



Andreia Filipa Moreira Gomes

# Nanopartículas lipídicas como transportadores de fármacos para o Sistema Nervoso Central

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Andreia Filipa Moreira Gomes

# Nanopartículas lipídicas como transportadores de fármacos para o Sistema Nervoso Central

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Andreia Filipa Moreira Gomes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011145416, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 14 de setembro de 2016.

---

(Andreia Filipa Moreira Gomes)

**A Tutora**

---

(Dra. Carla Sofia Pinheiro Vitorino)

**A Aluna**

---

(Andreia Filipa Moreira Gomes)

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a Professora Dra. Carla Vitorino, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e apoio incansável.

Aos meus amigos pelo apoio e carinho, sabemos que não há distância ou compromisso que ponha em causa uma amizade. Longe ou perto, o que importa é que seja verdadeiro.

Aos meus pais, por serem os meus pilares e me apoiarem em todos os momentos da minha vida. Não sabem o orgulho que sinto por vos ter como exemplo.

Aos meus irmãos por serem a minha alegria, sem eles não seria a mesma pessoa. Ao Ricardo, sei que estás sempre comigo.

A eles, dedico todo este trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais volta ao seu tamanho inicial.”*

ALBERT EINSTEIN

## LISTA DE ABREVIATURAS

Apo E: Apolipoproteína E

BHE: Barreira Hematoencefálica

DL50: Dose Letal a 50%

Gp-P: Glicoproteína-P

LDC: *Lipid-Drug Conjugates*/Conjugados Fármaco-Lípido

LNC: *Lipid Nanocapsules*/Nanocápsulas lipídicas

LPRs: *low density lipoprotein receptor-related protein*

NLC: *Nanostructured Lipid Carriers*/Transportadores Lipídicos Nanoestruturados

NLs: Nanopartículas Lipídicas

NPs: Nanopartículas

PBCA: Poli (n-butilcianoacrilato)

PEG: Polietilenoglicol

SLN: *Solid Lipid Nanoparticles*/Nanopartículas Lipídicas Sólidas

TEER: *Transendothelial electrical resistance*/Resistência elétrica transendotelial

## ÍNDICE

<b>Resumo/Abstract</b> .....	3
<b>1. Introdução</b> .....	4
<b>2. Barreira hematoencefálica</b> .....	6
<b>3. Mecanismos de transporte através da BHE</b> .....	7
<b>4. Nanopartículas como veículos de fármacos</b> .....	9
<b>5. Nanopartículas lipídicas</b> .....	12
<b>6. Estratégias das nanopartículas lipídicas para veicular fármacos até ao SNC</b> .....	15
6.1. Estabilizar moléculas com instabilidade físico-química ou biológica .....	15
6.2. Melhorar a biodisponibilidade dos fármacos transportados.....	16
6.3. Aumentar a permeação de fármacos através da BHE .....	17
<b>7. Aplicações terapêuticas</b> .....	19
<b>8. Conclusões e perspectivas futuras</b> .....	23
<b>9. Referências bibliográficas</b> .....	25

## RESUMO

A prevalência de doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) tem aumentado ao longo dos últimos anos na população mundial. A maior parte dos fármacos presentes no mercado não se mostra eficaz no tratamento deste tipo de doenças, pois não são capazes de permear a barreira hematoencefálica (BHE). As nanopartículas lipídicas são nanossistemas que permitem ultrapassar este problema, uma vez que possuem capacidade de transpor esta barreira biológica e atingir o seu alvo terapêutico. Apresentam diversas vantagens face a outros tipos de nanopartículas, tais como maior estabilidade, maior capacidade de carga, menor citotoxicidade, permitem a libertação controlada do fármaco e têm um custo de produção relativamente baixo. Este trabalho aborda vários aspetos que influenciam o transporte de fármacos até ao SNC e os mecanismos que foram desenvolvidos para tornar este transporte mais eficaz.

**Palavras-chave:** nanopartículas, sistema nervoso central, nanopartículas lipídicas, barreira hematoencefálica.

## ABSTRACT

*The prevalence of central nervous system (CNS) disorders has increased over the past few years among populations worldwide. Most of the drugs present in the market are ineffective in treating cerebral diseases, because they cannot cross the blood brain barrier (BBB). The lipid nanoparticles were developed to overcome this problem, since they are able to cross this biologic barrier and target the drugs to the biophase. These carriers offer several advantages in comparison to other types of nanoparticles, such as better stability, higher load capacity, lower cytotoxicity, provide controlled release of the drugs and lower cost of production. This work discusses many aspects that can influence the transport to CNS and the mechanisms developed to make these nanosystems more effective.*

**Keywords:** nanoparticles, central nervous system, lipid nanoparticles, blood brain barrier.

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento de doenças neurológicas continua a ser um enorme desafio para a tecnologia farmacêutica. O número de pessoas afetadas por este tipo de doenças continua a crescer ao longo dos últimos anos, o que explica o elevado interesse no desenvolvimento de novas terapias mais eficazes. A previsão que aproximadamente metade da população desenvolverá Alzheimer em algum ponto da sua vida, enfatiza a gravidade desta situação. Apesar da vasta investigação de novas estratégias para o tratamento deste tipo de doenças, há ainda um longo caminho a percorrer.<sup>1</sup>

O sucesso no transporte de fármacos até ao SNC é um árduo desafio, devido à presença de barreiras anatómicas e fisiológicas, que regulam a passagem de moléculas endógenas e exógenas para o parênquima cerebral. Torna-se desafiante alcançar um efeito terapêutico dos fármacos com ação a nível do SNC e que necessitem de ultrapassar estas barreiras em concentrações terapêuticas. A barreira hematoencefálica é uma estrutura complexa e dinâmica que separa o sangue do encéfalo, e que possui um papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC.<sup>2</sup>

Durante as últimas três décadas, vários esforços têm sido feitos no sentido de resolver este problema e várias estratégias têm sido propostas. Mais recentemente, a nanociência e nanotecnologia têm permitido considerar os nanotransportadores como uma possível solução. As nanopartículas, se forem modificadas, podem apresentar um certo tropismo para a superfície luminal da BHE e alcançar o parênquima cerebral através da transcitose. Apesar de ser uma estratégia promissora, apenas alguns fármacos incorporados em nanotransportadores se encontram disponíveis no mercado. Isto deve-se em grande parte às dificuldades no seu processo de fabrico, à reduzida estabilidade física e química, mas também à sua toxicidade, particularmente por acumulação no cérebro.

As nanopartículas lipídicas (NLs) foram desenvolvidas no início dos anos 90 e têm demonstrado ser capazes de ultrapassar estes problemas. Graças à sua natureza lipídica, são biodegradáveis, o que as torna menos tóxicas que outros tipos de nanopartículas. Além desta característica, apresentam um tamanho reduzido, o que prolonga o seu tempo de circulação na corrente sanguínea, a sua produção em larga escala é exequível e são capazes de evitar o “efeito *burst*”, que poderia gerar um aumento da toxicidade por libertação de uma grande quantidade de fármaco.<sup>3</sup>

Várias classes de NLs têm vindo a ser desenvolvidas, com o objetivo de melhorar as características destes transportadores.<sup>4</sup>

O presente trabalho tem como objetivo analisar como a nanotecnologia tem representado um papel importante através do desenvolvimento de mecanismos que tornam possível alcançar o SNC e de que modo as NLs se mostram vantajosas neste transporte, analisando os resultados obtidos com o seu uso no tratamento de várias doenças neurológicas.

## 2. Barreira Hematoencefálica

O tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso central continua a ser um enorme desafio atualmente. Um dos maiores obstáculos para o seu tratamento reside na capacidade da BHE em limitar a entrada de fármacos no cérebro.

