



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - CAMPUS DIADEMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA PAULA MACEDO DE VASCONCELOS

PLATAFORMA DE CARREADORES LIPÍDICOS PARA VEICULAÇÃO DE
BIOATIVOS EM FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS: DESENVOLVIMENTO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA VEICULAÇÃO EM PÓS E CÁPSULAS

DIADEMA – SP

2021

ANA PAULA MACEDO DE VASCONCELOS

PLATAFORMA DE CARREADORES LIPÍDICOS PARA VEICULAÇÃO DE
BIOATIVOS EM FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS: DESENVOLVIMENTO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA VEICULAÇÃO EM PÓS E CÁPSULAS

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Newton Andréo Filho

DIADEMA – SP

2021

ANA PAULA MACEDO DE VASCONCELOS

PLATAFORMA DE CARREADORES LIPÍDICOS PARA VEICULAÇÃO DE
BIOATIVOS EM FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS: DESENVOLVIMENTO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA VEICULAÇÃO EM PÓS E CÁPSULAS

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Aprovado em:

Prof. Dr. Marcelo Dutra Duque

Prof^a. Dra. Michele Georges Issa

Prof^a. Dra. Samanta Cardoso Mourão

Vasconcelos, Ana Paula

Plataforma de carreadores lipídicos para veiculação de bioativos em formas farmacêuticas sólidas: desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para veiculação em pós e cápsulas / Ana Paula Macedo de Vasconcelos – Diadema, 2021.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Lipid carrier platform for the delivery of bioactives in solid pharmaceutical forms: development of lipid nanoparticles for delivery in powders and capsules.

1.Carreadores lipídicos 2.Nanopartículas lipídicas 3.Nanoencapsulação de fármacos
4.Veiculação de bioativos 5.DoE de formulação e processo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me guiou ao longo de toda vida.
Aos meus pais, Rosângela e Evaldo, que são meu alicerce e a quem devo tudo.
E, por fim, minha família e amigos pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de São Paulo pelo suporte educacional no mestrado e graduação.

Aos laboratórios de Pré-formulação e NILE (Nanotechnology Innovation Laboratory Enterprise) pela utilização dos equipamentos e suporte técnico.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Newton Andréo Filho pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela orientação do mestrado, mas principalmente pelo exemplo de ser humano.

Aos professores Dra. Michele George Isa e Dr. Marcelo Dutra Duque, pelo apoio durante todo mestrado e pelo exemplo de profissionais.

À mestranda Lilian Rosário da Silva Mantonheri, pelo apoio e suporte técnico na realização dos experimentos.

Aos Farmacotécnicos e Pesquisadores Claudia Bueno, Mariana Oliveira, Margarete Moreno de Araujo, Brian Dutra e Ronaldo Adriano Timm pelo carinho e suporte técnico.

*O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende com a vida e com os humildes.*

Cora Coralina

RESUMO

A nanotecnologia é definida pela *National Science Foundation – NSF*, agência americana dedicada ao progresso da ciência, como sendo o desenvolvimento de pesquisa e tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular. Em termos gerais, as nanopartículas são estruturas coloidais, que apresentam dimensões compreendidas entre 0,1 e 1000 nm. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma plataforma de nanocarreadores lipídicos para veiculação de bioativos. Inicialmente realizou-se uma revisão bibliográfica para conhecer as possibilidades de nanoestruturas lipídicas, formulação e processo, suas vantagens e dificuldades. Para escolha da formulação e processo foram realizados DoE (Design of experiments) por planejamento estatístico fatorial do tipo 2^3 adicionados três pontos centrais considerando dois níveis e três fatores. Foram avaliados a porcentagem total de tensoativos (%TA - 4% e 8%), proporção de lauril sulfato de sódio (LSS) na mistura de tensoativos (%LSS → TA - 0% e 10%) e porcentagem de fase oleosa (%FO - 10% e 20%) assim como tempo (5 e 15 minutos), pressão (5000 psi e 15000 psi) e temperatura (30°C e 70°C), resultando na escolha de 8% de tensoativos (%TA), sem adição de lauril sulfato de sódio (0% para %LSS) e 10 % de fase oleosa (%FO) e cerca de 12.500 psi, temperatura de 70°C, durante 15 minutos de processamento. Por fim as nanopartículas foram incorporadas aos diluentes amido pré-gelatinizado, celulose microcristalina 102 e celulose microcristalina 200 e caracterizadas através umidade, do tamanho de partículas, Potencial Zeta, Difração a Laser (SLS) e Recuperação. A umidade de todas as amostras foi abaixo de 5,0%. Considerando os valores encontrados no teste de recuperação do Oil Red todas amostras demonstraram resultados adequados, com foco nas amostras de proporção 5:5. O teste de recuperação demonstrou melhores resultados para o diluente MCC200. A partir dos resultados de caracterização, foi escolhida a proporção de DLT:NL de 5:5 de Celulose microcristalina PH200 como possível insumo carreador de nanopartículas lipídicas para veiculação em formas sólidas de uso oral como pós e cápsula.

Palavras chaves: carreadores lipídicos, nanopartículas lipídicas, nanoencapsulação de fármacos, veiculação de bioativos, DoE de formulação e processo.

ABSTRACT

Nanotechnology is defined by the National Science Foundation – NSF, an American agency dedicated to the progress of science, as the development of research and technology at the atomic, molecular or macromolecular levels. In general terms, nanoparticles are colloidal structures, which have dimensions between 0.1 and 1000 nm. The objective of this work was to develop a lipid nanocarrier platform for the delivery of bioactives. Initially, a bibliographical review was carried out to know the possibilities of lipid nanostructures, formulation and process, their advantages and difficulties. To choose the formulation and process, DoE (Design of Experiments) was carried out by factorial statistical planning of type 2^3 , adding three central points considering two levels and three factors. The total percentage of surfactants (%TA - 4% and 8%), proportion of sodium lauryl sulfate (LSS) in the surfactant mixture (%LSS → TA - 0% and 10%) and percentage of oil phase (%) were evaluated FO - 10% and 20%) as well as time (5 and 15 minutes), pressure (5000 psi and 15000 psi) and temperature (30°C and 70°C), resulting in the choice of 8% surfactants (%TA), without addition of sodium lauryl sulfate (0% to %LSS) and 10% oil phase (%FO) and about 12,500 psi, temperature 70°C, during 15 minutes of processing. Finally, the nanoparticles were incorporated into the diluents pregelatinized starch, microcrystalline cellulose 102 and microcrystalline cellulose 200 and characterized by moisture, particle size, Zeta Potential, Laser Diffraction (SLS) and Recovery. The moisture of all samples was below 5.0%. Considering the values found in the Oil Red recovery test, all samples showed adequate results, with a focus on samples with a 5:5 ratio. Recovery testing showed better results for the MCC200 diluent. From the characterization results, the DLT:NL ratio of 5:5 of Microcrystalline Cellulose PH200 was chosen as a possible carrier input for lipid nanoparticles for delivery in solid forms for oral use such as powders and capsules.

Key words: lipid carriers, lipid nanoparticles, drug nanoencapsulation, bioactives delivery, formulation and process DoE.

PREÂMBULO

A utilização de sistemas nanoestruturados possibilita inúmeros benefícios, como aumento da eficácia terapêutica, direcionamento para receptores e alvos específicos, diminuição da dose terapêutica, liberação progressiva e controlada e controle da toxicidade de alguns fármacos. Considerando as inúmeras vantagens dos sistemas nanoestruturados, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma plataforma de carreadores lipídicos nanoestruturados para veiculação de bioativos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral. A revisão bibliográfica e as atividades realizadas, incluindo as metodologias propostas, experimentos realizados, resultados e discussão, estão divididas em 2 capítulos. O capítulo 1 aborda uma revisão bibliográfica sobre nanoestruturas e nanopartículas lipídicas, suas vantagens em comparação aos demais nanocarreadores, possibilidades de formulação e processo de obtenção. O capítulo 2 discorre sobre a seleção quantitativa dos excipientes da formulação, assim como a utilização da homogeneização de alta pressão como método de obtenção das nanopartículas lipídicas, os melhores parâmetros de processo e adição e caracterização das nanopartículas à excipientes diluentes. Inicialmente foram realizados ensaios projetados em DoE (*Design of experiments*) e análise estatística com significância maior de 95%. Foram avaliados a porcentagem total de tensoativos (%TA - 4% e 8%), proporção de lauril sulfato de sódio (LSS) na mistura de tensoativos (%LSS → TA - 0% e 10%) e porcentagem de fase oleosa (%FO - 10% e 20%) assim como tempo (5 e 15 minutos), pressão (5000 psi e 15000 psi) e temperatura (30°C e 70°C), resultando na escolha de 8% de tensoativos (%TA), sem adição de lauril sulfato de sódio (0% para %LSS) e 10 % de fase oleosa (%FO) e cerca de 12.500 psi, temperatura de 70°C, durante 15 minutos de processamento. Por fim, as nanopartículas foram incorporadas à diluentes e caracterizados através do teste de pH, umidade, UV-Vis, Difração a laser (Cilas) e Espalhamento dinâmico de luz (Liticizer) e Zeta potencial (Liticizer). A partir dos resultados de caracterização, foi escolhida a proporção de DLT:NL de 5:5 de MCC200 demonstrando que foi possível preparar uma plataforma de carreadores lipídicos para veiculação de bioativos e adicioná-las a demais excipientes para veiculação em pós e cápsula.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Sistemas nanoestruturados e carreadores lipídicos.....	15
Resumo.....	16
1. Introdução.....	17
2. Revisão bibliográfica.....	19
2.1. Nanotecnologia na saúde.....	19
2.2. Nanotecnologia farmacêutica.....	19
2.3. Nanopartículas Lipídicas.....	21
2.3.1. Estrutura da NL.....	22
2.3.2. Método de preparação.....	23
2.3.2.1. Formulação.....	23
2.3.2.1.1. Lipídeos.....	24
2.3.2.1.2. Tensoativos.....	26
2.3.2.2. Processo de obtenção das nanopartículas.....	27
2.4 Homogeneização de alta pressão (HAP).....	29
2.5 Liofilização.....	30
2.5.1. O processo de liofilização.....	30
2.6. Caracterização NL.....	32
2.7. Estabilidade e condições de armazenamento.....	33
2.8. Aplicação terapêutica.....	33
2.9. Regulamentação dos nanomedicamentos.....	34
3. Considerações finais.....	35
4. Referências.....	37

Capítulo 2 – Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para veiculação em formas farmacêuticas sólidas: aplicação de DoE para variáveis de formulação e processo.....	44
Resumo.....	45
1. Introdução.....	46
2. Objetivo.....	46
2.1. Objetivo geral.....	48
2.2. Objetivos específicos.....	48
3. Materiais e métodos.....	49
3.1. Materiais.....	49
3.2. Equipamentos.....	49
3.3. Definição das variáveis independentes para proposição dos DoEs de formulação e processo.....	50
3.4. DoE para variáveis de formulação e processo na obtenção de nanopartículas lipídicas.....	53
3.5. Processo de obtenção das nanopartículas lipídicas.....	57
3.6. Caracterização das dispersões de nanopartículas lipídicas.....	59
3.6.1. Descrição dos aspectos físicos.....	59
3.6.2. Análise de pH.....	59
3.6.3. Tamanho de partícula.....	60
3.6.4. Estabilidade das formulações de dispersão de nanopartículas.....	61
3.7. Preparo da Curva Analítica de Oil Red.....	61
3.8. Definição do solvente para extração do OR das nanopartículas lipídicas...	62
3.9. Preparação das Nanopartículas lipídicas contendo OR (NL-OR).....	62
3.10. Caracterização das dispersões de nanopartículas NL-OR e NL-BR.....	63
3.10.1. Difração a laser.....	63
3.10.2. Espalhamento dinâmico de luz.....	63
3.10.3. Zeta potencial.....	63
3.10.4. Teor de OR.....	64
3.11. Incorporação das dispersões de NL em diluentes em pó para preparação de formas farmacêuticas sólidas.....	64
3.12. Caracterização das amostras liofilizadas de NL incorporadas em diluentes em pó.....	65

3.12.1. Umidade relativa.....	65
3.12.2. Liberação de nanopartículas.....	65
3.12.3. Teor de OR nas dispersões em pó de NL.....	66
4. Resultados e discussão.....	66
4.1. Análise de pH e aspectos físicos.....	67
4.2. Análise de tamanho e uniformidade.....	69
4.3. Superfície de resposta a partir dos DoEs de formulação e processo.....	75
4.4. Otimização de experimento a partir de estudos utilizando DoE de formulação e processo para obtenção de dispersões de nanopartículas lipídicas.....	86
4.5. Curva analítica de Oil Red (OR).....	90
4.6. Escolha do solvente para solubilização das nanopartículas lipídicas.....	92
4.7. Caracterização das formulações de NL com e sem OR a partir dos estudos de otimização de formulações e de processo.....	93
4.8. Incorporação das dispersões de NL nos diluentes para formas farmacêuticas sólidas.....	97
4.8.1. Análise das dispersões de NP nos diluentes através da microscopia eletrônica de varredura.....	98
4.8.2. Análise de umidade das dispersões de NP em diluentes.....	100
4.9. Análise do teor nas amostras DLT : NP.....	101
4.10. Avaliação da capacidade de dessorção (liberação) das NL a partir das misturas de NL-OR e NL-BR.....	105
5. Conclusão.....	108
6.Referências.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Escala comparativa entre dimensões atômica, nanométrica, microscópica e macroscópica. Fonte: Próprio autor.

Figura 1.2. Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica. Fonte: Próprio autor.

Figura 1.3. Composição e organização das nanopartículas lipídicas (NLs). Fonte: Próprio autor.

Figura 1.4. Estrutura molecular do triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico. Fonte: tesesusp.net

Figura 1.5. Estrutura molecular do behenato de glicerilo (compritol). Fonte: chemicalbook.net

Figura 1.6. Estrutura molecular do polissorbato 80. Fonte: researchgate.net

Figura 1.7. Estrutura molecular do poloxamer 188. Fonte: researchgate.net

Figura 1.8. Ilustração esquemática de um típico ciclo de liofilização. A linha sólida representa o curso de temperatura e a linha tracejada representa o curso de pressão durante os diferentes estágios de um processo de liofilização: 1) congelamento, 2) secagem primária e 3) secagem secundária. Fonte: Adaptado de KASPER, J, 2012

Figura 2.1. DoE de formulação representando o *experimental space* para o estudo. Fonte: próprio autor.

Figura 2.2. DoE de processo representando o *experimental space* para o estudo. Fonte: próprio autor.

Figura 2.3. Ilustração esquemática do homogeneizador de alta pressão (Nano DeBEE) e do processo de homogeneização por alta pressão. Fonte: Adaptado de Nano DeBEE Laboratory Homogenizer - HTSS.

Figura 2.4. Ilustração esquemática do processo de obtenção da formulação emulsionada para posterior preparação do sistema nanoparticulado. Fonte: próprio autor.

Figura 2.5. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de formulação na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo zero dia. %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

Figura 2.6. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de formulação na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo 1 dia. %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

Figura 2.7. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de formulação na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo 7 dias. %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

Figura 2.8. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de processo na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo zero dia. Tempo: tempo de processamento em homogeneizador de alta pressão; Pressão: pressão imposta na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão; Temperatura: temperatura em que as dispersões de nanopartículas foram mantidas no homogeneizador de alta pressão.

Figura 2.9. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de processo na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo um dia. Tempo: tempo de processamento em homogeneizador de alta pressão; Pressão: pressão imposta na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão; Temperatura: temperatura em que as dispersões de nanopartículas foram mantidas no homogeneizador de alta pressão.

Figura 2.10. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de processo na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo sete dias. Tempo: tempo de processamento em homogeneizador de alta pressão; Pressão: pressão imposta na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão; Temperatura: temperatura em que as dispersões de nanopartículas foram mantidas no homogeneizador de alta pressão.

Figura 2.11. Curva analítica de OR analisado por espectrofotometria UV-vis a 511 nm.

Figura 2.12. Verificação da presença de resíduos de behenato de glicerila frente aos solventes testados após uma hora de contato em temperatura ambiente. a- acetona; b- isopropanol; c- dimetilsulfóxido.

Figura 2.13. Perfis de distribuição de tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sem OR (A) e com OR (B).

Figura 2.14. Espectros de absorção no UV-vis para amostras de NL-BR e NL-OR extraídas por etanol absoluto.

Figura 2.15. A. amido pré-gelatinizado sem nanopartículas e liofilização. Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients, B. APG: NP 10:0, C. APG:NP 7:3.

Figura 2.16. A. Celulose microcristalina 102 sem nanopartículas e liofilização (100x). Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients, B. APG: NP 10:0 (502x), C. APG:NP 7:3 (360x).

Figura 2.17. A.celulose microcristalina 200 sem nanopartículas e liofilização (100x).
Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients, B. MCC 200:NP 10:0 (501x), C. MCC
200:NP 7:3 (360x).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Técnicas de preparação e secagem das nanopartículas lipídicas (NL).

Fonte: Próprio autor.

Tabela 2.1 Formulações elaboradas a partir de DoE 2³ adicionados três pontos centrais para obtenção de nanopartículas lipídicas considerando variáveis de formulação.

Tabela 2.2 Delineamento experimental 2³ adicionados três pontos centrais para obtenção de nanopartículas lipídicas considerando variáveis de processo.

Tabela 2.3. Composição da formulação de nanopartículas lipídicas para veiculação do marcador OR a partir dos estudos em DoE de formulação e processo.

Tabela 2.4. Avaliação do pH e consistência frente ao tempo de armazenamento à temperatura ambiente, para o DoE das formulações de nanopartículas lipídicas considerando as variáveis de formulação.

Tabela 2.5. Avaliação do pH e consistência frente ao tempo de armazenamento à temperatura ambiente, para o DoE das formulações de nanopartículas lipídicas considerando as variáveis de processo.

Tabela 2.6. Dados referentes ao tamanho das nanopartículas lipídicas obtidos por difração a laser após produção das dispersões de nanopartículas conforme DoE referente às variáveis de formulação, e armazenamento a temperatura ambiente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Tabela 2.7. Dados referentes ao tamanho das nanopartículas lipídicas, obtidos por difração a laser, após produção das dispersões de nanopartículas, conforme DoE referente às variáveis de processo, e armazenamento a temperatura ambiente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Tabela 2.8. Compilação dos sumários dos modelos de análise de variância aplicados para avaliação de superfície de respostas a partir do DoE de formulação, para um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Tabela 2.9. Compilação dos sumários dos modelos de análise de variância aplicados para avaliação de superfície de respostas a partir do DoE de processo, para um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Tabela 2.10. Parâmetros utilizados para estudo de otimização de experimentos a partir de dados prévios de análise de superfície de resposta de DoEs de formulação e processo para obtenção de dispersões de nanopartículas.

Tabela 2.11. Resultados dos estudos de otimização de experimento, a partir da análise de superfície de resposta para os DoEs de formulação e processo, considerando os tempos de armazenamento de 0, 1 e 7 dias.

Tabela 2.12. Resultados de absorvância para construção de curva analítica de OR em etanol analisada à 511 nm.

Tabela 2.13. Solubilização do behenato de glicerila em diferentes solventes.

Tabela 2.14. Análise de tamanho de partículas e potencial zeta por difração a laser e espalhamento dinâmico de luz para as dispersões de NL com e sem OR.

Tabela 2.15. Determinação do teor de OR nas formulações de NL com e sem OR.

Tabela 2.16 Características físico-químicas dos diluentes utilizados na formulação.

Tabela 2.17 Dados de umidade residual das misturas de DLT:NL após processo de liofilização para obtenção da formulação em pó.

Tabela 2.18. Valores teóricos dos componentes das misturas de diluentes e NL para cálculo da concentração teórica de OR nas amostras liofilizadas de misturas e solução de análise.

Tabela 2.19. Dados referentes ao teor e recuperação de OR nas misturas de DLT:NL-OR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

Tabela 2.20. Dados referentes ao teor e recuperação de OR nas misturas de DLT:NL-BR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

Tabela 2.21. Dados referentes à porcentagem de partículas liberadas com OR nas misturas de DLT:NL-BR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

Tabela 2.22. Dados referentes à porcentagem de partículas liberadas sem OR nas misturas de DLT:NL-BR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

LISTA DE ABREVIações

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APG – Amido pré-gelatinizado

BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados

d50-v – mediana da distribuição de tamanho – diâmetro em volume passante

d50-n - mediana da distribuição de tamanho – diâmetro em número passante

dm-v – Tamanho médio em volume passante.

dm-n - Tamanho médio em número passante.

DLS – Difração a Laser

DoE – Design of experiments.

EE – Eficiência de encapsulação

FO – Fase oleosa.

HAP – Homogeneização de alta pressão.

LSS – Lauril sulfato de sódio.

MCC102 – Celulose microcristalina PH102

MCC200 – Celulose microcristalina PH200

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

NE - Nanoemulsões

N&N – Nanociência e nanotecnologia

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NL – Nanopartículas lipídicas.

NSF – National Science Foundation

OR – Oil Red

OEX – Otimização de experimento

PDI – Índice de Polidispersão

PVP K30 - Polivinilpirrolidona

RU – Razão de uniformidade.

spam-v – SPAM em volume passante.

TA – Tensoativo.

TCC – Triglicerídeo de ácido cáprico / caprílico

TW80 – Polissorbato 80

CAPÍTULO 1

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS E CARREADORES LIPÍDICOS.

RESUMO

A nanotecnologia é definida pela *National Science Foundation – NSF*, agência americana dedicada ao progresso da ciência, como sendo o desenvolvimento de pesquisa e tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular. Em termos gerais, as nanopartículas são estruturas coloidais, que apresentam dimensões compreendidas entre 0,1 e 1000 nm. Na área farmacêutica, estudos promissores são realizados com nanocristais, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas. As nanopartículas lipídicas (NL) são sistemas de dimensões nanométricas e constituição lipídica destinados a veiculação e liberação de fármacos. As vantagens das NL destacam-se pela possibilidade de direcionamento a um alvo específico e liberação controlada dos fármacos nelas encapsulados, o aumento da estabilidade destes fármacos, a redução de eventos adversos, a não utilização de solventes orgânicos em sua produção, além da facilidade de produção em larga escala e de esterilização. O objetivo desse capítulo foi realizar uma revisão bibliográfica sobre os sistemas nanoparticulados e suas propriedades, com foco em nanopartículas lipídicas, visando o embasamento teórico para o desenvolvimento da plataforma de carreadores lipídicos para veiculação de bioativos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral. A metodologia utilizada para a revisão consistiu na busca por trabalhos científicos utilizando as palavras-chaves “carreadores lipídicos”, “nanopartículas lipídicas”, “nanoencapsulação de fármacos”, “veiculação de bioativos”, “DoE de formulação e processo” em bases de dados nacionais, como Periódicos CAPES, Biblioteca Digital e Arca e “pharmaceutical nanotechnology”, “drug encapsulation”, “freeze drying”, “high pressure homogenization” em bancos de dados internacionais, como LILACS, MEDLINE, Scielo, PubMed, PubChem. O período de levantamento dos artigos científicos consistiu entre junho de 2020 à abril de 2021. Foram selecionados aproximadamente 400 trabalhos. A partir do levantamento, houve a seleção dos artigos de revisão, ensaios in vitro - in vivo, monografias, teses e capítulos de livros, sem restrição de tempo, o que resultou em 165 trabalhos. Foram lidos os resumos e abstracts para selecionar os assuntos adequados, resultando em 89 trabalhos, e por fim, escrever a revisão bibliográfica.

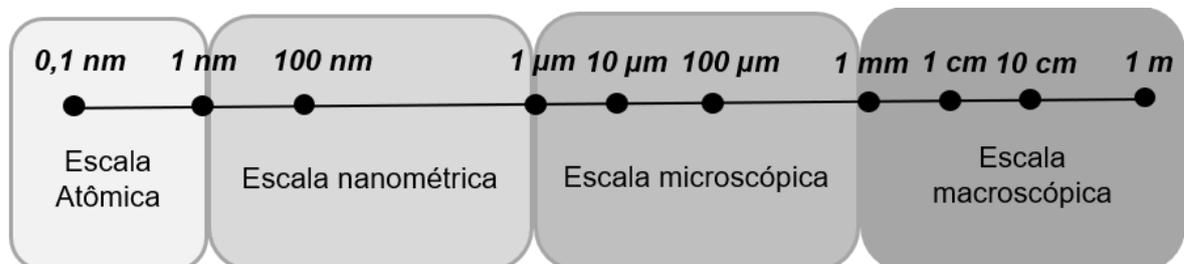
1. INTRODUÇÃO

Passaram-se cerca de 30 anos desde que a nanociência e nanotecnologia (N&N) começaram a integrar de forma mais consistente a agenda da comunidade científica e tecnológica. As reações às nanotecnologias vão do mais contagiante otimismo, pelas possibilidades que oferecem frente a muitos dos desafios da humanidade, como nas áreas da energia, saúde, agricultura e pecuária, processamento e armazenamento de informação, para citar apenas alguns, até o temor por possíveis impactos ambientais e efeitos adversos para a saúde humana e animal (SILVA *et al.*, 2011). Essas novas oportunidades têm reflexos sobre vários setores, gerando demandas de novos investimentos, mão de obra especializada e novos aspectos regulatórios (SILVA *et al.*, 2011). Para uma melhor compreensão dessa questão inicia-se explicando que o prefixo nano tem origem na palavra grega nános que significa anão. Atualmente a expressão nano é utilizada em unidades de medida, significando um bilionésimo da unidade (Figura 1.1). Ou seja, um nanômetro equivale a bilionésima parte do metro (HIA, NASIR, 2011).

A nanotecnologia é definida pela *National Science Foundation – NSF*, agência americana dedicada ao progresso da ciência, como sendo o desenvolvimento de pesquisa e tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular. Em termos gerais, as nanopartículas são estruturas coloidais, que apresentam dimensões compreendidas entre 0,1 e 1000 nm (SILVA *et al.*, 2011).

Figura 1.1 Escala comparativa entre dimensões atômica, nanométrica, microscópica e macroscópica.

Fonte: Próprio autor.



A nanotecnologia desenvolvida para a saúde é designada nanobiotecnologia (FREITAS, 2005), contemplando nanomedicina, nanocosmecêutica e nanofármacos (FREITAS, 2005).

Na área farmacêutica, estudos promissores são realizados com nanocristais, partículas coloidais, destacando-se nanopartícula poliméricas e nanopartículas lipídicas (NICOLAS, COUVREUR, 2009).

As nanopartículas são obtidas por diferentes vias e possuem diferentes propriedades físicas, químicas e morfológicas (BOLLHORST, REZWAN, MAAS, 2017). A partir do conhecimento do sistema nanoparticulado, é possível escolher aquele mais apropriado para o efeito desejado e assim potencializar, por exemplo, a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica do fármaco (DESHMUKH *et al.*, 2013).

