entalpia e do IR é ainda mais pronunciada para os NLC<sub>RM</sub>, comparativamente ao *bulk* e à mistura do lípido sólido com o óleo.

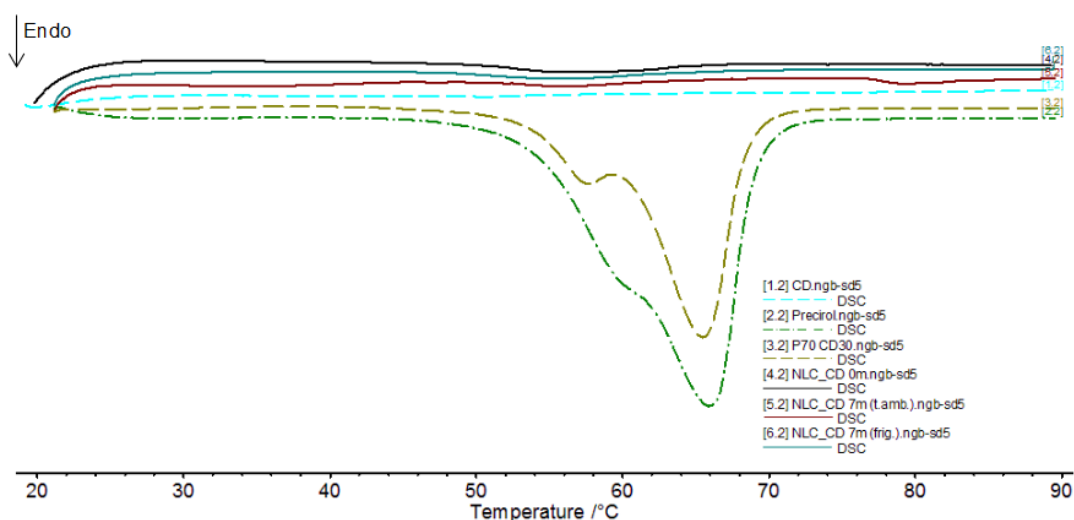


Figura 28 – Termograma do lípido sólido (Precirol<sup>®</sup> ATO 5) e lípido líquido (CD – cetil dimeticone) isolados, da mistura lípido sólido com lípido líquido (P<sub>70</sub>CD<sub>30</sub>) e dos NLC<sub>CD</sub>, no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Tabela 16 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado, a mistura lípido sólido com lípido líquido e as dispersões coloidais de NLC<sub>CD</sub>, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

<u>Constituintes / Dispersões de nanopartículas lipídicas</u>	<u>Onset (°C)</u>	<u>Ponto de fusão (°C)</u>	<u>Entalpia (J/g)</u>	<u>Índice de recristalização, IR (%)</u>
<b>Precirol<sup>®</sup> ATO 5</b>	56,00	65,90	205,89	100,00
<b>P<sub>70</sub> : CD<sub>30</sub></b>	61,20	65,50	130,27	90,39
<b>NLC<sub>CD</sub> (0 meses)</b>	50,40	55,90	4,19	29,07
<b>NLC<sub>CD</sub> (7 meses a 20±1°C)</b>	52,70	56,10	3,65	25,33
<b>NLC<sub>CD</sub> (7 meses a 5±1°C)</b>	50,20	55,00	1,55	10,75

P – Precirol<sup>®</sup> ATO 5; CD – Cetil dimeticone

A adição de cetil dimeticone ao lípido sólido induziu a um deslocamento do ponto de fusão para temperaturas mais baixas (de 65,90°C para 65,50°C), a uma redução da entalpia de fusão (de 205,89J/g para 130,27J/g) e conseqüentemente a uma diminuição do IR para 90,39%. Como previsto, verifica-se que a preparação de NLC<sub>CD</sub> levou a uma redução ainda mais significativa do *onset*, do ponto de fusão, da entalpia e do IR, relativamente ao lípido sólido isolado e à mistura do lípido sólido com o cetil dimeticone (Tabela 16).

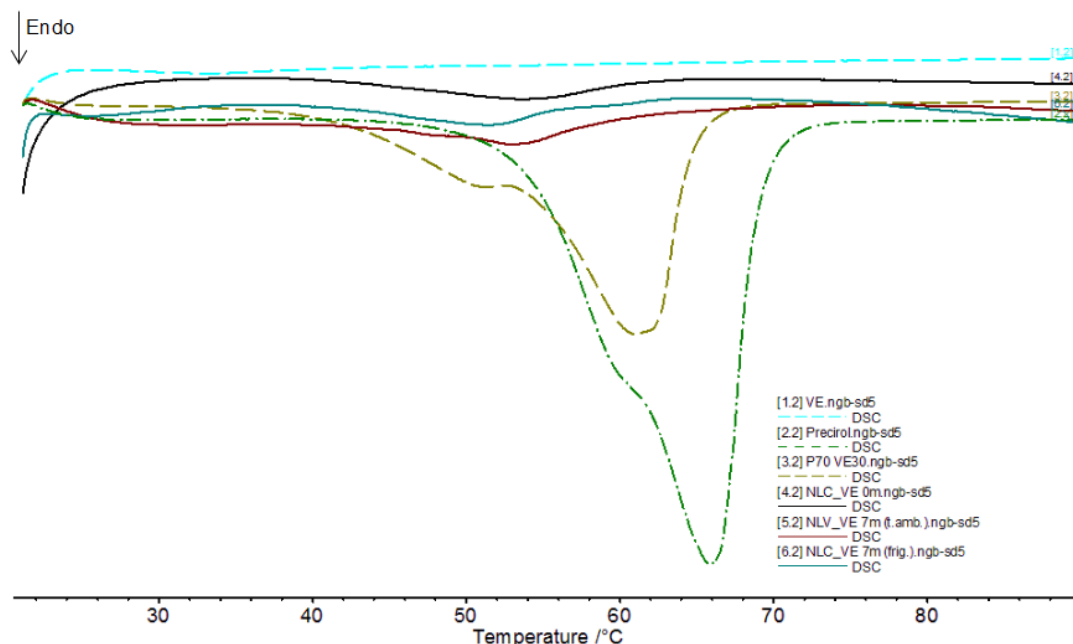


Figura 29 – Termograma do lípido sólido (Precirol<sup>®</sup> ATO 5) e lípido líquido (VE – vitamina E) isolados, da mistura lípido sólido com lípido líquido (P<sub>70</sub>VE<sub>30</sub>) e dos NLC<sub>VE</sub>, no dia da preparação (0m) e após 7 meses de armazenamento a 20±1°C e a 5±1°C.

Tabela 17 – Registo dos parâmetros da análise da DSC para o lípido sólido isolado, a mistura lípido sólido com lípido líquido e as dispersões coloidais de NLC<sub>VE</sub>, no dia da preparação e após 7 meses de armazenamento a diferentes temperaturas.

<u>Constituintes / Dispersões de nanopartículas lipídicas</u>	<u>Onset (°C)</u>	<u>Ponto de fusão (°C)</u>	<u>Entalpia (J/g)</u>	<u>Índice de recristalização, IR (%)</u>
<b>Precirol<sup>®</sup> ATO 5</b>	56,00	65,90	205,89	100,00
<b>P<sub>70</sub> : VE<sub>30</sub></b>	54,50	61,00	127,74	88,63
<b>NLC<sub>VE</sub>(0 meses)</b>	41,50	54,00	3,39	22,83
<b>NLC<sub>VE</sub> (7 meses a 20±1°C)</b>	48,60	52,80	2,61	18,11
<b>NLC<sub>VE</sub> (7 meses a 5±1°C)</b>	43,10	51,30	4,85	33,65

P – Precirol<sup>®</sup> ATO 5; VE – Vitamina E

A adição de vitamina E ao *bulk* de Precirol<sup>®</sup> ATO 5 levou a uma diminuição do ponto de fusão (de 65,90°C para 61,00°C), a uma redução da entalpia necessária para fundir o lípido (de 205,89J/g para 127,74J/g) e consequentemente a uma diminuição do IR para 88,63%. Como podemos ver pela análise da Tabela 17, a diminuição do *onset*, do ponto de fusão, da entalpia e do IR é ainda mais pronunciada para os NLC<sub>VE</sub>, comparativamente ao *bulk* e à mistura do lípido sólido com o lípido líquido.

Pela análise das Tabelas 14, 15, 16 e 17 verifica-se, para todas as dispersões de nanopartículas lipídicas preparadas, uma diminuição nos parâmetros analisados (*onset*, ponto de fusão, entalpia e IR) comparativamente ao *bulk* e à mistura de lípido sólido com lípido líquido. Esta redução pode ser justificada pela ocorrência de interações entre os lípidos e os agentes tensioativos, ou com o aumento da superfície das nanopartículas, e permite comprovar a ocorrência de alterações significativas no estado cristalino dos lípidos, que pode permitir espaço suficiente para acomodar outras moléculas (por exemplo, quando se pretende incorporar ingredientes ativos cosméticos ou fármacos nas formulações) (130, 131). Resultados semelhantes já foram anteriormente publicados na literatura (17, 57, 106, 132, 133).

É importante salientar que, apesar da diminuição dos pontos de fusão e de início de temperatura de fusão das dispersões de nanopartículas lipídicas preparadas, estes continuam a ser maiores do que 40°C, requisito essencial para que a matriz lipídica se mantenha no estado sólido à temperatura corporal, evitando a presença de *supercooled melts* (17, 92, 107, 133, 134).

