

Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I

Eliana B. Souto

Faculdade de Ciências da Saúde, UFP

Centro de Genômica e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Patrícia Severino

Faculdade de Ciências da Saúde, UFP

Departamento de Processos Biotecnológicos, UNICAMP

Maria Helena A. Santana

Departamento de Processos Biotecnológicos, UNICAMP

Resumo: Nanopartículas poliméricas produzidas a partir de polímeros sintéticos, como copolímeros do ácido metacrílico, ésteres acrílicos ou metacrílicos, têm sido amplamente utilizadas na área farmacêutica para encapsulação de princípios ativos. Essas nanopartículas apresentam as vantagens de proteção, liberação controlada, melhor biodisponibilidade e menor toxicidade, proporcionando maior conforto aos pacientes e adesão ao tratamento. A produção das nanopartículas (nanocápsulas e nanosferas) por polimerização de monômeros é revisada e descrita neste artigo, evidenciando os parâmetros tecnológicos que interferem nas características físico-químicas das nanopartículas, como a solubilidade do princípio ativo, o volume e pH do meio de polimerização, a massa molar e concentração do monômero e a natureza e concentração do tensoativo.

Palavras-chave: Nanocápsulas, nanosferas, polímeros, polimerização de monômeros.

Preparation of Polymeric Nanoparticles by Polymerization of Monomers - Part I

Abstract: Polymeric nanoparticles obtained from synthetic polymers such as copolymers of methacrylic acid, acrylic esters or metacrylics, have been widely used in pharmaceuticals for encapsulation of drugs. These nanoparticles have the advantages of drug protection, controlled release, improved bioavailability and lower toxicity, resulting in greater comfort to patients and compliance to the treatment. The production of nanoparticles (nanospheres and nanocapsules) by polymerization of monomers is reviewed and discussed in this article, highlighting the technological parameters that affect the physicochemical characteristics of nanoparticles, e.g. drug solubility, phase volume, pH of polymerization, molecular weight and monomer concentration, and the nature and concentration of the surfactant.

Keywords: Nanocapsules, nanospheres, polymer, polymerization of monomers.

Introdução

Nanopartículas poliméricas podem apresentar-se na forma de nanocápsulas ou nanosferas^[1-3]. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanosferas não contêm óleo na sua formulação, mas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido^[4]. As nanopartículas poliméricas são empregadas como veículos de fármacos^[5], proteínas e antigênicos^[6] para administração injetável^[7], oral^[8], tópico^[9], sistemas bioadesivos, e como o principal componente de sistemas de liberação controlada na forma de implantes^[10].

Os polímeros biodegradáveis empregados na produção de nanopartículas poliméricas por polimerização de monômeros são copolímeros do ácido metacrílico e de éster acrílico ou metacrílico^[11]. A composição polimérica (hidrofobicidade, carga superficial, perfil de degradação) e do princípio ativo encapsulado (massa molar, carga, localização na nanosfera, absorção ou incorporação) influenciam na biodisponibilidade^[1], sendo a degradação polimérica realizada por esterases e dependente do comprimento da cadeia alquil do polímero^[12]. As vantagens deste veículo é promover a liberação controlada, e devido seu tamanho é capaz de penetrar em pequenos capilares a alcançar as células

promovendo direcionamento específico por um período de dias ou semanas no caso da forma farmacêutica endovenosa^[13].

Preparação a partir da Polimerização de Monômeros

Na preparação de nanopartículas biodegradáveis com base em reações de polimerização utiliza-se como monômeros os cianoacrilatos de alquilo, que formam polímeros denominados polialquilcianoacrilatos (PACA)^[5].