O objetivo desse capítulo foi realizar uma revisão bibliográfica sobre os sistemas nanoparticulados e suas propriedades, com foco em nanopartículas lipídicas, visando o embasamento teórico para o desenvolvimento da plataforma de carreadores lipídicos para veiculação de bioativos em formas farmacêuticas sólidas de uso oral.

A metodologia utilizada para a revisão consistiu na busca por trabalhos científicos utilizando as palavras-chaves “carreadores lipídicos”, “nanopartículas lipídicas”, “nanoencapsulação de fármacos”, “veiculação de bioativos”, “DoE de formulação e processo” em bases de dados nacionais, como Periódicos CAPES, Biblioteca Digital e Arca e “pharmaceutical nanotechnology”, “drug encapsulation”, “freeze drying”, “high pressure homogenization” em bancos de dados internacionais, como LILACS, MEDLINE, Scielo, PubMed, PubChem. O período de levantamento dos artigos científicos consistiu entre junho de 2020 à abril de 2021. Foram selecionados aproximadamente 400 trabalhos. A partir do levantamento, houve a seleção dos artigos de revisão, ensaios in vitro - in vivo, monografias, teses e capítulos de livros, o que resultou em 165 trabalhos. Foram lidos os resumos e abstracts para selecionar os assuntos adequados, resultando em 89 trabalhos, e por fim, escrever a revisão bibliográfica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanotecnologia na saúde

A nanotecnologia possui subáreas específicas voltadas à saúde e bem-estar. Destacam-se a nanomedicina, com o desenvolvimento de novos materiais de substituição (próteses) compatíveis com órgãos e fluidos, materiais para regeneração dos ossos e tecidos e kits para autodiagnóstico; a nanocosmecêutica, com desenvolvimento de produtos com melhor desempenho, como filtros solares, shampoos e condicionadores; e nanofármacos, com o desenvolvimento de nanoestruturas contendo os fármacos de interesse (ALVES, 2010).

2.2. Nanotecnologia farmacêutica

As ciências farmacêuticas têm estudado a vantagem da associação de fármacos a sistemas nanométricos (nanofármacos), buscando as melhorias das características que favoreçam sua aplicação do ponto de vista de uso clínico e/ou de sua produção em escala industrial. Dentre essas alterações podem ser citadas o direcionamento do fármaco até células ou tecidos alvo (vetorização) (FIGUEIRAS *et al.*, 2014), a melhora nas características de solubilidade aquosa (DURAN *et al.*, 2010) e o aumento na sua absorção oral e ocular, a diminuição dos efeitos adversos e/ou colaterais (SEVERINO *et al.*, 2017) e aumento na eficácia terapêutica (PALOS *et al.*, 2017), a proteção do fármaco frente a fatores de degradação, tais como a luz e o calor, entre outras aplicações (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Com a nanotecnologia podem ser desenvolvidas novas formulações e novas rotas de liberação, aumentando seu potencial terapêutico, por serem liberados em locais inicialmente inacessíveis do corpo (GROOT, LOEFFLER, 2006).

A utilização de nanomateriais oferece a promessa de liberar o fármaco em alvos específicos fornecendo inúmeras vantagens, tais como: aumento da eficácia terapêutica, aumento da resistência as enzimas gástricas, melhora da solubilidade para fármacos fracamente solúveis em água pertencentes às classes 2 e 4 do Sistema

de Classificação Biofarmacêutica (BCS) (DURAN *et al.*, 2010), direcionamento para receptores e alvos específicos (FIGUEIRAS *et al.*, 2014), diminuição da dose terapêutica (SEVERINO *et al.*, 2017), liberação progressiva e controlada de fármacos, diminuição da toxicidade e decomposição dos fármacos, incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas em nanocápsulas, assim como diminuição de número de doses ao paciente (SEVERINO *et al.*, 2017), direcionando, desta maneira, as pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos mais sofisticados e personalizados (RAMOS, PASA, 2008).

Apesar das inúmeras vantagens em utilizar nanoestruturas para veiculação de fármacos, algumas dificuldades são observadas, como elevado custo dos materiais e produção, adequação da compatibilidade entre os materiais utilizados e possível aumento da toxicidade devido à facilidade de absorção (RAMOS, PASA, 2008).

Nanopartículas são potenciais dispositivos para liberação controlada de fármacos, devido sua habilidade em direcionar a liberação em órgãos ou tecidos específicos, ou ainda atuando como carreadores de DNA na terapia gênica. Também ajudam a aumentar a estabilidade de fármacos e proteínas (SOPPIMATH *et al.* 2020) pelo isolamento proporcionado pela encapsulação e podem liberar os bioativos em diferentes partes do corpo por períodos prolongados (HANS, LOWMAN, 2002).

O fármaco dissolvido é encapsulado ou ligado à matriz e, dependendo do método de preparação, podem ser obtidas nanoesferas ou nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas do tipo parede-núcleo (*core-shell*) em que o fármaco é confinado na cavidade da partícula e envolvido por uma camada polimérica de espessura variável, enquanto nanoesferas são sistemas matriciais em que o fármaco é fisicamente e uniformemente disperso (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Um dos objetivos da encapsulação é proteger substâncias sensíveis isolando fisicamente os bioativos do ambiente externo. Ressalta-se que, em função de um único agente encapsulante não possuir todas as propriedades do material de parede ou da matriz ideal, grupos de pesquisadores têm focado em misturas de carboidratos, gomas e proteínas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007), assim como de compostos lipídicos. O encapsulamento não só protege o material encapsulado da umidade, da luz, do oxigênio, de agentes externos adicionais, mas também permite/auxilia no controle da liberação das substâncias ativas. Os mecanismos de liberação dos materiais ativos encapsulados variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem por: variação de temperatura

e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva, e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (BRANNON-PEPPAS, 2003). Entre as principais nanopartículas farmacêuticas, destacam-se os nanocristais, as nanopartículas poliméricas e as nanopartículas lipídicas. Nessa revisão será dado foco nas nanopartículas lipídicas.

2.3. Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas lipídicas (NL) são sistemas de liberação de fármacos compostos por partículas de tamanho nanométrico, cuja matriz é formada por lipídios (WISSING *et al.*, 2004). Conforme a composição da matriz lipídica tais nanopartículas podem ser classificadas como Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), as nanopartículas lipídicas de primeira geração, e os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), consideradas nanopartículas lipídicas de segunda geração.

O estudo do uso das nanopartículas lipídicas como sistemas de liberação de substâncias ativas teve início da década de 1990 com os grupos de Müller (Berlim, Alemanha) e Gasco (Turim, Itália). Tendo em conta o seu potencial terapêutico e a necessidade de ultrapassar as limitações apresentadas pelos sistemas coloidais tradicionais (por exemplo, lipossomas, nanopartículas poliméricas, micro e nanoemulsões) (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

As vantagens das NL destacam-se pela possibilidade de uma liberação controlada a um alvo específico dos fármacos nelas encapsulados, o aumento da estabilidade destes fármacos, a baixa toxicidade de seus componentes, a não utilização de solventes orgânicos em sua produção, além da facilidade de produção em larga escala e de esterilização (WISSING *et al.*, 2004).

O uso de lipídios sólidos isoladamente ou associados a lipídios líquidos, possibilita um maior controle sobre a cinética de liberação de compostos encapsulados e melhora a estabilidade de ingredientes lipofílicos sensíveis quimicamente (HELGASON *et al.*, 2009), além de melhorar a capacidade da nanoestrutura. As NL são usadas como transportadora e os ingredientes ativos são dispersos em nível molecular na matriz lipídica.

Os lipídeos mais utilizados na obtenção das NLs são triglicerídeos (triestearina), glicídios parciais (monoestearato de glicerila), ácidos graxos (ácido

esteárico), esteróis (colesterol), triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico e ácido oleico. Também são utilizados diversos emulsificantes e polímeros, como os sais biliares (taurodeoxicolato) e lecitinas (MEHNERT, MADER, 2001) para evitar a agregação das partículas e estabilizá-las.

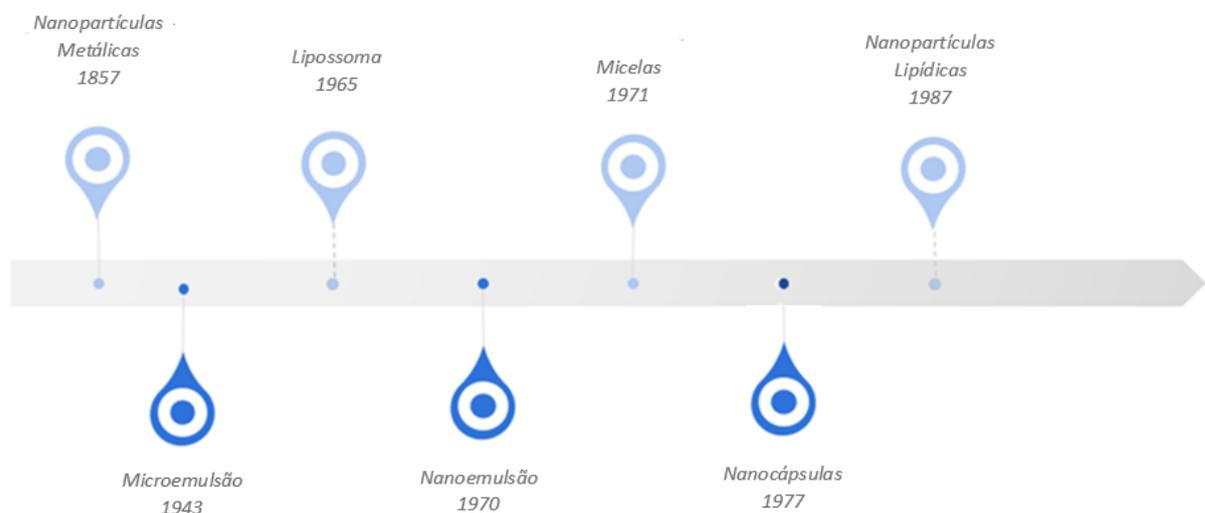
A preparação destes sistemas pode ser realizada por diferentes técnicas, incluindo homogeneização de alta pressão, emulsificação e sonicação, microemulsificação e técnicas de emulsificação e evaporação do solvente. Porém, a homogeneização à alta pressão (HAP) tem sido a mais utilizada devido ao seu fácil escalonamento para aplicação industrial e curto tempo de processo (DIMER *et al.*, 2013, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014, BONIFÁCIO *et al.*, 2014)

2.3.1. Estrutura das NL

Uma NL é tipicamente esférica com diâmetros entre 10 e 1000 nm. Possuem uma matriz de núcleo lipídico constituída estritamente por lipídios sólidos a temperatura ambiente e corporal e podem solubilizar moléculas lipofílicas .

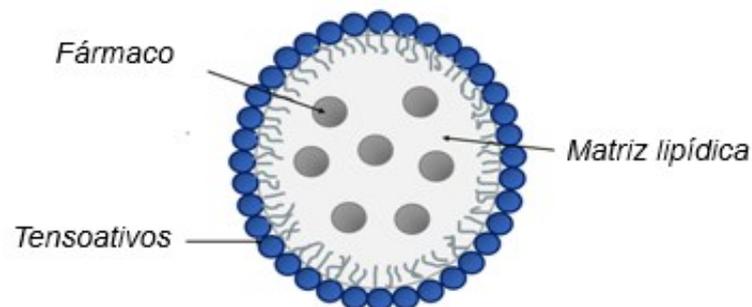
NLs foram apresentados como opções potencialmente atraentes e comercializáveis devido aos seus componentes naturais. Foram identificados na década de 1990 como um sistema transportador substituto para lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas (ATTAMA, MOMOH, BUILDERS, 2012). O desenvolvimento histórico dos nanocarreadores é ilustrado abaixo (Figura 1.2).

Figura 1.2. Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica. Fonte: Próprio autor.



As NLs são compostas de lipídeo de fase sólida e tensoativo (ATTAMA, MOMOH, BUILDERS, 2012). A fase dispersa é a gordura sólida e o tensoativo é usado como emulsificante (Figura 1.3). Os tensoativos são usados em concentrações de cerca de 0,5 a 5% com a finalidade de diminuir a tensão interfacial, superficial, auxiliar na formação da NL e aumentar a estabilidade. A seleção adequada de lipídeos e tensoativos pode afetar as propriedades dos sistemas nanoestruturados, como tamanho de partícula e capacidade de encapsulação do fármaco (WAGHMARE A. *et al.*, 2012). Em comparação com os lipossomas, eles têm melhor estabilidade do fármaco e liberação prolongada (WAGHMARE A. *et al.*, 2012) e são mais seguros do que os transportadores poliméricos por evitarem solventes orgânicos em sua produção. Além disso, a transposição de escala desses carreadores lipídicos é mais factível (WAGHMARE A. *et al.*, 2012).

Figura 1.3. Composição e organização das nanopartículas lipídicas (NLs). Fonte: Próprio autor



2.3.2. Método de preparação

2.3.2.1. Formulação

Os excipientes mais comumente usados em qualquer formulação de NL são lipídios sólidos, emulsionantes, co-emulsionantes e água.

2.3.2.1.1 Lipídeos

O termo lipídio é usado em sentido amplo, incluindo triglicerídeos, ácidos graxos, ceras e esteroides (MANDAWGADE, PATRAVALE, 2008).

As nanopartículas lipídicas possuem como vantagem o fato de que a matriz lipídica pode ser constituída por lipídios fisiológicos, diminuindo o risco de toxicidade crônica (MANDAWGADE, PATRAVALE, 2008).

O uso de matriz constituída por misturas de lipídios sólido/líquido no lugar de lipídios exclusivamente líquido pode ser benéfico, pois favorece o controle sobre a cinética de liberação de compostos encapsulados e melhora a estabilidade de ingredientes lipofílicos quimicamente sensíveis.

Esses efeitos potencialmente benéficos decorrem de a uma série de características físico-químicas associadas ao estado físico da fase lipídica. Em primeiro lugar, a mobilidade dos agentes reativos em uma matriz sólida é menor do que em uma matriz líquida e, portanto, as taxas de reações de degradação dos fármacos veiculados em nanoestruturas podem ser retardadas (MEHNERT, MADER, 2001).

Uma possibilidade é utilizar triglicerídeos de cadeia média, como o triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (figura 1.4), constituindo o lipídio líquido com ácidos graxos saturados, como o behenato de glicerilo, constituindo o lipídio sólido (figura 1.5).

Figura 1.4. Estrutura molecular do triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico. Fonte: tesesusp.net

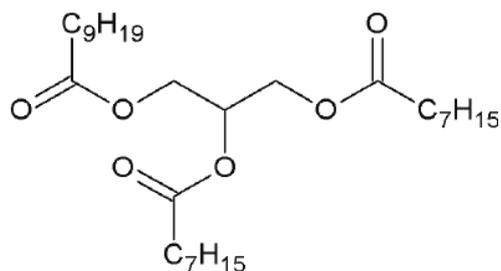
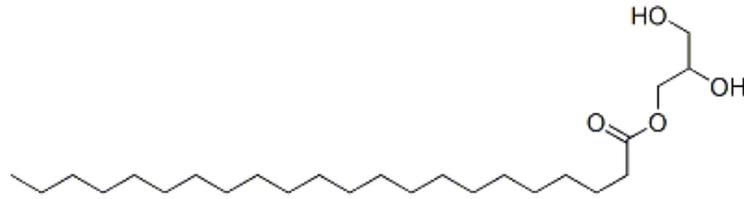


Figura 1.5. Estrutura molecular do behenato de glicerilo (compritol). Fonte: chemicalbook.net



O uso de uma matriz exclusivamente sólida também pode retardar a digestão dos lipídios constituintes, contribuindo, mais uma vez, para uma liberação mais sustentada do composto encapsulado (WAGHMARE A. *et al.*, 2012).

Na homogeneização a quente, a dispersão e o tamanho da nanopartícula lipídica são aumentados com lipídios de maior ponto de fusão e isso é devido à maior viscosidade da fase dispersa. Alguns parâmetros são específicos para cada lipídio, como cristalização e hidrofobicidade. Quimicamente, a maioria dos lipídios são misturas de vários compostos, de modo que sua composição pode variar entre diferentes fornecedores e de lote para lote. Essas diferenças podem afetar a qualidade da nanopartícula lipídica em grande escala (por exemplo, mudando o potencial zeta, retardando os processos de cristalização etc.) (MEHNERT, MADER, 2001).

O aumento quantitativo dos lipídios em mais de 5% -10%, geralmente resulta em um aumento de tamanho e distribuição das partículas (MEHNERT, MADER, 2001).

Apesar das vantagens apresentadas, as NL constituídas essencialmente de lipídios sólidos também apresentam desvantagens, sendo a principal delas a menor capacidade de encapsulação de fármacos e a expulsão de parte dos fármacos encapsulados durante armazenamento em razão da recristalização da matriz lipídica sólida. Para contornar esse problema foi desenvolvida a segunda geração de nanopartículas lipídicas conhecidas como Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.

2.3.2.1.2. Tensoativos

Os tensoativos estabilizam a dispersão dos lipídeos na formulação final (MEHNERT, MADER, 2001).

A utilização de tensoativos se faz com o objetivo de prevenir a aglomeração das NL de forma mais eficiente (MEHNERT, MADER, 2001). A escolha dos tensoativos possui grande impacto na qualidade das NL, visto serem capazes de reduzir a tensão superficial entre as fases lipídica e aquosa durante a homogeneização (MEHNERT, MADER, 2001).

Durante a preparação da NL, a emulsão primária deve conter excesso de tensoativo para cobrir as novas superfícies formadas durante a homogeneização de alta pressão; caso contrário, isso levará a aglomeração de novas superfícies lipídicas descobertas (PADOVANI, 2015).

O tempo gasto para redistribuição dos tensoativos entre novas superfícies de partículas e micelas é diferente para diferentes tipos de tensoativos (PADOVANI, 2015). Dentre os utilizados destacam-se polissorbato 80 (figura 1.6) poloxamer 188 (figura 1.7), poloxamer 407, polissorbato 80 (figura 1.7) e lecitina (ZHANG *et al.*, 2006).

Figura 1.6. Estrutura molecular do polissorbato 80. Fonte: researchgate.net

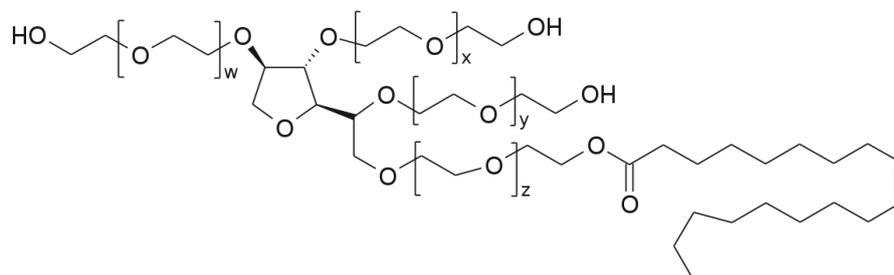
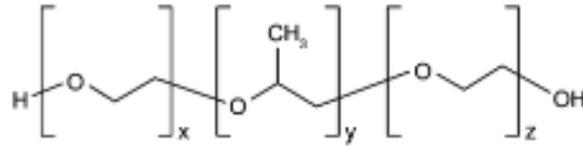


Figura 1.7. Estrutura molecular do poloxamer 188. Fonte: researchgate.net



2.3.2.2. Processo de obtenção das nanopartículas

NLs são preparadas principalmente por homogeneização de alta pressão, a quente ou a frio. No entanto outras técnicas são plausíveis de uso como microemulsão, ultrassom com homogeneização de alta velocidade e método de evaporação do solvente (tabela 1.1).

Tabela 1.1 Técnicas de preparação e secagem das nanopartículas lipídicas (NL). Fonte: Próprio autor.

Método	Técnica	Vantagem	Desvantagem
Homogeneização de alta pressão	A emulsão passa por uma lacuna de tamanho micrométrico, sob pressão de 100-2000 bar. Isso leva a um alto cisalhamento das partículas. (BECK <i>et al</i> , 2013)	Baixo custo Possibilidade de realizar em laboratório e escala industrial. (BECK <i>et al</i> , 2013)	Processo de uso intenso de energia. (BECK <i>et al</i> , 2013)
Ultrassom com homogeneização de alta velocidade	Os dois métodos juntos aumentam a redução das partículas. Ocorre a redução da tensão de cisalhamento pela cavitação gerada pelo ultrassom. (CASSOL, 2016)	Tensão de cisalhamento reduzida. (CASSOL, 2016)	Processo pode gerar calor e alto estresse para emulsão. (CASSOL, 2016)

Microemulsificação	As NLS são produzidas com solventes que distribuem muito rapidamente na fase aquosa, enquanto as partículas de maior tamanho são obtidas com solventes lipofílicos. (DAMASCENO <i>et al.</i> 2011)	Baixo consumo de energia mecânica. (DAMASCENO <i>et al.</i> 2011)	Técnica muito sensível a mudanças de parâmetros. (DAMASCENO <i>et al.</i> 2011)
Evaporação do solvente	O material lipofílico é dissolvido em um solvente orgânico imiscível em água, que é emulsificado em uma fase aquosa. Após a evaporação do solvente, a dispersão de nanopartículas é formada por precipitação do lipídio no meio aquoso. (LAZARIN, 2013)	Escalonável. Processo contínuo. (LAZARIN, 2013)23	Impacto ambiental. (LAZARIN, 2013)

Para aumentar a estabilidade das NLS, a emulsão pode ser convertida em pó sólido reconstituível por meio de liofilização ou secagem por spray drying (SINHA V.R. *et al.*, 2010).

A homogeneização de alta pressão possibilita a versatilidade e possibilidade de escalonamento do processo, ideal para fabricação em larga escala, demonstrado por VASCONCELLOS *et al.* (2021) no estudo de Escalonamento de tecnologias através do desenvolvimento de produto e processo do laboratório à escala piloto e por ALBECHT *et al.* (2015) no estudo sobre a indústria biofarmacêutica e seu processo produtivo.

A liofilização gera dispersões de nanopartículas na forma de pó com boa estabilidade, possui um processo escalonável, *eco-friendly* e de alto rendimento, além das formulações demonstrarem boa estabilidade. Como demonstra SILVA *et al.*, em relação ao processo de Spray Dryer, a Liofilização apresenta maior rendimento com

igual teor de umidade (SILVA et al.,2016), por esses motivos, sendo o processo escolhido para o desenvolvimento do projeto.

Observando as possibilidades de processo para obtenção das NLs, a homogeneização de alta pressão e a liofilização foram os selecionados.

2.4. Homogeneização de alta pressão (HAP)

HAP utiliza a alta pressão (100 a 2.000 bar) para empurrar uma dispersão de partículas através de uma abertura de poucos micrômetros para criar partículas de tamanho submicrométrico. A alta tensão de cisalhamento, os choques entre a dispersão e as partes internas da câmara de interação e as ondas cavitação geradas pela rápida despressurização quebram as partículas dispersas, reduzindo o tamanho (BECK *et al*, 2013).

A HAP pode ser realizada em alta temperatura (HAP a quente) ou abaixo da temperatura ambiente (HAP a frio) (SCHWARZ, 2004).

No processo de homogeneização a quente, o ativo é incorporado no lipídio fundido, em uma temperatura de 5 a 10°C em relação ao ponto de fusão do lipídio. A mistura é adicionada em solução de tensoativos a quente formando uma pré-emulsão (óleo em água) e homogeneizada a alta pressão. Geralmente são necessários menos ciclos em relação ao processo ao frio. Em seguida ocorre o resfriamento a temperatura ambiente, levando à cristalização do lipídio e formação das nanopartículas. (MARCATTO, 2009).

O processo de homogeneização a frio é mais adequado para ativos hidrofílicos. O ativo é dissolvido no lipídio fundido com ou sem tensoativo. A mistura é solidificada para aumentar a fragilidade do lipídio e facilitar o processo de moagem. Após a moagem, ocorre a incorporação em tensoativo e homogeneização à 0°C em até 15 minutos de processo (MARCATTO, 2009).

2.5. Liofilização:

A liofilização tem sido usada na estabilização a longo prazo de nanopartículas (COURIEL, 2008), isso porque geralmente as formulações liofilizadas demonstram uma transição vítrea, tolerando maiores variações de temperatura e umidade (CHEN, *et al.*, 1995).

Entre as vantagens da liofilização destacam-se a estrutura inalterada da amostra, com reduzidas alterações nos aspectos de qualidade, como teor, umidade (1 a 3%), fácil armazenamento e transporte e processo de baixa poluição (COURIEL, 2008).

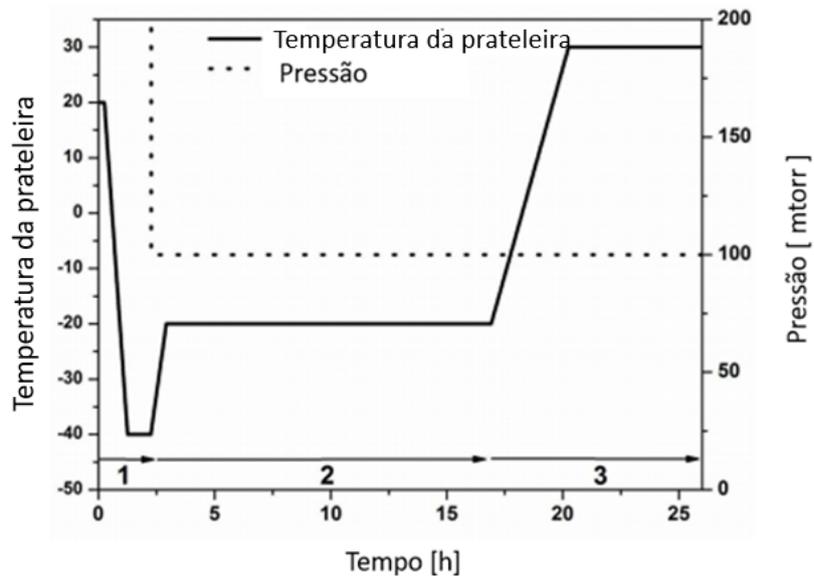
As desvantagens são constituídas pela demora do processo (mais de 24 horas), equipamento de valor elevado e alto custo energético durante o processo (COURIEL, 2008).

Trata-se de um processo no qual a amostra é congelada seguida por uma redução do teor de solvente por sublimação e por dessorção a valores que minimizam o crescimento biológico (JENNINGS, 1999).

2.5.1. O processo de liofilização

Um processo de liofilização típico pode ser dividido em três fases: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A Figura 1.4 exibe um esquema ilustrando um ciclo de liofilização típico.