A BHE atua como uma barreira física, regulando a passagem de moléculas, íões e células da corrente sanguínea para o cérebro e restringindo os tipos de fármacos que são capazes de atingir o SNC através de uma administração sistêmica.<sup>1</sup>

A BHE restringe a entrada de agentes tóxicos, em grande parte devido às células endoteliais localizadas nas paredes dos vasos sanguíneos. Na realidade, estas células endoteliais possuem particularidades que são essenciais para a sua função barreira a nível do SNC. Possuem dois tipos de junções entre as células adjacentes, conhecidas como junções de adesão e as junções de oclusão. As junções de adesão participam na adesão das células endoteliais entre si, na iniciação da polarização celular e na regularização da permeabilidade paracelular. As junções de oclusão separam o domínio apical do basolateral, causando polarização celular e restringindo a passagem de íões, compostos hidrofílicos e macromoléculas através de transporte paracelular.<sup>5</sup>

Estas junções criam ainda uma elevada resistência elétrica transendotelial (TEER) entre o sangue e o cérebro, o que gera uma restrita difusão passiva de compostos através da BHE.<sup>6</sup>

Mas existem outros mecanismos que colaboram para esta função barreira da BHE. Na superfície luminal das células endoteliais é expressa a glicoproteína-P (Gp-P), uma proteína transportadora ATP dependente, pertencente à família dos transportadores ABC. Através de um sistema de efluxo a Gp-P impede que substâncias hidrofóbicas atravessem a BHE. O problema reside no facto de vários fármacos candidatos a alcançarem o SNC serem substratos dos transportadores ABC, pelo que o seu alcance terapêutico será limitado.<sup>7</sup>

A barreira enzimática também exerce um papel fundamental na proteção do SNC. Um vasto leque de enzimas, como a acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, gamaglutamiltranspeptidase e a monoamina oxidase, são capazes de degradar diferentes compostos químicos suscetíveis de ultrapassarem a BHE e atingirem o cérebro.<sup>2</sup>

Para além das células endoteliais, a BHE é composta por uma diversidade de células, como pericitos, astrócitos, neurónios e microglia, que lhe conferem as propriedades bioquímicas e a sua estrutura especializada.

Os pericitos encontram-se separados das células endoteliais pela lâmina basal. Estas células estão associadas a neovascularização, angiogénese e a estabilidade dos vasos sanguíneos. Os astrócitos interagem com as células endoteliais, de modo a assegurar uma adequada função neuronal e o controlo da circulação sanguínea cerebral. Controlam os níveis de potássio, inativam neurotransmissores, regulam e produzem fatores de crescimento e citocinas. São, indubitavelmente, células essenciais para a homeostase do SNC. A microglia funciona como células imunocompetentes no cérebro. Por seu lado, os neurónios afetam as células endoteliais promovendo a síntese e libertação de ocludina para a periferia das células. A ocludina faz parte da composição das junções de oclusão presentes entre as células endoteliais e o papel dos neurónios será assim importante na estabilidade das junções e, conseqüentemente, da BHE.<sup>5, 7, 8</sup>

Além de proteger o SNC, a BHE tem outras funções de igual importância como i) transporte seletivo de moléculas que fornecem os nutrientes essenciais para o bom funcionamento do sistema nervoso, ii) eliminar produtos residuais e iii) regular a homeostase no cérebro.<sup>7</sup>

Pequenas moléculas e gases existentes no sangue, como o oxigénio e o dióxido de carbono, difundem-se passivamente através da BHE, enquanto os nutrientes essenciais como a glucose e aminoácidos necessitam de proteínas específicas de transporte, de forma a alcançarem o cérebro.<sup>2</sup>

### **3. Mecanismos de transporte através da BHE**

Mais de 98% das novas moléculas potencialmente eficazes para o tratamento de doenças do SNC não são capazes de atravessar a BHE. Somente pequenas moléculas lipofílicas (<500 Da) são capazes de atravessar a BHE e atingir uma concentração a nível do SNC que seja farmacologicamente eficaz.<sup>5, 6</sup>

Existem diversos mecanismos para a passagem de moléculas solúveis através da BHE, os quais podem ser observados com maior detalhe na Figura I e serão sucintamente explicados.<sup>9</sup>

A difusão paracelular ocorre entre as células endoteliais e é um processo não saturável e não competitivo. Apenas pequenas moléculas hidrossolúveis conseguem atravessar a BHE através deste mecanismo, uma vez que as junções de oclusão limitam este tipo de transporte.<sup>6, 10</sup>

A difusão transcelular ocorre através das células endoteliais e é também um mecanismo não saturável e não competitivo. Para utilizar este mecanismo de transporte, as moléculas deverão apresentar alguns requisitos, como elevado caráter lipofílico e baixo peso molecular.<sup>7, 10</sup>

Para os nutrientes essenciais alcançarem o SNC são utilizadas proteínas transportadoras, que se encontram na superfície das células endoteliais. Estas proteínas reconhecem o seu substrato específico, permitindo um transporte seletivo de moléculas para o SNC. Existem proteínas transportadoras específicas para o transporte de certos nutrientes como glucose, aminoácidos, nucleósidos, galactose, vitaminas e hormonas, que se adaptam às necessidades metabólicas do cérebro e à concentração de substratos existentes no plasma.<sup>1,10</sup>

Outro mecanismo para transpor a BHE é a transcitose mediada por recetores presentes na superfície do lúmen das células da BHE. Moléculas de maiores dimensões são capazes de atingir o SNC através deste transporte, como é o caso da insulina, angiotensina II, folatos, transferrina e lipoproteínas de baixa densidade (LDL).<sup>1, 6, 7, 10</sup>

Podemos ainda mencionar a transcitose mediada por adsorção, que acontece com a albumina e a imunoglobulina. Devido à carga negativa existente na membrana plasmática das células endoteliais, esta é capaz de interagir com substâncias policatiónicas graças ao efeito eletrostático e, assim, estas moléculas serão capazes de transpor a BHE.<sup>6, 10</sup>

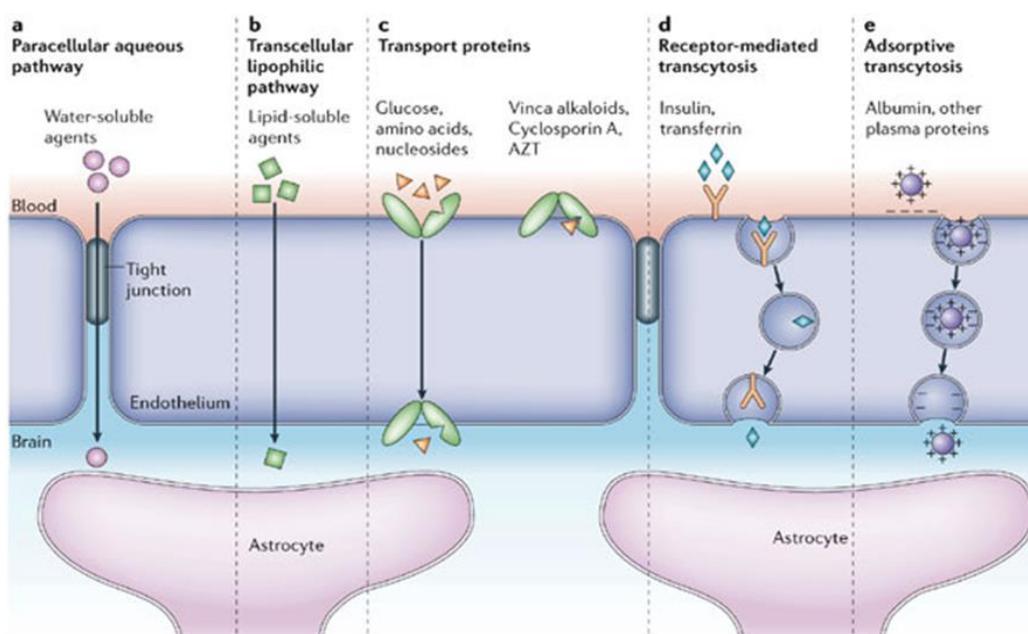


Figura I - Mecanismos de transporte através da BHE.<sup>9</sup>

Os fármacos podem utilizar estes mecanismos de transporte, mimetizando os nutrientes e compostos endógenos. No entanto, é imprescindível que apresentem certas características para que tal seja viável. Além do tamanho restrito que estas moléculas devem apresentar, uma elevada solubilidade lipídica e não serem substratos dos transportadores ativos de efluxo, são fatores cruciais para o sucesso do seu transporte.<sup>10</sup>