A reação de polimerização dos cianoacrilatos de alquilo ocorre em três fases, iniciando-se pela nucleação, que consiste na ativação do monômero e geração de carbânions reativos, seguindo-se a fase de propagação ou crescimento do polímero e, por fim, o término da reação^[13]. A nucleação pode ocorrer na presença de qualquer um dos íons OH⁻, CH₃O⁻ ou CH₃COO⁻, que desencadeia um mecanismo denominado polimerização aniônica^[1]. A Figura 1 apresenta, esquematicamente, a reação de polimerização de cianoacrilatos de alquilo iniciada pelo íon OH⁻^[14]. A reação ocorre espontaneamente devido ao tipo de substituição eletrofílica do átomo de carbono em posição β na dupla ligação. O iniciador desencadeia um ataque nucleofílico ao carbono α do monômero cianoacrilato (1). Uma vez ativado o monômero, com formação

de um carbânio (2), segue-se a fase de propagação, em que este último reage com outros monômeros, resultando oligômeros ativados, capazes de continuar indefinidamente o crescimento do polímero, aumentando, em consequência, a sua massa molar (3). A polimerização continua até a cadeia reativa atacar uma espécie incapaz de reagir com outra molécula monomérica (4), atingindo-se, então, o termo da reação. Um inibidor da reação de polimerização pode ser um próton presente em meio ácido, que, ao reagir com a cadeia polimérica, neutraliza a carga negativa^[15]. A presença de SO₂ reduz a velocidade de polimerização por acidificar o meio, permitindo obter nanopartículas de menores dimensões^[5]. As nanopartículas de PACA são preparadas no seio de emulsões, obtendo-se nanosferas ou nanocápsulas, conforme a natureza da fase interna da emulsão.

Nanosferas

A preparação de nanosferas de PACA processa-se no seio de emulsões do tipo O/A e encontra-se apresentada, esquematicamente, na Figura 2. A fase interna da emulsão é formada por gotículas de monômeros insolúveis em água (1), que são emulsificadas numa solução aquosa ácida (pH 1,0-3,5), contendo um tensoativo (2). Para acidificar a fase aquosa podem utilizar-se os ácidos cítrico, fosfórico, sulfúrico, perclórico ou clorídrico^[17]. Uma vez emulsificada a fase interna na fase externa, as gotículas monoméricas são estabilizadas pelas moléculas do tensoativo (1), formando-se reservatórios, a partir dos quais ocorre a difusão de monômeros para a fase externa

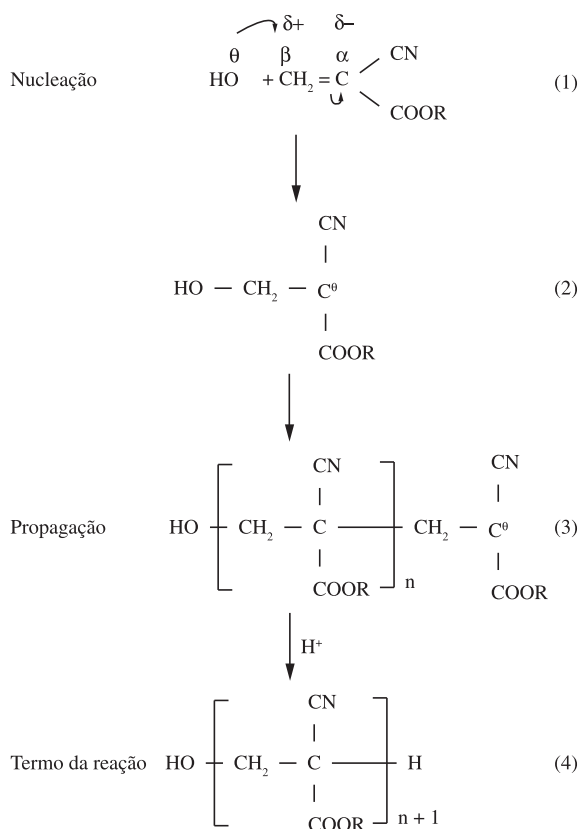


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de polimerização aniônica de cianoacrilatos de alquilo. (Adaptado de Soppimath et al., 2001^[16]). 1) Ataque nucleófilo ao carbono α do monômero cianoacrilato de alquilo; 2) carbânio reativo; 3) cadeia oligomérica em crescimento; 4) termo da reação. R – cadeia alquílica; n – número de monômeros.

aquosa (2). As moléculas do tensoativo em excesso podem também organizar-se sob a forma de micelas (3)^[18].