Figura 1.8: Ilustração esquemática de um típico ciclo de liofilização. A linha sólida representa o ciclo do curso de temperatura e a linha tracejada representa o curso de pressão durante os diferentes estágios de um processo de liofilização: 1) congelamento, 2) secagem primária e 3) secagem secundária. Fonte: Adaptado de KASPER, J., 2012.



A etapa de congelamento corresponde ao resfriamento das prateleiras, nas quais as amostras são colocadas, à temperatura de congelamento desejada e mantendo a temperatura constante para o equilíbrio (CONSTANTINO, 2004).

A amostra é inicialmente resfriada até a nucleação, na temperatura abaixo do ponto de congelamento (NAIL, 2002). Após a nucleação do gelo, os cristais de gelo começam crescer resultando na concentração de congelamento da amostra (SEARLES, 2004). A etapa de congelamento na liofilização é muito importante, pois afeta a qualidade da liofilização e do produto (CHANG, PATRO, 2004). Após o congelamento, ocorre a etapa de “recozimento” (*annealing*), a qual permite a cristalização completa dos excipientes (CHANG, PATRO, 2004).

A etapa de secagem, na qual a água é removida do produto por sublimação, ocorre pela introdução de vácuo na câmara do produto (TRAPPLER, 2004). A pressão da câmara deve ser reduzida abaixo da pressão de vapor de gelo e levar à sublimação. O aumento na pressão da câmara leva à um aumento na temperatura do produto e conseqüente secagem do produto (FRANKS, 2007).

2.6. Caracterização NL

A caracterização física e química das NLs é necessária e inclui zeta potencial, tamanho de partícula, eficiência de encapsulação (% EE), espalhamento dinâmico de luz laser (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Nanopartículas com potencial de zeta entre -10 e $+10$ mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto nanopartículas com potencial zeta superior a $+30$ mV ou menos de -30 mV são consideradas fortemente catiônicas e fortemente aniônicas, respectivamente (MAYORAL *et al.*, 2014). Como a maioria das membranas celulares são carregadas negativamente, o potencial zeta pode afetar a tendência de uma nanopartícula de permear membranas, com partículas catiônicas geralmente exibindo mais toxicidade associada à morte da parede celular (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O tamanho das nanopartículas pode ser dependente da técnica de preparo, natureza dos excipientes, características físico-química do fármaco e proporção entre fase oleosa e aquosa (LEGRAND *et al.*, 1999). A estabilidade das nanopartículas pode ser dependente do tamanho das mesmas e evidencia a sua agregação ao longo do tempo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A encapsulação pode ser verificada pela concentração do ativo associado às nanopartículas. Ela pode ser verificada através da dissolução das nanopartículas após ultrafiltração e centrifugação e posterior análise do ativo no sobrenadante. A eficiência de recuperação (%EE) pode ser calculada como a diferença percentual entre concentração do ativo inicialmente adicionada e a encontrada após processamento no sobrenadante (TEKADE, DUTTA, GAJBHIYE, JAIN, 2009).

A cristalinidade de lipídios ou modificações polimórficas também podem ser analisadas via calorimetria exploratória diferencial (DSC) (DALE, KIJLSTRA, VINCENT, 2005) e são medidas pelas entalpias associadas aos pontos de fusão e temperaturas de transição vítrea dos componentes.

Conhecer a morfologia e as estruturas das amostras também é muito importante para verificar as propriedades e comportamento a longo prazo. O Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) e o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) oferecem uma maneira de observar as nanopartículas e os excipientes. No MET, os feixes de elétrons atravessam as amostras e formam a

imagem em uma tela fluorescente possibilitando produzir imagens de alta resolução (até 300 mil vezes maior), o que possibilita verificar as nanopartículas com maior precisão do que o MEV (ATTIAS, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é realizada por feixe de elétrons que realiza varredura sobre a superfície das estruturas amostras, fornecendo uma imagem da superfície com profundidade e tridimensionalidade de cerca de 0,3nm (WILLIAMS *et al.*, 2006).

2.7. Estabilidade e condições de armazenamento

A estabilidade dos NLs está vinculada a sua composição, material lipídico, concentração, tipo de tensoativo e temperatura durante seu processo de obtenção.

Os NLs podem apresentar algumas dificuldades de estabilidade pela possibilidade de agregação entre as nanopartículas, crescimento de Oswald, coalescência, perda de conteúdo e hidrólise em meio aquoso (WU Y. *et al.*, 2019).

Para diminuir esses possíveis fenômenos em amostras suscetíveis é possível realizar a secagem das NLs. A liofilização e a secagem por pulverização são as técnicas em destaque para as NLs. Recentemente, o método de electrospray também foi empregado para preparar NLs (WU Y. *et al.*, 2019).

2.8. Aplicação terapêutica

As NLs possuem várias possibilidades de aplicação, entre elas a administração de fármacos pela via oral, parenteral, inalatória e tópica.

O fármaco associado à NL, ganha potencial melhora na eficácia terapêutica, aumento da resistência as enzimas gástricas, melhora da solubilidade para fármacos da classe biofarmacêutica (BCS) 2 e 4 (DURAN *et al.*, 2010), direcionamento para receptores e alvos específicos (FIGUEIRAS *et al.*, 2014), diminuição da dose terapêutica (PALOS *et al.*, 2017), liberação progressiva e controlada de fármacos e diminuição da toxicidade (RAMOS, PASA, 2008).

NLs podem ser adicionados aos transportadores inalatórios para os pulmões, capazes de fornecer uma deposição pulmonar profunda, boa adesão e

liberação prolongada nos pulmões. As vantagens da liberação do fármaco em NLs nos pulmões, incluem o controle do perfil de liberação, liberação prolongada, degradação in vivo mais rápida e melhor tolerabilidade em comparação com partículas feitas de alguns materiais poliméricos. As formulações de pó seco ou suspensões aquosas de NLs podem ser usadas para distribuição pulmonar de fármacos (MANJUNATH, VENKATESWARLU, 2016).

O uso de NLs como carreadores para filtros solares, ativos antiacne e antienvhecimento tem sido muito destacado. Uma vez que os NLs possuem semelhança com a estrutura da pele através da presença de lipídios, podem ser utilizadas para o bloqueio de UV e de hidratação da pele. (BOCCA C. *et al*, 1998).

2.9. Regulamentação dos nanomedicamentos

As atribuições da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foram definidas pela Lei nº 9782/1999, sendo responsável por fiscalizar a produção e a comercialização de produtos relacionados à saúde, como alimentos, medicamentos e cosméticos. Além disso, a ANVISA realiza a aprovação de produtos mediante registro que serão colocados no mercado de consumo dentro de parâmetros de segurança estabelecidos em resoluções e legislações específicas (COSTA, 2013).

Em 10 de junho de 2013 a Anvisa publicou uma portaria nº 993, em que Instituiu o Comitê interno de Nanotecnologia- CIN, com a finalidade de (ANVISA, 2021):

1. Elaborar um diagnóstico institucional relacionado à dimensão da nanotecnologia para vigilância sanitária, considerando as competências da agência” (ANVISA, 2021);
2. “Elaborar um diagnóstico institucional sobre produtos que usam a nanotecnologia e a expertise relacionada a tecnologia na agência” (ANVISA, 2021);
3. “Elaborar documento sobre as ações e políticas regulatórias que estão sendo adotadas por outros países e em nível internacional com relação à nanotecnologia em áreas de interesse para a vigilância sanitária” (ANVISA, 2021);

4. “Sugerir à Diretoria Colegiada alternativas de políticas, diretrizes e de governança regulatória da nanotecnologia no âmbito da agência. (ANVISA, 2021).

Atualmente, estima-se a existência de aproximadamente 1200 produtos registrados na ANVISA que se utilizam das nanotecnologias. Destacando-se medicamentos como Daunoxome®, Caelyx®, Luprondepot, Neodecapeptyl, Brexin, Maxsulid, Ambiso, utilizados na oncologia (BATISTA, 2014).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de sistemas nanoestruturados oferece a promessa de liberar o fármaco em alvos específicos fornecendo inúmeras vantagens, tais como: aumento da eficácia terapêutica, aumento da resistência as enzimas gástricas, melhora da solubilidade para fármacos fracamente solúveis em água, direcionamento para receptores e alvos específicos, diminuição da dose terapêutica, liberação progressiva e controlada de fármacos, diminuição da toxicidade decomposição dos fármacos, incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas em nanocápsulas, assim como diminuição de número de doses ao paciente, direcionando, desta maneira, as pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos mais sofisticados e personalizados

Os métodos de preparação de nanopartículas estão em constante desenvolvimento. Nanopartículas lipídicas (NLs) são dispersões coloidais com propriedades que possibilitam algumas melhoras em comparação de outras nanopartículas, como microemulsões, suspensões, lipossomas e nanopartículas poliméricas. Utilizando NLs é possível ter um sistema de entrega de fármacos quimicamente mais estável e fisiologicamente adequado com menos limitações em comparação às demais.

Apesar de seus inúmeros benefícios e vantagens, as NLs possuem possibilidades de melhorias e desenvolvimento na sua obtenção. A escolha da melhor formulação e método de produção adequado é crucial para manter o fármaco íntegro e potencializar as vantagens das NLs.

Durante essa revisão foram abordados alguns métodos de obtenção das NLs, suas vantagens e desafios. As informações agrupadas nessa revisão permitem considerar os principais aspectos para o desenvolvimento desses nanocarreadores, assim como seu processamento para conversão em pó para veiculação em formas farmacêutica sólidas.

4.REFERÊNCIAS

ANVISA, Diagnóstico Institucional de Nanotecnologia. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA)**, 2021.

ALBRECHT, I. *et al.*, Indústria biofarmacêutica e seu processo produtivo, **Universidade Estadual de Maringá**, v.15, n.1, 2015.

ALVES, O. L. Cartilha sobre nanotecnologia. **ABDI**, 2010.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients, **Springer**, 2014

ATTAMA, A.A.; MOMOH M.A.; BUILDERS, P.F. Sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados de lipídios: uma revolução no design e desenvolvimento de formas farmacêuticas. **A.D. Farmacologia, Toxicologia e Ciências Farmacêuticas**, 2012.

ATTIAS, M. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia**, p. 30-46, 2007.

BATISTA, A.J.S., Os desafios da nanotecnologia para vigilância sanitária de medicamentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2014.

BECK, R.C.R. *et al.* Processo de obtenção de nanopartículas poliméricas utilizando homogeneização alta pressão. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2013.

BOCCA, C. *et al.* Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.** p. 185 – 193, 1998.

BOLLHORST, T.; REZWAN, K.; MAAS, M. Colloidal capsules: nano and microcapsules with colloidal particle shells. **Chem. Soc. Ver.**, p. 91-126, 2017.

BONIFÁCIO, B.V. *et al.* Nanotechnology – based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, n.9, p.1-15, 2014.

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. *Polymeric Delivery Systems: Properties and Applications*. **Oxford University Press**, cap. 3, p. 42-52, 2003.

CASSOL, G.S. Estudo da aplicação do ultrassom e de um agitador de alta velocidade no desenvolvimento de protetores solares. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2016.

CHANG, B.S.; PATRO, S.Y. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals, *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, **AAPS Press**, 2004.

CONSTANTINO, H.R.; PIKAL, M.J. Preface *In Lyophilization of Biopharmaceuticals*, **AAPS Press**, 2004.

COSTA, E.A. A regulação de medicamentos no Brasil. **Grupo A Educação**, 2013.

COURIEL, B. Freeze Drying: Past, Present and Future, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, p. 352-357, 2008.

DALE, P.J.; KIJLSTRA J.; VINCENT, B. Adsorption of Non-Ionic Surfactants on Hydrophobic Silica Particles and the Stability of the Corresponding Aqueous Dispersions. **Langmuir**, p. 12250 – 12256, 2005.

DAMASCENO, B.P.G.L. *et al.* Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista Ciência Farmácia Básica Aplicada**, n. 32, p.9-18, 2011.

DESHMUKH, P.K. *et al.* Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self-assembly systems: targeting and biosensory applications. **J. Control Release**, p. 294-306, 2013.

DIMER, F.A. *et al.* Impactos da Nanotecnologia Na Saúde: Produção De Medicamentos. **Química Nova**, p.1520-1526, 2013.

DURAN, N. *et al.* Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v.33, n.1, p.151-158, 2010.

EMEJE, M.O. *et al.* Nanotechnology in Drug Delivery, **Intech Open Access Publisher**, 2012.

FIGUEIRAS, A.R.R. *et al.* Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v.5, n.2, p.14-26, 2014.

FRANKS, F.; AUFFRET, T. Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals, **RSC Publishing**, 2007.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, p. 221-229, 2008.

FREITAS, R. A. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. **International Journal of Surgery**, v. 3, n.4, p. 243-246, 2005.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GROOT, R.; LOEFFLER, J. Roadmap report concerning the use of nanomaterials in the Medical & Health sector. **6th Framework Programme. European Commission**, 2006.

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science** p. 319-327, 2002.

HELGASON, T. *et al.* Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science, Oxford**, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HIA, J.; NASIR, A. Photonanodermatology: The interface of photobiology, dermatology and nanotechnology. **Photodermatology Photoimmunology and Protomedicine**, p 27, 2011.

JENNINGS, T. Lyophilization, introduction and basic principles, **Interpharm Press**, 1999.

LAZARIN, C. Correlação da viscosidade da fase orgânica com o tamanho de nanopartículas depoli(l-ácido láctico) produzidas por miniemulsificação/evaporação do solvente. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, 2013.

LEGRAND, P *et al.* Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **S.T.P. Pharma Sci.**, v.9, p.411-418, 1999.

LIM, S.B.; BANERJEE A.; ÖNYÜKSEL, H., J. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. **Controlled Release**, pg. 34 – 45, 2012.

MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 363, 2008.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V. J. Lipid as Biological Materials for Nanoparticulate Delivery. **Drug Targeting**, pg. 632-645, 2016.

MARCATTO, P.D. *et al.* Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, p. 1-37, 2009.

MAYORAL, J.B *et al.* Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. **Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional**, v.8, n. 4, 2014.

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

MUHLEN, A. Z., SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, p. 149-155, 1998.

NAIL, S.L. *et al.* Fundamentals of Freeze-Drying, Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, **Kluwer Academic/ Plenum Publisher**, 2002.

NICOLAS, J. COUVREUR, P. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros – Parte I. **Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v.1, p.111, 2009.

PADOVANI, G.C. *et al.* Advances in dental materials through nanotechnology: facts, perspectives and toxicological aspects. **Trends Biotechnol.**, p. 621, 2015.

PALOS, A.L. *et al.* Recentes Avanços nos Sistemas de Entrega de Nanofármacos no contexto da Doença Inflamatória Intestinal, **Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**, 2017.

RAMOS, B. G. Z.; PASA, T. B. C. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.89, p.95-101, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHWARZ, C. *et al.* Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. **Controlled Release**, p. 83-96, 2004.

SEARLES, J.A. Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization. Freeze-Drying/Lyophilization. **Pharmaceutical and Biological Products**, 2004.

SEVERINO, P. *et al.* Processo de obtenção de nano e micropartículas de quitosana encapsulando 4-metilesculetina e produto obtido. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, 2017.

SINHA, V.R. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, p. 212-238, 2010.

SILVA, J.M.S. *et al.* Comparação de processos de secagem por spray dryer e liofilização em microencapsulação de extrato de beterraba. **Universidade Estadual de Maringá**, 2016.

SILVA, M.S. *et al.* Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v.190, p. 366-374, 2011.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Emerging Lipid Based Drug Delivery Systems. **Pharm. Pharmacol. Lett.** p. 123-126, 2012.

SOPPIMATH, K.S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, p.1-20, 2020.

TEKADE, R.K.; DUTTA, T.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N.K. Exploring dendrimer towards dual drug delivery: pH responsive simultaneous drug-release kinetics. **Microencapsul.**, n. 26, p. 287-296, 2009.

TRAPPLER, E. Lyophilization Equipment. Lyophilization of Biopharmaceuticals, **AAPS Press**, 2004.

VASCONCELLOS, E.P. et al. Escalonamento de tecnologias: desenvolvimento de produto e processo do laboratório à escala piloto conectado ao mercado (parte 1). **Química Nova**, v.44, n.33, p.377-384, 2021.

WAGHMARE, A. *et al.* Solid lipid nanoparticles: a promising drug delivery system. **Int Res J Pharm.** p.100, 2012.

WAGHMARE, A. *et al.* Solid lipid nanoparticles: A promising drug delivery system. **Int. Res. J. Pharm.**, p. 100-107, 2012.

WILLIAMS *et al.*, Transmission Electron Microscopy. **A Textbook for Materials Science**, 2006.

WISSING, A.S. *et al.* Aplicações cosméticas para lipídio sólido nanopartículas (SLN). **Int J Pharm**, p. 254, 2004.

WU, Y. *et al.* A comprehensive characterization of pyrolysis oil from softwood barks. **Mol. Pharmaceutics**, p. 1371 - 1379, 2019.

YANG, S.C. *et al.* Effect of penetration enhancers and amorphization on transdermal permeation flux of raloxifene-encapsulated solid lipid nanoparticles: an ex vivo study on human skin. **J. Controlled Release**, pg. 299 – 307, 2019.

ZHANG, Z.; FENG, S. In vitro investigation on poly (lactide) – Tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy. **Biomacromolecules**, v.7, n.4, p. 1139 -1146, 2006.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA VEICULAÇÃO EM FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS: APLICAÇÃO DE DOE PARA VARIÁVEIS DE FORMULAÇÃO E PROCESSO

RESUMO

Design of experiments (DoE) é uma ferramenta de planejamento experimental muito utilizada para otimizar o número de experimentos a serem realizados, buscando os resultados mais precisos e rápidos. Os experimentos realizados utilizam os fatores estipulados pelo pesquisador, considerando número de variáveis independentes e dependentes, assim como o software estatístico mais adequado ao estudo realizado. A eficiência do processo, tamanho e uniformidade das nanopartículas e liberação e permeação dependem da formulação da emulsão previamente elaborada e dos parâmetros a serem selecionados no equipamento, dos quais o número de ciclos ou tempo de processamento, a temperatura e a pressão de processamento são os mais importantes. Para verificar o qualitativo e quantitativo de excipientes, as formulações foram delineadas através de planejamento estatístico fatorial do tipo 2^3 adicionados três pontos centrais, considerando dois níveis para cada um dos três fatores, porcentagem total de tensoativos (%TA - 4% e 8%), proporção de lauril sulfato de sódio (LSS) na mistura de tensoativos (%LSS TA → 0% e 10%) e porcentagem de fase oleosa (%FO - 10% e 20%). Um novo delineamento do tipo 2^3 adicionados três pontos centrais foi realizado para os parâmetros de processo tempo (5 e 15 minutos), pressão (5000 psi e 15000 psi) e temperatura (30°C e 70°C). Após análise foram definidos como parâmetros de formulação a utilização de 8% de tensoativos (%TA), sem adição de lauril sulfato de sódio (0% para %LSS) e 10% de fase oleosa (%FO). Para os parâmetros de processo de homogeneização de alta pressão foram utilizadas pressão de cerca de 12.500 psi, temperatura de 70°C, durante 15 minutos de processamento. Os parâmetros avaliados em ambos os estudos foram relacionados ao pH, tamanho e distribuição de tamanho, com significância maior de 95% e posteriormente caracterizados na formulação final do produto. As nanopartículas foram incorporadas a diluentes com o objetivo de veicular em pós e cápsulas. Todas as amostras passaram por verificação umidade, tamanho de partícula, volume passante e número passante por difração a laser e espalhamento dinâmico de luz, zeta potencial, recuperação do Oil Red e dessorção das nanopartículas dos excipientes. A partir dos resultados de caracterização, foi escolhida a proporção de DLT:NL de 5:5 de MCC200. O projeto demonstrou que foi possível preparar uma plataforma de carreadores lipídicos para veiculação em pós.

1.INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a nanotecnologia vem ganhando espaço nas mais diversas áreas, incluindo campos relacionados ao desenvolvimento de medicamentos, cosméticos e alimentos (SILVA *et al.*, 2011). Dentre os diversos sistemas nanoestruturados utilizados para a veiculação de bioativos temos os nanocarreadores lipídicos, tais como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), as nanoemulsões (NE) e microemulsões (ME) (NICOLAS, COUVREUR, 2009).

Os nanocarreadores lipídicos tem despertado grande interesse de pesquisadores da academia, de empresas farmacêuticas e de cosméticos visto possibilitarem a elaboração de nanoestruturas contendo os bioativos de interesse, utilizando lipídios sólidos e líquidos de origem animal e vegetal, muitos dos quais presentes endogenamente no corpo humano, favorecendo a biocompatibilidade e reduzindo eventuais efeitos tóxicos (DESHMUKH *et al.*, 2013). Além disso, os nanocarreadores lipídicos podem ser obtidos por processos considerados “eco-friendly”, visto que alguns não carecem da utilização de solventes orgânicos, ou grandes consumos de água e energia, além de dispensar o uso de materiais derivados do petróleo (COURIEL, 2008).

A homogeneização em alta pressão (HAP) é um dos métodos mais utilizados para a produção de nanopartículas lipídicas, sendo altamente reprodutível e escalonável. A eficiência do processo dependerá da formulação da emulsão previamente elaborada e dos parâmetros a serem selecionados no equipamento, dos quais o número de ciclos ou tempo de processamento, a temperatura e a pressão de processamento são os mais importantes (COURIEL, 2008).

Portanto, os dois conjuntos de fatores, de formulação e processo, assumem considerável importância no desenvolvimento de formulações de carreadores lipídicos, HAP. FHIONNLAOICH *et al.* (2019) demonstrou, através de um estudo de caso, a possibilidade de implementar o DoE na síntese de nanopartículas, LUIZ *et al.* também demonstrou a utilização do projeto de experimentos (DoE) no desenvolvimento e otimização de nanopartículas como sistemas de entrega de fármacos e GRANEMANN *et al.* (2014) demonstrou, utilizando DoE, o impacto da velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio em

nanoemulsões fotoprotetoras. Em todos os casos fica claro que formulação e processo podem interferir significativamente nas propriedades do produto final.

A busca por condições ideais de formulação e processamento é parte integral da rotina de trabalho de pesquisadores que visam o desenvolvimento de formulações e sistemas nanoestruturados seguros, eficazes, e que atendam aos parâmetros de qualidade pretendidos.

Design of Experiments (DoE) é uma ferramenta de planejamento experimental muito utilizada na área de desenvolvimento de formulações para otimizar o número de experimentos a serem realizados, gerando resultados mais precisos e rápidos. Essa ferramenta não se restringe ao desenvolvimento farmacotécnico, se difundindo em diversas áreas do conhecimento como psicologia, sociologia, engenharia, economia, biologia, medicina e farmácia (RIBEIRO, CATEN, 2003)

O planejamento experimental é realizado de modo a considerar como variáveis independentes os parâmetros que se sabe ou suspeita que podem interferir na qualidade ou desempenho de um produto, enquanto os parâmetros utilizados para medir a qualidade ou desempenho são consideradas variáveis dependentes. Para que se possa perceber a importância que determinada variável independente assume frente ao sistema em estudo, faz-se necessário trabalhar tal variável em diferentes níveis, buscando assim estabelecer uma relação entre os níveis de um determinado fator e a resposta gerada (RIBEIRO, CATEN, 2003). Assim, por exemplo, em um estudo onde se considera 3 fatores de formulação em 4 níveis, teremos um estudo 4^3 , totalizando 64 experimentos ou combinações de fatores e níveis, em que serão coletados dados sobre os parâmetros de qualidade ou desempenho (variáveis dependentes) a serem submetidos à análise estatística.

É a partir das variáveis dependentes que se realizam as análises estatísticas das respostas para saber, por exemplo, quais os principais componentes do estudo (fatores) ou a interação entre eles que são capazes de interferir mais significativamente nos parâmetros avaliados. A identificação desses fatores e das faixas em que operam para fornecer os resultados desejados permite estabelecer faixas de trabalho ideais para que o objetivo do estudo seja atingido.

Nesse trabalho buscou-se estabelecer a partir de dois planejamentos experimentais (DoEs), um aplicado à formulação e outro ao processo, as condições ótimas para obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados por emulsificação prévia seguida por homogeneização em alta pressão. Foram utilizados DoEs 2^3

adicionados três pontos centrais. Para DoE de formulação estudou-se a influência da concentração de tensoativos e de material lipídico na formulação, e a proporção de lauril sulfato de sódio entre os tensoativos. Já para o DoE de processamento, estudou-se a influência da pressão, temperatura e tempo de processamento.

Os parâmetros definidos como mais adequados foram utilizados para preparação de formulações de NL contendo um corante lipofílico como modelo de substância a ser incorporado nos nanocarreadores e posteriormente veiculados em diluentes em pó para elaboração de formas sólidas. As misturas em pó foram caracterizadas quanto à umidade, tamanho de partícula, volume passante e número passante por difração a laser e espalhamento dinâmico de luz, zeta potencial, recuperação do Oil Red e dessorção das nanopartículas dos excipientes. Através das propriedades físico-químicas encontradas foi possível propor uma formulação de pó e cápsulas.

2.OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Estabelecer a melhor combinação de parâmetros de formulação e processo para obtenção de nanopartículas lipídicas através de homogeneização em alta pressão, com adequado tamanho de partícula (200 – 500 nm), em um perfil de distribuição monomodal para posterior liofilização e obtenção de insumo nanoestruturado para veiculação em formas farmacêuticas sólidas.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar DoE de formulação para obtenção do melhor padrão qualitativo e quantitativo dos excipientes.
- Realizar DoE de processo para obtenção dos melhores parâmetros de processo no homogeneizador de alta pressão (NanoDebee).
- Caracterizar as dispersões de nanopartículas lipídicas em relação ao tamanho de partículas, distribuição, uniformidade e potencial zeta.

- Incorporar as dispersões de NL em diluentes em pó para preparação de formas farmacêuticas sólidas.
- Caracterizar as amostras liofilizadas de NL incorporadas em diluentes em pó, em relação à umidade, teor e liberação das nanopartículas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- Behenato de glicerilo (Compritol[®] 888 CG ATO, Gatefosse, São Paulo – SP, Brasil).
- Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Polymol[®] 812, Aqia, São Paulo – SP, Brasil).
- Polivinilpirrolidona K30 (Kollidon[®] K30, Basf, São Paulo – SP, Brasil)
- Polissorbato 80 (Tween 80, Labsynth, Diadema – SP, Brasil).
- Lauril sulfato de sódio (Mapric, São Paulo – SP, Brasil).
- Água purificada por osmose reversa, MiliQ.
- Etanol (Scharlau, São Paulo – SP, Brasil).