Várias estratégias estão a ser estudadas para tornar o transporte de fármacos para o SNC mais eficaz. Entre elas, podemos referir algumas técnicas invasivas, como a abertura temporária da BHE, a aplicação intraventricular ou intracerebral do fármaco ou o uso de um implante intracerebral com libertação controlada do fármaco, como é exemplo o GLIADEL® Wafer, utilizado como tratamento complementar em doentes com glioma. Como qualquer outro tipo de técnica invasiva, estas estratégias estão associadas a um elevado risco de complicações, tais como infeções ou edema cerebral.<sup>11</sup>

Como alternativa existem estratégias não invasivas, como a utilização de pró-fármacos, a conjugação dos fármacos com ligandos naturais ou artificiais, modificações químicas provocadas por fármacos, utilização da via intranasal e os sistemas de nanopartículas.<sup>5, 12</sup>

A utilização de sistemas de nanopartículas é uma das opções mais promissoras para que os fármacos consigam alcançar o SNC, em concentração suficiente para que haja o efeito terapêutico pretendido.

#### **4. Nanopartículas como veículos de fármacos**

Os sistemas coloidais apresentam-se como candidatos eficazes para ultrapassar as barreiras existentes. Estes consistem em agregados moleculares com tamanhos que variam entre 1 e 1000 nm, e onde os fármacos podem ser adsorvidos, encapsulados ou ligados covalentemente e, assim, serem capazes de transpor a BHE.<sup>10</sup>

As nanopartículas (NPs) são um exemplo deste tipo de sistemas. São particularmente interessantes graças à sua versatilidade e podem ser formadas por diferentes polímeros, como o polialquicianoacrilato (PACA), ácido poliláctico (PLA) ou poli (n-butilcianoacrilato) (PBCA), sendo este último dos mais utilizados com esta finalidade.<sup>13</sup>

As nanopartículas são agentes promissores no combate às doenças neurológicas, pois é possível adequar as suas propriedades, utilizando ligandos à sua superfície, de modo a melhorar a sua seletividade, levando ao aumento da eficácia do fármaco que incorporam e

atenuando os seus efeitos secundários.<sup>14</sup> Devido às suas características protegem o fármaco de degradação, reduzem a clearance renal e aumentam a sua semi-vida na corrente sanguínea, permitem controlar a cinética de libertação do composto e ainda alterar a sua velocidade de dissolução.<sup>15</sup>

Existem vários mecanismos para que as NPs consigam transpor a BHE:

- Através da transcitose ou endocitose, tirando proveito dos mecanismos de transporte existentes nas células endoteliais, possibilitando o transporte das NPs com o respetivo conteúdo terapêutico através destas células;
- Inibindo o sistema de efluxo transmembranar (inibindo a função da Gp-P);
- Abrindo as junções de oclusão entre as células endoteliais e permitindo assim a entrada dos fármacos através destas;
- Por indução de um efeito tóxico local na vasculatura cerebral, responsável por uma limitada permeabilização das células endoteliais;
- Graças à solubilização dos lípidos existentes na membrana das células endoteliais, utilizando tensioativos associados às NPs, o que leva à fluidificação da membrana, conhecido por efeito tensioativo.<sup>10</sup>

No entanto, é a modificação da superfície das nanopartículas a via mais apelativa para o sucesso do seu transporte até ao SNC. Sistemas de transporte específicos localizados na BHE podem ser usados como alvos, através da conjugação das NPs com um transportador específico, que será detetado pelos recetores existentes na BHE.<sup>10</sup>

A modificação das NPs pode ser realizada utilizando diversos tipos de ligandos (tais como a insulina, transferrina, lactoferrina e anticorpos) ou tensioativos como o polissorbato 80.<sup>16</sup> O polissorbato 80 adsorve proteínas plasmáticas, tais como a apoproteína E, possibilitando o seu reconhecimento e ligação com os recetores *low density lipoprotein receptor-related protein* (LPRs) existentes nas células endoteliais.<sup>17,18</sup>

Um estudo realizado com nanopartículas de albumina confirma o sucesso do seu transporte até ao cérebro, quando estas se encontram revestidas com ApoE, após administração intravenosa.<sup>19</sup>

A utilização de nanopartículas catiónicas é uma alternativa bastante atrativa para promover a passagem de fármacos através da BHE.

Este sistema combina a vantagem de uma matriz lipídica com um revestimento hidrofílico. A matriz serve de reservatório para fármacos hidrofóbicos e a superfície catiónica favorece a endocitose. A carga positiva na superfície destas nanopartículas permite criar uma atração eletrostática com as cargas negativas presentes na membrana plasmática das células endoteliais, promovendo assim a transcitose destas nanopartículas.<sup>20</sup>

As nanopartículas podem ser constituídas por polímeros, lípidos ou uma combinação de ambos. Deste modo, podemos dividi-las em diferentes classes consoante a sua constituição.<sup>21</sup> Na Tabela I podemos verificar os principais resultados de vários nanotransportadores utilizados para transportar fármacos para o SNC.

*Tabela I: Principais classes de nanotransportadores usados no transporte de fármacos para o SNC*<sup>20</sup>

<b>NANOTRANSPORTADOR</b>	<b>FÁRMACO TRANSPORTADO</b>	<b>PRINCIPAIS OUTCOMES</b>
<b>Nanopartículas poliméricas</b>	Metotrexato	A quantidade de fármaco a alcançar o cérebro e o líquido cefalorraquidiano aumenta, especialmente com NP de dimensão reduzida (<100 nm).
	Dalargina	Penetração na BHE é 3 vezes superior com o uso de NP.
	Temozolamida	PBCA-NPs revestidas com polissorbato 80 transpõem a BHE tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .
	Dexametasona	A inflamação das células da glia foi significativamente reduzida com PLGA <sup>1</sup> -NPs.
	Nimodipina	Níveis mais elevados atingiram o sangue, líquido cefalorraquidiano e tecidos cerebrais <i>in vivo</i> .
<b>Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)</b>	Doxorrubicina	SLN com base em ácido esteárico-PEG2000 permitiram aumentar o tempo de circulação e a acumulação no cérebro.
	Paclitaxel	A administração oral provoca um aumento 3 vezes superior da concentração no plasma e a nível cerebral. Ao combinar este sistema com siRNA é possível reduzir o crescimento tumoral.
	Camptotecina	Melhoria da AUC quando este fármaco foi administrado oralmente utilizando SLN formuladas com ácido esteárico.
	Melatonina	Início de ação tardio e melhoria da AUC.
<b>Nanocápsulas lipídicas (LNCs)</b>	Etopósido	Valor de DL50 foi substancialmente inferior utilizando as LNCs nas linhas celulares do glioma, comparativamente com a utilização de etopósido livre.