Os locais de ativação dos monômeros determinam o mecanismo de crescimento da partícula, que pode ocorrer por nucleação micelar ou por nucleação homogênea. A polimerização ocorre por nucleação micelar quando o carbânio gerado na fase externa aquosa não é suficientemente solúvel nessa fase, iniciando-se a reação no interior das micelas do tensoativo (4) ou, em alternativa, à superfície destas. Em ambos os casos, a polimerização continua no interior das micelas (6). À medida que ocorre a difusão dos monômeros das gotículas emulsificadas (1) para o interior das micelas (6), o polímero cresce, dando origem a nanosferas (7). A polimerização ocorre por nucleação homogênea quando o carbânio gerado na fase externa aquosa é suficientemente solúvel nessa fase. Neste caso, o oligômero formado torna-se insolúvel e precipita na fase externa, dando origem às nanosferas primárias, que são estabilizadas por moléculas do agente tensoativo provenientes das micelas. As nanosferas finais resultam do crescimento das nanosferas primárias, devido à captura de novos oligômeros ou à fusão de várias nanosferas primárias. No final da reação, são obtidas nanosferas com um número elevado de cadeias poliméricas (7).

O princípio ativo incorporado nas nanosferas de PACA pode ser adicionado à emulsão O/A antes ou após o início da reação de polimerização. No primeiro caso, em regra, o princípio ativo fica incorporado nas nanosferas, no segundo caso, fica adsorvido à sua superfície. O tensoativo é responsável por evitar a coalescência das gotículas da fase interna, uma vez que estabiliza a emulsão. Em regra, são utilizados tensoativos não iônicos, como, por exemplo, poloxâmeros, polisorbatos ou Triton X-100; ou estabilizantes estereoisoméricos, como o dextrano^[19].

Após a reação de polimerização, a dispersão aquosa de nanosferas, que apresenta um pH ácido, é neutralizada com uma solução aquosa de NaOH até um valor de pH entre 5,5 e 7. Em seguida, as nanosferas são separadas por filtração, centrifugação ou ultracentrifugação^[18]. No final, são lavadas com água deionizada e liofilizadas^[20,21].

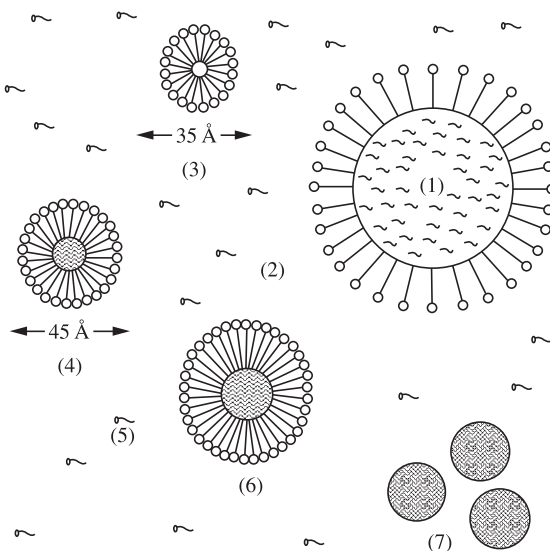


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de polimerização no meio de uma emulsão O/A. 1) Gotícula de monômeros estabilizada por moléculas de agente tensoativo (diâmetro cerca de 1 µm); 2) fase aquosa externa; 3) micela de tensoativo; 4) micela de tensoativo contendo monômeros; 5) molécula de tensoativo; 6) crescimento da cadeia polimérica na micela do tensoativo; 7) nanopartículas poliméricas recém-formadas.

As características físico-químicas das nanosferas obtidas por reações de polimerização de cianoacrilatos de alquilo são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem a solubilidade do princípio ativo, o volume e pH do meio de polimerização, a massa molar e concentração do monômero e a natureza e concentração do agente tensoativo^[22].

Solubilidade do princípio ativo

Como se referiu anteriormente, o princípio ativo pode ser adicionado à emulsão O/A antes ou após a reação de polimerização. Uma vez que, no primeiro caso, o princípio ativo fica incorporado nas nanosferas, obtém-se uma capacidade de carregamento elevadas. No segundo caso, a quantidade de princípio ativo adsorvido às nanosferas aumenta com o aumento do intervalo de tempo decorrido entre o início da reação de polimerização e o momento da adição do princípio ativo^[23].