3.2. Equipamentos

- Homogeneizador de alta pressão – HAP (NanoDeBEE, Bee International Inc, South Easton - MA, Estados Unidos da América).
- Agitador magnético com aquecimento (HSC, Velp Scientifica, Usmate Velate – MB, Itália).
- Balança analítica (Shimadzu modelo AY220, Sinc do Brasil, São Paulo – SP, Brasil).
- Analisador de Partículas (Cilas, Modelo 1190. Orleans - França).
- Liofilizador (Liobras, Modelo Liotop L108, São Carlos - SP, Brasil).
- Banho Maria (Marte científica, modelo SSD-5L, São Paulo – SP, Brasil).
- Espectrofotômetro UV (Thermo, modelo Evolution 210, São Paulo - SP, Brasil).
- Balança para análise de umidade (Radwag modelo MAC 210, China).
- Phmetro (Hanna Instruments Brasil, modelo 14633, Brasil).

- Centrífuga de solo refrigerada (THERMO, modelo Sorvall RC-6 Plus, Brasil)

3.3. Definição das variáveis independentes para proposição dos DoEs de formulação e processo

Um sistema emulsionado, como é o caso das nanopartículas lipídicas, implica em escolhas e ações que podem ser classificadas em três categorias de acordo com o tipo de variáveis que estejam envolvidas (SALAGER, 2000). As duas primeiras escolhas estão relacionadas a quais compostos utilizar para fazer a emulsão e à quantidade de cada um deles. A terceira está relacionada à metodologia de preparo da nanoemulsão. A primeira escolha a ser feita envolve a natureza das substâncias que irão compor a emulsão, ou seja, fase oleosa, fase aquosa e os estabilizantes (tensoativos e co-tensoativos).

A concentração de fase oleosa pode interferir diretamente nas propriedades da emulsão formada. Sabe-se, por exemplo, que uma maior quantidade de fase oleosa pode exigir uma maior concentração de tensoativos para estabilizá-la (MANDAWGADE, PATRAVALE, 2008). Além disso, a maior quantidade de material a ser disperso resulta em incremento de viscosidade, isso porque o aumento da quantidade de fase dispersa leva ao aumento do número de partículas e, conseqüentemente, aumento da quantidade de moléculas de água ancoradas à superfície das partículas, reduzindo a quantidade de água livre.

Adicionalmente, deve-se considerar que ao processar a formulação de emulsão ordinária para obtenção de nanopartículas lipídicas tem-se um aumento da área superficial total das partículas dispersas, exigindo maior quantidade de tensoativo para estabilizar o sistema nanoestruturado, visto que as partículas menores, em número exponencialmente maior, resultam em um aumento proporcional da área interfacial óleo/água. A variação da quantidade de fase oleosa no sistema emulsionado pode ainda alterar a capacidade de encapsulação dos fármacos lipofílicos pela nanoestrutura. A natureza dos lipídios utilizados também é determinante para a formação de um nanocarreador lipídico estável e capaz de veicular o fármaco de interesse (MANDAWGADE, PATRAVALE, 2008). Assim, é

necessário conhecer as propriedades físico-químicas dos componentes lipídicos, a miscibilidade entre eles e a capacidade de solubilização do bioativo.

Nesse contexto, lipídios sólidos tenderão a gerar partículas mais estáveis e rígidas podendo oferecer uma liberação mais prolongada em razão da maior retenção dos fármacos no interior das partículas. Por outro lado, carreadores lipídicos constituídos exclusivamente por lipídios sólidos apresentam maior tendência a recristalização, e conseqüente expulsão do fármaco do interior das nanopartículas (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

Nesse trabalho buscou-se avaliar a influência da concentração da fase oleosa em dois níveis 10 e 20% p/p, a partir de uma proporção fixa (4:6) de lipídios líquido (triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico - Polymol® 812) e sólido (behenato de glicerilo - Compritol® 888 CG ATO). Ambos os lipídios são bastante utilizados na elaboração de nanocarreadores para administração em diferentes vias e para veiculação de fármacos de diferentes classes terapêuticas (MEHNERT, MADER, 2001).

Os outros dois fatores de formulação considerados foram referentes aos tensoativos utilizados. Os tensoativos são parte essencial para obtenção e estabilização de nanopartículas lipídicas. Esses materiais com características anfifílicas são capazes de se posicionarem entre as fases aquosa e oleosa, reduzindo a tensão interfacial entre elas e, assim, favorecendo a dispersão de uma fase no interior da outra (PADOVANI, 2015). Além disso, como dito anteriormente, o processamento da emulsão ordinária ou preliminar para formação de partículas de dimensões nanométricas leva a um aumento significativo da área superficial total da fase oleosa exposta ao meio aquoso, logo, um excesso de tensoativo faz-se necessário na elaboração da emulsão preliminar (PADOVANI, 2015). Nesse trabalho buscou-se utilizar como tensoativo principal o polissorbato 80 (Tween 80), tensoativo não-iônico cujo uso em formulações farmacêuticas de administração oral é bastante difundido (ZHANG *et al.*, 2006). Além disso, existem diversos trabalhos na literatura que descrevem o uso de polissorbitos na elaboração de sistemas nanoestruturados (ZHANG *et al.*, 2006).

Tendo em vista que a concentração de tensoativos na formulação assume papel importante para a formação do sistema emulsionado, possibilitando a redução do tamanho de partícula e favorecendo a manutenção da estabilidade do sistema disperso, buscou-se avaliar a influência da concentração de tensoativos (4 e 8% p/p)

na formação do sistema nanoestruturado. Além disso, tendo em vista que formulações com alta carga superficial (potencial zeta superior a 30mV em módulo), tendem a apresentar maior estabilidade devido a repulsão entre as partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003), considerou-se como terceiro fator de formulação a proporção do tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio incluído na formulação. O lauril sulfato de sódio possui alta capacidade emulsionante podendo favorecer a obtenção de nanopartículas menores com menor concentração de tensoativos na formulação. Neste estudo, o lauril sulfato de sódio foi utilizado nas proporções de zero e 10 % p/p do total de tensoativos.

Conforme mencionado anteriormente, a terceira categoria de fatores que podem interferir na obtenção de sistemas emulsionados convencionais e nanoestruturados diz respeito ao processo de fabricação, em que os parâmetros de temperatura, agitação e tempo de processamento assumem especial importância.

A temperatura é parâmetro físico essencial capaz de levar a variações de estado físico, viscosidade e densidade das fases aquosas e oleosa, impactando diretamente nas propriedades e qualidade da emulsão formada (BRANNON-PEPPAS, 2003). O aquecimento favorece a fusão dos lipídios sólidos, assim como reduz a viscosidade das fases aquosa e oleosa, o que possibilita uma melhor dispersão de uma fase no interior da outra colaborando para a redução do tamanho das partículas. Nesse sentido, formulações de nanocarreadores lipídicos tendem a apresentar menor tamanho de partículas quando produzidas em temperaturas elevadas (BRANNON-PEPPAS, 2003). Por outro lado, o aquecimento de formulações sempre deve ser controlado, visto que as reações químicas são favorecidas a altas temperaturas, o que pode resultar na degradação do fármaco ou outros componentes, comprometendo a qualidade da formulação. Ainda, o aumento da temperatura favorece a dissolução dos fármacos nas fases aquosas e oleosas podendo alterar a partição deles nessas fases, comprometendo a eficiência de encapsulação do fármaco frente ao sistema em estudo (WAGHMARE A. *et al.*, 2012).

Outros dois parâmetros importantes para o processamento de nanopartículas lipídicas em homogeneizador de alta pressão a partir de emulsão preliminar referem-se à pressão e o tempo de processamento. Esses dois parâmetros são determinantes para a obtenção de sistemas que atendam ao pretendido quanto às propriedades das nanoestruturas formadas.

A pressão é o parâmetro fundamental no processo de homogeneização de alta pressão, visto que quanto maior, maiores as forças de cisalhamento, cavitação e choque no interior da câmara de interação, tornando o processo mais efetivo para a redução do tamanho das partículas lipídicas originárias da emulsão preliminar para a formação das nanopartículas (SCHWARZ, 2004).

Da mesma forma, o tempo de processamento possui papel essencial para que se possa atingir a homogeneidade de tamanho de partícula pretendida para o sistema nanoestruturado (DIMER *et al.*, 2013, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014, BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

O tempo de processamento deve ser adequado de modo a garantir que toda a formulação possa passar pela câmara de interação do equipamento em número de vezes suficiente para que a fragmentação das gotículas atinja o nível desejado. Assim, tempos muito reduzidos de processamento podem resultar em alta dispersidade (SPAM) de tamanhos, e perfil polimodal. Ao contrário, o sobreprocessamento das formulações além de favorecer a degradação pode conduzir a desestabilização do sistema. Isso foi observado por Jakupec (2003) que verificaram que o excesso de tempo de processamento de amostras de nanopartículas lipídicas no homogeneizador de alta pressão resultou em partículas maiores e perda de estabilidade (JAKUPEC *et al.*, 2003).

Portanto, para execução desse trabalho estabeleceu-se como variáveis de processo em dois níveis distintos a temperatura (30 e 70°C), pressão (5.000 e 15.000 psi) e tempo de processamento (5 e 15 min).

3.4. DoE para variáveis de formulação e processo na obtenção de nanopartículas lipídicas

A fim de definir as melhores condições para obtenção de formulação de nanopartículas lipídicas para posterior encapsulação na fase oleosa de fármacos de baixa solubilidade em meio aquoso e veiculação em formas farmacêuticas sólidas, foram propostos dois planejamentos experimentais, um de formulação e outro de processo, utilizando ferramenta de DoE (*Design of experiments*) disponível no programa computacional Minitab®, versão 18.1.

As formulações foram delineadas através de planejamento estatístico fatorial completo do tipo 2^3 adicionados três pontos centrais, considerando dois níveis para cada um dos três fatores, porcentagem total de tensoativos (%TA - 4% e 8%), proporção de lauril sulfato de sódio (LSS) na mistura de tensoativos (%LSS \rightarrow TA - 0% e 10%) e porcentagem de fase oleosa (%FO - 10% e 20%). No delineamento, foram adicionadas 3 repetições no ponto central resultando em mais três formulações com 6% de tensoativo total, 5% de LSS em relação a concentração total de tensoativos e 15% de fase oleosa. A Figura 2.1 representa o *experimental space* (o espaço de exploração experimental) envolvido no conjunto de experimentos planejados e a Tabela 2.1 apresenta todas as variações de formulação elaboradas a partir do processo de homogeneização em alta pressão referente ao ponto central do DoE de processo.

Figura 2.1. DoE de formulação representando o *experimental space* para o estudo. Fonte: próprio autor.

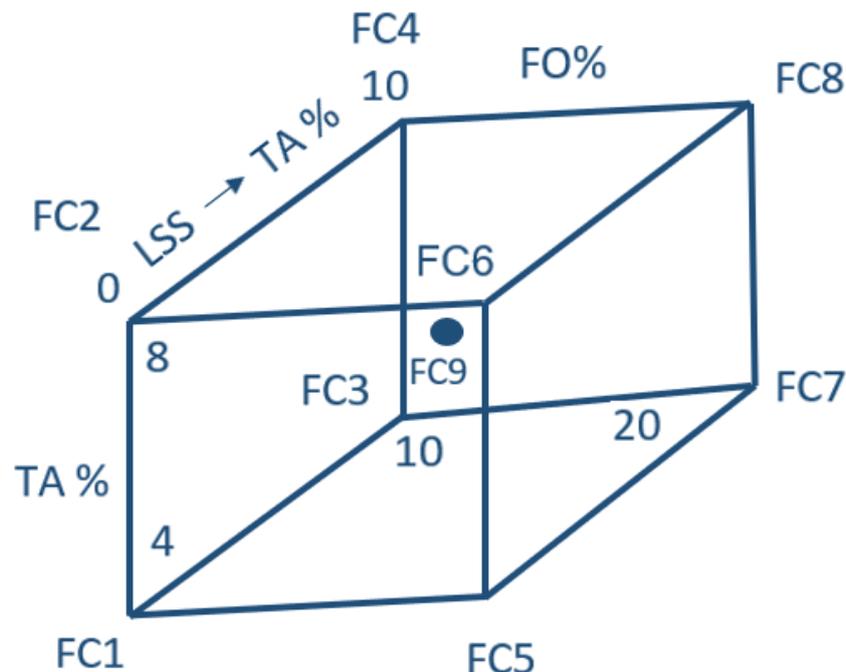


Tabela 2.1. Formulações elaboradas a partir de DoE 2³ adicionados três pontos centrais para obtenção de nanopartículas lipídicas considerando variáveis de formulação.

Formulações											
Ordem											
Padrão das formulações	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
Ordem dos ensaios	10	5	2	3	1	6	11	9	4	7	8
DoE 2 ³ - fatores e níveis											
%TA ¹	4	8	4	8	4	8	4	8	6	6	6
%LSS → TA ²	0	0	10	10	0	0	10	10	5	5	5
%FO ³	10	10	10	10	20	20	20	20	15	15	15
Composição (% p/p)											
Behenato de glicerila	6	6	6	6	12	12	12	12	9	9	9
Triglicerídeos do ácido cáprico/ Caprílico	4	4	4	4	8	8	8	8	6	6	6
Polissorbato 80	4	8	3,6	7,2	4	8	3,6	7,2	5,7	5,7	5,7
Lauril sulfato de sódio	0	0	0,4	0,8	0	0	0,4	0,8	0,3	0,3	0,3
Polivinil-pirrolidona k30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Água purificada	85	81	85	81	75	71	75	71	78	78	78

¹%TA: porcentagem total de tensoativos; ²%LSS → TA: proporção de lauril sulfato de sódio na mistura de tensoativos; ³%FO: porcentagem de fase oleosa.

Também para as variáveis de processo, foi utilizado DoE 2³ adicionados três pontos centrais, para avaliar a interferência de 3 variáveis independentes de processamento (fatores) em dois níveis na obtenção de dispersões de nanopartículas lipídicas, sendo elas o tempo de processamento (5 e 15 minutos), a pressão de processamento (5.000 e 15.000 psi) e a temperatura de processamento (30 e 70°C). Também nesse estudo o DoE foi adicionado de ponto central (10 minutos, 10.000 psi e 50°C) em triplicada para avaliação da reprodutibilidade do método e fixação do

design space, totalizando 11 experimentos. A Figura 2.2 representa o *experimental space* envolvido no conjunto de experimentos planejados e a Tabela 2.2 apresenta todas as variações de processo aplicadas para a formulação referente ao ponto central do DoE de formulação.

Figura 2.2 DoE de processo representando o *experimental space* para o estudo. Fonte: próprio autor.

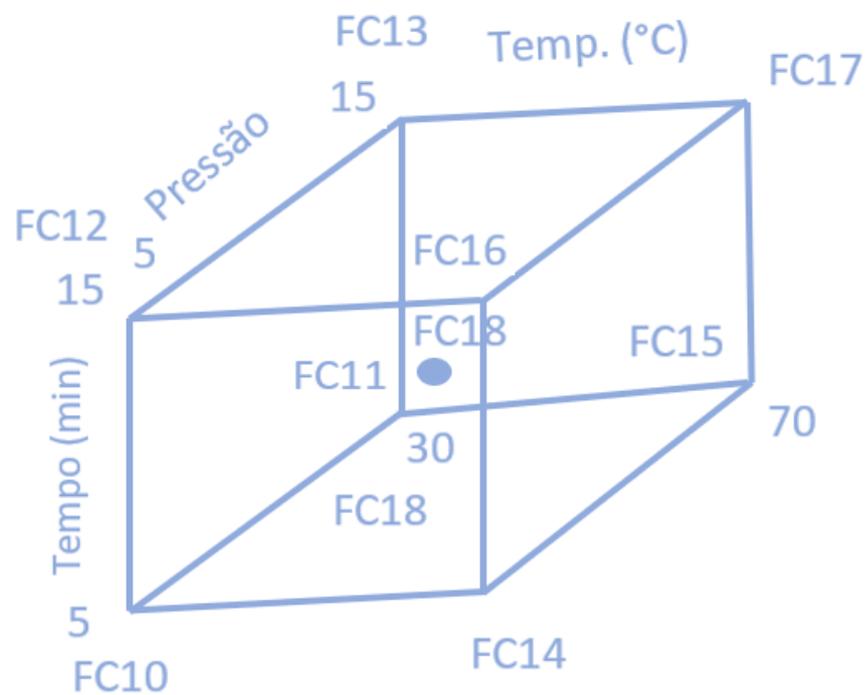


Tabela 2.2 Delineamento experimental 2³ adicionados três pontos centrais para obtenção de nanopartículas lipídicas considerando variáveis de processo.

Formulações ¹											
Ordem Padrão											
das	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
formulações											
Ondem dos	6	2	7	10	8	9	1	5	11	4	3
ensaios											
DoE 2 ³ - fatores e níveis de processamento											
Tempo (min)	5	5	15	15	5	5	15	15	10	10	10
Pressão x	5	15	5	15	5	15	5	15	10	10	10
10 ³ (psi)											
Temp. (°C)	30	30	30	30	70	70	70	70	50	50	50

1- A composição da formulação utilizada foi equivalente à FC9, descrita no DoE de formulação, Tabela 2.1.

As variáveis dependentes avaliadas para as 22 formulações obtidas foram pH, tamanhos médios em volume e número passante, tamanho em d50% e SPAM (dispersidade) em volume passante e razão de uniformidade (RU) para os tempos zero (análise imediatamente após a obtenção das formulações), 1, 7, 14, 21, 27, 35, 42 e 49 dias.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística do experimento por superfície de resposta utilizando software Minitab 18.1, considerando os fatores significantes quando $p < 0,05$. Gráficos de Pareto foram apresentados para identificação dos elementos principais para cada variável independente isoladas, quadráticas e em associação com outra variável.

3.5. Processo de obtenção das nanopartículas lipídicas

As dispersões de nanopartículas lipídicas foram obtidas por processo de emulsificação de material lipídico sólido (behenato de glicerila – BHG) e líquido (triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico – TCC) da fase oleosa com a fase aquosa composta por polivinilpirrolidona (PVP K30), lauril sulfato de sódio (LSS), um

tensoativo aniônico e polissorbato 80 (TW80) um tensoativo não iônico, todos dissolvidos em água purificada.

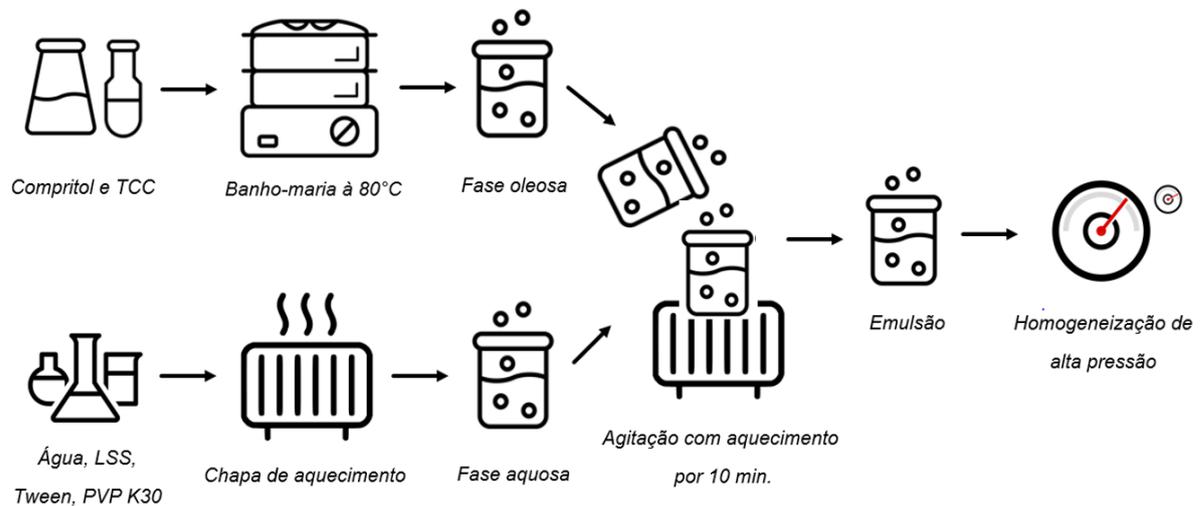
As fases aquosa e oleosa foram aquecidas em banho-maria a 5 °C acima do ponto de fusão do material lipídico (cerca de 80 °C), e a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante utilizando agitador magnético. Após a finalização da transferência, a emulsão foi mantida sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, a emulsão previamente preparada foi submetida ao processo de homogeneização por alta pressão - HAP (Nano DeBEE®) conforme os parâmetros de tempo, temperatura e pressão previamente descritos. O processo foi conduzido em sistema fechado, ou seja, com circulação contínua da preparação, e contrapressão de 1.500 psi. A figura 2.3 ilustra o homogeneizador de alta pressão (Nano DeBEE) e a figura 2.4 o processo de obtenção das formulações de nanopartículas lipídicas.

Figura 2.3. Ilustração esquemática do homogeneizador de alta pressão (Nano DeBEE) e do processo de homogeneização por alta pressão. Fonte: Adaptado de Nano DeBEE Laboratory Homogenizer - HTSS.



As formulações obtidas, conforme os DoEs propostos, foram analisadas para os mesmos parâmetros citados no item 3.4. Os dados coletados a partir da avaliação das variáveis dependentes foram submetidos a análise estatística de experimento de superfície de resposta utilizando software Minitab 18.1, considerando os fatores significantes quando $p < 0,05$. Gráficos de Pareto foram apresentados para identificação dos elementos principais para cada variável independente isoladas e quadráticas e a associação com entre variáveis.

Figura 2.4. Ilustração esquemática do processo de obtenção da formulação emulsionada para posterior preparação do sistema nanoparticulado. Fonte: próprio autor.



3.6. Caracterização das dispersões de nanopartículas lipídicas

3.6.1. Descrição dos aspectos físicos

A descrição dos aspectos físicos das amostras foi acompanhada nos tempos zero, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias. Parâmetros como consistência, separação de fases e coloração foram observados e descritos durante o estudo. Os aspectos físicos foram categorizados de 1 a 4, sendo o valor 1 atribuído ao aspecto físico menos intenso, enquanto o valor 4 foi atribuído ao mais intenso.

3.6.2. Análise de pH

O pH das amostras foram acompanhadas nos tempos zero, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias. A análise foi conduzida com as amostras à 25 °C em pHmetro sem a realização de diluições das amostras (Hanna Instruments Brasil, modelo 14633, Brasil).

3.6.3. Tamanho de partícula

O tamanho das nanopartículas é uma resposta muito importante pois está relacionada com a habilidade destas partículas atravessarem as barreiras biológicas de forma seletiva, conseguindo atingir os sítios de ação específicos, podendo ser células, tecidos ou órgãos. (JORNADA et. al., 2012).

As nanopartículas formadas foram caracterizadas quanto a sua distribuição do tamanho por difração a laser (Static Light Scattering - SLS) em Analisador de Partículas (Modelo Cilas 1190, Orleans - França), utilizando a leitura na faixa de 0,040 μm – 2.500 μm aplicando o modelo de Mie, considerando índices de refração de 1,333 e 1,460, para o meio aquoso de dispersão e material lipídico constituinte das nanopartículas, respectivamente. Nessa técnica foram registrados os valores de tamanho expressos em volume passante e em número passante. Enquanto o primeiro considera o volume das partículas para determinar a distribuição de tamanhos, o segundo considera a distribuição de tamanhos a partir do número absoluto de partículas para uma determinada faixa. Foram determinados os valores de d10, d50 e d90%, para efeito do cálculo de dispersidade ($\text{Spam} = (d90 - d10)/d50$), sendo admitidos valores próximos a 2,0 como adequados.

Além disso, os valores de diâmetro médio (dm) expressos em volume e número passante foram registrados e a razão entre ambos foi determinada, sendo denominado razão de uniformidade ($\text{RU} = (\text{dm}_{\text{volume passante}}/\text{dm}_{\text{número passante}})$). Para RU, valores iguais a 1,0 podem ser considerados como indicador de uniformidade perfeita para o sistema de nanopartículas formada, visto que os tamanhos médios seriam idênticos. Na prática, verifica-se que valores próximos a 5,0 já indicam uma boa uniformidade do sistema nanoparticulado.

Para efeito da avaliação dos parâmetros de formulação e processamento na obtenção das nanopartículas lipídicas, foram considerados como variáveis dependentes relacionadas ao tamanho os valores de tamanho médio expressos em volume e número passante, os valores de Spam em volume passante, os valores de RU e os valores de d50% em volume passante, que representam a mediana da distribuição de tamanho da população de nanopartículas das dispersões analisadas.

3.6.4. Estabilidade das formulações de dispersão de nanopartículas

Logo após a realização de cada um dos 22 experimentos, sendo 11 relacionados à variáveis de formulação e 11 a variáveis de processo, amostras foram analisadas para cada um dos parâmetros já citados e, posteriormente, mantidas em temperatura ambiente (25 °C), em frascos ampolas de vidro tipo I, incolores, de 30 mL, para análise dos mesmos parâmetros nos tempos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias, para verificar a estabilidade das nanopartículas com variação em função do tempo e assim escolher a melhor formulação e processo.

3.7. Preparo da Curva Analítica de Oil Red

Nesse trabalho, o corante lipofílico Oil Red (OR) foi utilizado como substância marcadora, de fácil quantificação na faixa do espectro eletromagnético visível entre 500 e 550 nm, de modo a permitir a avaliação do sistema por espectrofotometria de modo simples, rápido e barato, fornecendo boa especificidade para análise.

Para definição dos picos de máxima absorção, uma solução a 5 mg/mL de OR em triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (TCC) foi diluída em etanol absoluto até concentração de 0,020 mg/mL, sendo, em seguida, analisada por espectrofotometria de UV-vis na faixa de 200 a 600 nm. Os picos foram registrados, sendo selecionado para construção da curva analítica aquele com melhor especificidade e boa absorvidade.

Para construção da curva analítica foram preparadas diluições em etanol absoluto da solução de OR em TCC para a faixa de concentração de 0,78 a 25 µg/mL e analisadas em espectrofotômetro em $\lambda = 511$ nm, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Etanol absoluto foi utilizado como branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados de absorbância coletados foram relacionados com a concentração sendo realizada a regressão linear para avaliação da correlação entre concentração e absorbância e avaliação da linearidade de resposta.

3.8. Definição do solvente para extração do OR das nanopartículas lipídicas

A fim de determinar a quantidade de OR presente nas formulações de nanopartículas em desenvolvimento deve-se garantir que toda a formulação esteja solúvel no meio para que o fármaco, ou neste caso o corante lipofílico possa ser quantificado. Assim, buscou-se definir um solvente ou sistema solvente capaz de solubilizar o lipídio sólido, behenato de glicerila, formador da matriz lipídica da nanopartícula. Para tanto, amostras de 1 g do lipídio foram adicionados de 10mL dos solventes DMSO, acetonitrila, acetona, metanol, etanol, propilenoglicol, isopropanol, n-octanol e acetato de etila.