### **3.2.6. Morfologia**

Independentemente da sua composição, todas as nanopartículas lipídicas preparadas exibiram forma quase esférica e uma superfície lisa, facto comprovado através das imagens de cryoSEM, como se pode verificar na Figura 30. Os tamanhos observados por esta técnica são compatíveis com os resultados obtidos por LD (ver secção 3.2.2). Estes resultados foram já reportados por outros autores, em trabalhos semelhantes (109, 133).

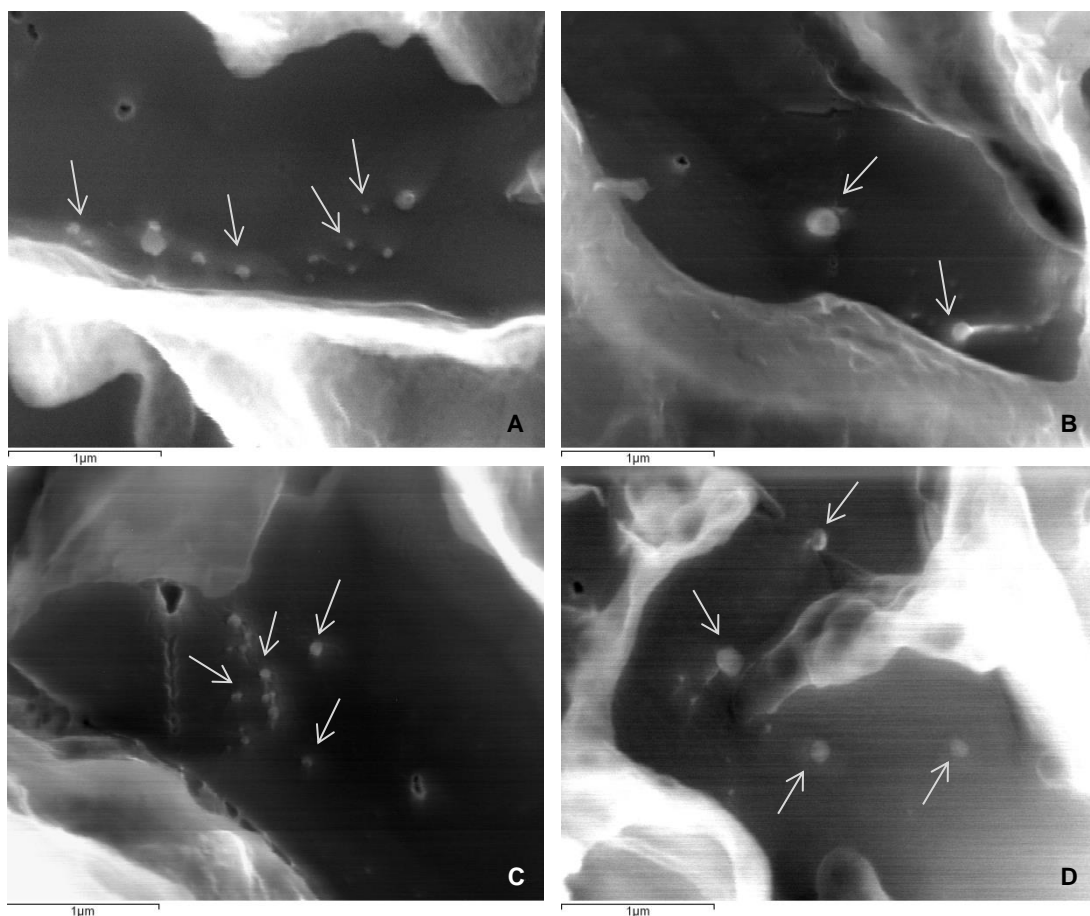


Figura 30 – Imagens de cryoSEM das nanopartículas lipídicas, indicadas pelas setas (ampliação x35000). A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E.

### 3.3. Caracterização das preparações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas

#### 3.3.1. Análise organolética

Os resultados da análise organolética são apresentados na Figura 31 e resumidos na Tabela 18.

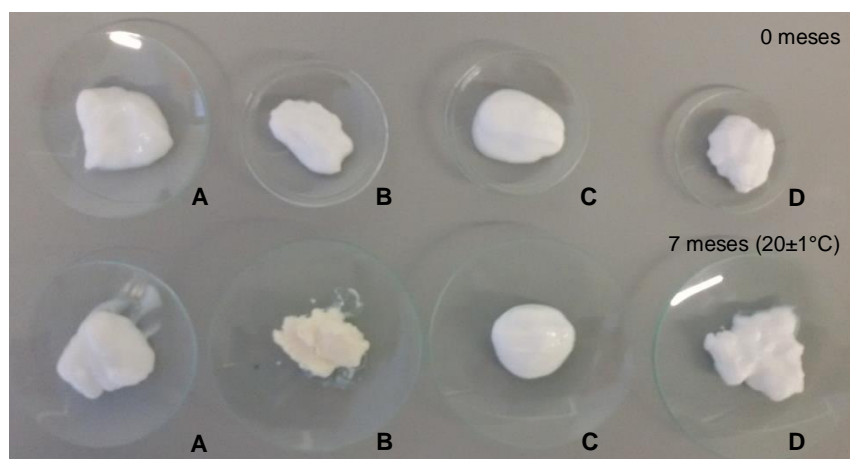


Figura 31 – Aspeto das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento à temperatura ambiente.

Tabela 18 – Avaliação das características organoléticas das nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento.

<u>Tempo e condições de armazenamento</u>	<u>Nanodispersão gelificada</u>	<u>Cor</u>	<u>Aspeto</u>	<u>Odor</u>
		Branco	Homogéneo	Inodoro
<b>0 dias</b>	SLN	✓	✓	✓
	NLC <sub>RM</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>CD</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>VE</sub>	✓	✓	✓
<b>7 meses (20±1°C)</b>	SLN	✓	✓	✓
	NLC <sub>RM</sub>	✗	✗	✗
	NLC <sub>CD</sub>	✓	✓	✓
	NLC <sub>VE</sub>	✓	✓	✓

RM – Óleo de rosa mosqueta; CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

✓ Conforme; ✗ Não Conforme

No dia da preparação, todas as formulações semissólidas eram brancas, inodoras, opacas e homogêneas, não se verificando, visualmente, diferenças perceptíveis

entre estas. No entanto, ao fim de 7 meses a formulação semissólida de NLC<sub>RM</sub> apresentou sinais de instabilidade, ocorrendo alteração de cor, odor e aspeto. Estas alterações eram expectáveis, tendo em consideração a análise organolética da nanodispersão de NLC<sub>RM</sub>, devido à coloração amarela que adquiriu, provavelmente resultante da oxidação dos lípidos.

É importante salientar que, na sequência da observação das características organoléticas da nanodispersão gelificada de NLC<sub>RM</sub> aos 7 meses, as análises dos parâmetros pH, textura e reologia desta formulação já não foram realizadas. Esta formulação teria que ser otimizada, por exemplo, com adição de um agente antioxidante e/ou diminuição da quantidade de lípido líquido, para se poder prosseguir com os ensaios de caracterização. A avaliação da cor desta preparação semissólida foi realizada, para demonstrar que ocorreram alterações estatisticamente significativas na sua coloração.

### 3.3.2. Estabilidade acelerada por centrifugação

Na Figura 32 podemos verificar o aspeto final das nanodispersões gelificadas depois de realizados os 2 ciclos de centrifugação.

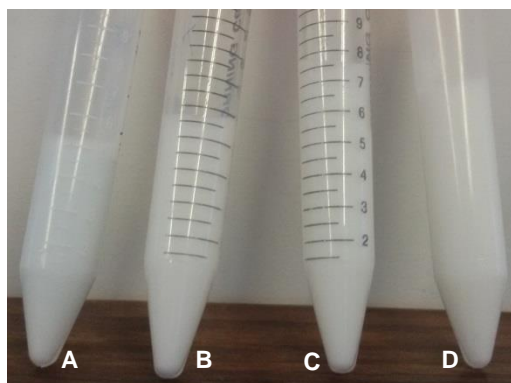


Figura 32 – Aspeto das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

Verificou-se que nenhuma das preparações semissólidas submetidas a este teste apresentou instabilidade física, manifestando, no final, o mesmo aspeto homogéneo verificado logo após a sua preparação. Não se observou separação de fases, precipitação, formação de grumos ou quaisquer outros sinais de instabilidade.

Tendo em consideração estes resultados, podemos prever uma boa estabilidade para as nanodispersões gelificadas.

### 3.3.3. pH

A determinação do pH foi efetuada em todas as formulações semissólidas, após a preparação e ao fim de 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ , de forma a avaliar possíveis variações de pH que poderiam ser indicadoras de instabilidade. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 33.

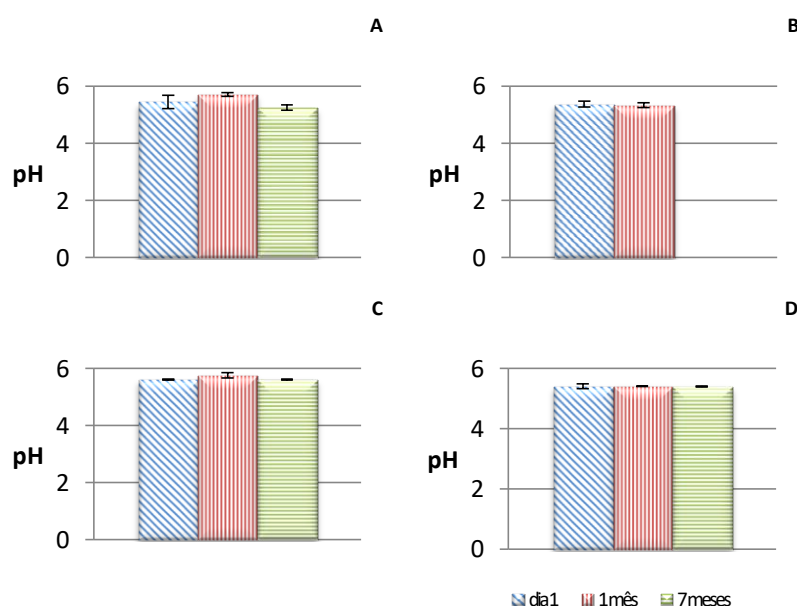


Figura 33 – Representação gráfica da variação de pH das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E ao longo do tempo de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ .

Como se pode verificar nos vários gráficos, os valores médios de pH situam-se entre 5,2 e 5,8, sendo valores compatíveis com a aplicação cutânea pretendida.

Após 7 meses a formulação de NLC<sub>RM</sub> encontrava-se oxidada, razão pela qual não se efetuou a medição deste parâmetro após este tempo de armazenamento.

A Tabela 19 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada ao pH das várias nanodispersões gelificadas, após a preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ .

Os resultados destacados a negrito evidenciam os casos em que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) no pH das amostras para as condições em análise.

Tabela 19 – Níveis de significância da análise estatística do pH das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

<u>Nanodispersão gelificada</u>	<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>
<b>SLN</b>	Dia 1 - 7 meses ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ )	<b>0,251</b>
<b>NLC<sub>CD</sub></b>	Dia 1 - 7 meses ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ )	<b>0,842</b>
<b>NLC<sub>VE</sub></b>	Dia 1 - 7 meses ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ )	<b>0,951</b>

CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

Após análise estatística, verifica-se que o tempo de armazenamento não afeta o pH das formulações semissólidas ( $p \geq 0,05$ ), o que é indicativo da sua estabilidade.

Para além disso, é importante referir que este se mantém em valores compatíveis com a aplicação cutânea pretendida.

### 3.3.4. Morfologia

A morfologia das nanodispersões gelificadas foi analisada por cryoSEM, sendo as imagens apresentadas na Figura 34, onde se observa, em todas as formulações, a presença de uma estrutura em rede tridimensional, típica dos hidrogéis (99, 135). Também se verifica a presença de nanopartículas incorporadas nesta, cujo tamanho nanométrico se mantém. Estes resultados vêm confirmar que as formulações semissólidas preparadas são capazes de aprisionar as nanopartículas na sua rede, estabilizando-as. Este facto foi descrito em trabalhos experimentais anteriormente publicados (99).

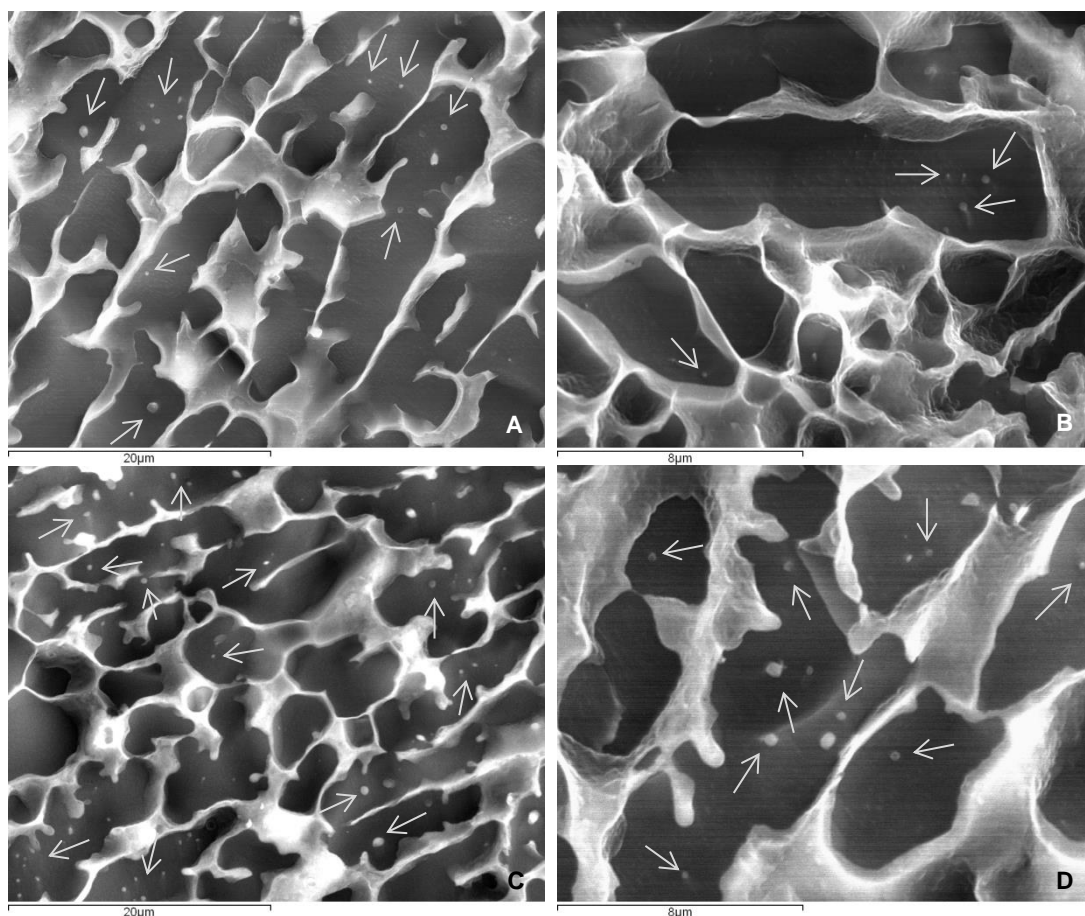


Figura 34 – Imagens de cryoSEM das nanodispersões gelificadas contendo (nanopartículas lipídicas indicadas pelas setas): A - SLN (ampliação x3000), B - NLC com óleo de rosa mosqueta (ampliação x7000), C - NLC com cetil dimeticone (ampliação x3000) e D - NLC com vitamina E (ampliação x7000).

### 3.3.5. Reologia

A avaliação das alterações da viscosidade das preparações para aplicação cutânea, durante o tempo de armazenamento, é um critério adequado para a avaliação da sua estabilidade (56, 96, 114).

Na Figura 35 estão representados, para cada formulação, os reogramas obtidos ao fim de 2 dias e após 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

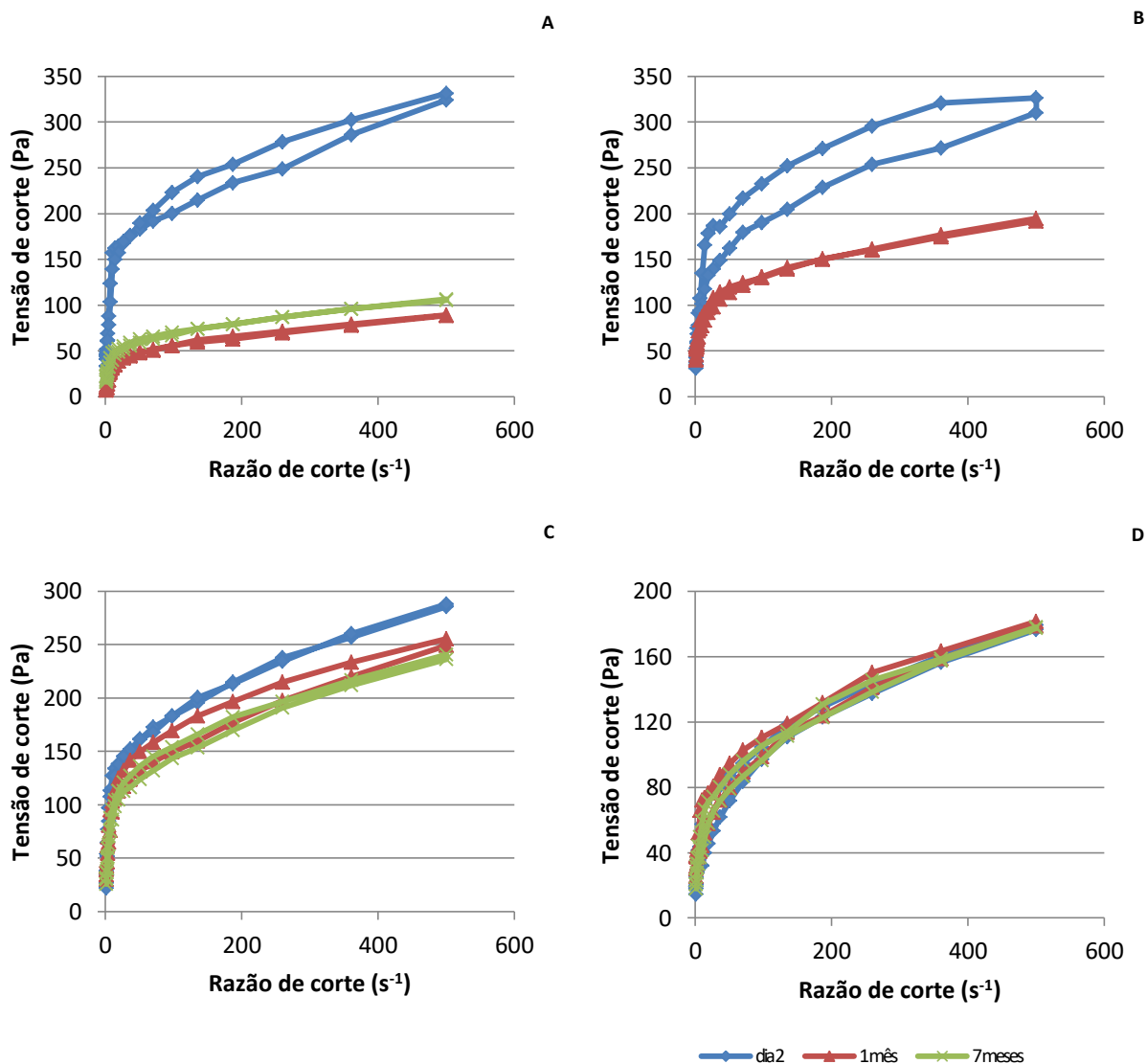


Figura 35 – Reogramas das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após 2 dias, 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ .

Pela análise dos reogramas observa-se que todas as dispersões de NLC gelificadas apresentam um comportamento não-newtoniano plástico, ou pseudoplástico com valor de cedência, ao passo que a dispersão de SLN gelificada apresenta um comportamento não-newtoniano pseudoplástico. Em todos os reogramas se verifica uma diminuição da viscosidade da preparação com o aumento da velocidade de corte (115).

A formulação preparada a partir das nanodispersões de SLN sofreu uma diminuição significativa de viscosidade ao longo do tempo, o que poderá ser indicativo de alguma instabilidade. Pelo contrário, na nanodispersão gelificada preparada com  $\text{NLC}_{\text{VE}}$ , a influência do tempo de armazenamento no comportamento reológico da mesma foi

praticamente nula, fazendo prever que esta formulação será mais estável do que as restantes.

Saliente-se que aos 7 meses a formulação contendo NLC<sub>RM</sub> encontrava-se oxidada, razão pela qual não se efectuou a medição após este tempo de armazenamento.

Nos reogramas correspondentes às nanodispersões gelificadas preparadas com SLN e com NLC<sub>RM</sub>, ao fim de 2 dias, vemos áreas de histerese (curvas ascendente e descendente não sobreponíveis), indicando que as formulações apresentam tixotropia (diminuição da viscosidade com o tempo). No entanto, verificou-se ausência de tixotropia após 1 ou 7 meses de armazenamento. A obtenção de formulações de uso cutâneo com carácter tixotrópico é bastante almejada, pois estas deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluidas facilitando o espalhamento e a absorção. No final da aplicação recuperam a viscosidade inicial, o que evita que o produto escorra (116).

Trabalhos semelhantes, usando formulações semissólidas à base de nanopartículas lipídicas, demonstraram comportamentos reológicos idênticos (56, 96).

### **3.3.6. Textura**

A análise dos parâmetros de textura, firmeza (aferida pelos valores de força máxima) e adesividade (aferida pelos valores de área negativa) das formulações semissólidas pode ser analisada através da Figura 36 e da Figura 37, respetivamente.

Estes parâmetros são diretamente influenciados pela viscosidade das formulações semissólidas (121).

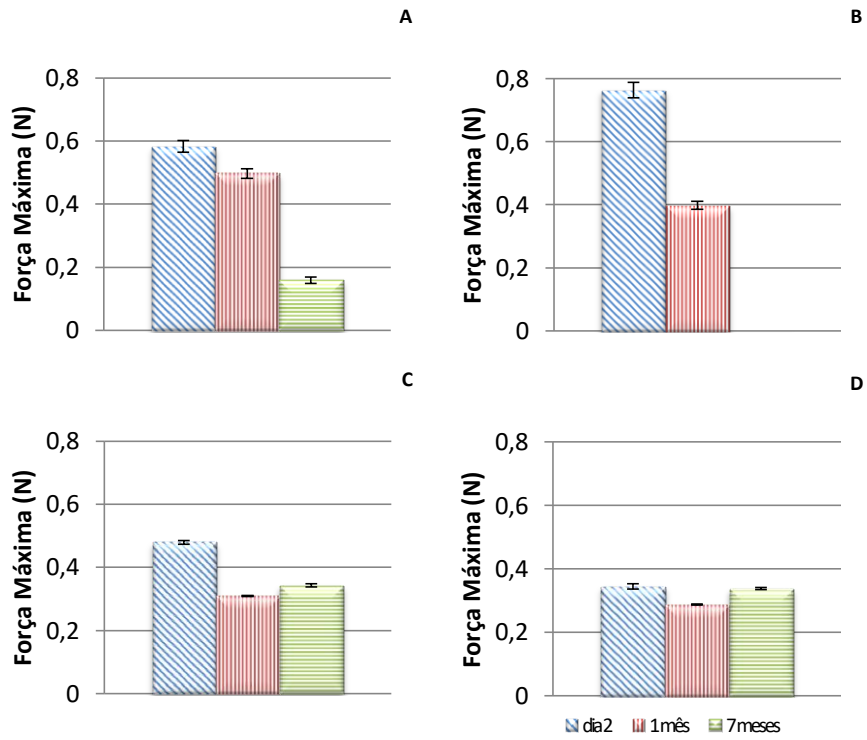


Figura 36 – Representação gráfica da variação da força máxima (firmeza) das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após 2 dias, 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

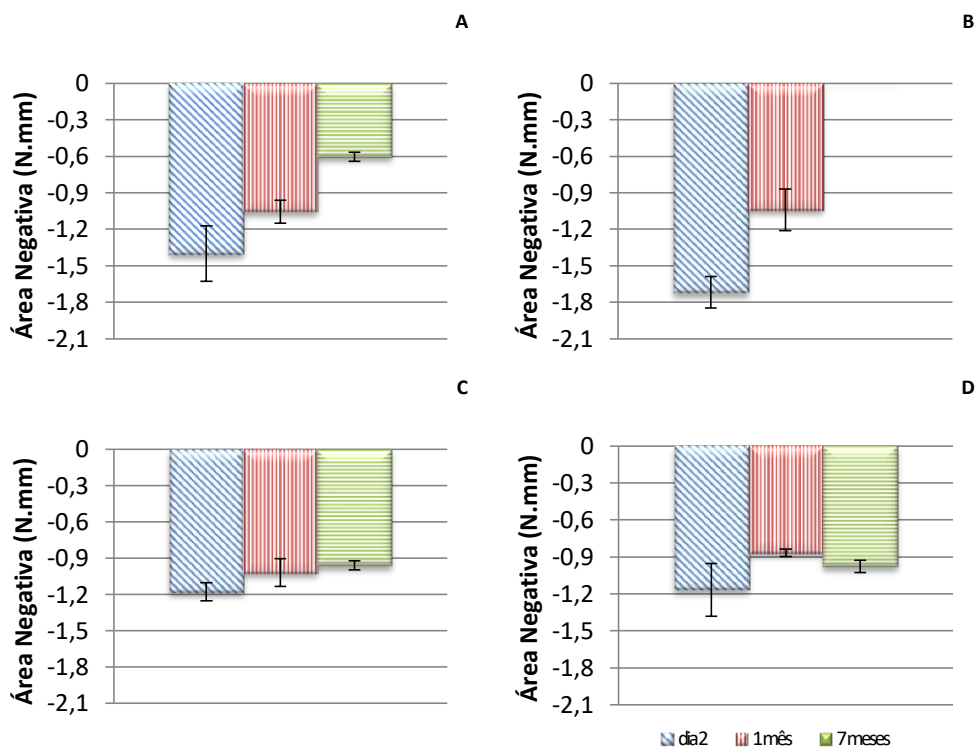


Figura 37 – Representação gráfica da variação da área negativa (adesividade) das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, após 2 dias, 1 e 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ .

Aos 7 meses a formulação de NLC<sub>RM</sub> encontrava-se oxidada, razão pela qual não se efetuou a avaliação dos parâmetros de firmeza e adesividade após este tempo de armazenamento. Para as restantes formulações interessa verificar se existem diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de textura ao longo do tempo de armazenamento.

A Tabela 20 resume os níveis de significância dos contrastes estabelecidos pela análise estatística efetuada à firmeza e à adesividade das várias nanodispersões gelificadas preparadas, após a preparação e ao fim de 7 meses de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ .

Os resultados destacados a **negrito** evidenciam os casos em que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p\geq 0,05$ ) nos parâmetros de textura das amostras para as condições em análise.

Tabela 20 – Níveis de significância da análise estatística da textura das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento a 20±1°C.

<u>Parâmetros de textura</u>	<u>Nanodispersão gelificada</u>	<u>Condições analisadas</u>	<u>Níveis de significância</u>
<b>Firmeza</b>	SLN	Dia 2 - 7 meses (20±1°C)	<0,001
	NLC <sub>CD</sub>	Dia 2 - 7 meses (20±1°C)	<0,001
	NLC <sub>VE</sub>	Dia 2 - 7 meses (20±1°C)	<b>0,282</b>
<b>Adesividade</b>	SLN	Dia 2 - 7 meses (20±1°C)	0,004
	NLC <sub>CD</sub>	Dia 2 - 7 meses (20±1°C)	0,011
	NLC <sub>VE</sub>	Dia 2 - 7 meses (20±1°C)	<b>0,208</b>

CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

Verificam-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na textura das formulações semissólidas contendo SLN e NLC<sub>CD</sub> após preparação e no final do ensaio.