No caso dos princípios ativos hidrofílicos, a sua incorporação em nanosferas de PACA é, com frequência, reduzida, sendo preferível recorrer-se à sua adsorção. No caso dos princípios ativos lipofílicos, a sua presença no meio de polimerização, antes da adição do monômero, permite obter uma capacidade de carga elevada^[24]. Para aumentar a incorporação dos princípios ativos com hidrossolubilidade reduzida pode recorrer-se ao uso de ciclodextrinas, cujos complexos aumentam a concentração do princípio ativo no meio de polimerização e o número de locais hidrófobos na estrutura da nanosfera^[25].

O princípio ativo veiculado nas nanosferas pode envolver-se na reação de polimerização, ficando, por isso, quimicamente ligada ao polímero. No entanto, o estabelecimento de ligações entre o princípio ativo e a rede polimérica poderá conduzir à sua inativação. Quando o princípio ativo é adicionada após a reação, não está presente durante a formação das nanosferas, pelo que não influencia as propriedades físico-químicas destas últimas. O aumento da concentração do princípio ativo no meio de polimerização aumenta, quer o tamanho das nanosferas, quer a sua capacidade de carga. No entanto, um excesso de princípio ativo pode instabilizar a emulsão O/A e a quantidade de polímero recém-formado pode ser insuficiente para aprisionar todo princípio ativo. É de notar ainda que, se o princípio ativo for um sal, a sua ionização em meio aquoso pode também induzir a reação de polimerização, originando polímeros com massa molar mais elevada^[23].

Proporção de fase e pH do meio de polimerização

O aumento da proporção de fase do meio de polimerização origina nanosferas com capacidade de carga mais elevada, uma vez que é formado um maior número de núcleos de polimerização, resultando também um aumento da eficiência de encapsulação. O aumento do pH do meio de polimerização é acompanhado pelo aumento do tamanho das nanosferas. Com efeito, uma elevada concentração em íons hidroxilas aumenta a velocidade de iniciação da reação. No entanto, a um valor de pH superior a 4, a velocidade da reação não é controlada, originando polímeros mais amorfos e nanosferas de maiores dimensões. O abaixamento do pH do meio de polimerização origina polímeros com massa molar menor, uma vez que, na presença de íons H⁺, a velocidade de termo da reação é elevada. Com efeito, a duração da reação de polimerização é menor em meios de pH baixo, formando-se apenas cadeias oligoméricas. Em meios de pH mais elevado, a duração da reação de polimerização é maior, resultando cadeias poliméricas maiores^[26].

Massa molar e concentração do monômero

Os monômeros de cadeia alifática mais longa, isto é, de maior massa molar, estão associados a uma eficiência de encapsulação maior. Em regra, o aumento da concentração do monômero no meio de polimerização aumenta a eficiência de encapsulação

e a capacidade de carga das nanosferas e diminui o número de nanosferas formadas, já que conduz ao aumento do seu tamanho^[27].

Natureza e concentração do tensoativo

A natureza do tensoativo parece influenciar a massa molar do polímero formado. Os tensoativos aniônicos ionizam-se em meio aquoso, cedendo os seus cátions, pelo que a polimerização das cadeias termina mais cedo, originando polímeros com menor massa molar. Pelo contrário, os tensoativos não iônicos formam um número maior de núcleos de polimerização, originando um aumento da eficiência de encapsulação e da capacidade de carga das nanosferas^[27]. A partir das reações de polimerização de cianoacrilatos de alquilo, são obtidas nanosferas de dimensões de cerca de 200 nm, embora possam ser reduzidas para 30 nm, através do aumento da concentração do tensoativo.

Nanocápsulas

Com vista a aumentar a incorporação de princípios ativos lipofílicos, as nanocápsulas de PACA foram preparadas no seio de emulsões do tipo O/A. Como a reação de polimerização dos monômeros cianoacrilato de alquilo ocorre na interface O/A da emulsão, o mecanismo denomina-se polimerização interfacial^[28]. O método consiste na dissolução dos monômeros num solvente orgânico polar – como, por exemplo, etanol, *n*-butanol, isopropanol, acetonitrilo ou acetona –, juntamente com o princípio ativo e um óleo – como o Miglyol® 812 ou 840^[27]. A solução límpida obtida é injetada lentamente, sob agitação, numa fase aquosa que contém um tensoativo do tipo O/A – como, por exemplo, o poloxâmero 188 ou o polysorbato 80. Em contato com a água, o óleo insolubiliza-se, formando uma dispersão coloidal, e o solvente orgânico polar difunde-se para a fase externa aquosa. Os monômeros orientam-se segundo a sua polaridade na interface O/A, desencadeando-se a polimerização aniônica à superfície das gotículas de óleo, o que conduz à formação da parede das nanocápsulas^[29].