	Paclitaxel	Prolongamento no tempo de semi-vida no cérebro de 21 minutos para mais de 5 horas com o uso das LNCs. Diminuição da progressão do tumor em murghanhos.
<b>Lipossomas</b>	Fenitoína	Melhoria na ação local no tratamento da epilepsia.
	Cisplatina	Aumento na concentração do fármaco e promoção da morte celular nas áreas afetadas pelo tumor.
<b>Micelas</b>	Anfotericina, Morfina	Aumento da quantidade de fármaco a alcançar o cérebro.
<b>Dendrímeros</b>	Metotrexato	Melhoria no transporte do fármaco em situação de glioma.

<sup>1</sup> PLGA: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

Neste trabalho vamos focar a nossa atenção nas nanopartículas lipídicas e nas vantagens que estas possuem comparativamente às restantes classes de nanopartículas.

## 5. Nanopartículas Lipídicas

No início dos anos 90, a atenção dos grupos de investigação de Müller, Gasco e Westesen focou-se no desenvolvimento de um sistema de transporte alternativo aos lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas. Foram desenvolvidas as nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), uma classe de partículas coloidais compostas por lípidos, com elevada estabilidade *in vivo* e que permanecem no estado sólido à temperatura ambiente e corporal.

22

Comparativamente aos lipossomas e nanopartículas poliméricas, as SLN apresentam maior capacidade de carga, maior estabilidade, menor citotoxicidade, permitem a libertação controlada do fármaco e têm um custo de produção relativamente baixo. Além disso, durante a sua produção não são utilizados solventes orgânicos e são formulações capazes de se manterem estáveis até 3 anos.<sup>23</sup>

O tamanho das SLN varia entre 50 e 1000 nm, são compostas por lípidos dispersos numa solução aquosa de tensoativo(s) e podem incorporar principalmente compostos lipofílicos.<sup>22</sup> Estas partículas podem ser facilmente preparadas através da técnica da microemulsão ou homogeneização de alta pressão. A sua matriz pode ser composta por um lípido sólido ou uma mistura de lípidos, tais como os mono-, di- e triglicerídeos, ácidos gordos, ceras e esteróides. Vários tensoativos como fosfolípidos, poloxâmeros e polissorbatos possibilitam a sua estabilização estérica. Os restantes compostos usados vão influenciar a qualidade da

dispersão das SLN. Diferentes lípidos e emulsionantes requererão diferentes métodos e parâmetros de homogeneização. A fase lipídica é composta por vários compostos químicos e a estabilidade dos fármacos varia consoante os lípidos usados. A escolha do emulsionante é importante para a estabilidade física da formulação, que é imprescindível para o processo de esterilização. Geralmente, quanto maior a concentração de emulsionante menor o tamanho da partícula, o que é desejável numa administração intravenosa. Por outro lado, o aumento do conteúdo lipídico resulta, em grande parte dos casos, num aumento do tamanho de partícula e numa ampla distribuição do tamanho de partícula.<sup>23</sup>

Apesar das inúmeras vantagens relativamente a outros sistemas de transporte existentes, as SLN apresentam desvantagens que comprometem o seu sucesso no transporte de fármacos, nomeadamente a sua capacidade de carga limitada pela cristalinidade da matriz e perda de fármaco após a sua produção.<sup>24</sup>

Vários estudos foram feitos no sentido de ultrapassar os problemas relacionados com as SLNs e, em 1999, foi desenvolvida uma nova geração de nanotransportadores lípidos, os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC). Estes foram formulados usando combinações de lípidos sólidos e líquidos e apresentam uma matriz não estruturada, com menor tendência a sofrer cristalização, o que torna possível incorporar uma maior quantidade de fármaco e melhorar a estabilidade destes sistemas durante o armazenamento, havendo menos perdas do seu conteúdo durante esta fase. Como exemplo dos lípidos sólidos que são utilizados na formulação dos NLC temos o ácido esteárico, palmitato de cetilo e palmitoestearato de glicerol. Os lípidos líquidos mais utilizados são triglicéridos do ácido caprílico e cáprico, monoacilglicéris, vitamina E e seus derivados. A seleção destes componentes dependerá não só das propriedades físico-químicas do fármaco transportado, bem como da via de administração escolhida.<sup>25,26</sup>

Na figura 2 podemos observar as principais diferenças estruturais entre SNL e NLC, além de algumas propriedades que estas apresentam na incorporação de fármacos.

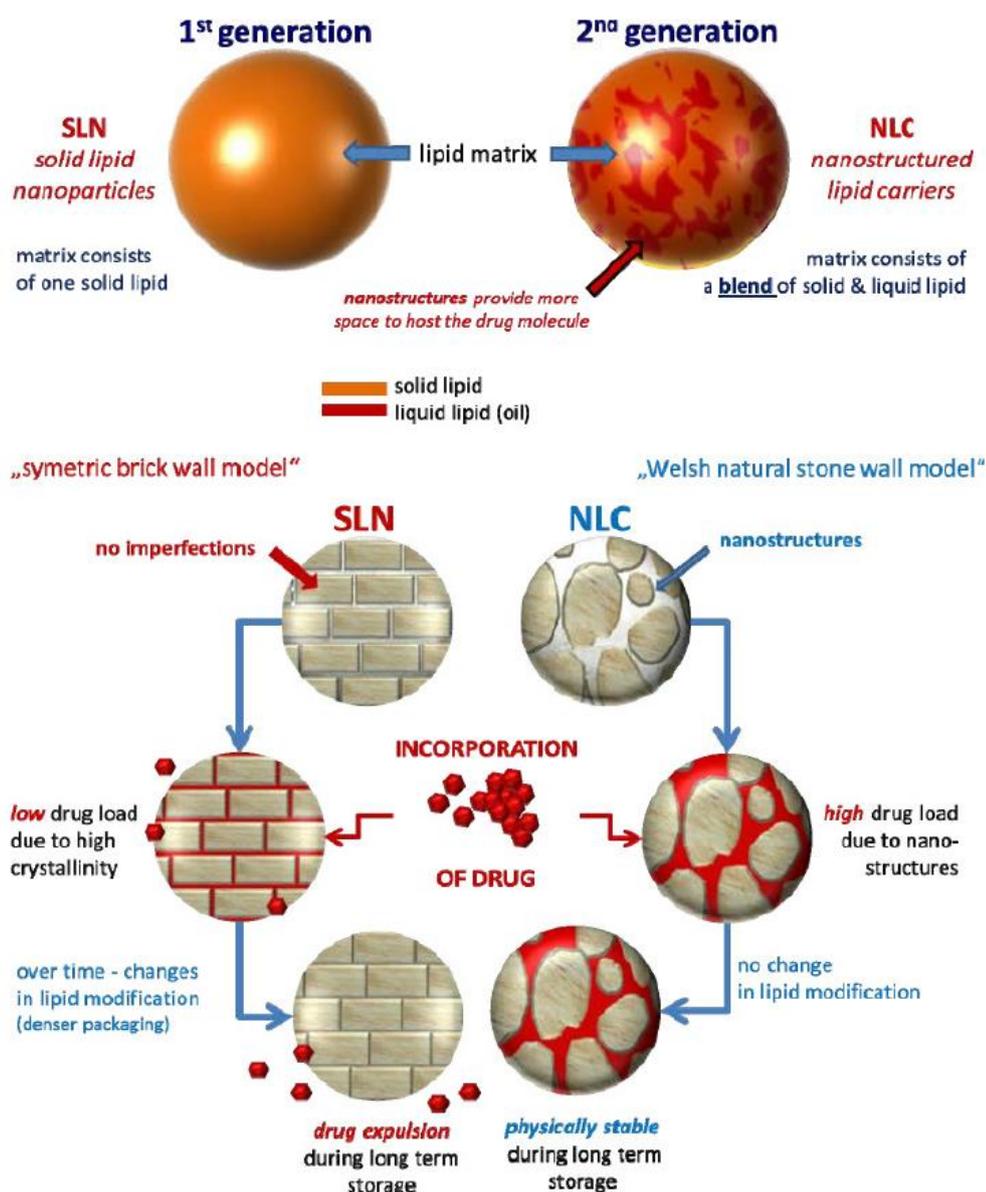


Figura 2 - Principais diferenças estruturais entre SLN e NLC <sup>27</sup>

Contudo, ambos os sistemas apresentam limitações. Tanto as SLN como os NLC apresentam apenas capacidade de encapsular compostos ou fármacos lipofílicos, que sejam solúveis na matriz lipídica das nanopartículas.