A solubilização foi observada por inspeção visual, após 1h de contato com os solventes a temperatura ambiente, seguida por 1h de contato à temperatura de 40°C e, por fim após 24 horas de contato a temperatura ambiente. As amostras de behenato de glicerila foram consideradas solúveis quando não se verificava resíduo de amostra no interior do solvente.

3.9. Preparação das Nanopartículas lipídicas contendo OR (NL-OR)

Cinquenta gramas de dispersão de nanopartículas lipídicas contendo OR (NL-OR) foram preparadas conforme descrito no item 3.5, sendo que o TCC foi substituído pela solução a 5 mg/mL de OR em TCC. A formulação de nanopartículas contendo OR (NL-OR) encontra-se descrita na Tabela 2.3, sendo utilizado como parâmetros de processo pressão de 12.000 psi, 70 °C de temperatura do reservatório da dispersão de NL e 15 minutos de processamento.

A fim de possibilitar a comparação do sistema nanoparticulado com OR (NL-OR) e sem o OR encapsulado preparou-se também formulação de NL sem a adição de OR (NL-BR).

As formulações foram avaliadas quanto ao tamanho por difração a laser, espalhamento dinâmico de luz laser, potencial zeta e teor de OR. Posteriormente as dispersões foram incorporadas em diluentes em pó para formas sólidas, liofilizadas e avaliadas quanto a umidade residual liberação das nanopartículas e o teor de OR nos diluentes incorporados.

Tabela 2.3 Composição da formulação de nanopartículas lipídicas para veiculação do marcador OR a partir dos estudos em DoE de formulação e processo.

Componentes	Quantidade (p/p)
Solução de Oil Red em triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (5mg/mL)	4,0
Behenato de glicerila	6,0
Polissorbato 80	8,0
Polivinilpirrolidona K30	1,0
Água purificada	81,0

3.10. Caracterização das dispersões de nanopartículas NL-OR e NL-BR

3.10.1. Difração a laser

Amostras das dispersões de NL foram avaliadas por difração a laser conforme previamente descrito no item 3.6.3.

3.10.2. Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz, também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons foi conduzido em equipamento Litisizer (Anton Paar) utilizando-se o ângulo de 90° a temperatura de 25°C, com as amostras diluídas em água purificada.

Todas as medidas foram determinadas em relação à volume, intensidade e número de D10, D50 e D90.

3.10.3. Zeta potencial

O potencial zeta refere-se a intensidade de carga elétrica presente na superfície das partículas geradas a partir dos íons ancorados (camada fixa) e os contra-íons livres no meio (camada móvel), a qual vai perdendo intensidade da superfície da partícula para o meio de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Para a medida de potencial zeta as 1 mL das amostras foram diluídas em 9 mL de água purificada e analisadas em equipamento Litisizer (Anton Paar). Todas as medidas foram determinadas em relação ao potencial zeta médio, pico de distribuição, intensidade média e condutividade.

3.10.4. Teor de OR

O teor de OR nas dispersões de NL foi determinado pela dissolução de cerca de 0,5g de dispersão em 10mL de etanol absoluto. Após completa homogeneização, as amostras das dispersões de NL com e sem OR foram centrifugadas à 10.000 rpm por 20 minutos e os sobrenadantes analisados em espectrofotômetro UV-vis a 511 nm. Os valores de absorbância foram registrados e posteriormente aplicados na equação da reta da curva analítica de OR em etanol. A recuperação de OR foi determinada pela relação percentual entre a concentração determinada e a concentração teórica.

3.11. Incorporação das dispersões de NL em diluentes em pó para preparação de formas farmacêuticas sólidas.

Existem diversos estudos sendo conduzidos para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para veiculação de fármacos para as mais diferentes vias de administração (SILVA *et al.*, 2011). Entretanto, a formulação final para administração dos nanocarreadores restringisse, essencialmente às dispersões coloidais, onde as nanopartículas encontram-se suspensas em um meio aquoso para ser administrado (SILVA *et al.*, 2011). As dispersões coloidais apesar de muito utilizadas apresentam uma série de desvantagens como a possibilidade de difusão do fármaco encapsulado durante armazenamento, aglomeração das partículas, favorecimento de reações de decomposição e crescimento microbiano (SEVERINO *et al.*, 2017). Nesse sentido as formulações sólidas são alternativas a tais dispersões coloidais, entretanto, pouca atenção tem sido dada a transformação das dispersões coloidais em pó para posterior veiculação em formas sólidas.

Nesse trabalho propomos utilizar diluentes comumente empregados em formas farmacêuticas sólidas como adsorventes para reter as dispersões de nanopartículas lipídicas para que sejam transformadas em insumos em pós para

veiculação em formas farmacêuticas sólidas como pós e cápsulas. Assim as dispersões de NL contendo ou não OR foram incorporadas aos diluentes celulose microcristalina 102 (MCC102), 200 (MCC200) e no amido pré-gelatinizado (APG), nas proporções de DLT:NL (diluyente de formas sólidas: dispersão de nanopartículas lipídicas) 7:3, 5:5 e 3:7, pela simples adição de quantidades proporcionais de dispersão de NL para que fosse atingida massa final de 3,0 g de mistura. Diluentes e NL foram homogeneizados em gral de vidro com auxílio de espátula e posteriormente congelados à -20°C por 24h. Após, amostras foram submetidas à liofilização por 48 h, sob vácuo de 26 µm Hg e temperatura do condensador de - 56°C (Liobras, Modelo Liotop L108, São Carlos - SP, Brasil). As amostras liofilizadas foram armazenadas em frascos com tampa rosca envolvidos em parafilme e mantidos à temperatura ambiente para caracterização.

3.12. Caracterização das amostras liofilizadas de NL incorporadas em diluentes em pó

3.12.1. Umidade relativa

Cerca de 0,2 g de cada uma das amostras liofilizadas foram analisadas quanto a umidade residual em balança para determinação de umidade provida com lâmpada halógena com aquecimento até 120 °C (Radwag modelo MAC 210, China). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.12.2. Liberação de nanopartículas

O ensaio de liberação de nanopartículas foi realizado para avaliação das propriedades das misturas DLT:NL em pó em liberar as nanopartículas para o meio, permitindo que interajam com o meio biológico mais intimamente e, assim, possam sofrer absorção de forma íntegra ou sejam digeridas ou mesmo liberem o fármaco gradualmente.

Nesse ensaio, cerca de 1,0 g de dispersão em pó das NL (liofilizado entre os diluentes de formas sólidas e as NL) foram adicionadas de 10 mL de água e submetidos a agitação vigorosa em agitador de tubos por 10 minutos. Após, as

amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 10.000 rpm e os sobrenadantes recolhidos e analisados por difração a laser, sendo registrados os valores de tamanho em volume e número passante. Também foram registradas as porcentagens de partículas com dimensões iguais ou inferiores à 500 e 1000 nm em volume passante e em 100 e 300 nm em número passante.

3.12.3. Teor de OR nas dispersões em pó de NL

Para determinação do teor de OR nas nanopartículas lipídicas tomou-se amostra de cerca de 100 mg de dispersão em pó de NL e adicionou-se 2,5 mL de etanol, sendo mantido sob agitação em agitador magnético por 1 hora. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos (Centrífuga refrigerada Thermo) e o sobrenadante analisado diretamente em espectrofotômetro à 511 nm. Os valores de absorvância foram aplicados à equação da reta da curva analítica e o teor de OR determinado. A recuperação de OR foi determinada pela relação percentual entre a quantidade de OR determinada e a quantidade teórica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos delineamentos projetados para o estudo, com planejamento estatístico fatorial do tipo 2^3 adicionados três pontos centrais para formulação, considerando dois níveis para cada um dos três fatores, porcentagem total de tensoativos (%TA - 4% e 8%), proporção de lauril sulfato de sódio (LSS) na mistura de tensoativos (%LSS TA - 0% e 10%) e porcentagem de fase oleosa (%FO - 10% e 20%) e delineamento do tipo 2^3 adicionados três pontos centrais foi realizado para os parâmetros de processo tempo (5 e 15 minutos), pressão (5000 psi e 15000 psi) e temperatura (30°C e 70°C) foram realizadas as análises das amostras e reportadas nos resultados, assim como as caracterizações das nanopartículas adicionadas aos diluentes.

4.1. Análise de pH e aspectos físicos

Os valores de pH das formulações produzidas a partir dos DoEs de formulação e processo são apresentados nas Tabelas 2.3 e 2.4. Todos os valores de pH mostraram-se levemente ácidos (pH 5,0 (FC11) a pH 6,5 (FC9C)) após o processamento por homogeneização em alta pressão, estando abaixo da neutralidade (pH = 7,0). Após acompanhamento da estabilidade por 49 dias verificou-se que a maioria das formulações apresentaram um decaimento do pH (pH 4,3 (FC18A) a pH 6,01 (FC3)).

Valores de pH próximo ao neutro (6,0 – 8,0) tendem a ter interferência mínima na estabilidade do sistema emulsionado, especialmente no que diz respeito a hidrólise de mono, di e triglicerídeos (MANDAWGADE, PATRAVALE, 2008), como o TCC, ao contrário de valores elevados (8,0 – 14,0) ou muito reduzidos que favorecem a decomposição desses compostos pelo favorecimento das reações de hidrólise nessas faixas de pH. O TCC é capaz de sofrer hidrólise gerando os ácidos graxos livres cáprico e caprílico, resultado em redução do pH. Isso fica claro ao verificar-se os menores valores de pH após 49 dias para 3 das 4 formulações contendo 20% de fase oleosa (Tabela 2.3).

Ao contrário, o processo de homogeneização de alta pressão parece não interferir na acidificação das formulações após 49 dias de acompanhamento da estabilidade, visto que as condições mais estressantes para o sistema, não levaram a maior redução de pH.

Os resultados da inspeção visual das formulações quanto a consistência, turbidez e a separação de fases estão expressos nas Tabelas 2.4 e 2.5. Referente à separação de fases nenhuma das formulações apresentou qualquer sinal de separação, mantendo-se como sistemas homogêneos ao longo de todo o estudo. Todas as amostras demonstraram o mesmo aspecto de turbidez (brancas e opacas). As consistências das amostras variaram de 1- baixíssima (água); 2- baixa (azeite); 3- média (glicerina); 4- alta (creme).

A consistência das amostras aumentou com o aumento da fase oleosa e esse aspecto é favorecido pelo aumento das concentrações de tensoativos. Nesse trabalho busca-se desenvolver dispersão de nanopartículas para incorporação em diluentes para compressão direta, visando a secagem para utilização como insumo

para elaboração de formas farmacêuticas sólidas. Assim, formulações com maior consistência podem apresentar maior dificuldade de permear e se distribuir pela superfície e poros dos diluentes em pó, comprometendo o processo de incorporação. Nesse sentido, formulações de baixa consistência (1 e 2) foram consideradas de maior interesse para posterior incorporação aos diluente em pó, como celulose microcristalina e amido pré-gelatinizado.

Tabela 2.4. Avaliação do pH e consistência frente ao tempo de armazenamento à temperatura ambiente, para o DoE das formulações de nanopartículas lipídicas considerando as variáveis de formulação.

Tempo (dias)	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
	Ph										
0	5,92	5,70	5,79	5,96	5,30	5,60	5,86	5,75	5,55	6,35	6,50
1	5,59	5,68	6,10	5,95	5,40	5,65	5,86	5,77	6,01	5,93	5,97
7	5,30	5,93	6,20	6,50	5,25	5,92	5,19	5,61	5,87	5,09	5,79
14	5,32	5,53	6,14	5,93	5,30	5,70	5,16	5,61	5,76	5,14	5,52
21	5,32	5,49	5,91	5,93	5,20	5,61	5,09	4,96	5,56	4,83	5,37
28	5,13	5,41	6,08	5,47	5,24	5,47	5,27	4,96	5,20	5,00	5,25
35	5,26	5,31	5,66	5,22	5,08	5,14	5,45	4,97	5,43	4,85	5,38
42	5,21	5,30	5,82	5,14	5,04	5,25	5,24	4,71	5,27	4,88	5,33
49	5,27	5,10	6,01	5,00	4,97	4,97	5,82	4,91	5,07	5,13	5,66
	Consistência										
0	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
14	1,00	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
21	1,00	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	1,00	3,00	1,00	1,00	3,00
28	2,00	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	1,00	3,00	1,00	1,00	3,00
35	2,00	2,00	1,00	2,00	4,00	4,00	1,00	3,00	1,00	1,00	3,00
42	2,00	2,00	1,00	3,00	4,00	4,00	1,00	3,00	1,00	1,00	4,00
49	2,00	2,00	1,00	3,00	4,00	4,00	1,00	3,00	1,00	1,00	4,00

Destaque vermelho representa os piores resultados e destaque azul os melhores resultados.

Tabela 2.5. Avaliação do pH e consistência frente ao tempo de armazenamento à temperatura ambiente, para o DoE das formulações de nanopartículas lipídicas considerando as variáveis de processo.

Tempo	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
	pH										
0	5,30	5,0	5,33	5,23	5,50	5,42	5,14	5,74	5,39	5,44	5,24
1	5,35	5,53	5,31	5,32	5,18	5,43	5,55	5,73	6,15	5,95	5,68
7	5,57	5,88	4,90	5,30	4,85	5,11	5,69	5,27	5,96	5,41	5,21
14	5,64	5,26	4,86	5,22	4,97	5,23	5,13	5,25	4,42	4,68	5,28
21	5,13	5,00	5,05	4,95	5,10	5,36	5,38	5,32	4,00	4,36	5,31
28	5,14	4,77	5,08	5,52	5,50	5,63	5,26	5,44	3,79	4,96	5,30
35	5,32	4,73	5,36	5,29	5,44	5,39	5,23	5,18	4,09	4,55	5,25
42	5,06	5,21	5,36	5,45	5,57	5,54	5,79	5,13	4,56	4,45	5,20
49	5,19	4,93	5,42	5,31	5,28	5,29	5,59	5,51	4,30	4,52	5,28
Consistência ¹											
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00
14	2,00	1,00	2,00	1,00	3,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00
21	3,00	1,00	3,00	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00
28	3,00	1,00	3,00	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00
35	3,00	1,00	3,00	2,00	3,00	2,00	1,00	3,00	2,00	2,00	1,00
42	4,00	1,00	3,00	2,00	3,00	2,00	1,00	3,00	2,00	2,00	1,00
49	4,00	1,00	3,00	2,00	3,00	2,00	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00

¹ Consistência: escala arbitrária adotada para caracterização das formulações sendo: 1- baixíssima (água); 2- baixa (azeite); 3- média (glicerina); 4- alta (creme). Destaque vermelho representa os piores resultados e destaque azul os melhores resultados.

4.2. Análise de tamanho e uniformidade

A partir da leitura das amostras em difração a laser, foi possível encontrar os valores de dm-v (diâmetro médio em volume passante), d50-v (mediana da distribuição de tamanho – diâmetro em volume passante a qual divide a população de partículas à metade), spam-v (dispersidade em volume passante), dm-n (diâmetro médio em número passante) e d50-n (mediana da distribuição de tamanho – diâmetro

em número passante a qual divide a população de partículas à metade). Os resultados estão reportados nas tabelas 2.6 e 2.7.

Foi possível verificar uma característica semelhante em todas as amostras. Quando analisadas no T0, os tamanhos médios das partículas das formulações mostraram-se maiores. Após 24h, os resultados de tamanhos ficavam menores e com melhor uniformidade, os quais foram mantidos ao longo do estudo de estabilidade, evidenciando que nas primeiras 24h ocorre uma adequação da estabilização e organização do tamanho das nanopartículas.

Com os valores obtidos, realizou-se análise estatística com significância maior de 95% e os resultados são discutidos a seguir.

Tabela 2.6. Dados referentes ao tamanho das nanopartículas lipídicas obtidos por difração a laser após produção das dispersões de nanopartículas conforme DoE referente às variáveis de formulação, e armazenamento a temperatura ambiente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Tempo (dias)	Valores de d50 em volume passante (μm)										
	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
0	0,463	1,190	0,600	0,473	0,430	1,080	0,753	0,603	0,646	0,667	0,667
1	0,507	0,373	0,657	0,553	0,473	0,383	0,783	0,630	0,756	0,743	0,610
7	0,567	0,323	0,750	0,573	0,467	0,353	0,780	0,763	0,690	0,760	0,740
49	0,563	0,390	0,753	0,587	0,493	0,363	0,790	0,653	0,6733	0,793	0,693
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	8,57	-218,78	8,63	14,46	9,15	-181,76	3,83	4,24	14,54	10,31	-9,30
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	10,59	-15,47	12,44	3,49	-1,44	-8,49	-0,42	17,46	-9,67	2,20	17,57
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	10,05	4,28	12,82	5,69	4,05	-5,51	0,85	3,57	-12,39	6,30	12,02
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	-0,60	17,10	0,44	2,28	5,41	2,75	1,27	-16,84	-2,48	4,20	-6,74
	Valores de dm em volume passante										
	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
0	0,700	1,910	0,823	0,650	0,690	1,693	1,103	0,867	0,943	0,970	0,920
1	0,793	0,503	0,857	0,707	1,040	0,553	1,143	0,890	1,040	1,090	0,993
7	0,893	0,470	0,990	0,740	0,790	0,510	1,163	1,210	1,013	1,200	1,217
49	0,903	0,547	1,023	0,787	0,823	0,527	1,180	0,933	0,993	1,220	1,107
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	11,76	-279,50	3,90	8,02	33,65	-206,04	3,50	2,62	9,30	11,01	7,38
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	11,19	-7,09	13,46	4,50	-31,65	-8,49	1,72	26,45	-2,63	9,17	18,36
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	12,18	7,94	16,28	10,17	-26,32	-5,05	3,11	4,64	-4,70	10,66	10,25
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	1,11	14,03	3,25	5,94	4,04	3,17	1,42	-29,65	-2,01	1,64	-9,94
	Valores de Spam em volume passante										
	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
0	3,22	3,66	2,89	2,82	3,54	3,52	3,27	3,06	2,92	3,23	2,92
1	3,35	2,77	2,65	2,55	3,54	3,04	3,03	3,01	3,89	3,27	3,89
7	3,51	3,13	2,54	2,60	3,84	3,01	3,39	3,66	3,91	3,65	3,91
49	3,66	2,81	2,90	2,74	3,82	3,01	3,39	3,10	3,71	3,53	3,71
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	3,97	-32,22	-8,80	-10,52	0,00	-15,59	-8,15	-1,66	24,90	1,33	24,90
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	4,67	11,40	-4,55	1,79	7,67	-1,17	10,78	17,94	0,53	10,38	0,53
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	8,59	1,43	8,40	7,02	7,39	-1,27	10,57	2,97	-4,83	7,25	-4,83
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	4,11	-11,25	12,39	5,32	-0,31	-0,10	-0,24	-18,24	-5,39	-3,50	-5,39

Continuação Tabela 2.6

Valores de dm em número passante											
	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
0	0,083	0,063	0,067	0,083	0,080	0,053	0,053	0,083	0,053	0,067	0,053
1	0,080	0,073	0,053	0,053	0,077	0,073	0,053	0,090	0,063	0,053	0,053
7	0,083	0,063	0,063	0,053	0,080	0,073	0,053	0,090	0,060	0,053	0,057
49	0,083	0,073	0,053	0,053	0,083	0,073	0,067	0,087	0,053	0,053	0,080
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	-4,13	13,64	-25,14	-56,29	-4,30	27,29	0,00	7,44	15,80	-25,14	0,00
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	3,96	-15,80	15,80	0,00	4,13	0,00	0,00	0,00	-5,50	0,00	6,00
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	3,96	0,00	0,00	0,00	7,92	0,00	20,09	-3,81	-18,76	0,00	33,38
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	0,00	13,64	-18,76	0,00	3,96	0,00	20,09	-3,81	-12,57	0,00	29,13
Valores de Razão de Uniformidade											
	FC1	FC2	FC3	FC4	FC5	FC6	FC7	FC8	FC9A	FC9B	FC9C
0	8,42	30,32	12,99	7,81	8,63	31,99	20,83	10,43	17,81	14,63	17,31
1	9,92	6,88	16,16	13,33	9,96	7,57	21,59	9,89	16,50	20,57	18,77
7	10,75	7,55	15,71	13,96	9,88	6,97	21,97	13,44	16,89	22,61	21,65
49	10,86	7,46	19,29	14,82	9,90	7,18	19,53	10,80	18,74	23,01	14,52
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	15,08	-340,60	19,62	41,39	13,44	-322,83	3,50	-5,43	-7,95	28,88	7,76
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	7,71	8,89	-2,86	4,46	-0,90	-8,54	1,72	26,45	2,30	9,04	13,31
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	8,70	7,74	16,24	10,05	-0,67	-5,39	-10,52	8,40	11,97	10,62	-29,26
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	1,07	-1,27	18,57	5,85	0,23	2,90	-12,46	-24,53	9,90	1,74	-49,10

Destaque vermelho representa os piores resultados e destaque azul os melhores resultados.

Os resultados esperados são considerados adequados quando as nanopartículas possuírem menor tamanho, demonstrado por dm-v (diâmetro médio em volume passante) e d50-v (mediana da distribuição de tamanho – diâmetro em volume passante a qual divide a população de partículas à metade) com grande número de nanopartículas, dm-n (diâmetro médio em número passante) e boa dispersidade, spam-v (dispersidade em volume passante).

A partir dos resultados foi possível observar melhores valores de dm-v para FC4 e piores para FC7, melhores valores de d50-v para FC5 e piores para FC7, bons resultados de spam-v para FC4 e piores para FC7, bons resultados de dm-n para FC4 e piores para FC2 e melhores resultados.

Os resultados encontrados no teste de tamanho de partícula foram projetados para análise do DoE.

Tabela 2.7. Dados referentes ao tamanho das nanopartículas lipídicas, obtidos por difração a laser, após produção das dispersões de nanopartículas, conforme DoE referente às variáveis de processo, e armazenamento a temperatura ambiente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Tempo (dias)	Valores de d50 em volume passante										
	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
0	1,080	0,920	2,723	0,690	1,073	0,870	1,023	0,680	0,784	0,743	0,757
1	0,960	1,093	1,033	0,663	1,103	0,967	1,187	0,803	0,863	0,813	0,910
7	1,073	1,150	2,707	0,693	0,977	0,780	1,220	0,657	0,807	0,837	0,887
49	1,053	1,070	2,510	0,697	1,140	0,883	1,100	0,713	0,800	0,767	0,830
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	-12,50	15,85	-163,55	-4,03	2,72	10,00	13,77	15,35	9,19	8,61	16,85
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	10,56	4,93	61,82	4,33	-12,96	-23,94	2,73	-22,32	-7,02	2,80	-2,63
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	8,86	2,18	58,83	4,79	3,22	9,44	7,88	12,62	7,91	6,08	9,64
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	-1,90	-7,48	-7,84	0,49	14,32	11,69	-10,91	7,93	-0,84	-9,13	-6,83
Tempo (dias)	Valores de dm em volume passante										
	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
0	1,977	1,3471	3,680	0,990	1,807	1,517	1,5601	1,013	1,103	1,080	1,057
1	1,840	1,593	1,910	0,967	1,823	1,627	1,637	1,250	1,180	1,153	1,210
7	1,937	1,610	3,743	1,017	1,677	1,337	1,673	0,970	1,120	1,177	1,200
49	1,987	1,513	3,470	1,080	1,860	1,510	1,520	1,123	1,133	1,130	1,163
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	-7,43	15,48	-92,67	-2,42	0,91	6,76	4,69	18,94	6,50	6,36	12,67
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	4,99	1,04	48,98	4,93	-8,74	-21,70	2,19	-28,87	-5,36	1,99	-0,83
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	7,38	-5,29	44,96	10,50	1,97	-7,73	-7,68	-11,28	-4,12	-2,06	-4,01
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	2,52	-6,39	-7,88	5,86	9,85	11,48	-10,09	13,65	1,17	-4,13	-3,15
Tempo (dias)	Valores de Spam em volume passante										
	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
0	4,50	3,12	2,87	3,15	3,94	4,20	3,40	3,28	3,03	2,87	2,99
1	4,79	3,04	4,53	3,21	3,82	3,97	2,95	3,53	2,83	2,65	2,65
7	4,41	2,81	2,99	3,28	4,01	4,10	2,93	3,24	2,93	2,76	2,76
49	4,68	2,94	2,97	3,53	3,75	4,10	2,99	3,65	3,07	2,99	2,99
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	6,10	-2,87	36,53	1,93	-3,04	-5,74	-15,22	7,05	-7,26	-8,14	-12,62
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	-8,50	-8,09	-51,57	2,07	4,62	3,34	-0,61	-8,87	3,54	4,02	4,02
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	-2,37	-3,43	-52,34	8,94	-1,95	3,27	1,22	3,16	7,97	11,36	11,36
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	5,64	4,31	-0,51	7,01	-6,88	-0,07	1,82	11,05	4,59	7,65	7,65

Continuação Tabela 2.7

Tempo (dias)	Valores de dm em número passante										
	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
0	0,053	0,070	0,063	0,053	0,063	0,053	0,063	0,067	0,063	0,053	0,063
1	0,053	0,087	0,063	0,053	0,067	0,063	0,053	0,057	0,067	0,063	0,077
7	0,053	0,100	0,063	0,067	0,063	0,053	0,053	0,090	0,063	0,063	0,073
49	0,053	0,077	0,063	0,090	0,070	0,053	0,057	0,080	0,063	0,053	0,063
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	0,00	19,26	0,00	0,00	5,10	15,80	-18,76	-17,64	5,10	15,80	17,47
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	0,00	13,30	0,00	20,09	-5,37	-18,76	0,00	37,00	-5,37	0,00	-4,64
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	0,00	-13,04	0,00	40,78	4,71	-18,76	6,00	29,13	-5,37	-18,76	-21,17
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	0,00	-30,38	0,00	25,89	9,57	0,00	6,00	12,50	0,00	-18,76	-15,80
Valores de Razão de Uniformidade											
	FC10	FC11	FC12	FC13	FC14	FC15	FC16	FC17	FC18A	FC18B	FC18C
0	37,26	19,45	58,43	18,69	28,68	28,47	24,75	16,30	17,51	20,40	16,77
1	34,74	18,54	30,32	18,24	27,85	25,68	30,92	22,16	18,01	18,30	15,99
7	36,59	16,20	59,48	16,20	26,65	25,17	31,61	10,78	17,78	18,67	16,42
49	37,53	19,90	55,12	15,29	26,94	28,48	27,52	14,76	17,98	21,33	18,46
$\Delta\%_{0 \rightarrow 1}$	-7,23	-4,91	-92,72	-2,44	-3,00	-10,84	19,95	26,43	2,81	-11,47	-4,85
$\Delta\%_{1 \rightarrow 7}$	5,04	-14,44	49,03	-12,65	-4,49	-2,05	2,18	-105,57	-1,33	2,00	2,61
$\Delta\%_{1 \rightarrow 49}$	7,43	6,85	45,00	-19,31	-3,37	9,82	-12,35	-50,11	-0,21	14,21	13,36
$\Delta\%_{7 \rightarrow 49}$	2,52	18,60	-7,91	-5,92	1,08	11,63	-14,85	26,98	1,10	12,46	11,04

Destaque vermelho representa os piores resultados e destaque azul os melhores resultados.