Gasco et al., 1991^[30] preparou, por polimerização interfacial em emulsões e em microemulsões invertidas (A/O), nanocápsulas com núcleo aquoso para incorporar princípios ativos hidrofílicos. Neste caso, a fase aquosa contendo o princípio ativo é emulsificada num óleo que contém um tensoativo do tipo A/O – como, por exemplo, um éster do sorbitano. Em seguida, é adicionada uma solução orgânica de monômeros ao sistema recém-preparado. A reação de polimerização ocorre na interface A/O, dando origem à parede das nanocápsulas. A vantagem das nanocápsulas de núcleo aquoso diz respeito ao fato do princípio ativo não se encontrar apenas adsorvido, mas sim incorporado, permitindo uma melhor proteção após a administração *in vivo*. Em qualquer um dos casos, o solvente orgânico é evaporado a pressão reduzida e as nanocápsulas são separadas por centrifugação ou por ultracentrifugação e lavadas com água deionizada^[29].

As características físico-químicas das nanocápsulas obtidas a partir de reações de polimerização de cianoacrilatos de alquilo em emulsões do tipo O/A são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem a solubilidade do princípio ativo, o pH do meio de polimerização, a natureza e o volume do óleo, a natureza do solvente orgânico e a concentração do tensoativo.

Solubilidade do princípio ativo

A preparação de nanocápsulas por polimerização interfacial é particularmente adaptada para veiculação dos princípios ativos lipossolúveis, ocorrendo no seio de emulsões do tipo O/A. A capacidade de carga e a eficiência de encapsulação das nanocápsulas são maiores, quanto maior for a solubilidade do princípio ativo no óleo^[31].

No caso de princípios ativos hidrossolúveis, a eficiência de encapsulação é menor, uma vez que estes sofrem difusão para a fase externa aquosa. Como se referiu anteriormente, para este tipo de princípios ativos, torna-se mais adequada a preparação de nanocápsulas de núcleo aquoso, no seio de emulsões do tipo A/O^[32].

pH do meio de polimerização

Em regra, o diâmetro médio das nanocápsulas de PACA obtidas por polimerização interfacial está compreendido entre 200 e 300 nm, dependendo das condições de preparação^[33]. No entanto, este parâmetro é afetado de um modo significativo pelo pH do meio de polimerização. Para valores inferiores a 4, a dispersão obtida apresenta uma distribuição mais heterogênea de tamanhos, pelo que a fase aquosa deverá possuir, preferencialmente, um pH compreendido entre 4 e 10. O pH do meio influencia igualmente a velocidade da reação de polimerização, que, por sua vez, determina a massa molar do polímero formado. Para baixos valores de pH, a velocidade da reação é elevada. Neste caso, o contato entre as moléculas de monômero e de iniciador da polimerização é instantâneo, formando-se vários núcleos de polimerização e resultando muitas cadeias poliméricas de baixa massa molar. Para valores de pH elevados, a velocidade da reação é lenta, resultando cadeias poliméricas de massa molar elevada^[34].

Fase lipofílica e sua proporção

A natureza da fase lipofílica afeta as dimensões das nanocápsulas. Os óleos que apresentam alguma hidrofília são dispersos mais facilmente na fase externa aquosa do que os óleos totalmente hidrofóbicos. Desta forma, as gotículas emulsificadas apresentam menores dimensões, originando nanocápsulas também menores. No que se refere ao volume do óleo, o seu aumento conduz a maior eficiência de encapsulação de substâncias lipossolúveis e ao aumento do número de nanocápsulas formadas, não tendo um efeito significativo nas suas dimensões^[35].