Novos estudos foram desenvolvidos e surgiu uma nova classe de nanopartículas lipídicas, os conjugados fármaco-lípido (LDC), produzidos para ultrapassar as limitações das SLN e NLC, nomeadamente a sua reduzida capacidade de carga de fármacos hidrofílicos. Estes sistemas são compostos por partículas lipídicas sólidas resultantes da ligação entre o fármaco e um lípido, através da formação de um sal (usando um ácido gordo) ou por ligação covalente (com ésteres ou éteres). Posteriormente, submete-se este sistema a homogeneização a alta pressão utilizando uma solução aquosa de tensoativo.<sup>10</sup>

As nanocápsulas lipídicas (LNCs) caracterizam-se como uma estrutura híbrida entre nanopartículas poliméricas e lipossomas, com a vantagem de apresentar maior estabilidade e um processo de produção mais simples, o qual se baseia na inversão de fases de uma emulsão óleo/água em função de uma mudança de temperatura. A sua estrutura consiste numa matriz de triglicerídeos líquidos oleosos, rodeada por uma interface coesa de tensoativo. Geralmente, as LNC possuem uma superfície com carga negativa devido às moléculas de fosfolípidos.<sup>28</sup>

Estas classes de nanopartículas lipídicas podem ser usadas como veículos de transporte de fármacos para o SNC com diferentes objetivos:<sup>10</sup>

- estabilizar moléculas que possam ser instáveis tanto a nível biológico como físico-químico;
- melhorar a biodisponibilidade do fármaco transportado;
- aumentar a permeação de um fármaco através da BHE.

## **6. Objetivos do uso de NLs para veicular fármacos até ao SNC**

### **6.1 Estabilizar moléculas com instabilidade físico-química ou biológica**

Muitos fármacos utilizados no tratamento de doenças no SNC apresentam reduzida estabilidade *in vivo*. Neste contexto, é imprescindível melhorar a estabilidade no plasma destas moléculas, pois estes compostos podem sofrer rapidamente processos de degradação. Os compostos mais instáveis terão ainda tendência a possuir uma rápida clearance, reduzido tempo de semi-vida e uma baixa performance *in vivo*.

Compostos que contêm certos grupos funcionais são mais suscetíveis de sofrer hidrólise por enzimas plasmáticas. Entre estes grupos funcionais podemos citar os ésteres, amidas, lactonas e sulfonamidas.<sup>10</sup>

A camptotecina, que possui uma elevada atividade antitumoral, apresenta elevada instabilidade a pH fisiológico, decorrente da abertura do anel lactónico e posterior formação da sua forma carboxilada menos ativa. A sua porção lactónica é suscetível de sofrer hidrólise espontânea, formando a correspondente forma carboxilada, num processo onde o pH é um fator decisivo. A forma lactónica intacta predomina em pH ácido, enquanto que a presença da espécie carboxilada (anel aberto) é favorecida em meio neutro e alcalino. Apesar da forma carboxilada possuir solubilidade aquosa superior, é cerca de 10 vezes menos potente.

É então imprescindível a manutenção do anel lactônico para que se preserve a sua atividade antitumoral.<sup>29</sup>

Na tentativa de estabilizar a camptotecina, as SLN apresentam vantagem em comparação com outros transportadores coloidais. Yang et al, mostraram que este sistema aumenta a estabilidade da camptotecina, evitando a sua hidrólise e aumentando o tempo de retenção da camptotecina na sua forma activa.<sup>30</sup> Os resultados deste trabalho evidenciaram que as moléculas de camptotecina incorporadas em SLN, apenas se convertem na forma carboxilada após o fármaco ser libertado para o meio neutro tamponado. No entanto, quando o meio é ácido, o fármaco libertado permanece sob a forma activa. Isto sugere que as SLN protegem o fármaco de sofrer hidrólise, até que seja libertado no meio. Os estudos realizados *in vivo* em murganhos, mostraram que o fármaco na forma lactónica possui um tempo de semi-vida prolongado no sangue e nos principais órgãos, conduzindo, consequentemente, a uma maior acumulação no cérebro.<sup>30</sup>

Recentemente, um grupo de investigadores testou as SLNs como uma plataforma adequada para estabilizar a camptotecina, no seu transporte até ao cérebro. Martins et al, utilizaram SLN compostas por cetilpalmitato e polissorbato 80, preparadas por homogeneização a alta pressão. Considerando vários parâmetros, as formulações desenvolvidas neste estudo mantiveram-se estáveis em termos de tamanho e carga, até um ano de armazenamento. Estudos de libertação *in vitro*, mostraram um perfil de libertação prolongada no plasma, confirmando a estabilidade física das partículas em pH fisiológico.<sup>31</sup>

Curiosamente, as SLN alteraram o perfil de biodistribuição da camptotecina *in vivo*, prolongando o seu tempo de retenção no cérebro, conduzindo a uma maior eficácia para atingir o alvo terapêutico e provocando um aumento do potencial efeito antitumoral desta molécula. Para além disto, os efeitos colaterais foram reduzidos. Foi então concluído que as SLN são capazes de estabilizar certos tipos de moléculas lábeis, que podem sofrer processos de hidrólise.<sup>31</sup>

## 6.2 Melhorar a biodisponibilidade do fármaco transportado

Apesar de algumas moléculas serem teoricamente capazes de atravessar a BHE, existem diversos fatores que põem em causa este transporte. É fundamental que o fármaco exista numa concentração suficientemente elevada, para ultrapassar a fraca permeabilidade através da BHE, assim como se mostra importante retardar a eliminação do fármaco do organismo, de modo a que este seja capaz de exercer o seu efeito terapêutico.<sup>10</sup>

Foram realizados estudos utilizando a clozapina, um fármaco antipsicótico com propriedades lipofílicas e com reduzida biodisponibilidade por via oral, devido ao efeito de primeira passagem. Estes foram incorporados em SLN, compostas por diferentes tipos de triglicerídeos, e foi possível observar que a biodisponibilidade deste fármaco aumentou 3.1 a 4.5 vezes, através da administração intraduodenal.<sup>32</sup>

Um exemplo interessante é dado pela noscapina, utilizada no tratamento do glioblastoma, mas que tem um tempo de semi-vida plasmático muito curto e sofre rápida eliminação. Madan *et al*, desenvolveram SLN com estearato de polietilenoglicol para incorporar este fármaco e compararam a sua eficácia com as SLN sem este tipo de modificação.<sup>33</sup> Foi observado que o tempo de semi-vida plasmática aumentou 11 vezes nas SLN modificadas e 5 vezes nas SLN inalteradas, quando comparado com o fármaco em solução.<sup>33</sup>