Pelo contrário, as nanodispersões gelificadas de NLC<sub>VE</sub> não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) quer para a firmeza, quer para a adesividade medidas 2 dias após preparação e no final do ensaio. Podemos, então, concluir que estas formulações apresentam estabilidade nos parâmetros de textura ao longo do tempo. Convém lembrar que estes resultados são concordantes com os ensaios de reologia, nos quais esta formulação também demonstrou manter-se estável ao longo do tempo de armazenamento.

Diversos autores reportaram, em trabalhos semelhantes, a influência direta da viscosidade nos parâmetros de textura das formulações preparadas (56, 96, 121, 122).

### 3.3.7. Cor

A análise da cor das formulações preparadas permite verificar de forma simples e rápida a estabilidade das preparações contendo nanopartículas lipídicas, uma vez que os fenómenos de oxidação geralmente se traduzem em alterações de cor (56, 124).

A alteração da cor das preparações ao longo do tempo encontra-se representada na Figura 38, através da análise da variação do parâmetro Chroma (C\*). A determinação deste parâmetro foi efetuada em todas as formulações semissólidas, após a preparação e ao fim de 1 e 7 meses de armazenamento a 20±1°C.

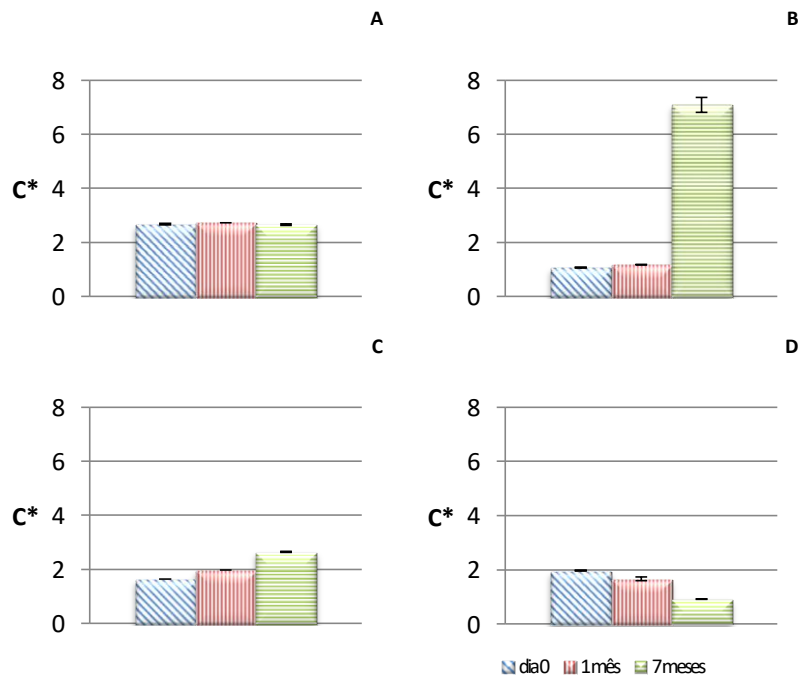


Figura 38 – Representação gráfica da variação do parâmetro Chroma das nanodispersões gelificadas contendo: A - SLN, B - NLC com óleo de rosa mosqueta, C - NLC com cetil dimeticone e D - NLC com vitamina E, ao longo do tempo de armazenamento.

Neste ensaio interessa avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre a cor inicial da preparação e a cor no final do tempo de armazenamento.

Aos 7 meses a formulação de NLC<sub>RM</sub> encontrava-se oxidada, adquirindo coloração amarela. Este facto é facilmente observável através da observação da elevada variação do parâmetro Chroma, que ocorreu devido à alteração de coloração no sentido da coordenada b (amarelo).

A Tabela 21 resume os níveis de significância da análise estatística da variação do parâmetro Chroma das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados destacados a negrito evidenciam os casos em que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) na coloração das amostras para as condições em análise.

Tabela 21 – Níveis de significância da análise estatística da variação do parâmetro Chroma das várias nanodispersões gelificadas ao longo do tempo de armazenamento a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ .

<u>Nanodispersão gelificada</u>	<u>Intervalo de tempo analisado</u>	<u>Níveis de significância</u>
<b>SLN</b>	Dia 0 - 7 meses ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ )	<b>0,539</b>
<b>NLC<sub>RM</sub></b>	Dia 0 - 7 meses ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ )	<0,001
<b>NLC<sub>CD</sub></b>	Dia 0 - 7 meses ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ )	<0,001
<b>NLC<sub>VE</sub></b>	Dia 0 - 7 meses ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ )	<0,001

RM – Óleo de rosa mosqueta; CD – Cetil dimeticone; VE – Vitamina E

Após análise estatística, verifica-se que o tempo de armazenamento influencia a cor de todas as nanodispersões gelificadas de NLC ( $p < 0,05$ ).

Apenas a formulação semissólida contendo SLN se manteve com o parâmetro Chroma sem alterações estatisticamente significativas ao fim de 7 meses, o que poderá indicar que as formulações isentas de lípido líquido tendem a apresentar uma maior estabilidade relativamente a este parâmetro, isto porque uma das manifestações da oxidação dos óleos é a alteração da cor das formulações.

### 3.4. Avaliação da biocompatibilidade

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios de caracterização das nanodispersões gelificadas, foi selecionada a formulação semissólida contendo NLC<sub>VE</sub> como sendo a mais promissora e, neste sentido, os ensaios de citotoxicidade foram apenas realizados nas dispersões de NLC<sub>VE</sub> e nas nanodispersões gelificadas contendo estas nanopartículas.

Os resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade das formulações desenvolvidas, avaliada em células HaCat, pelos ensaios de redução do MTT e de incorporação do vermelho neutro, são ilustrados nas Figuras 39 e 40, respetivamente. Após 24h de incubação, foi observado um efeito dependente da concentração sobre a viabilidade celular, para ambas as formulações testadas, e em ambos os ensaios de citotoxicidade realizados. No entanto, o ensaio de redução do MTT demonstrou ser um ensaio mais sensível para a avaliação da citotoxicidade das formulações desenvolvidas, quando comparado com o ensaio de incorporação do vermelho neutro. Com efeito, com o ensaio de redução do MTT é possível observar um efeito citotóxico mais acentuado, especialmente para concentrações mais elevadas (10-100µg/mL).

Relativamente ao ensaio de redução do MTT realizado nas NLC<sub>VE</sub> (Figura 39) verificam-se alterações estatisticamente significativas na viabilidade celular para concentrações iguais ou superiores a 5µg/mL. Por outro lado, no mesmo ensaio, realizado na formulação gelificada de NLC<sub>VE</sub> (NLC<sub>VE</sub>-HG), apenas se verificam alterações estatisticamente significativas na viabilidade das células em concentrações iguais ou superiores a 10µg/mL.

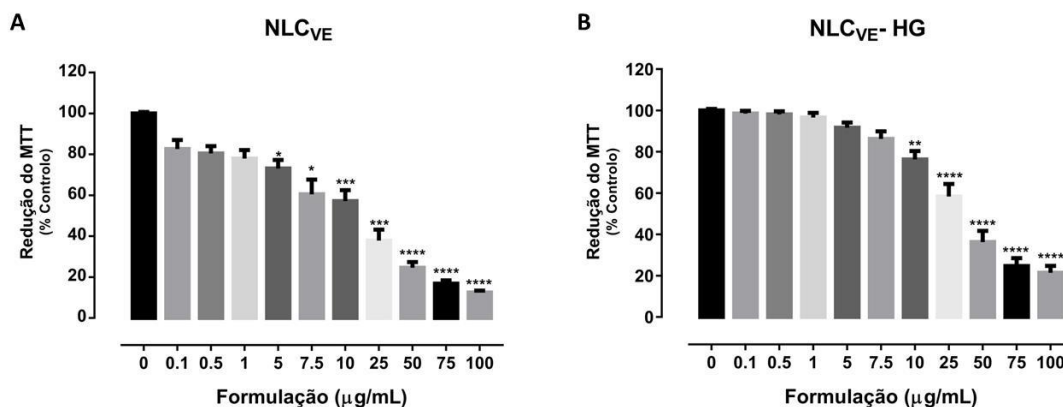


Figura 39 – Citotoxicidade das formulações NLC<sub>VE</sub> (NLC com vitamina E) **(A)** e NLC<sub>VE</sub>-HG (nanodispersão gelificada de NLC<sub>VE</sub>) **(B)** (0-100μg/mL) em células HaCat, 24h após a exposição, avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são apresentados como média ± SD de 3 experiências independentes (realizada em triplicado). As comparações estatísticas foram estimadas utilizando o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn [\*p<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001 vs. controle (0μg/mL)].

Quando analisamos a citotoxicidade das formulações por recurso ao ensaio de incorporação do vermelho neutro (Figura 40) verificam-se, igualmente, alterações estatisticamente significativas na viabilidade das células para concentrações iguais ou superiores a 5μg/mL de NLC<sub>VE</sub>. Quando se analisa a viabilidade celular na formulação semissólida contendo NLC<sub>VE</sub> apenas se verificam alterações estatisticamente significativas para concentrações iguais ou superiores a 7,5μg/mL.