Os resultados esperados são considerados adequados quando as nanopartículas possuírem menor tamanho, demonstrado por dm-v (diâmetro médio em volume passante) e d50-v (mediana da distribuição de tamanho – diâmetro em volume passante a qual divide a população de partículas à metade), com grande número de nanopartículas, dm-n (diâmetro médio em número passante) e boa dispersidade, spam-v (dispersidade em volume passante).

A partir dos resultados foi possível observar melhores valores de dm-v para F13 e piores para FC12, melhores valores de d50-v para FC13 e piores para FC16, bons resultados de spam-v para FC18B e piores para FC10, bons resultados de dm-n para FC12 e piores para FC17.

Os resultados encontrados no teste de tamanho de partícula foram projetados para análise do DoE.

4.3 Superfície de resposta a partir dos DoEs de formulação e processo

A utilização da ferramenta estatística para o design de experimentos vem ganhando destaque nos diversos campos da ciência, uma vez que utiliza um delineamento estatístico para estabelecer uma relação causal entre variáveis independentes (possíveis fatores causais da resposta) e variáveis dependentes (as respostas propriamente ditas) (RIBEIRO, J.L.; CATEN, C.T., 2003). Assim, na análise de superfície de resposta do modelo de estudo utilizado, quando se obtém uma boa correlação ($R^2 > 90\%$), pode-se considerar que a variação das variáveis independentes nas faixas de valores estudadas mantém uma boa relação com a variável dependente analisada (RIBEIRO, J.L.; CATEN, C.T., 2003).

Complementarmente, visando a otimização do estudo, é possível avaliar a capacidade de predição que o modelo utilizado oferece frente a variável dependente estudada. Assim, quando maior o valor de R^2 preditivo ($R^2(\text{pred})$), maior a capacidade do modelo em prever um resultado desejado (ótimo). Por conseguinte, $R^2(\text{pred})$ igual ou próximo a zero indica que o modelo de estudo não é capaz de prever o resultado de uma variável de resposta frente aos parâmetros estabelecidos para otimização do mesmo (DIAS, R.A.T, 2015).

Além disso, aplicando-se a análise de superfície de resposta a partir de um modelo de DoE, tem-se a possibilidade de identificação dos principais componentes do modelo (variáveis independentes), segundo gráfico de Pareto que, isoladamente, em interação quadrática, ou em interação com outra variável, seria capaz de interferir de forma significativa ($p < 0,05$) em relação a uma variável dependente específica (DIAS, R.A.T, 2015).

Nesse trabalho buscou-se realizar análise de superfície dos dados de pH, diâmetro 50% em volume passante (d_{50-v}), diâmetro médio em volume passante ($dm-v$), dispersidade de tamanho em volume passante ($spam-v$), diâmetro médio em número passante ($dm-n$) e razão de uniformidade (RU), considerados como variáveis dependentes nos DoEs realizados para formulação e processo, admitindo-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$. As análises foram realizadas em software Minitab 18.1, considerando os dados para os tempos 0, 1 e 7 dias, sendo obtidos os relatórios completos dos estudos. As Tabela 2.8 e 2.9 apresentam os principais dados referente aos estudos realizados.

Tabela 2.8. Compilação dos sumários dos modelos de análise de variância aplicados para avaliação de superfície de respostas a partir do DoE de formulação, para um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Sumário dos modelos de Análise de Variância para DoE de formulação				
Variáveis dependentes	S	R ² (%)	R ² (pred) (%)	Fatores* com p < 0,05
T0				
pH	0,4478	49,02	0,00	-----
d50-v	0,0144	99,89	96,04	%TA, %LSS, %FO, %TA ² , %TA. % LSS, %LSS. % FO
dm-v	0,0357	99,77	90,05	%TA, %LSS, %TA ² %, TA. % LSS, % LSS. % FO
spam-v	0,1541	90,78	0,00	%LSS
dm-n	0,0267	58,67	0,00	-----
RU	1,9530	98,38	47,52	%TA, %LSS, TA. % LSS
T1				
pH	0,0385	99,00	80,48	%LSS, %FO, %TA ² , % TA. % LSS
d50-v	0,0689	93,11	51,98	%LSS, %TA ²
dm-v	0,0480	98,54	67,73	%TA, %LSS, %FO, %TA ² , % LSS. % FO
spam-v	0,4084	68,30	28,67	-----
dm-n	0,0082	88,59	0,00	-----
RU	2,5592	92,88	0,00	%LSS, %TA ²
T7				
pH	0,3507	81,83	56,68	-----
d50-v	0,0301	99,06	95,51	%TA, %LSS, %TA ² , %TA.%FO, %LSS.%FO
dm-v	0,0974	96,17	66,96	%TA, %LSS, %TA ²
spam-v	0,6238	87,64	0,00	-----
dm-n	0,0073	90,72	0,00	-----
RU	2,8876	92,22	0,00	%LSS, %TA ²

* Fatores considerados variáveis independentes no DoE formulação: %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

Como é possível verificar na Tabela 2.8, para o tempo zero, ou seja, logo após a preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas, as variáveis dependentes d50-v, dm-v e RU apresentaram R² superior à 95%, e resultaram em um R²(pred) diferente de zero, sendo consideradas para o estudo de otimização. Nos

estudos de otimização da formulação, os valores de $R^2(\text{pred})$ foram utilizados como fatores de correção para a variável dependente correspondente.

Diferentemente ao observado no T0, para os tempos de 1 dia e 7 dias outras variáveis dependentes foram consideradas para otimização da formulação, sendo o pH incluído em ambas, enquanto span-v foi incluído apenas para a otimização considerando os dados coletados após 7 dias. Ao contrário, a variável RU foi excluída para ambos no experimento de otimização em que se considerou $R^2(\text{pred})$ como fator de correção.

Os gráficos de Pareto, para identificação dos componentes principais que apresentaram significância estatística por interferirem nas variáveis dependentes são apresentados nas Figuras de 2.5 a 2.7, respectivamente para os tempos 0, 1 e 7 dias.

É interessante notar que para as análises realizadas nos diferentes tempos, às variáveis dependentes %TA e a %LSS, assim como a interação entre elas e com a %FO resultam em maior influência nas características estudadas para as dispersões de nanopartículas, especialmente para d_{50-v} , d_m-v e RU. A maior concentração de tensoativos, tende a favorecer a formação de nanopartículas, visto que possibilita a maior estabilização das nanogotículas de fase oleosa fundida, intensamente formadas durante a ação de cisalhamento e cavitação na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão.

Figura 2.5. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de formulação na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo zero dia. %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

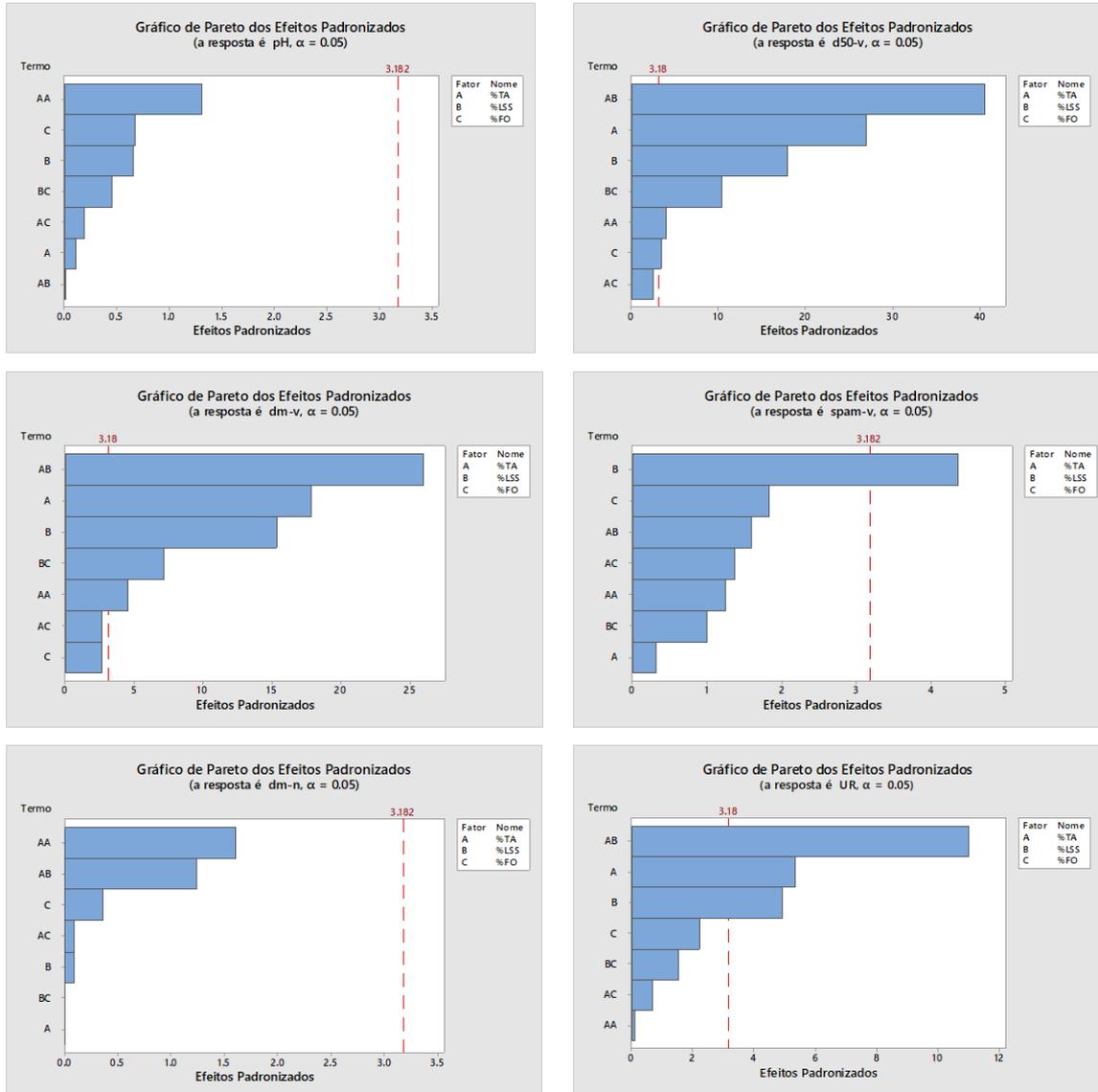


Figura 2.6. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de formulação na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo 1 dia. %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

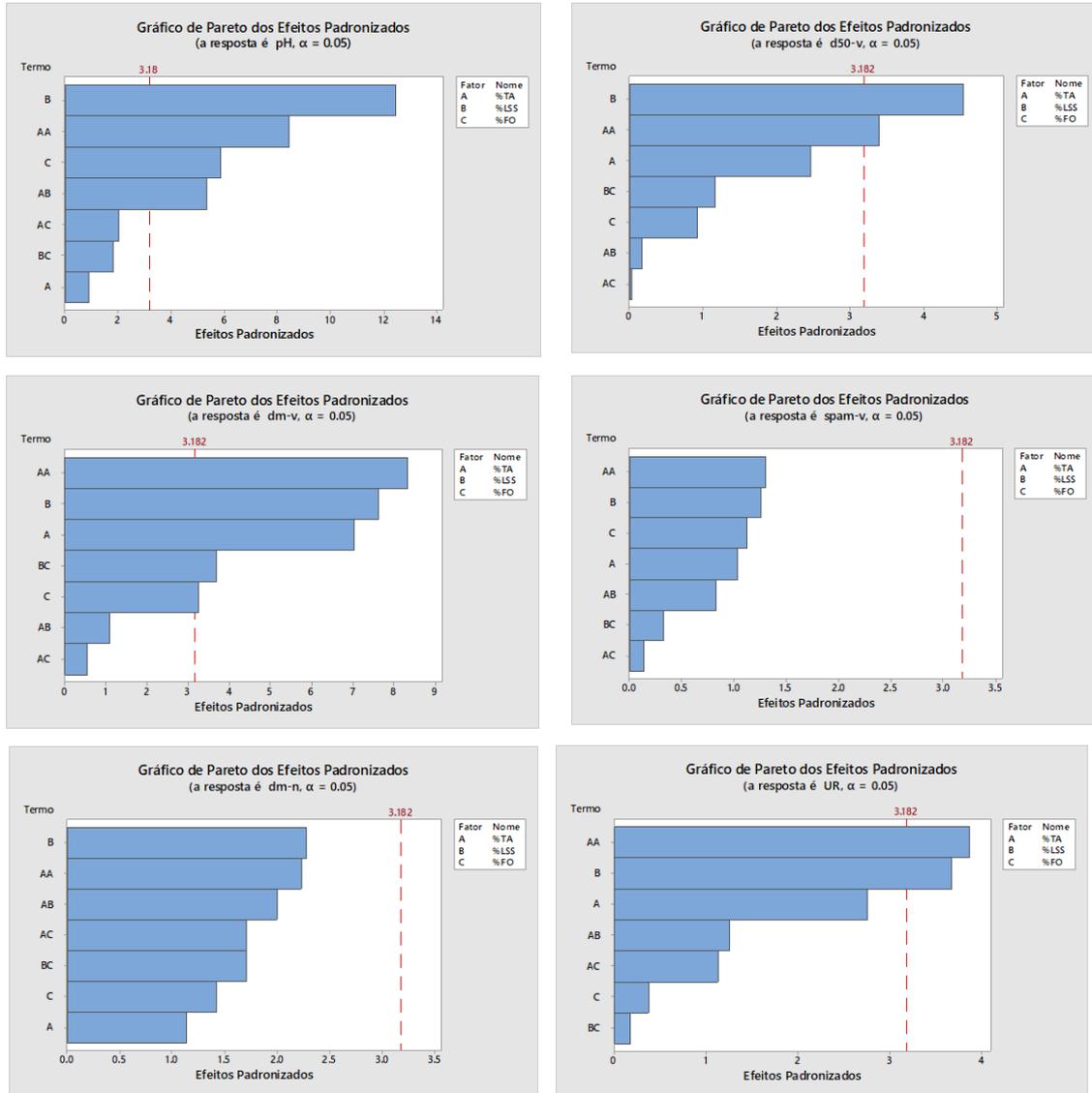
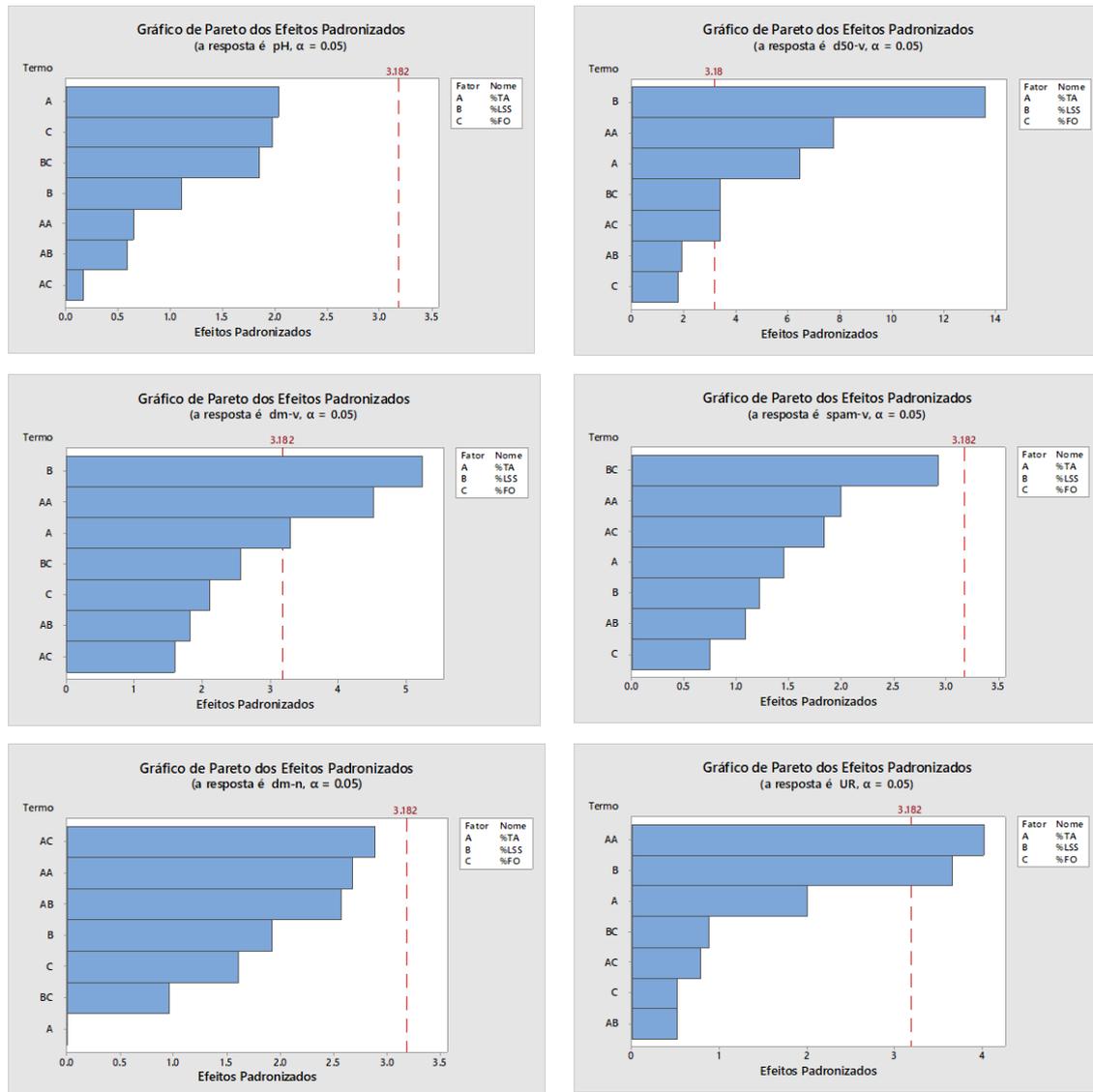


Figura 2.7. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de formulação na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo 7 dias. %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.



De modo semelhante ao discutido referente ao DoE de formulação, os principais resultados obtidos na análise de superfície de resposta a partir do DoE de processo para obtenção de dispersões de nanopartículas lipídicas foram demonstrados na tabela 2.9.

Tabela 2.9. Compilação dos sumários dos modelos de análise de variância aplicados para avaliação de superfície de respostas a partir do DoE de processo, para um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Sumário dos modelos de Análise de Variância para DoE de formulação				
Variáveis dependentes	S	R ² (%)	R ² (pred) (%)	Fatores* com p < 0,05
T0				
pH	0,2174	47,91	0,00	-----
d50-v	0,3542	88,81	0,00	-----
dm-v	0,3686	93,31	0,00	Pressão
spam-v	0,4294	80,94	0,00	-----
dm-n	0,0094	28,66	0,00	-----
RU	3,2034	98,04	3,59	Pressão, Temperatura, Pressão ² , Pressão.Tempo, Pressão.Temperatura, Temperatura.Temperatura
T1				
pH	0,1937	87,07	62,03	Pressão ²
d50-v	0,0656	94,59	0,00	Pressão, Pressão.Tempo
dm-v	0,1060	96,87	0,00	Pressão, Tempo, Pressão ²
spam-v	0,1720	98,22	96,01	Pressão, Pressão ² , Pressão.Temperatura
dm-n	0,0117	62,17	0,00	-----
RU	2,4156	95,82	0,00	Pressão, Pressão ²
T7				
pH	0,3539	72,19	0,00	-----
d50-v	0,3534	88,55	0,00	-----
dm-v	0,4171	91,43	0,00	Pressão
spam-v	0,3630	88,17	0,00	-----
dm-n	0,0190	52,51	0,00	-----
RU	1,1740	99,78	94,40	Pressão, Tempo, Temperatura, Pressão ² , Pressão.Tempo, Pressão.Temperatura, Tempo.Temperatura

* Fatores considerados variáveis independentes no DoE formulação: %TA: porcentagem de tensoativo na formulação; %LSS: proporção de lauril sulfato de sódio em relação ao total de tensoativos na formulação; %FO: porcentagem de fase oleosa na formulação.

Como é possível verificar na Tabela 2.9, para o tempo zero, ou seja, logo após a preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas, a variável RU apresentaram R² superior à 95%, e resultou em um R²(pred) diferente de zero, sendo considerada para o estudo de otimização. Nos estudos de otimização da formulação,

os valores de $R^2(\text{pred})$ foram utilizados como fatores de correção para a variável dependente correspondente.

Diferentemente ao observado no T0, para os tempos de 1 dia, outras variáveis dependentes dm-v e spam-v foram consideradas para otimização da formulação, sendo o pH incluído em ambas, enquanto para o tempo 7 dias apenas RU foi incluído.

Os gráficos de Pareto, para identificação dos componentes principais que apresentaram significância estatística por interferirem nas variáveis dependentes são apresentados nas Figuras de 2.8 a 2.10, respectivamente para os tempos 0, 1 e 7 dias.

É interessante notar que para as análises realizadas nos diferentes tempos, às variáveis dependentes Pressão e Tempo, resultam em maior influência nas características estudadas para as dispersões de nanopartículas, especialmente para d50-v, dm-v e RU. A maior pressão tende a favorecer a formação de nanopartículas, visto que possibilita o maior cisalhamento das nanopartículas, diminuindo seu tamanho.

Em 0 dia a análise dos gráficos de Pareto, para determinação de componentes principais demonstra maior significância para o parâmetro pressão em dm-v e RU. Em RU também é possível verificar significância nos parâmetros de Pressão e Temperatura, e em associação com Pressão, Tempo e Temperatura.

No tempo 1 dia a análise dos gráficos de Pareto, para determinação de componentes principais demonstra maior significância para o parâmetro pressão em pH, d50-v, dm-v, spam-v e UR. Em d50-v é possível verificar significância na associação de Pressão e Tempo. Em dm-v é possível verificar significância na associação de Pressão, sozinha e em associação com Pressão e Tempo. Em spam-v é possível verificar significância da Pressão sozinha e em associação com Pressão e Temperatura. Em RU é possível verificar significância da Pressão sozinha e em associação com Pressão.

No tempo 7 dias a análise dos gráficos de Pareto, para determinação de componentes principais demonstra maior significância para o parâmetro pressão em dm-v e UR. Em dm-v é possível verificar significância no parâmetro Pressão. Em RU é possível verificar significância no parâmetro Pressão, sozinha e em associação com Pressão, Tempo e Temperatura, Tempo em associação com Pressão e Temperatura e Temperatura em associação com tempo.

Figura 2.8. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de processo na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo zero dia. Tempo: tempo de processamento em homogeneizador de alta pressão; Pressão: pressão imposta na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão; Temperatura: temperatura em que as dispersões de nanopartículas foram mantidas no homogeneizador de alta pressão.

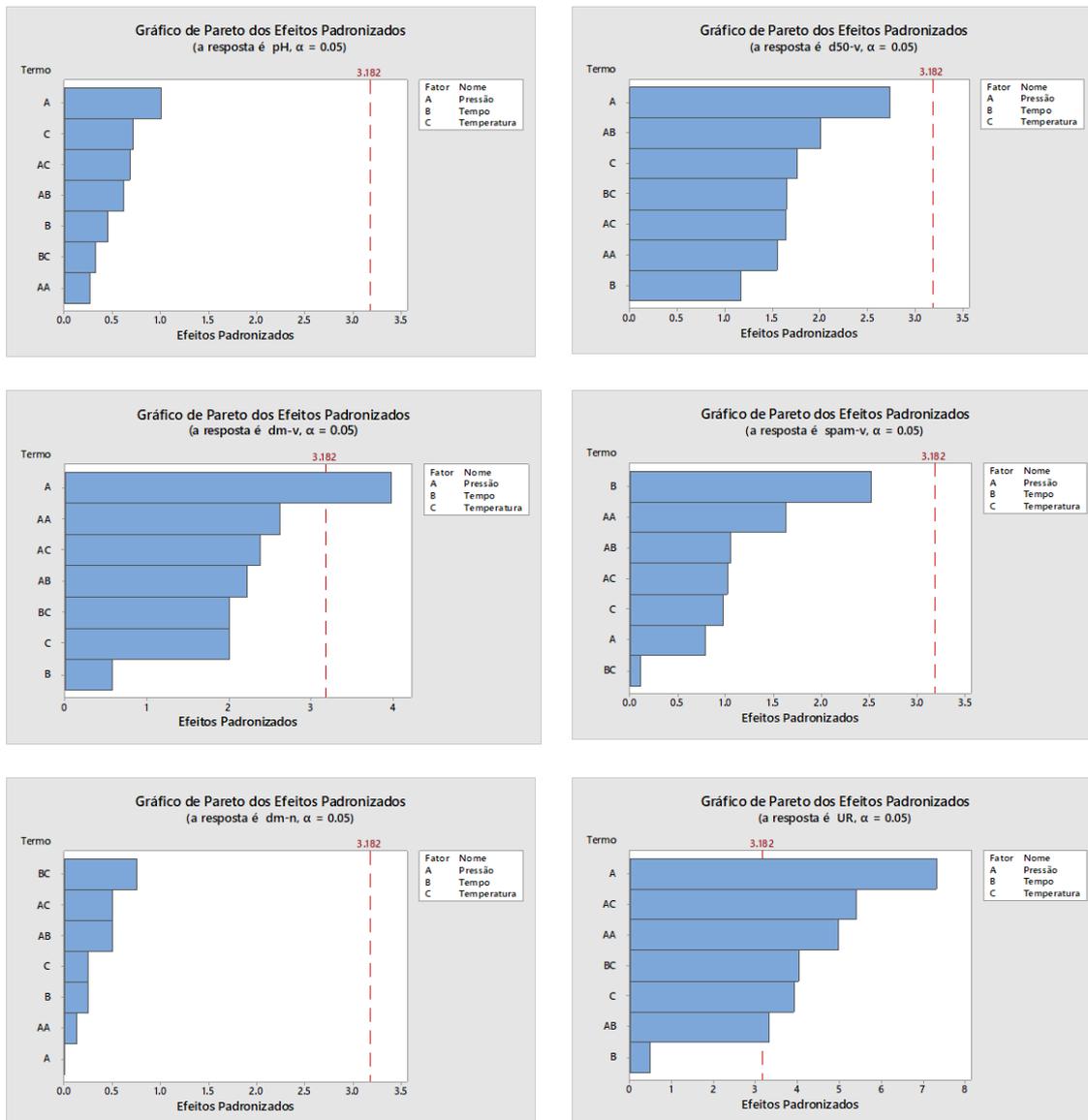


Figura 2.9. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de processo na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo 1 dia. Tempo: tempo de processamento em homogeneizador de alta pressão; Pressão: pressão imposta na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão; Temperatura: temperatura em que as dispersões de nanopartículas foram mantidas no homogeneizador de alta pressão.