Num estudo recente, foram estudados NLC modificados com tricaprina e triestearina, onde se incorporou bromocriptina, um agonista dopaminérgico usado no tratamento da doença de Parkinson. Este fármaco apresenta um início de ação lento (1-2 horas) e tempo de semi-vida prolongado (3 a 5 horas), o que explica o seu reduzido potencial para reduzir a discinesia, quando comparado com a L-DOPA. Nesse sentido, a sua incorporação em NLC representa uma estratégia para obter níveis plasmáticos estáveis e aumentar o seu tempo de semi-vida. Este estudo foi realizado em murganhos após administração intraperitoneal destes sistemas, de modo a avaliar a sua potencial ação no controlo da doença de Parkinson. Os resultados evidenciaram uma atenuação da acinesia, tendo sido observada maior eficácia nos grupos em que foram administradas NLC, comparativamente aos que receberam a bromocriptina livre.<sup>34</sup>

### 6.3 Aumentar a permeação de fármacos através da BHE

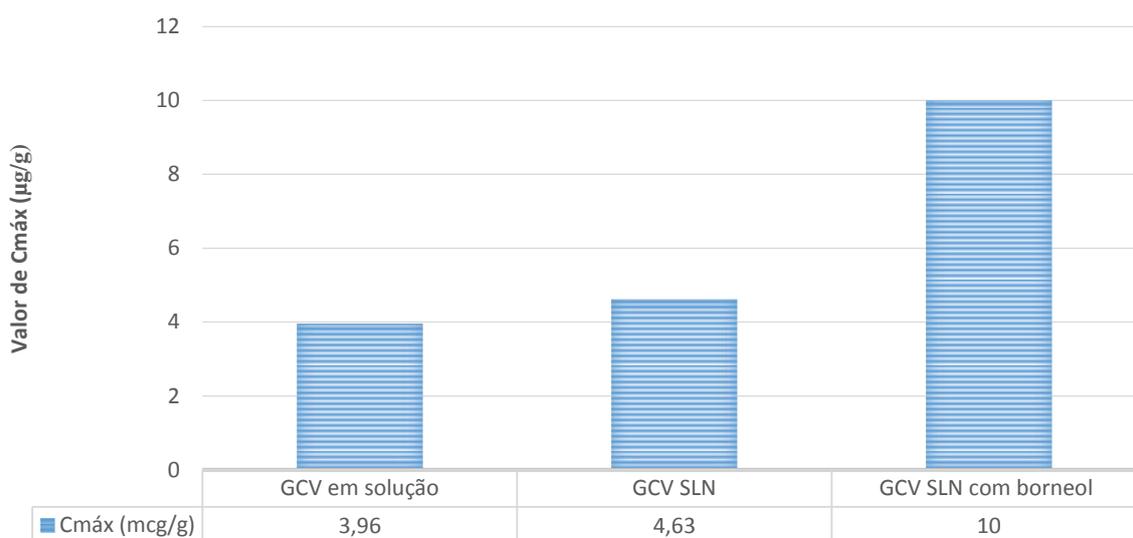
As nanopartículas lipídicas podem ser usadas como transportadores que vão interagir com a BHE, tornando possível a penetração de fármacos que são incapazes de atravessar esta barreira.

A doxorubicina, um fármaco altamente hidrofílico que não tem capacidade de atravessar a BHE, tem demonstrado uma significativa atividade antitumoral. No entanto, o seu uso clínico é limitado, devido aos efeitos que provoca a nível cardíaco, nomeadamente a miocardiopatia. Isto provoca efeitos tóxicos agudos, que podem ser evitados caso este fármaco seja direcionado eficazmente para o seu alvo terapêutico.

Zara *et al*, incorporaram doxorubicina em SLN, utilizando ácido esteárico como fase interna e Epikuron200® como tensoativo.<sup>35</sup> Após administração intravenosa em murganhos, as SLN conduziram a uma modificação da farmacocinética da doxorubicina. Esta apresentou inferior concentração no fígado, coração e rins, mas em contrapartida foi detetada a sua presença no cérebro, o que não se verifica quando este fármaco é administrado em solução.<sup>35</sup>

Apesar das nanopartículas lipídicas terem capacidade de atravessar a BHE, o aumento da concentração de fármaco no alvo pretendido continua a ser bastante limitado. Ao longo dos últimos anos têm sido estudadas novas abordagens baseadas nos sistemas de transporte endógeno localizados na BHE. Para isto, os nanotransportadores devem ser reformulados.<sup>10</sup>

Estudos foram feitos utilizando SLN modificadas com borneol para incorporar ganciclovir (GCV). Este fármaco previne a invasão e multiplicação do citomegalovírus em células saudáveis. Observou-se que o borneol foi capaz de abrir acentuadamente as junções de oclusão na BHE, favorecendo a passagem de substâncias através desta via intercelular, verificando-se ainda o aumento dos níveis de histamina e 5-hidroxi-triptamina no hipotálamo e inibindo ainda o sistema de efluxo da glicoproteína-P. Foram analisados parâmetros farmacocinéticos, especificamente a concentração máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), após a administração intravenosa do ganciclovir em solução, ganciclovir encapsulado em SLN e ganciclovir em SLN modificadas com borneol. Os resultados foram os seguintes:



**Figura 3** - Níveis de  $C_{m\acute{a}x}$  a nível cerebral utilizando diferentes sistemas para transportar o ganciclovir. Adaptado de <sup>36</sup>

A concentração máxima no cérebro variou de 3,96 µg/g com o GCV em solução, para 4,63 µg/g usando GCV-SLN e 10 µg/g utilizando GCV encapsulado em SLN modificadas com borneol.

Deste estudo, conclui-se que a combinação de SLN com o borneol é vantajosa para que seja possível permear a BHE e veicular o ganciclovir até ao seu alvo.<sup>36</sup>

Como discutido previamente, revestir as nanopartículas com polissorbato 80 é uma estratégia para aumentar a absorção de ApoE na sua superfície, facilitando assim a endocitose destes sistemas para o cérebro.

Vários estudos têm sido realizados utilizando o polissorbato 80. Num destes estudos, recorreu-se ao Tween<sup>®</sup>80 para estabilizar SLN, usadas como veículos para o transporte de curcumina. Esta molécula é um antioxidante com elevado potencial para ser usado a nível neurológico. O valor observado de AUC foi 8 vezes superior em relação ao fármaco administrado na forma livre, o que confirma o prolongamento da circulação obtido quando este sistema é utilizado. A concentração alcançada no cérebro foi 30 vezes superior, em relação à curcumina livre.

A eficácia deste sistema de transporte deve-se ao reduzido tamanho de partícula, que consegue evitar o mecanismo de primeira passagem no fígado.<sup>37</sup>

## **7. Aplicações Terapêuticas**

São várias as doenças que afetam o SNC e múltiplos esforços têm sido feitos ao longo dos últimos anos de modo a encontrar soluções de tratamento, através da procura de substâncias capazes de penetrar a BHE e de alcançar as células alvo em concentração suficiente para possuírem eficácia terapêutica.

As nanopartículas lipídicas têm elevado interesse para o tratamento de diversos tipos de doenças que afetam o SNC, tais como tumores cerebrais, doenças neurodegenerativas, epilepsia, esclerose múltipla ou AVC.