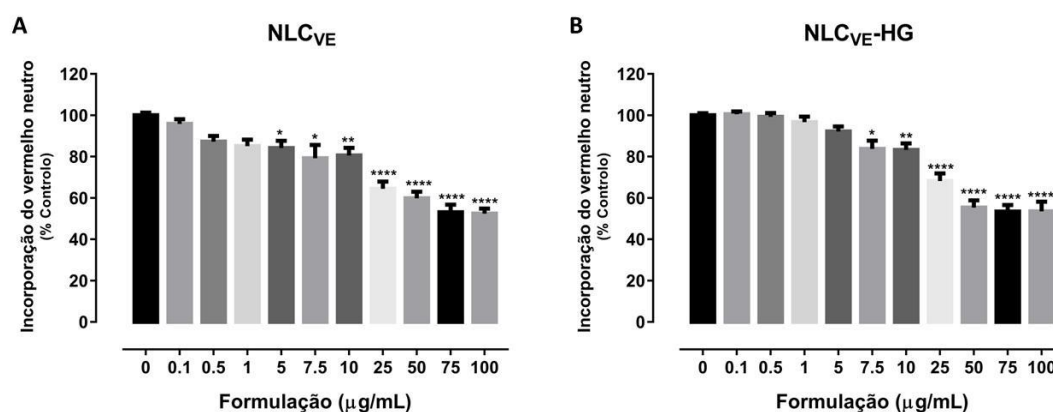


Figura 40 – Citotoxicidade das formulações NLC<sub>VE</sub> (NLC com vitamina E) **(A)** e NLC<sub>VE</sub>-HG (nanodispersão gelificada de NLC<sub>VE</sub>) **(B)** (0-100μg/mL) em células HaCat, 24h após a exposição, avaliada pelo ensaio de incorporação do corante vermelho neutro. Os resultados são apresentados como média ± SD de 4 experiências independentes (realizada em triplicado). As comparações estatísticas foram estimadas utilizando o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn [\*p<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001 vs. controle (0μg/mL)].

Com estes ensaios comprova-se que, para concentrações até 1µg/mL e 5µg/mL (inclusive) a dispersão coloidal de NLC<sub>VE</sub> e a nanodispersão gelificada de NLC<sub>VE</sub>, respetivamente, apresentam biocompatibilidade.

Em ambos os ensaios de citotoxicidade realizados, a formulação de nanopartículas lipídicas (NLC<sub>VE</sub>) demonstrou ser mais citotóxica em relação às células HaCat, quando comparada com a formulação gelificada de NLC<sub>VE</sub> (NLC<sub>VE</sub>-HG), provavelmente devido a uma maior capacidade da primeira para entrar nos queratinócitos, comparativamente com as nanopartículas lipídicas aprisionadas na rede do gel (NLC<sub>VE</sub>-HG).

Para comprovar este facto, seria necessário efetuar estudos com nanopartículas lipídicas marcadas (por exemplo, com um marcador de fluorescência) a fim de observar, por microscopia confocal, se as nanopartículas lipídicas livres penetram mais profundamente nas células (136).

### 3.5. Avaliação do potencial irritativo

Tal como referido anteriormente, a formulação semissólida contendo  $NLC_{VE}$  apresentou resultados promissores, quer nos ensaios de caracterização, quer nos ensaios de avaliação da biocompatibilidade e, neste sentido, o ensaio *in vitro* de irritação foi apenas realizado nesta formulação.

De acordo com os valores obtidos para cada uma das soluções controlo (Tabela 22), o ensaio foi considerado válido visto que todos os valores calculados foram considerados conforme os critérios do teste. O procedimento adotado indica para a solução de NaCl 0,9% o valor unitário de 0; para as soluções de controlo positivo, LSS 1% e NaOH 0,1N, os valores são 10 e 19, respetivamente.

Tabela 22 – Resultados obtidos nos controlos do ensaio (n=3).

<u>Solução Controlo</u>	<u>Pontuação obtida</u> <u>(Média±Desvio-padrão)</u>	<u>Conformidade</u>
<b>Controlo Negativo – NaCl 0,9%</b>	0±0	Conforme
<b>Controlo Positivo – NaOH 0,1N</b>	19±0	Conforme
<b>Controlo Positivo – LSS 1%</b>	10±0	Conforme

Os resultados obtidos para a formulação semissólida contendo  $NLC_{VE}$  encontram-se reportados na Tabela 23 e na Figura 41.

Tabela 23 – Resultados do ensaio *in vitro* de irritabilidade (HET-CAM) das nanodispersões gelificadas contendo  $NLC_{VE}$ .

<u>Nanodispersão</u> <u>gelificada</u>	<u>Pontuação obtida</u> <u>(Média±Desvio-padrão)</u>	<u>Classificação</u>
<b><math>NLC_{VE}</math></b>	0±0	Não irritante

VE – Vitamina E

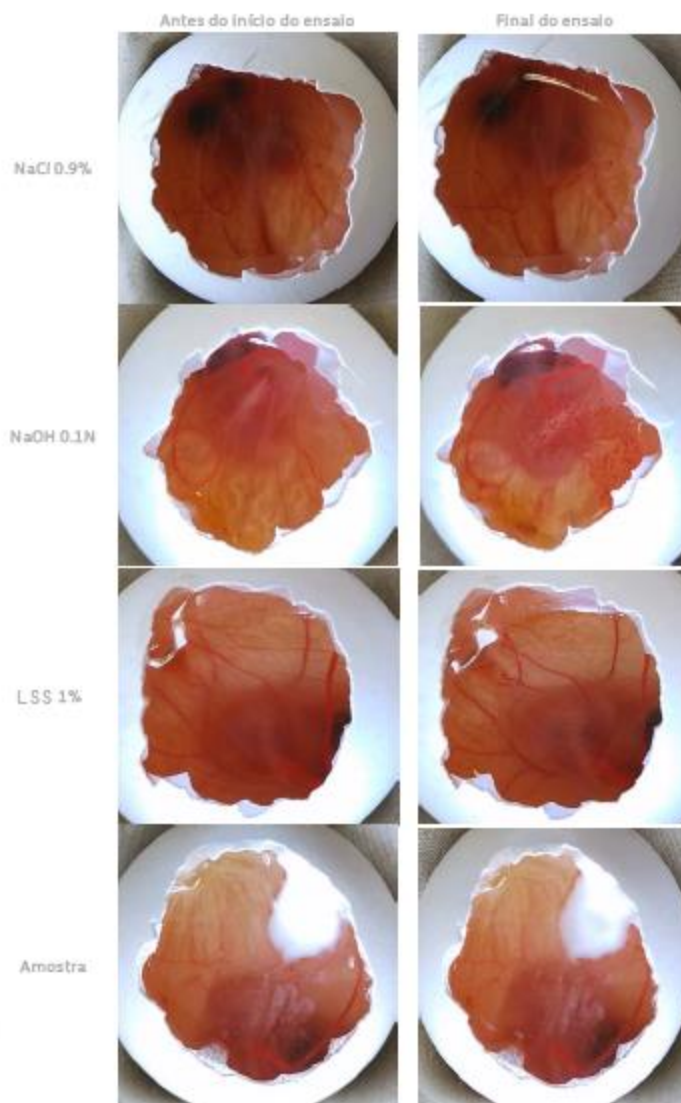


Figura 41 – Fotografias dos ovos onde foi aplicada a amostra (nanodispersão gelificada contendo NLC com vitamina E) e os controlos, antes e no final do ensaio.

O estudo realizado permite concluir que a formulação semissólida de NLC<sub>VE</sub>, de acordo com os critérios do método adotado, é classificada como “não irritante” no ensaio HET-CAM, o que permite concluir que pode ser utilizada com segurança em produtos cosméticos, inclusivamente em produtos de contorno de olhos, uma vez que se prevê que a aplicação deste produto, mesmo em contacto com a zona ocular, não trará problemas de irritação.

## 4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A indústria cosmética tem feito enormes progressos no desenvolvimento e incorporação de nanossistemas inovadores e eficazes nos seus produtos. Apesar do ingrediente ativo de um cosmético ser essencial, a base em que está inserido e o tipo de nanossistema de transporte são também muito importantes.

Existem na literatura científica vários estudos que comprovam o aumento da eficácia de ingredientes ativos cosméticos incorporados em nanopartículas lipídicas, em comparação com o seu uso em sistemas convencionais (por exemplo, cremes ou emulsões O/A), ou em outros nanossistemas (por exemplo, nanoemulsões).

Tendo em conta as vantagens que apresentam para a promoção da penetração cutânea de ingredientes ativos e da hidratação da pele, a comercialização de formulações cosméticas à base de nanopartículas lipídicas tem vindo a aumentar, esperando-se que esta tendência se mantenha nos próximos anos.

Neste trabalho foi desenvolvida uma nanodispersão gelificada contendo NLC<sub>VE</sub>, que possui elevado potencial para aplicação cutânea. A formulação apresentou um pH de 5.4, compatível com a aplicação cutânea pretendida, valor que não sofreu variação estatisticamente significativa ao longo do tempo de armazenamento. O tamanho médio da população de nanopartículas foi de 105nm e, por cryoSEM, foi possível verificar a rede típica dos hidrogeles aprisionando e estabilizando as nanopartículas lipídicas no seu interior. A influência do tempo de armazenamento no comportamento reológico desta formulação foi praticamente nula, fazendo prever que se trata de uma formulação estável. Para além disso, os parâmetros de textura (firmeza e adesividade) mantiveram-se sem alterações estatisticamente significativas, após a preparação e no final do ensaio. Tendo em conta estes resultados, a nanodispersão gelificada contendo NLC<sub>VE</sub> foi selecionada para prosseguir com ensaios de citotoxicidade, demonstrando ser biocompatível e não citotóxica, quando utilizada em concentrações até 5µg/mL (inclusive). Face a estes resultados, a formulação selecionada foi submetida a ensaios de avaliação do potencial irritativo. O teste *in vitro* de irritabilidade (HET-CAM) é considerado uma solução preditiva e conveniente para os estudos de segurança pré-clínicos de sistemas coloidais como as nanopartículas lipídicas. A nanodispersão gelificada contendo NLC<sub>VE</sub> foi considerada não irritante, o que viabiliza a sua utilização futura em produtos cosméticos.