Natureza do solvente orgânico

Para preparar nanocápsulas é conveniente recorrer a solventes apróticos (acetona e acetonitrila) em vez de solventes próticos (etanol, *n*-butanol e isopropanol), já que os primeiros favorecem a ocorrência da polimerização interfacial, devido ao fato da reação ter início na fase aquosa. Pelo contrário, os solventes próticos podem iniciar a reação de polimerização na fase orgânica, devido a um certo carácter nucleofílico desses solventes. Nesse caso, a formação de nanocápsulas resulta, principalmente, da precipitação do polímero recém-formado na interface em vez de ocorrer uma reação de polimerização interfacial, característica dos cianoacrilatos de alquila. Adicionalmente, os solventes apróticos permitem obter nanocápsulas com uma distribuição mais homogênea de tamanhos^[36].

Concentração do agente tensoativo

Dentro de certos limites, o aumento da concentração do agente tensoativo presente na fase aquosa, conduz à redução das dimensões das nanocápsulas obtidas, devido à redução do tamanho das gotículas emulsificadas onde ocorre a polimerização interfacial. Verifica-se também um aumento da eficiência de encapsulação e da capacidade de carga, devido ao aumento do número de gotículas emulsificadas^[35].

Conclusão

O uso de polímeros biodegradáveis na produção de nanopartículas é uma aplicação consolidada na área médica e farmacêutica. A preparação de nanosferas e nanocápsulas por polimerização de monômeros é possível a incorporação de princípios ativos,

hidrofílicos ou hidrofóbicos, e macromoléculas como proteínas e peptídeos. Essa abordagem deve ser sempre considerada como uma opção para aplicações de liberação controlada e direcionamento específico de fármacos e por várias vias de administração, promovendo as vantagens de proteção do princípio ativo, melhor biodisponibilidade e menor toxicidade; proporcionando maior conforto e adesão dos pacientes ao tratamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) do Ministério da Ciência e Tecnologia (PTDC/SAU-FAR/113100/2009), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/Brasil) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, Brasil).

Referências Bibliográficas

- Nicolas, J. & Couvreur, P. - Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., **1**, p.111 (2009). PMID:20049783. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.15>
- Severino, P.; Santana, M.H.; Pinho, S.C. & Souto, E.B. - Polímeros, in press (2011).
- Araújo, J.; Veja, V.; Lopes, C. M.; Egea, M. A.; García, M. L. & Souto, E. B. - Colloid Surf. B Biointerfaces, **72**, p.48 (2009).
- Schaffazick, S. R.; Stanisçuaski, S. G.; Freitas, L. L. & Pohlmann, A. R. - Quím. Nova, **26**, p. 726 (2003). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>
- Liu, H. & Chen, J. - J. Pharm. Sci. Technol., **63**, p. 207 (2009).
- Garg, N. K.; Mangal, S.; Khambete, H.; Sharma, P. K. & Tyagi, R. K. - Recent Pat. Drug Deliv. Formul., **4**, p.114 (2010).
- Liu, D.; Wang, L.; Liu, Z.; Zhang, C. & Zhang, N. - J. Biomed. Nanotechnol., **6**, p.675 (2010). <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2010.1160>
- Chellampillai, B. & Pawar, A. P. - Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., **35**, p.123 (2011). <http://dx.doi.org/10.1007/s13318-010-0016-7>
- Zhang, W.; Gao, J.; Zhu, Q.; Zhang, M.; Ding, X.; Wang, X.; Hou, X.; Fan, W.; Ding, B.; Wu, X. & Gao, S. - Int. J. Pharm., **402**, p.205 (2010). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.037>
- Anancharungsuk, W.; Polpanich, D.; Jangpatarapongsa, K. & Tangboriboonrat, P. - Colloids Surf. B Biointerfaces, **78**, p.328 (2010). PMID:20392612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.025>
- Scheler, S.; Kitzan, M. & Fahr, A. - Int. J. Pharm., **403**, p.207 (2011). PMID:20969936. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.019>
- Vauthier, C.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H. & Couvreur, P. - Adv. Drug Deliv. Rev., **55**, p.519 (2003). [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00041-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00041-3)
- Andrieux, K. & Couvreur P. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., **1**, p.463 (2009). PMID:20049811. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.5>
- Souto, E. B. - “Aspectos tecnológicos da preparação de micro e nanopartículas biodegradáveis”, in: Anais do Seminário do 4º Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto (2003).
- Graf, A.; McDowell, A. & Rades, T. - Expert Opinion on Drug Deliv., **6**, p.371 (2009). PMID:19382881. <http://dx.doi.org/10.1517/17425240902870413>
- Soppimath, K.; Kulkarni, A. & Aminabhavi, T. - J. Control. Release, **75**, p.331 (2001). [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00404-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00404-7)
- Arias, J. L.; Ruiz, M. A.; Lopez-Viata, M. & Delgado, A. V. - Colloids Surf. B Biointerfaces, **62**, p.64 (2008). PMID:17961994. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.018>