### Glioma

Os gliomas são dos tumores cerebrais mais frequentes e apesar de existirem várias técnicas agressivas para combater este tipo de tumores, como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, estes ainda apresentam um pobre prognóstico. Muitos agentes anticancerosos são substratos dos transportadores de efluxo que se encontram na BHE, dificultando a

obtenção de concentrações terapêuticas no SNC. Este problema não pode ser solucionado aumentando as doses destes fármacos, devido à possibilidade de surgirem efeitos tóxicos. As formulações baseadas em lipídios têm apresentado especial interesse para contornar estes problemas. São capazes de aumentar os níveis de vários agentes antitumorais no cérebro, tais como o paclitaxel, doxorubicina, etopósido e camptotecina.<sup>38</sup>

Foram realizados estudos utilizando a edelfosina, uma molécula com ação antitumoral, mas que não é suficientemente absorvida quando administrada isoladamente. Para melhorar as suas características, a molécula foi incorporada em nanopartículas lipídicas. Estas foram preparadas por homogeneização a alta pressão, onde se utilizou como fase aquosa uma solução de Tween 80<sup>®</sup> e como fase lipídica Compritol 888<sup>®</sup> ATO ou Precirol 5<sup>®</sup> ATO, juntamente com a edelfosina. Foi possível concluir que a administração destas nanopartículas por via oral, conduz à acumulação de edelfosina no cérebro. Esta acumulação é explicada pelo efeito de inibição da função da Gp-P, provocado pelo polissorbato 80. Adicionalmente, os resultados observados *in vivo*, mostraram uma redução da evolução do glioma em murganhos. Os resultados foram analisados 14 dias após a administração destas nanopartículas e comparados com a administração de edelfosina em solução, sendo possível verificar uma significativa redução do crescimento do tumor quando a edelfosina foi incorporada nas NLs, o que as torna uma atrativa opção para o tratamento de gliomas.<sup>39</sup>

### Epilepsia

Apesar do elevado número de fármacos antiepiléticos existentes, uma elevada percentagem de doentes é ainda resistente à farmacoterapia.

O diazepam é uma benzodiazepina utilizada como ansiolítico, sedativo ou com ação antiepilética, com propriedades lipofílicas capaz de atravessar a BHE. Apesar da sua lipofilia, é rapidamente redistribuído para fora do cérebro.<sup>40</sup>

Estudos realizados com o diazepam, em que este foi incorporado em SLN, mostraram que estas formulações permitiram prolongar o tempo de ação do fármaco, pois conduziram a uma redução da velocidade de libertação, quando comparadas com o diazepam em solução. O tipo e concentração de tensoativo e de lipídios usados influencia as características físico-químicas das SLNs *in vitro*. As SLN formadas com Tween 80<sup>®</sup> como tensoativo e baixa concentração de lipídios na matriz apresentaram os melhores resultados na eficiência da incorporação do diazepam, com menores perdas ao longo do seu transporte, para além de terem permitido uma libertação prolongada deste fármaco no seu local de ação.<sup>41</sup>

A carbamazepina é um fármaco lipofílico com atividade antiepilética, por inativação dos canais de sódio. Foram realizados estudos onde se utilizaram SLN contendo quitosano, um biopolímero que permite a libertação controlada de fármacos. Estas nanopartículas apresentaram uma elevada eficiência de encapsulação, além de terem proporcionado estabilidade física do fármaco. Foi avaliado o efeito das SLN contendo carbamazepina na redução do tempo das convulsões, em comparação com o uso de carbamazepina em solução. As SLN demonstraram uma libertação controlada do fármaco por um período prolongado e permitiram reduzir a duração das convulsões.<sup>42</sup>

### Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são condições muito debilitantes, ainda sem cura, que afetam pessoas de todas as idades e resultam da degeneração progressiva e morte de neurónios. O resveratrol é um polifenol, encontrado nas uvas que, recentemente, tem sido estudado pelo seu potencial benefício no tratamento de doenças neurodegenerativas. De facto, o resveratrol aumenta as defesas antioxidantes do organismo e diminui as citocinas pro-inflamatórias, ajudando a manter a homeostase. Apesar disto, as suas propriedades farmacocinéticas não são favoráveis *in vivo*, apresentando reduzida solubilidade, instabilidade química e sendo rapidamente metabolizado. Como consequência, o resveratrol dificilmente consegue alcançar o cérebro. Foram realizados estudos onde se tirou partido da utilização de SLN, para transportar o resveratrol, visto estes transportadores serem capazes de ultrapassar os problemas de solubilidade e degradação desta molécula, permitindo assim atingir o cérebro em concentrações terapêuticas. As SLN foram revestidas com ApoE, o que possibilitou o seu reconhecimento e ligação às LPRs existentes nas células endoteliais, promovendo assim a endocitose destes nanosistemas. Os resultados *in vitro* da utilização destas SLN revelaram um aumento na permeabilidade do resveratrol de 1.8 vezes quando é utilizada ApoE para revestir estas nanopartículas. Foi então concluído que a utilização de SLN conjugadas com ApoE pode ser uma estratégia para o transporte de resveratrol até ao SNC no combate às doenças neurodegenerativas.<sup>43</sup>

Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos no tratamento destas doenças neurológicas, é necessário um maior esforço para tornar estes sistemas eficazes *in vivo* e reduzir a sua potencial neurotoxicidade. A função da BHE é proteger o SNC de potenciais agentes tóxicos e xenobióticos. Ao utilizar métodos de transporte pela BHE, estaremos a expor o SNC a concentrações de substâncias que o podem danificar. Daí, surge a

necessidade de uma dupla capacidade de atingir o seu alvo específico, de modo a atingir apenas as células alvo, sem danificar outras células do cérebro. Sistemas que tenham esta característica devem ser estudados, de modo a ultrapassar o problema da potencial toxicidade destas partículas.<sup>6</sup>

## 8. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao longo das últimas décadas um crescente interesse em desenvolver sistemas de transporte de fármacos, capazes de alcançar o SNC, tornou-se um dos principais objetivos da neurociência.

Grande parte dos fármacos existentes no mercado não apresenta capacidade para atravessar a BHE e, por isso, o tratamento das doenças neurológicas continua longe de ser suficientemente eficaz. O desenvolvimento de transportadores que sejam capazes de incorporar estes fármacos e de os direcionar para o seu alvo terapêutico tem sido promovido e várias estratégias têm surgido ao longo dos últimos anos. As nanopartículas lipídicas surgiram recentemente como uma alternativa para veicular estes fármacos e mostram um elevado interesse terapêutico, sendo capazes de estabilizar fármacos contra a sua degradação química nos fluidos biológicos, aumentar a sua permanência na corrente sanguínea, além de possuírem capacidade para se ligarem diretamente a células endoteliais, induzindo a sua endocitose e alcançando o parênquima cerebral, permitindo assim ultrapassar alguns dos problemas que outros sistemas de transporte apresentam. A modificação destas nanopartículas tem particular interesse, pois é possível aumentar a sua afinidade para certos tipos de recetores endoteliais com a utilização de ligandos específicos.

Apesar disso, são necessários estudos mais aprofundados da sua potencial toxicidade a nível cerebral. Como muitas das patologias que afetam o SNC necessitam de um tratamento crónico, é imprescindível compreender de que forma a acumulação do fármaco no tecido cerebral pode provocar danos e, por esse motivo, devem ser utilizados vários métodos que permitam avaliar estes potenciais efeitos tóxicos.

No futuro, várias questões devem ser investigadas: 1) o material deve ser biodegradável e passível de ser eliminado do tecido cerebral, de modo a tornar estes sistemas biologicamente seguros; 2) o método de preparação deve ser robusto de modo a obter NLS de forma homogénea e reprodutível; 3) os factores que influenciam o comportamento *in vivo* das NLS devem ser elucidados e avaliados; 4) a capacidade de atingir o seu alvo terapêutico ainda não é satisfatória e devem ser investigados métodos para melhorar esta falha antes da aplicação clínica destes sistemas.