Os resultados dos estudos *in vitro* permitiram estimar o comportamento *in vivo* da formulação semissólida desenvolvida, minimizando o número de ensaios em voluntários, seguindo, deste modo, os princípios da declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial. No entanto, é importante salientar que, para a introdução dos produtos no

mercado, os ensaios em voluntários são fundamentais. Neste sentido, futuramente, de forma a validar as propriedades da vitamina E na formulação semissólida desenvolvida, deverá ser considerada a hipótese de a testar em voluntários, para se avaliar eventuais melhorias na hidratação da pele e correção de sinais de envelhecimento. Além disso, também seria interessante testar a utilização desta formulação na área farmacêutica, em problemas dermatológicos, como xerose, dermatite atópica ou eczemas, sob a forma de base dermatológica ou veiculando substâncias ativas para o tratamento destas patologias.

Outros testes que também devem ser considerados são a incorporação dos NLC<sub>VE</sub> em outros sistemas semissólidos convencionais como, por exemplo, em cremes O/A, e avaliar se estes trariam vantagens, em termos de facilidade de aplicação, estabilidade e características sensoriais, relativamente à nanodispersão gelificada desenvolvida neste trabalho.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Parker S. Anatomia e Fisiologia do Corpo Humano 2007.
2. Permeabilidade cutânea 2011 [cited 2014 29/10/2014]. Available from: <http://crispetersen.blogspot.pt/2011/07/permeabilidade-cutanea.html>.
3. Costa P. Apontamentos da disciplina Sistemas Semissólidos, Mestrado em Tecnologia Farmacêutica. 2013.
4. Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature reviews Genetics*. 2002 Mar;3(3):199-209. PubMed PMID: 11972157. Epub 2002/04/25. eng.
5. Schäfer-Korting M, Mehnert W, Korting H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(6):427-43.
6. K. A. Walters MSR. The Structure and Function of Skin 2002.
7. Toxicologia, Módulo II Conhecimento gerais, Pele [14/09/2014]. Available from: <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mII.pele.htm>.
8. Manual Merck de Informação Médica, Edição Ampliada e Atualizada: Editorial Oceano; 2008.
9. Harder J, Schroder JM, Glaser R. The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. *Experimental dermatology*. 2013 Jan;22(1):1-5. PubMed PMID: 23088757. Epub 2012/10/24. eng.
10. Mihrianyan A, Ferraz N, Strømme M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*. 2012 6//;57(5):875-910.
11. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in colloid and interface science*. 2006 Nov 16;123-126:369-85. PubMed PMID: 16843424. Epub 2006/07/18. eng.
12. Entendendo Nanopartículas Lipofílicas em Cosméticos 2014 [cited 2014 29/10/2014]. Available from: <http://www.ativosdermatologicos.com.br/site/informe/mostra.php?id=59>.
13. Vyas S, Rai S, Paliwal R, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, et al. Solid lipid nanoparticles (SLNs) as a rising tool in drug delivery science: One step up in nanotechnology. *Current Nanoscience*. 2008;4(1):30-44.
14. Chattopadhyay P, Shekunov BY, Yim D, Cipolla D, Boyd B, Farr S. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(6):444-53.
15. Wissing SA, Müller RH. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release*. 2002 6/17//;81(3):225-33.
16. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002 11/1//;54, Supplement(0):S131-S55.
17. Silva AC, González-Mira E, García ML, Egea MA, Fonseca J, Silva R, et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011 8/1//;86(1):158-65.
18. Patidar A, Thakur DS, Kumar P, Verma J. A REVIEW ON NOVEL LIPID BASED NANOCARRIERS. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2010;2(4).
19. Silva ACM, S.; Ferreira, D.; Santos, D.; Souto, E.B. Nanopartículas Lipídicas. In *Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos: Edições Universidade Fernando Pessoa*; 2011. 297 - 324 p.
20. Janeiro AI. Vectores Lipídicos para administração tópica de Corticosteróides. 2011.
21. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009 1/21//;366(1-2):170-84.
22. Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 7/10//;59(6):522-30.
23. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001 4/25//;47(2-3):165-96.
24. Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*. 2000 5/15//;66(2-3):115-26.
25. Wissing SA, Müller RH, Manthei L, Mayer C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. *Pharmaceutical research*. 2004;21(3):400-5.
26. Sakulkhu U, Jarupaiboon S, Trithong A, Prathontep S, Janyaprasert V, Puttipipatkachorn S, et al., editors. Production and Characterization of Rice bran extract encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Delivery. *Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*. 2007 NEMS'07 2nd IEEE International Conference on; 2007: IEEE.
27. Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2000 Jul;50(1):161-77. PubMed PMID: 10840199. Epub 2000/06/07. eng.
28. Muller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol*. 2011 Sep;8(3):207-27. PubMed PMID: 21291409. Epub 2011/02/05. eng.
29. Mendes AIdS. Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas contendo miconazol. 2012.
30. Sinha VR, Srivastava S, Goel H, Jindal V. Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S)-Trends and Implications in Drug Targeting. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2010;1(3).
31. Souto EB, Almeida AJ, Müller RH. Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2007 //;3(4):317-31.
32. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust J-E, Benoit J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. 2003;24(23):4283-300.
33. Bunjes H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2011;16(5):405-11.
34. Bunjes H, Westesen K, Koch MH. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 1996;129(1):159-73.
35. Marcato PD. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista eletrônica de farmácia*. 2009;6(2).
36. Silva AC. Apontamentos de Sistemas Dispersos Líquidos, Mestrado em Tecnologia Farmacêutica. 2014.

37. Pardeike J, Schwabe K, Muller RH. Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *Int J Pharm.* 2010 Aug 30;396(1-2):166-73. PubMed PMID: 20541000. Epub 2010/06/15. eng.
38. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2006;29(9):1790-8.
39. Souto EB, Müller RH. Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. *Drug Delivery: Springer;* 2010. p. 115-41.
40. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Silva AC, Lobo JMS. Applications of polymeric and lipid nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: present and future considerations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2014;17(3):278-93.
41. Kumar S, Randhawa JK. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C.* 2013 5/1;33(4):1842-52.
42. Üner M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2006;61(5):375-86.
43. Doktorovova S, Souto EB. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review. *Expert opinion on drug delivery.* 2009;6(2):165-76.
44. Muchow M, Maincent P, Müller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy.* 2008;34(12):1394-405.
45. Souto EB, Müller R. Lipid nanoparticles (solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) for cosmetic, dermal, and transdermal applications. *DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES.* 2007;166:213.
46. Wissing SA, Müller RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002 8/21;242(1-2):377-9.
47. Wissing SA, Müller RH. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International journal of pharmaceutics.* 2003;254(1):65-8.
48. Castelli F, Puglia C, Sarpietro MG, Rizza L, Bonina F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International journal of pharmaceutics.* 2005 11/4;304(1-2):231-8.
49. Mendes AI, Silva AC, Catita JA, Cerqueira F, Gabriel C, Lopes CM. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces.* 2013 Nov 1;111:755-63. PubMed PMID: 23954816. Epub 2013/08/21. eng.
50. Singhal GB, Patel RP, Prajapati B, Patel NA. Solid lipid nanoparticles and nano lipid carriers: as novel solid lipid based drug carrier. *Int Res J Pharm.* 2011;2(2):20-52.
51. Müller R, Radtke M, Wissing S. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International journal of pharmaceutics.* 2002;242(1):121-8.
52. Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2004 5/7;56(9):1257-72.
53. Doktorovova S, Gokce E, Ozyazici M, Souto E. Lipid matrix nanoparticles: Pharmacokinetics and biopharmaceutics. *Curr Nanosci.* 2009;5(3):358-71.
54. Teeranachaiideekul V, Müller RH, Junyaprasert VB. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)—Effects of formulation parameters on physicochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics.* 2007 8/1;340(1-2):198-206.
55. Jenning V, Thunemann AF, Gohla SH. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm.* 2000 Apr 20;199(2):167-77. PubMed PMID: 10802410. Epub 2000/05/10. eng.
56. Tichota DM, Silva AC, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3855-64. PubMed PMID: 25143733. Pubmed Central PMCID: Pmc4137996. Epub 2014/08/22. eng.
57. Fang CL, Al-Suwayeh SA, Fang JY. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Recent Pat Nanotechnol.* 2013 Jan;7(1):41-55. PubMed PMID: 22946628. Epub 2012/09/06. eng.
58. Hu F-Q, Jiang S-P, Du Y-Z, Yuan H, Ye Y-Q, Zeng S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2005 11/10;45(3-4):167-73.
59. Shidhaye S, Vaidya R, Sutar S, Patwardhan A, Kadam V. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—innovative generations of solid lipid carriers. *Current drug delivery.* 2008;5(4):324-31.
60. Chakraborty S, Shukla D, Mishra B, Singh S. Lipid - an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV.* 2009 Sep;73(1):1-15. PubMed PMID: 19505572. Epub 2009/06/10. eng.
61. Üner M, Wissing S, Yener G, Müller R. Skin moisturizing effect and skin penetration of ascorbyl palmitate entrapped in solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) incorporated into hydrogel. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2005;60(10):751-5.
62. The Use of Alpha-Tocopherol Acetate in Cosmetic Products. Opinion of the SCCNFP/0494/01; 25 September 2001.
63. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients. edition 5, editor 2009.
64. Vieira D, Ribeiro A, Fernandes I, Amaral J, Barreiro M. Desenvolvimento de um processo de microencapsulação baseado em quitosano para proteção do  $\alpha$ -tocoferol. Livro de resumos do I Encontro de Jovens Investigadores do Instituto Politécnico de Bragança. 2013:72-3.
65. Regulamento (CE) N° 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos, (2009).
66. Santos JSd, Vieira ABD, Kamada I. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. *Revista Brasileira de Enfermagem.* 2009;62:457-62.
67. Technical Data Sheet: Microcare® Silicone M1600.
68. Farmacopeia Portuguesa, 9.0 ed. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde, (2009).
69. Silva BDGd. Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos biofarmacêuticos: [sn]; 2015.
70. Krishnam Raju K, Sudhakar B, Murthy KVR. Factorial design studies and biopharmaceutical evaluation of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles for improving the oral bioavailability. *ISRN Nanotechnology.* 2014;2014.
71. Renata M. Daudt JE, Irene C. Kulkamp-Guerreiro, Adriana R. Pohlmann, Silvia S. Guterres. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. SBPC. 2013.