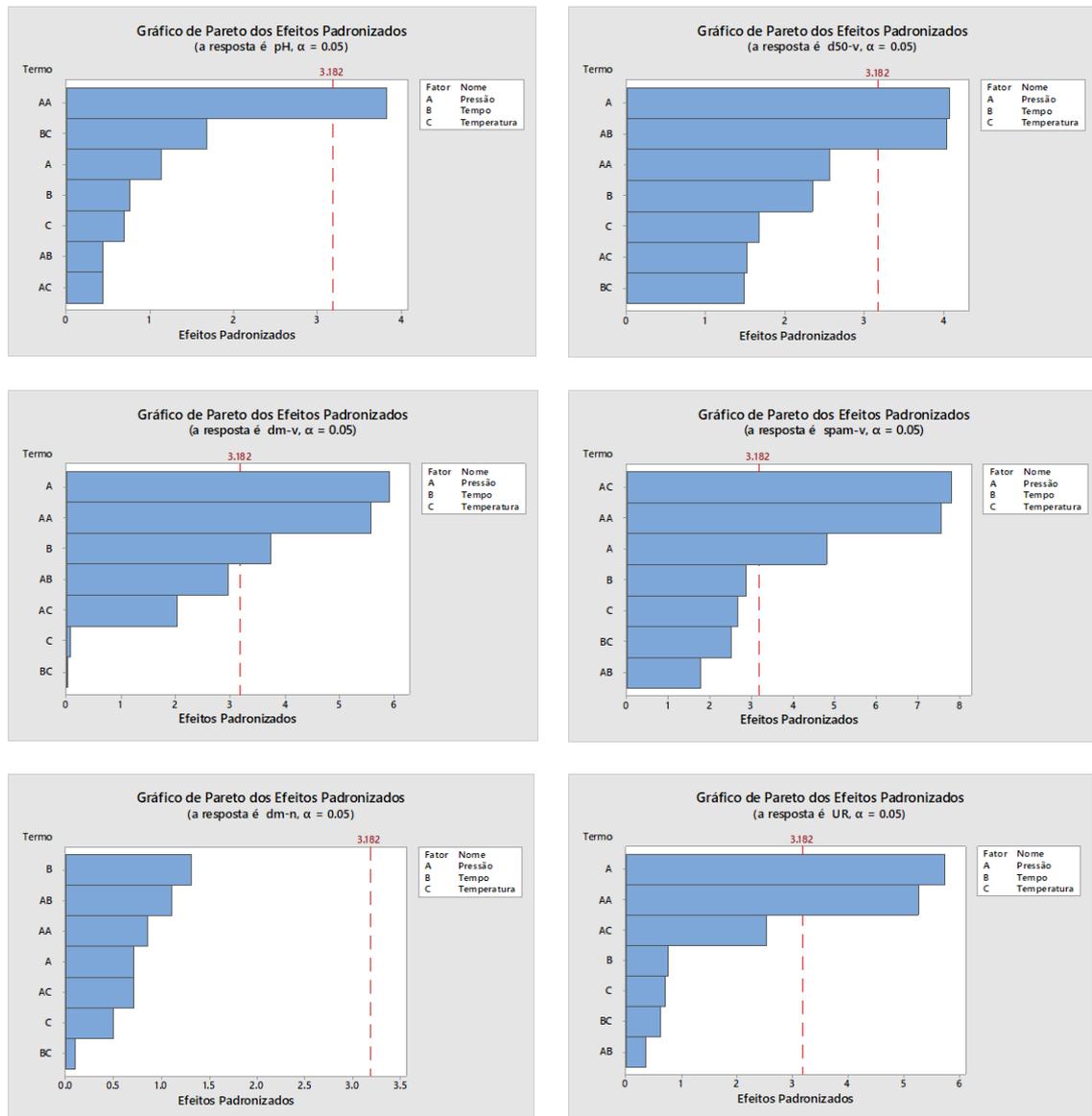
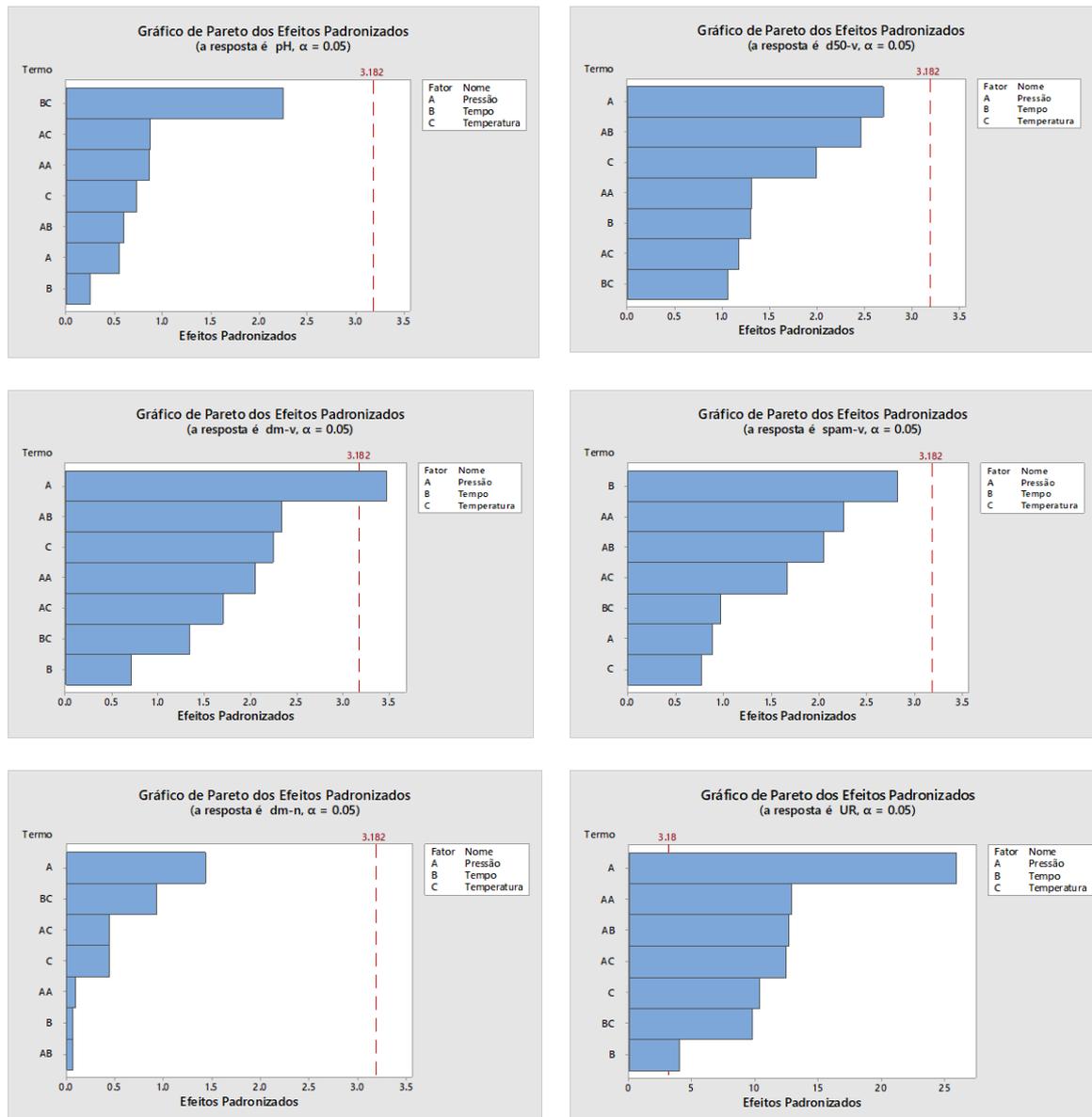


Figura 2.10. Gráficos de Pareto, para identificação de componentes principais a partir de DoE para o estudo de variáveis de processo na elaboração de dispersões de nanopartículas lipídicas no tempo sete dias. Tempo: tempo de processamento em homogeneizador de alta pressão; Pressão: pressão imposta na câmara de interação do homogeneizador de alta pressão; Temperatura: temperatura em que as dispersões de nanopartículas foram mantidas no homogeneizador de alta pressão.



4.4 Otimização de experimento a partir de estudos utilizando DoE de formulação e processo para obtenção de dispersões de nanopartículas lipídicas.

A otimização de experimento a partir da análise de superfície de resposta de um DoE é ferramenta que vem frequentemente sendo usada nas diferentes áreas do saber a fim de se obter a melhor resposta de um estudo, realizando o mínimo de experimentos necessários. Não obstante, esse recurso vem amplamente sendo aplicado na área farmacêutica seja para acelerar o desenvolvimento de formulações ou para definir as melhores condições de processamento (SILVA, L.P., 2020).

Nesse trabalho, buscamos identificar, a partir de 3 variáveis de formulação e 3 variáveis de processo, as melhores condições para compor uma dispersão de nanopartículas lipídicas, obtidas pela emulsificação de duas fases imiscíveis e processamento em homogeneizador de alta pressão.

A análise de superfície de resposta e identificação de efeitos de componentes principais, por meio dos gráficos de Pareto, possibilitaram a proposição de dois estudos de otimização (OEX1 e OEX2), onde as variáveis dependentes tiveram seus valores alvos previamente estabelecidos. Enquanto para um primeiro estudo de otimização (OEX1) considerou-se apenas como variáveis dependentes aquelas onde $R^2(\text{pred})$ foi maior ou igual a 10%, sendo o valor adotado como fator de correção (peso), o segundo estudo (OEX2) considerou aquelas variáveis dependentes que apresentavam ao menos dois fatores isolados ou em associação em que $p < 0,05$ no modelo de análise de variância dos DoEs realizados. Para esse segundo estudo, foi adotado o valor de 1,0 como fator de correção (peso).

A Tabela 2.10 sumariza os parâmetros adotados para o estudo de otimização de experimento, para os DoEs de formulação e processo, nos tempos 0, 1 e 7 dias.

Tabela 2.10. Parâmetros utilizados para estudo de otimização de experimentos a partir de dados prévios de análise de superfície de resposta de DoEs de formulação e processo para obtenção de dispersões de nanopartículas.

Variáveis dependentes	Valor alvo	DoE formulação		DoE processo	
		OEX1*	OEX2**	OEX1	OEX2
		Peso (fator de correção)			
		T0			
pH	6,0	-----	-----	-----	-----
d50-v	0,25	0,9604	1,0	-----	-----
dm-v	0,30	0,9005	1,0	-----	-----
spam-v	2,0	-----	-----	-----	-----
dm-n	0,06	-----	-----	-----	-----
RU	5,0	0,4752	1,0	-----	1,0
		T1			
pH	6,0	0,8048	1,0	0,6203	-----
d50-v	0,25	0,5198	1,0	-----	1,0
dm-v	0,30	0,6773	1,0	-----	1,0
spam-v	2,0	0,2867	-----	0,9601	1,0
dm-n	0,06	-----	-----	-----	-----
RU	5,0	-----	1,0	-----	1,0
		T7			
pH	6,0	0,5668	-----	-----	-----
d50-v	0,25	0,9551	1,0	-----	-----
dm-v	0,30	0,6696	1,0	-----	-----
spam-v	2,0	-----	-----	-----	-----
dm-n	0,06	-----	-----	-----	-----
RU	5,0	-----	1,0	0,9440	1,0

* OR1: considerou como variáveis dependentes aquelas onde $R^2(\text{pred})$ foi maior ou igual a 10%;

** OR2 considerou como variáveis dependentes as que apresentaram ao menos dois fatores isolados ou em associação com $p < 0,05$ no modelo de análise de variância dos DoEs.

A partir dos valores alvos e fatores de correção expressos na Tabela 2.10, as análises para otimização de experimento OEX1 e OEX2 foram conduzidas considerando para todas as variáveis dependentes importância igual a 1,0 e nível de confiança bilateral de 95% para todos os intervalos das variáveis.

Tabela 2.11. Resultados dos estudos de otimização de experimento, a partir da análise de superfície de resposta para os DoEs de formulação e processo, considerando os tempos de armazenamento de 0, 1 e 7 dias.

DoE formulação					
Tempo Armazenamento	Otimização de experimento	Desejabilidade	%TA	%LSS	%FO
T0	OEX1	0,8413	4,0	0,0	20,0
	OEX2	0,8143	7,98	10,0	10,0
T1	OEX1	0,7816	8,0	6,3	10,0
	OEX2	0,6852	8,0	0,0	14,1
T7	OEX1	0,9028	8,0	0,0	10,0
	OEX2	0,8360	8,0	0,0	10,0
DoE processo					
Tempo Armazenamento	Otimização de experimento	Desejabilidade	Pressão (psi)	Tempo (min)	Temp. (°C)
T0	OEX1	nd*	-----	-----	-----
	OEX2	0,9264	11378	15	70
T1	OEX1	0,9260	7701	15	70
	OEX2	0,6263	12374	15	30
T7	OEX1	0,9462	12658	15	70
	OEX2	0,9431	12651	15	70

* nd: dado não determinado, visto que a análise de superfície de resposta não indicou fatores para uso no estudo para otimização de experimento OEX1.

Foi possível verificar que para a maioria dos estudos de otimização de experimentos realizados, aqueles considerando os valores de $R^2(\text{pred})$ apresentaram maior desejabilidade composta, em alguns casos atingindo valores maiores que 90% (Tabela 2.11), sendo que os melhores resultados para os DoEs de formulação e processo ocorreram com os dados referentes a 7 dias de armazenamento após o preparo das dispersões de nanopartículas.

O maior valor de desejabilidade composta do estudo de otimização de experimento para o DoE de formulação foi para OEX1 em T7 ($D = 0,9028$), indicando uma formulação com 0, 8 e 10% para as variáveis independentes %LSS, %TA e %FO, respectivamente. Tal formulação equivale à FC2, elaborada durante a execução do DoE de formulação. Para essa formulação, os valores de d_{50-v} e d_{m-v} foram bastante discrepantes para os tempos 0 e 1 dia (T0, 1,19 e 1,91 μm ; T1, 0,37 e 0,50 μm ,

respectivamente). Sugerindo que imediatamente após a obtenção, possivelmente devido a maior concentração de tensoativo, a presença de microbolhas de ar pode ter elevado os valores de diâmetro das nanopartículas em dispersão. Entretanto, após 24 horas, havendo tempo para a remoção de tais bolhas, os valores registrados foram cerca de 219% e 280% menores para d50-v e dm-v, respectivamente. Ao contrário, ao compararmos as análises realizadas em 1 e 7 dias verificamos uma variação menor de cerca de 15% para d50-v e 7% para dm-v. Vale destacar que para a formulação FC2, d50-v e dm-v seguiram o estudo de estabilidade em temperatura ambiente por 49 dias sem variações expressivas de tamanho, resultando em d50-v e dm-v em valores de 0,390 μm ($\Delta\%_{1\rightarrow 49} = 4,28\%$) e 0,547 μm ($\Delta\%_{1\rightarrow 49} = 7,94\%$), respectivamente em T49.

De modo distinto, o estudo de otimização de experimento a partir dos resultados de análise de superfície de resposta do DoE de processo não foram tão conclusivos. Ainda que a otimização de experimento OEX1 tenham apresentado a melhor desejabilidade composta para T7 ($D = 0,9462$), para esse estudo foi considerado apenas a variável dependente RU, que se relaciona com a uniformidade de tamanho das partículas formadas, uma vez que correlaciona as medidas em volume e número passante. Para esse estudo, as variáveis independentes sugeridas foram, pressão de 12.658 psi, temperatura de 70 °C e tempo de processamento de 15 minutos. Essa combinação de fatores não foi testada previamente no DoE de processo, no entanto essa combinação de tempo e temperatura, para o valor de pressão mais próximo (15.000 psi), referente à formulação F17, foi a que apresentou o melhor resultado de RU (10,78) para T7.

Considerando T1, cuja desejabilidade composta para OEX1 foi de 0,9260, foram consideradas como variáveis dependentes spam-v e pH, sugerindo os mesmos valores de temperatura e tempo de processamento, porém para pressão de 7.701 psi. O valor de pressão sugerido não foi utilizado nos experimentos executados no DoE de processo, entretanto, o menor valor de pressão produziu os piores valores de spam-v e dm-v.

Deste modo, definiu-se os seguintes parâmetros para formulação de processo para a dispersão de nanopartículas lipídicas por emulsificação prévia, seguida por homogeneização de alta pressão. Na formulação escolheu-se a utilização de 8% de tensoativos (%TA), sem adição de lauril sulfato de sódio (0% para %LSS) e 10 % de fase oleosa (%FO), e no processo de homogeneização de alta pressão,

pressão de cerca de 12.500 psi, temperatura de 70°C, durante 15 minutos de processamento. Por fim, os parâmetros definidos como mais adequados foram utilizados para preparação de formulações de NL para confirmação dos resultados dos DoEs e posteriormente veiculados em diluentes em pó para elaboração de formas sólidas.

4.5. Curva analítica de Oil Red (OR)

O OR é um corante lipofílico vermelho muito utilizado na coloração de triglicerídeos neutros, lipídeos e algumas lipoproteínas. Possui peso molecular de 408,5 g/mol, log P de 5,936 e pKa em $13,52 \pm 0,5$ (PUBCHEM, 2021). Nesse trabalho o OR foi utilizado como modelo de substância lipofílica de fácil quantificação por espectrofotometria na faixa do ultravioleta–visível, devido à relativa especificidade em razão da absorção na faixa do verde de 500 e 565 nm.

Tendo comprovado a existência de um pico de absorção no comprimento de onda de 511 nm, utilizou-se desse comprimento de onda para construção da curva analítica. Nesse sentido, foram preparadas diluições de OR em etanol na faixa de concentração de 0,78 a 25 µg/mL. Os valores de absorbância foram registrados e a curva analítica foi construída, sendo determinada a linha de tendência e o coeficiente de correlação entre os valores de absorbância a 511 nm e as concentrações analisadas.

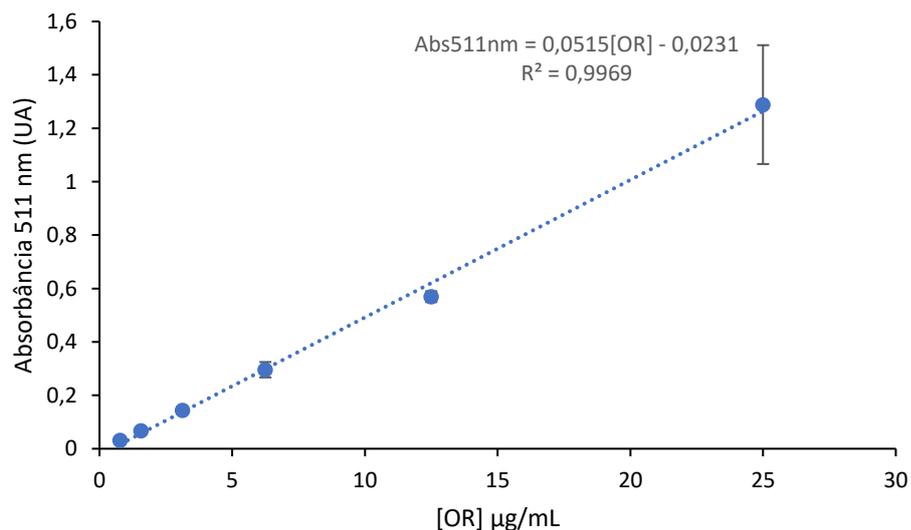
Os dados de absorbância para o comprimento de onda de 511 nm e os valores de desvio padrão e coeficiente de variação são apresentados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12. Resultados de absorvância para construção de curva analítica de OR em etanol analisada à 511 nm.

Concentração (µg/mL)	Absorvância – 511 nm (UA)					
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	DP	CV (%)
0,78	0,0256	0,0365	0,0317	0,0313	0,00546	17,47
1,56	0,0612	0,0667	0,0731	0,0670	0,00596	8,89
3,13	0,1314	0,1421	0,1568	0,1434	0,01275	8,89
6,25	0,2683	0,2932	0,3257	0,2957	0,02878	9,73
12,50	0,554	0,5924	0,5615	0,5693	0,02035	3,58
25,00	1,1363	1,1854	1,5440	1,2886	0,22257	17,27

A Figura 2.11 ilustra a curva analítica do OR em etanol. A correlação entre os valores de concentração do OR e os valores de absorvância permitiu a obtenção de linha de tendência cuja equação da reta determinada foi $Abs_{511nm} = [OR] \times 0,0515 - 0,0231$, com R^2 de 0,9969, permitindo a quantificação do OR dentro da faixa de concentração estabelecida para construção da curva analítica.

Figura 2.11. Curva analítica de OR analisado por espectrofotometria UV-vis a 511 nm.



4.6. Escolha do solvente para solubilização das nanopartículas lipídicas

Para quantificação do OR veiculado nas NL, tanto na forma de dispersão líquida quanto após a incorporação em diluentes para formas farmacêuticas sólidas faz-se necessário garantir que a matriz lipídica seja dissolvida em sistema solvente adequado. Para isso foi testada a dissolução do lipídio sólido behenato de glicerila em diferentes solventes. A Tabela 2.13 apresenta a lista de solventes testados, as condições de análise e as observações quanto a solubilização de 1 g de behenato de glicerila em 10 mL de solvente.

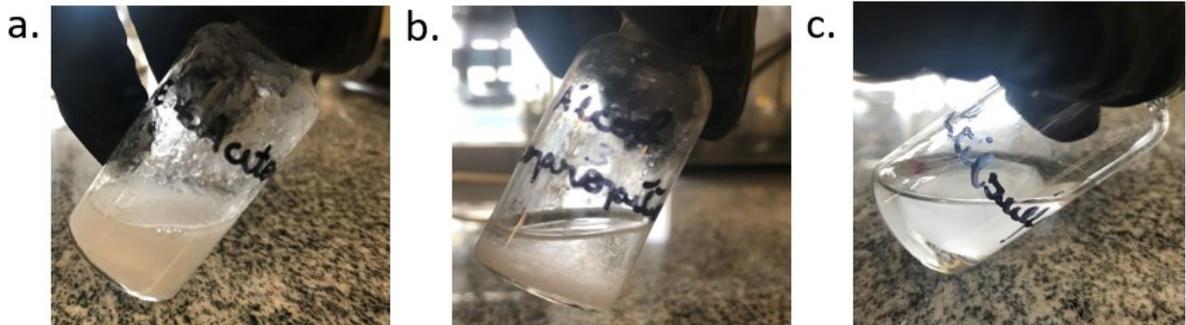
Tabela 2.13. Solubilização do behenato de glicerila em diferentes solventes.

Reagente	Tempo	Temperatura	Solubilização / Aspecto
Acetona	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Solubilizado
	24h	25°C	Parcialmente Solubilizado
n-octanol	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Não Solubilizado
	24h	25°C	Não Solubilizado
Propilenoglicol	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Não Solubilizado
	24h	25°C	Não Solubilizado
Étanol	1h	25°C	Solubilizado
	1h	40°C	Solubilizado
	24h	25°C	Solubilizado
Acetato de etila	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Não Solubilizado
	24h	25°C	Parcialmente Solubilizado
Acetonitrila	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Não Solubilizado
	24h	25°C	Parcialmente Solubilizado
Metanol	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Não Solubilizado
	24h	25°C	Parcialmente Solubilizado
Isopropanol	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Não Solubilizado
	24h	25°C	Parcialmente Solubilizado
Dimetilsulfóxido	1h	25°C	Não Solubilizado
	1h	40°C	Solubilizado
	24h	25°C	Solubilizado

Destaque azul representa os melhores resultados.

A Figura 2.12 ilustra o comportamento do behenato de glicerila em presença de alguns solventes em que não apresentou solubilidade suficiente para ser considerado para utilização em ensaios posteriores.

Figura 2.12. Verificação da presença de resíduos de behenato de glicerila frente aos solventes testados após uma hora de contato em temperatura ambiente. a- acetona; b- isopropanol; c- dimetilsulfóxido.