Apesar dos trabalhos necessários para desenvolver sistemas mais eficazes, é evidente que a nanotecnologia é uma promissora alternativa no tratamento de doenças neurológicas, permitindo construir novos conceitos na manipulação de fármacos e no seu transporte até ao SNC.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TOSI, Giovanni *et al.* - The «fate» of polymeric and lipid nanoparticles for brain delivery and targeting: Strategies and mechanism of blood-brain barrier crossing and trafficking into the central nervous system. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. ISSN 17732247. 32:2016) 66–76. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2015.07.007>
2. WILHELM, Imola; FAZAKAS, Csilla; KRIZBAI, Istvan A. - In vitro models of the blood-brain barrier. 2011) 113–128. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499332>
3. KAUR, Indu Pal *et al.* - Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 127:2 (2008) 97–109. Disponível em doi:10.1016/j.jconrel.2007.12.018.
4. BLASI, Paolo *et al.* - Lipid nanoparticles for brain targeting III . Long-term stability and in vivo toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 0378-5173. 454:1 (2013) 316–323. Disponível em doi:10.1016/j.ijpharm.2013.06.037.
5. BICKER, Joana *et al.* - Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 18733441. 87:3 (2014) 409–432 Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641114001015>
6. GAO, Huile - Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. . ISSN 22113835. 2016) 1–19. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383516301186>
7. ZHANG, Fan *et al.* - Targeting specific cells in the brain with nanomedicines for CNS therapies. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 18734995. 2015) 1–15. Disponível em doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.013.
8. BLANCHETTE, Marie; DANEMAN, Richard - Mechanisms of Development Formation and maintenance of the BBB. **MOD**. . ISSN 0925-4773. 138:2015) 8–16. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477315300095>
9. ABBOTT, N.Joan; RÖNNBÄCK, Lars; HANSSON, Elisabeth - Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**. . ISSN 1471-003X. 7:1 (2006) 41–53. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371949>.
10. GASTALDI, Lucia *et al.* - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain : Current state of the art. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS**. . ISSN 0939-6411. May (2014) Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641114001532>
11. WOHLFART, Stefanie; GELPERINA, Svetlana; KREUTER, Jörg - Transport of drugs across the blood – brain barrier by nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 0168-3659. 161:2 (2012) 264–273. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911005852>.
12. SHAH, Brijesh *et al.* - European Journal of Pharmaceutical Sciences Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles : Effect on formulation and characterization parameters. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**. . ISSN 0928-0987. 78:2015) 54–66. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098715003231>
13. MANGRAVITI, Antonella *et al.* - Nanobiotechnology-based delivery strategies: New frontiers in brain tumor targeted therapies. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 2016). Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916301651>

14. JULLERAT-JANNERET, Lucienne - The targeted delivery of cancer drugs across the blood – brain barrier: chemical modifications of drugs or. 13:December (2008). Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644608003309>
15. PÉREZ-HERRERO, Edgar; FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers , the future of chemotherapy. 93:2015) 52–79. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115001514>
16. SARAIVA, Cláudia *et al.* - Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood – brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 0168-3659. 235:2016) 34–47. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303236>
17. AZHARI, Hanisah *et al.* - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Stabilising cubosomes with Tween 80 as a step towards targeting lipid nanocarriers to the blood – brain barrier. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 0939-6411. 104:2016) 148–155. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641116301631>
18. SUN, Wangqiang *et al.* - Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. 25:2004) 3065–3071. Disponível em doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.087.
19. ZENSI, Anja *et al.* - Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 0168-3659. 137:1 (2009) 78–86.. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365909001527>
20. LUN, Ho; YU, Xiao; BENDAYAN, Reina - Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics ☆. 64:2012) 686–700. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11002766>
21. JO, Kreuter - Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier ( BBB ). 30:1 (2013) 49–54. doi:10.3109/02652048.2012.692491.
22. CENTRE, Nanobiomedical; ELECTROCHEMISTRY, Technical - Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles : Composition , properties and therapeutic strategies. 68:2016) 982–994. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116305501>
23. ALYAUTDIN, Renad *et al.* - Nanoscale drug delivery systems and the blood – brain barrier. 2014) 795–811. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926460/>
24. BELOQUI, Ana *et al.* - Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. . ISSN 1549-9634. 12:1 (2016) 143–161. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963415001781>
25. MONTENEGRO, Lucia *et al.* - Journal of Drug Delivery Science and Technology From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers : A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. 32:2016) 100–112. Disponível em doi: 10.1016/j.jddst.2015.10.003.
26. WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Solid Lipid Nanoparticles ( SLN ) and Nanostructured Lipid Carriers ( NLC ) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 0939-6411. 86:1 (2014) 7–22 Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641113002920>
27. PATEL, Dilip - DEVELOPMENT & SCREENING APPROACH FOR LIPID NANOPARTICLE: A REVIEW. 2:5 (2013) 27–32 Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/257920152\\_DEVELOPMENT\\_SCREENING\\_APPRO](https://www.researchgate.net/publication/257920152_DEVELOPMENT_SCREENING_APPRO)

- ACH\_FOR\_LIPID\_NANOPARTICLE\_A\_REVIEW. Acedido Agosto 11, 2016.
28. YURGEL, V.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. - Developments in the use of nanocapsules in oncology. 46:2013) 486–501. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854440/>
  29. TSAI, T. H.; LEE, C. H.; YEH, P. H. - Effect of P-glycoprotein modulators on the pharmacokinetics of camptothecin using microdialysis. 2001). Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1573054/>
  30. CHENG, Shi *et al.* - Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. 59:1999) 299–307. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365999000073>
  31. MARTINS, Susana M. *et al.* - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Brain targeting effect of camptothecin-loaded solid lipid nanoparticles in rat after intravenous administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 0939-6411. 85:3 (2013) 488–502. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641113002907>
  32. MANJUNATH, Koppam; VENKATESWARLU, Vobalaboina - Pharmacokinetics , tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. 107:2005) 215–228. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365905002701>
  33. MADAN, Jitender *et al.* - Poly ( ethylene ) -glycol conjugated solid lipid nanoparticles of nescapine improve biological half-life , brain delivery and efficacy in glioblastoma cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. . ISSN 1549-9634. 9:4 (2013) 492–503. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963412006004>
  34. ESPOSITO, Elisabetta *et al.* - Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bromocriptine. 25:7 (2008). Disponível em doi: 10.1007/s11095-007-9514-y.
  35. PAOLO, Gian *et al.* - PHARMACOKINETICS OF DOXORUBICIN INCORPORATED IN SOLID LIPID NANOSPHERES ( SLN ). 40:3 (1999). Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661899905091>
  36. REN, Jungang *et al.* - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Tissue distribution of borneol-modified ganciclovir-loaded solid lipid nanoparticles in mice after intravenous administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 0939-6411. 83:2 (2013) 141–148. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S093964111200344X>
  37. KAKKAR, Vandita *et al.* - Proof of concept studies to confirm the delivery of curcumin loaded solid lipid nanoparticles ( C-SLNs ) to brain. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 0378-5173. 448:2 (2013) 354–359. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313002652>
  38. GROVER, Aditya *et al.* - Brain-Targeted Delivery of Docetaxel by Glutathione-Coated Nanoparticles for Brain Cancer. 15:6 (2014) 1562–1568. Disponível em doi: 10.1208/s12249-014-0165-0.
  39. ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA, Ander *et al.* - In vitro and in vivo efficacy of edelfosine-loaded lipid nanoparticles against glioma. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 156:3 (2011) 421–426. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911005578>
  40. SHARMA, Deepak *et al.* - Nose-To-Brain Delivery of PLGA-Diazepam Nanoparticles. 16:5 (2015) 1108–1121. Disponível em <http://link.springer.com/article/10.1208/s12249-015-0294-0>
  41. ABDELBARY, Ghada; FAHMY, Rania H. - Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles : Design

- and Characterization. 10:1 (2009). Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663687/>
42. NAIR, Rahul *et al.* - Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. **Lipids in health and disease**. . ISSN 1476-511X. 11:2012) 72. Disponível em <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-72>
43. NEVES, Ana Rute; QUEIROZ, Joana Fontes; REIS, Salette - Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. **Journal of Nanobiotechnology**. . ISSN 1477-3155. 14:1 (2016) 27. Disponível em <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-016-0177-x>