72. Nohynek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010 3/1/:243(2):239-59.
73. Wissing SA, Müller RH. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003 7//;56(1):67-72.
74. Muller RH, Souto EB, Mehnert W. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Dermal Delivery. *Percutaneous Absorption. Drugs and the Pharmaceutical Sciences: CRC Press*; 2005. p. 719-38.
75. Wissing S, Lippacher A, Muller R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci*. 2001 Sep-Oct;52(5):313-24. PubMed PMID: 11567210. Epub 2001/09/22. eng.
76. Golmohammadzadeh S, Mokhtari M, Jaafari MR. Preparation, characterization and evaluation of moisturizing and UV protecting effects of topical solid lipid nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;48:683-90.
77. Nikolić S, Keck CM, Anselmi C, Müller RH. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 7/29//;414(1–2):276-84.
78. Wu XG, R. H. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. Paris, FRANCE: Editions de sant&#233;; 2009. 14 p.
79. Souto EB, Muller RH. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *Int J Cosmet Sci*. 2008 Jun;30(3):157-65. PubMed PMID: 18452432. Epub 2008/05/03. eng.
80. 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 Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006 6//;63(2):134-9.
81. Nohynek GJ, Dufour EK. Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: a risk to human health? *Archives of toxicology*. 2012 Jul;86(7):1063-75. PubMed PMID: 22466067. Epub 2012/04/03. eng.
82. Oliveira CAD, Dario MF, Sarruf FD, Mariz IFA, Velasco MVR, Rosado C, et al. Safety and efficacy evaluation of gelatin-based nanoparticles associated with UV filters. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 4/1//;140:531-7.
83. Regulamento (UE) 2016/621 da Comissão de 21 de abril de 2016 (2016).
84. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, (2013).
85. Chiari BG, Magnani C, Salgado HRN, Corrêa MA, Isaac VLB. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2012;33(3):323-30.
86. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983 1983/12/16;65(1):55-63.
87. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*. 1988;106(3):761-71.
88. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*. 2014 05/08 12/09/received 03/07/revised 04/02/accepted;5(2):43-57. PubMed PMID: PMC4099973.
89. Ridolfi DM. Nanopartículas lipídicas sólidas: encapsulação de tretinoína para aplicação tópica: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Química; 2011.
90. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O. The HET–CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicology in Vitro*. 1999 4//;13(2):375-84.
91. Abdelkader H, Pierscionek B, Carew M, Wu Z, Alany RG. Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. *British Medical Bulletin*. 2015 March 1, 2015;113(1):59-71.
92. de Jesus HEPP. Aplicação de polímeros sensíveis a estímulos em sistemas de liberação modificada de fármacos para uso oftálmico. 2016.
93. Cruz AS. Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2003.
94. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Originally published as Appendix B3 of "ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No. 10-7553 (2010).
95. Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products, (2014).
96. Silva AC, Kumar A, Wild W, Ferreira D, Santos D, Forbes B. Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2012 10/15//;436(1–2):798-805.
97. Hommoss A. Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations: Freie Universität Berlin; 2009.
98. Kasongo KW, Pardeike J, Müller RH, Walker RB. Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011;100(12):5185-96.
99. Silva AC, Amaral MH, González-Mira E, Santos D, Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012 5/1//;93(0):241-8.
100. da Silva Santos PS. Desenvolvimento e Caracterização de Microemulsões e Microemulgeles contendo Ibuprofeno. 2015.
101. Oliveira ÂZMd. Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico. 2011.
102. Amaral MHdAR. Estudo do Naproxeno em formas de aplicação cutânea. 1997.
103. Ferreira MSP. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas com Paclitaxel para Tratamento do Glioma. 2015.
104. Krambeck K. Desenvolvimento e testes de estabilidade de protetor labial com vitamina C. 2011.
105. Martins DBS. Desenvolvimento e testes de estabilidade de protetor labial com vitamina E. 2015.
106. Bunjes H, Unruh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced drug delivery reviews*. 2007 7/10//;59(6):379-402.
107. Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010 12/1//;81(2):412-21.
108. Freitas C, Müller R. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1999;47(2):125-32.
109. Silva A. Solid lipid nanoparticles (SLN) for oral delivery of risperidone 2012.
110. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Muller RH, Keck CM. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International journal of pharmaceutics*. 2011 Mar 15;406(1-2):163-72. PubMed PMID: 21219990. Epub 2011/01/12. eng.

111. Iyer R, Arunagirinathan MA, Prabhu CS, Bellare J. An improved specimen loader for cryo-scanning electron microscopy. *Scanning*. 2005 May-Jun;27(3):141-6. PubMed PMID: 15934506. Epub 2005/06/07. eng.
112. Fujikawa S, Endoh K. Cryo-scanning electron microscopy to study the freezing behavior of plant tissues. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1166:99-116. PubMed PMID: 24852632. Epub 2014/05/24. eng.
113. Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin pharmacology and physiology*. 2006;19(6):296-302. PubMed PMID: 16864974. Epub 2006/07/26. eng.
114. Almeida IFMd. Desenvolvimento e caracterização de oleogéles. 2002.
115. Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2009 Jun 5;136(2):88-98. PubMed PMID: 19250955. Epub 2009/03/03. eng.
116. Corrêa NM, Júnior FBC, Ignácio RF, Leonardi GR. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;41(1).
117. Lippacher A, Muller RH, Mader K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2001 Feb 19;214(1-2):9-12. PubMed PMID: 11282228. Epub 2001/04/03. eng.
118. Laba D. *Rheological properties of cosmetics and toiletries*: CRC Press; 1993.
119. Mohamed Y, Traisnel M, Gayot A. *Rhéologie et viscosimétrie. I: Principes fondamentaux*. STP pharma pratiques. 1994;4(1):30-6.
120. Jackman RL, Stanley DW. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science & Technology*. 1995 6//6(6):187-94.
121. Jones DS, Woolfson AD, Brown AF. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. *Pharmaceutical research*. 1997 Apr;14(4):450-7. PubMed PMID: 9144730. Epub 1997/04/01. eng.
122. Jones DS, Lawlor MS, Woolfson AD. Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): rheological and mathematical interpretation of textural parameters. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2002 Sep;91(9):2090-101. PubMed PMID: 12210055. Epub 2002/09/05. eng.
123. Almeida H, Helena Amaral M, Lobão P, Manuel Sousa Lobo J. Influence of drug incorporation, temperature and storage time on the ph, textural and rheological properties of different poloxamer hydrogels. *Current drug delivery*. 2013;10(6):753-64.
124. Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Advanced drug delivery reviews*. 2008 Mar 17;60(6):734-46. PubMed PMID: 18045728. Epub 2007/11/30. eng.
125. Vilas-Boas V, Silva R, Guedes-de-Pinho P, Carvalho F, Bastos ML, Remiao F. RBE4 cells are highly resistant to paraquat-induced cytotoxicity: studies on uptake and efflux mechanisms. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2014 Sep;34(9):1023-30. PubMed PMID: 24105845. Epub 2013/10/10. eng.
126. Meunier V, Bourrie M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell biology and toxicology*. 1995;11(3-4):187-94.
127. Silva R, Palmeira A, Carmo H, Barbosa DJ, Gameiro M, Gomes A, et al. P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity. *Archives of toxicology*. 2015 Oct;89(10):1783-800. PubMed PMID: 25234084. Epub 2014/09/23. eng.
128. 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 journal of pharmaceutics*. 2006;314(1):83-9.
129. Khalil RM, El-Bary AA, Kassem MA, Ghorab MM, Ahmed MB. Solid lipid nanoparticles for topical delivery of meloxicam: development and in vitro characterization. *European Scientific Journal*. 2013.
130. Araújo J, Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *International journal of pharmaceutics*. 2010 6/30;393(1-2):168-76.
131. Fang J-Y, Fang C-L, Liu C-H, Su Y-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(2):633-40.
132. Zimmermann E, Souto E, Müller R. Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLNTM) by means of DSC and <sup>1</sup>H NMR. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;60(7):508-13.
133. Gomes MJ, Martins S, Ferreira D, Segundo MA, Reis S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:1231-42. PubMed PMID: 24634584. Pubmed Central PMCID: PMC3952901. Epub 2014/03/19. eng.
134. Depaoli ACdC. Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema de transporte para ibuprofeno. 2014.
135. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2012 12//64, Supplement:18-23.
136. Huber Lda. Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas sólidas em tumores cutâneos: Universidade de São Paulo; 2013.