18. Bootz, A.; Vogel, V.; Schubert, D. & Kreuter, J. – *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, p.369 (2004). [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00193-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00193-0)
19. Raynaud, J.; Choquet, B.; Marie, E.; Dellacherie, E.; Nouvel, C.; Six, J. L. & Durand, A. - *Biomacromolecules*, **8**, p.1014 (2008). PMID:18271550. <http://dx.doi.org/10.1021/bm701101n>
20. Wu, M.; Dellacherie, E.; Durand, A. & Marie, E. - *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **69**, p.141 (2009). PMID:19147334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.12.010>
21. Wu, M.; Dellacherie, E.; Durand, A. & Marie, E. - *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **69**, p.147 (2009). PMID:19027270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.10.003>
22. Alonso, M.; Sanchez, A.; Torres, D.; Seijo, B. & Vila-Jato, J. J. *Microencapsul.*, **7**, p.517 (1990). PMID:1702468. <http://dx.doi.org/10.3109/02652049009040475>
23. Hammady, T.; Rabanel, J. M.; Dhanikula, R. S.; Leclair, G. & Hildgen, P. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, p.418 (2009). PMID:19462478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.01.007>
24. Stella, B.; Arpicco, S.; Rocco, F.; Marsaud, V.; Renoir, J. M.; Cattel, L. & Couvreur, P. – *Int. J. Pharm.*, **344**, p.71 (2007). PMID:17651931. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.006>
25. Duchene, D.; Ponchel, G. & Wouessidjewe D. – *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **36**, p.29 (1999).
26. Makhlof, A.; Tozuka, Y. & Takeuchi, H. – *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, p.1 (2009). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.013>
27. Bernardy, N.; Romio, A. P.; Barcelos, E. I.; Dal Pizzol, C.; Dora, C. L.; Lemos-Senna, E.; Araujo, P. H. & Sayer, C. – *J. Biomed. Nanotechnol.*, **6**, p.181 (2010). PMID:20738073. <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2010.1107>
28. Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H. & Elaissari, A. – *Int. J. Pharm.*, **385**, p.113 (2010). PMID:19825408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
29. Watanasirichaikul, S.; Rades, T.; Tucker, I. G. & Davies, N. M. – *Int. J. Pharm.*, **235**, p.237 (2002). [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00002-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00002-9)
30. Gasco, M. R.; Morel, S.; Trotta, M. & Viano, I. – *Pharm. Acta Helv.*, **66**, p.47 (1991).
31. Weiss-Angeli, V.; Bourgeois, S.; Pelletier, J.; Guterres, S. S.; Fessi, H. & Bolzinger, M. A. – *J. Pharm. Pharmacol.*, **62**(1), p.35 (2010).
32. Pitaksuteepong, T.; Davies, N. M.; Tucker, I. G. & Rades, T. – *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **53**, p.335 (2002). [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00245-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00245-4)
33. Fontana, M. C.; Coradini, K.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. & Beck, R. C. - *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **10**, p.3091 (2010).
34. Marchiori, M. L.; Lubini, G.; Dalla Nora, G.; Friedrich, R. B.; Fontana, M. C.; Ourique, A. F.; Bastos, M. O.; Rigo, L. A.; Silva, C. B.; Tedesco, S. B. & Beck, R. C. - *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **36**, p.962 (2010). PMID:20590450. <http://dx.doi.org/10.3109/03639041003598960>
35. Khoei, S. & Hossainzadeh, M. T. - *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **75**, p.133 (2010). PMID:19740631. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.08.021>
36. Moinard-Checot, D.; Chevalier, Y.; Briancon, S.; Beney, L. & Fessi, H. – *J. Colloid Interface Sci.*, **317**, 458 (2008).

Enviado: 16/04/11

Aceito: 09/06/11