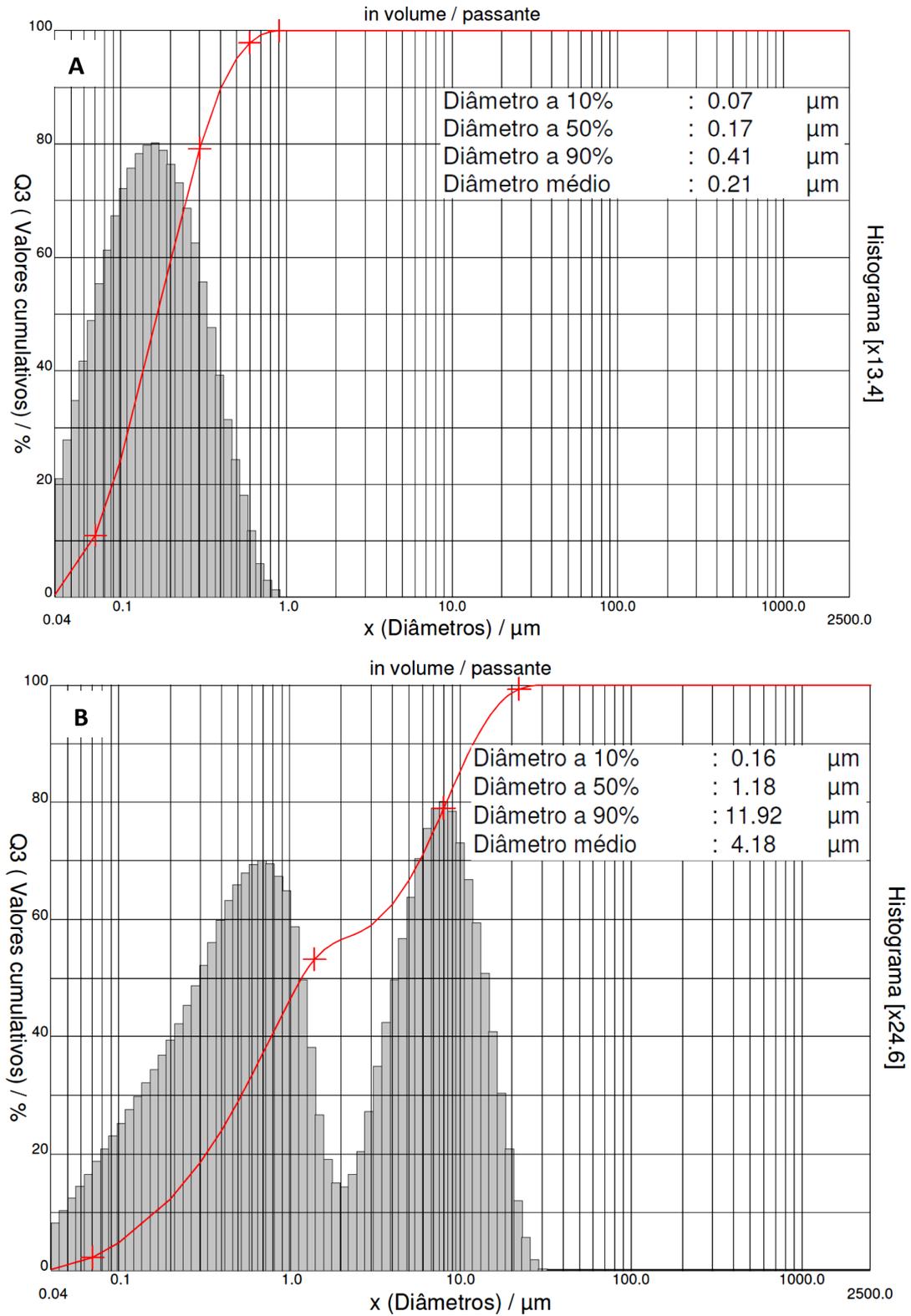
O etanol foi capaz de solubilizar o behenato de glicerila nas 3 condições testadas, sendo, portanto escolhido para solubilização da matriz lipídica das nanopartículas. De fato, é desejável que o solvente capaz de dissolver a matriz lipídica também seja miscível com o meio aquoso da dispersão de nanopartículas, assim como seja capaz de solvatar os diluentes para formas sólidas, favorecendo a extração das NL após secagem com esses excipientes. Além disso, os demais componentes constituintes da formulação de NL aqui trabalhada são miscíveis e/ou solúveis em etanol.

4.7 Caracterização das formulações de NL com e sem OR a partir dos estudos de otimização de formulações e de processo.

As formulações de NL com e sem OR foram preparadas utilizando os mesmos procedimentos descritos para as formulações produzidas em razão dos DoEs de formulação e processo. Ambas as formulações foram analisadas por difração a laser sendo registrados os valores de tamanho tanto em volume quanto e número passante.

A Figura 2.13 ilustra perfil de distribuição de tamanho de partículas das formulações produzidas.

Figura 2.13. Perfis de distribuição de tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sem OR (A) e com OR (B).



Os valores de d50-v, dm-v, dm-n foram registrados e os valores de Spam e RU foram calculados e encontram-se apresentados na Tabela 2.14.

As dispersões de NL também foram avaliadas quanto a distribuição do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta pela mobilidade eletroforética. Os dados de tamanho médio (Z-average) e potencial zeta são apresentados na Tabela 2.14.

Tabela 2.14 Análise de tamanho de partículas e potencial zeta por difração a laser e espalhamento dinâmico de luz para as dispersões de NL com e sem OR.

Parâmetro analisado	NL-OR	NL-BR
D50-v	4,393 μm	0,170 μm
Dm-v	6,813 μm	0,210 μm
Dm-n	0,080 μm	0,070 μm
Spam	3,817	2,000
RU	85,167	3,000
Z-average	759,2 nm	757,1 nm
PDI	30,5 %	26,2 %
Potencial Zeta	-12,0 mV	4,0 mV

Os resultados de difração a laser demonstraram resultados de Dm-v 6,813 μm e Dm-n 0,080 μm para formulação com Oil Red e Dm-v 0,210 μm e Dm-n 0,070 μm para formulação sem Oil Red (branco), sinalizando que as amostras com Oil Red não demonstraram uma uniformidade entre as nanopartículas formadas, por possíveis variações ou interferências durante a análise das amostras. Os resultados encontrados por espalhamento dinâmico de luz, no entanto, demonstraram uma uniformidade no tamanho das nanopartículas de aproximadamente 700,0 nm (Z-average) para as formulações com e sem Oil Red, demonstrando a similaridade entre as nanopartículas com e sem o Oil Red, assim como evidenciou que o corante não foi capaz de mudar a estrutura das nanopartículas.

O índice de polidispersão (PDI) é uma medida da heterogeneidade de uma amostra com base no tamanho. A polidispersão pode ocorrer devido à distribuição de tamanho em uma amostra ou aglomeração ou agregação da amostra durante o isolamento ou análise. Valores até 30% são considerados adequados. Assim as amostras com Oil Red e sem Oil Red demonstraram baixa dispersão.

O potencial zeta, que representa a análise de carga de superfície e possibilita entender a química, aglomeração ou floculação entre as partículas, apresentou resultados -12,0 mV para formulações com Oil Red e +4,0 mV para formulação sem Oil Red. Valores entre -15,0 mv e +15,0 mv representam a falta de aglomeração e neutralidade do tensoativo, demonstrando que as nanopartículas formadas possuem características adequadas e importantes para eficácia e segurança da plataforma, isso porque sem aglomeração as nanopartículas conseguem manter seu tamanho formado originalmente, auxiliando nas características desejadas e previstas no organismo.

Após as análises de tamanho as formulações de NL com e sem OR foram avaliadas quanto ao teor do corante nas formulações.

As formulações de NL-OR e NL-BR foram avaliadas quanto ao teor de OR por espectrofotometria de UV-vis a 511 nm. Essa avaliação é importante para determinar eventuais aumentos das concentrações das preparações em razão da elaboração do sistema emulsionado a quente ou em razão de diluição que pode ocorrer durante o processo de homogeneização em alta pressão.

De fato, o equipamento de homogeneização em alta pressão, deve ter todo o seu percurso capilar a ser percorrido pela formulação preenchido com água ou outro solvente apropriado, de modo que a ocorrência de diluição da formulação é algo esperado. Da mesma forma, no momento do esgotamento da formulação do sistema, também pode ocorrer diluição, visto que para o equipamento continue a processar é necessário a adição de solvente apropriado para finalização do esgotamento.

Os espectros de absorção no UV-vis para as formulações de NL-BR e NL-OR são apresentados na Figura 2.14. Os resultados obtidos na análise por espectrofotometria revelaram uma recuperação de cerca de 97,17%, confirmando uma leve diluição das amostras. Esse resultado é importante por indicar o nível de correção da concentração de OR que necessita ser realizado para avaliar a recuperação do marcador nas etapas posteriores, onde a dispersão de nanopartículas é incorporada aos diluentes para formas farmacêuticas sólidas. Os dados de absorbância, as concentrações calculadas e estimadas e a recuperação de OR são apresentados na Tabela 2.15.

Figura 2.14. Espectros de absorção no UV-vis para amostras de NL-BR e NL-OR extraídas por etanol absoluto.

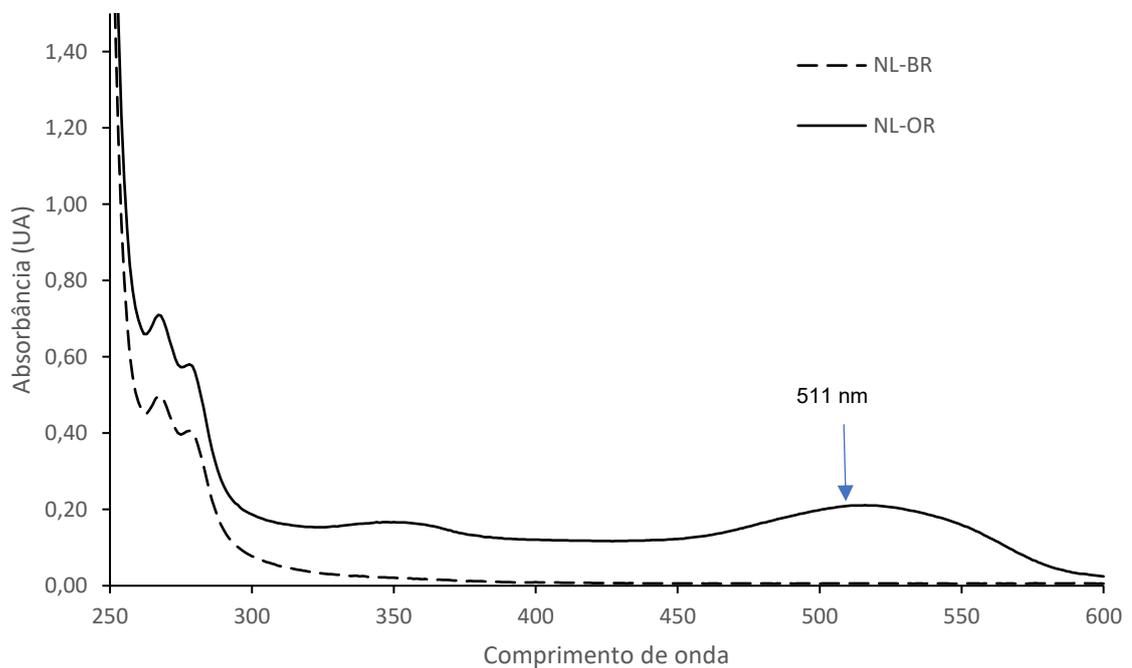


Tabela 2.15, Determinação do teor de OR nas formulações de NL com e sem OR

Parâmetros	NL-OR	NL-BR
Absorbância 511 nm (UA)	0,2021	0,0059
[OR] _{determinada} (µg/mL)	4,53	0,56
[OR] _{teórica} (µg/mL)	4,66	4,66
% Recuperação de OR (%)	97,17	12,08

4.8 Incorporação das dispersões de NL nos diluentes para formas farmacêuticas sólidas.

Dispersões de NL foram incorporadas em diluentes em pó utilizados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas. Foram utilizados 3 tipos de diluentes para compressão direta, o amido pré-gelatinizado, a celulose microcristalina PH 102 e PH200. Suas propriedades físico-químicas são reportadas na Tabela 2.16

O amido pré-gelatinizado é um diluente processado mecanicamente para romper os grânulos de amido e tornar o produto mais fluível e compressível (SHESKEY *et al.* 2009).

A celulose microcristalina possui função diluente e auxilia na lubrificação e desintegração de comprimidos (SHESKEY *et al.* 2009).

Os três excipientes melhoram a fluidez e compressibilidade dos pós, além de possuírem porosidade que auxilia na incorporação das nanopartículas.

Tabela 2.16 Características físico-químicas dos diluentes utilizados na formulação (SHESKEY *et al.* 2009).

Parâmetros	Amido pré-gelatinizado	Celulose microcristalina PH 102	Celulose microcristalina PH 200
Acidez / Alcalinidade	4,5 – 7,0	5,0 – 7,0	5,0 – 7,0
Densidade (verdadeira)	1,516 g/cm ³	1,668 g/cm ³	1,668 g/cm ³
Fluidez (índice de comp. Carr)	18 – 23%	1,41 g/s	1,41 g/s
Umidade	Higroscópico	higroscópico	Higroscópico
Solubilidade	Solúvel em água Insolúvel em solv. Orgânicos	Solúvel em hidróxido de sódio 5% p/v, praticamente insolúvel em água e maioria dos solventes orgânicos	Solúvel em hidróxido de sódio 5% p/v, praticamente insolúvel em água e maioria dos solventes orgânicos
Tamanho de partícula	30 – 150 mm	80 – 120	180 – 220

Para obtenção das dispersões de NL em pó, foram utilizados diluentes (DLT) para formas sólidas adicionados das dispersões de NL, inicialmente líquidas, nas proporções de 7:3, 5:5 e 3:7, respectivamente. Assim, considerando que para todas as composições foram preparadas 3,0 g de misturas, as quantidades de dispersão de NL pesadas foram de 0,900 g (7:3), 1,500 g (5:5) e 2,100 g (3:7).

4.8.1. Análise das dispersões de NP nos diluentes através da microscopia eletrônica de varredura.

As dispersões de nanopartículas em pó foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas proporções NP:DLT 0:10, 7:3, 5:5 e 3:7. A proporção NP:DLT 10:0 não foi analisada pois o equipamento permitia apenas amostras em forma sólida.

As análises demonstraram que a morfologia dos diluentes foram mantidas após a incorporação das nanopartículas e o processo de liofilização. Os três diluentes utilizados, amido pré-gelatinizado (figura 2.16), celulose microcristalina PH102 (figura 2.17), celulose microcristalina PH200 (figura 2.18) demonstraram similaridade de comportamento, mantendo a conformação original.

Figura 2.15. A. amido pré-gelatinizado sem nanopartículas e liofilização. Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients, B. APG:NP 10:0, C. APG:NP 7:3.

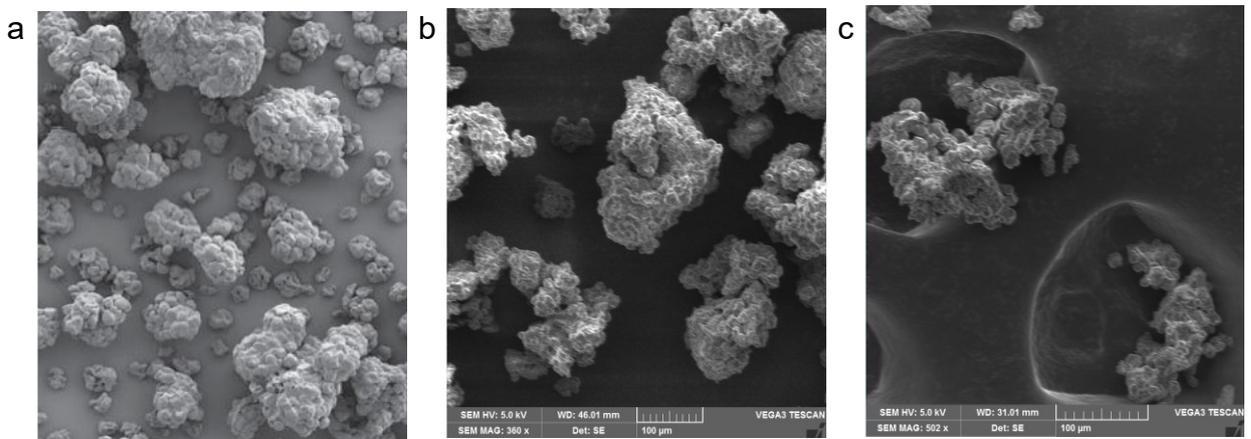


Figura 2.16. A. Celulose microcristalina 102 sem nanopartículas e liofilização (100x). Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients, B. APG:NP 10:0 (502x), C. APG:NP 7:3 (360x).

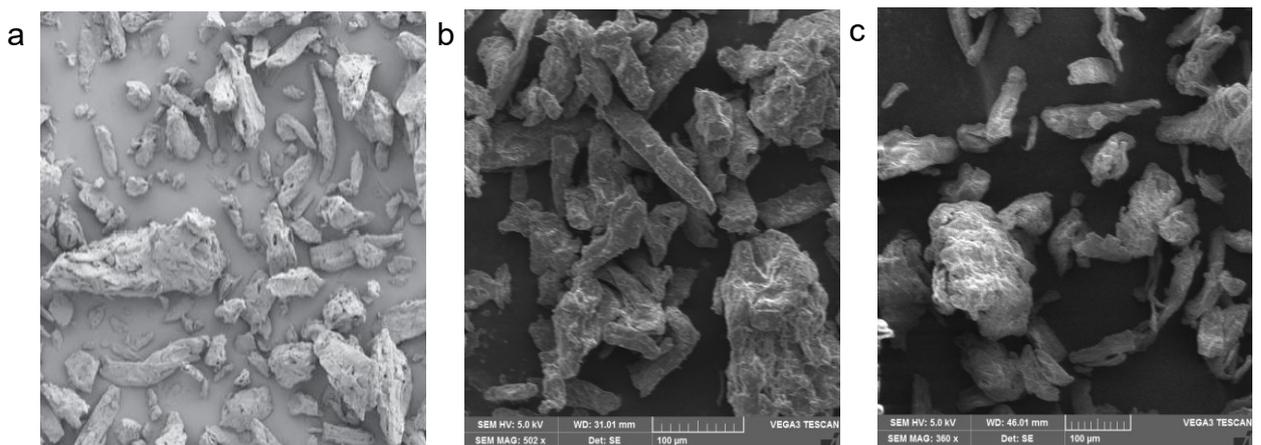
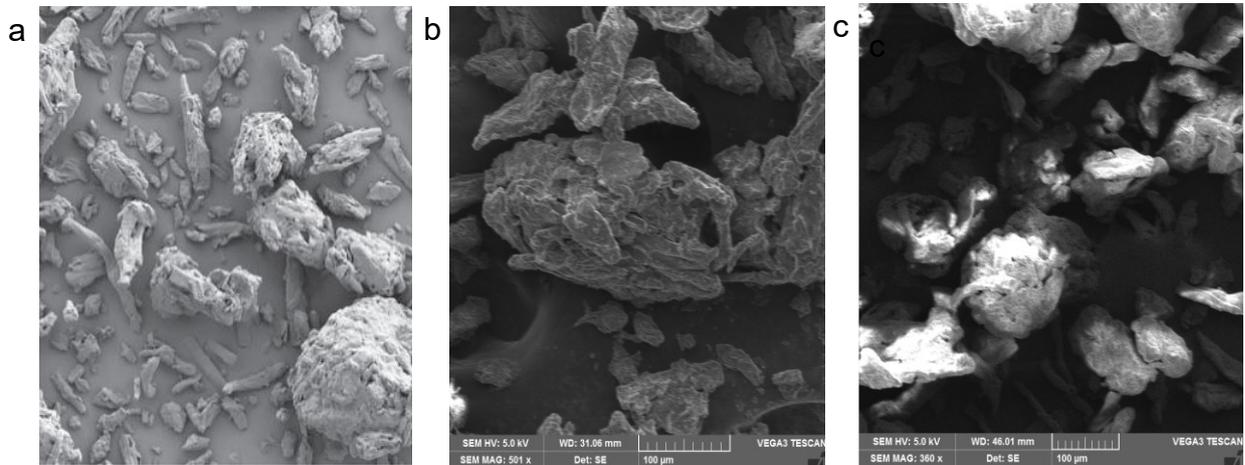


Figura 2.17. A. celulose microcristalina 200 sem nanopartículas e liofilização (100x). Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients, B. MCC 200:NP 10:0 (501x), C. MCC 200:NP 7:3 (360x).



A manutenção da morfologia dos diluentes e das proporções NP: DLT é ideal para manutenção do fluxo e compressibilidade em formulações sólidas para cápsulas e comprimidos.

4.8.2. Análise de umidade das dispersões de NP em diluentes

Após congelamento e 48h de liofilização a umidade residual das misturas de DLT:NL foram determinadas resultando em valores inferiores a 5% de umidade residual. Apenas as misturas preparadas com amido pré-gelatinizado resultaram em umidade residual superior a 4,0%, permitindo considerar o procedimento de liofilização adotado adequado para obtenção das misturas DLT:NL em pó. A Tabela 2.17 apresenta os dados de umidade residual para misturas preparadas.

Tabela 2.17 Dados de umidade residual das misturas de DLT:NL após processo de liofilização para obtenção da formulação em pó.

Diluyente (DLT)	Proporção de mistura DLT:NL	Umidade Residual (média ± DP)
APG	7:3	1,537 ± 0,534
	5:5	3,618 ± 0,184
	3:7	3,581 ± 0,855
MCC102	7:3	2,289 ± 0,527
	5:5	2,155 ± 0,314
	3:7	2,479 ± 0,392
MCC200	7:3	1,957 ± 0,633
	5:5	1,535 ± 0,043
	3:7	2,529 ± 0,071

4.9. Análise do teor nas amostras DLT : NP

A partir dos dados de Umidade Residual das misturas de DLT:NL e do teor de OR na dispersão de NL foi possível determinar a quantidade teórica de OR presente nas misturas e sua recuperação percentual.

Assim, com base nas quantidades de DLT e NL utilizados para a elaboração das misturas DLT:NP (7:3, 5:5 e 3:7), e considerando que as formulações de NL foram constituídas por cerca de 19% p/p de material não volátil que não poderia ser eliminado pela liofilização, foi possível estimar as quantidades teóricas de material não volátil originário das NL de 0,171 g, 0,285 g e 0,399 g, respectivamente, que foram incorporados aos diluentes.

Ainda, considerando uma formulação de NL de 50g, cerca de 9,5 g (19% p/p) refere-se a parte não volátil da formulação, dos quais 2,0 g refere-se ao triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (TCC). Deve-se recordar que para o preparo das NL-OR o corante foi previamente solubilizado no TCC (densidade = 0,86 g/mL) na concentração de 5 mg/mL, de modo que a quantidade teórica de OR deve ser corrigido pelo valor da densidade do óleo, ou seja, quanto pesado 2,0 g de solução de OR em TCC a 5,0 mg/mL, estamos tomando cerca de 2,33 mL da solução e, portanto, uma massa de OR de 11,63 mg. Considerando que temos 11,63 mg de OR em 9,5 g de material não volátil da dispersão de NL (19% de 50 g de formulação), a concentração de OR nesse material é de 0,12% p/p. A Tabela 2.18 traz os valores

teóricos utilizados para a construção da sequência de cálculos para definição da concentração teórica de OR nas misturas.

Tabela 2.18. Valores teóricos dos componentes das misturas de diluentes e NL para cálculo da concentração teórica de OR nas amostras liofilizadas de misturas e solução de análise.

Proporção de mistura DLT: NL	Massa de DLT (g)	Massa de dispersão de NL (g)	¹ Massa de NL liofilizada (g)	² Massa da Mistura DLT + NL liofilizada (g)	³ FC – Q _{OR} na mistura liofilizada	⁴ [OR] na mistura DLT/NL (µg/g)	⁵ [OR] _{teórica} na solução de análise (µg/mL)
7:3	2,100	0,900	0,171	2,271	0,0012	90,35	3,61
5:5	1,500	1,500	0,285	1,785	0,0012	191,60	7,66
3:7	0,900	2,100	0,399	1,299	0,0012	368,59	14,74

- 1- Massa calculada a partir do material não volátil que compõe a dispersão de NL. A massa de dispersão de NL foi multiplicada por 19%;
- 2- Somatória das massas de diluente (DLT) e de NL liofilizada
- 3- Fator de Correção de 0,12% para determinação da quantidade de OR a partir da razão entre a massa de NL liofilizada presente na mistura DLT:NL liofilizada.
- 4- Concentração resultante da aplicação do FC-Q_{OR} sobre a razão entre a massa de NL liofilizada presente na mistura DLT:NL liofilizada.
- 5- Solução preparada tomando-se cerca de 0,1 g da mistura DLT:NL liofilizada extraída em 2,5 mL de etanol absoluto e centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm.

Considerando o racional apresentado na Tabela 2.18 para elaboração das amostras de misturas de DLT:NL para análise por espectrofotometria, buscou-se tomar cerca de 0,100 g de cada uma das misturas para extração do corante com 2,5 mL de etanol absoluto. Os valores de teor de OR nas misturas de DLT:NL e a recuperação de OR das formulações são apresentados nas Tabelas 2.19-2.21.

Tabela 2.19. Dados referentes ao teor e recuperação de OR nas misturas de DLT:NL-OR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

DLT	DLT:NL -OR	Massa amostra DLT:NL -OR (g)	[OR] _{teórica} amostra (µg/mL)	ABS 511 nm (UA)	[OR] _{determinada} amostra (µg/mL)	Recuperação OR (%)
	7:3	0,1002 ± 0,0002	3,52 ± 0,01	0,1916 ± 0,0173	4,17 ± 0,34	118,46 ± 9,56
APG	5:5	0,1003 ± 0,0002	7,47 ± 0,01	0,3953 ± 0,0018	8,12 ± 0,03	108,72 ± 0,32
	3:7	0,1005 ± 0,0001	14,82 ± 0,25	0,7004 ± 0,0018	14,05 ± 0,31	95,71 ± 1,20
	7:3	0,1001 ± 0,0002	3,52 ± 0,01	0,1852 ± 0,0109	4,04 ± 0,21	115,02 ± 6,1414
MCC102	5:5	0,1004 ± 0,0001	7,47 ± 0,00	0,3619 ± 0,0012	7,48 ± 0,02	100,01 ± 0,3660
	3:7	0,1000 ± 0,0002	14,75 ± 0,23	0,6400 ± 0,0025	12,88 ± 0,05	87,30 ± 1,1776
	7:3	0,1002 ± 0,0002	3,52 ± 0,01	0,2645 ± 0,0723	5,58 ± 1,40	158,65 ± 39,91
MCC200	5:5	0,1003 ± 0,0002	7,47 ± 0,01	0,3579 ± 0,0065	7,40 ± 0,13	99,03 ± 1,51
	3:7	0,1004 ± 0,0002	14,66 ± 0,23	0,6590 ± 0,0071	13,25 ± 0,14	90,39 ± 2,35

Destaque azul representa os melhores resultados.

Para verificar a interferência dos demais excipientes da formulação na leitura da absorbância no UV-Vis, e desconsiderar os valores provenientes de variações analíticas, foram realizadas diluições com formulações placebos (sem Oil Red). Os resultados são reportados na tabela 2.19.

Tabela 2.20. Dados referentes ao teor e recuperação de OR nas misturas de DLT:NL-BR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

DLT	DLT:NL -BR	Massa amostra DLT:NL -BR (g)	[OR] _{teórica} amostra ($\mu\text{g/mL}$)	ABS 511 nm (UA)	[OR] _{determinada} amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação OR (%)
APG	7:3	0,1006	3,53	0,003 \pm	0,52	14,59
		$\pm 0,0004$	$\pm 0,01$	0,0032	$\pm 0,06$	$\pm 1,76$
	5:5	0,1000	7,45	0,0192 \pm	0,82	11,03
		$\pm 0,0002$	$\pm 0,01$	0,0084	$\pm 0,16$	$\pm 2,22$
	3:7	ND*	ND	ND	ND	ND
MCC102	7:3	0,1003	3,52	0,0107	0,66	18,65
		$\pm 0,0002$	$\pm 0,01$	$\pm 0,0082$	$\pm 0,16$	$\pm 4,52$
	5:5	0,1004	7,48	0,0148	0,74	9,84
		$\pm 0,0001$	$\pm 0,0086$	$\pm 0,0081$	$\pm 0,1571$	$\pm 2,10$
	3:7	ND	ND	ND	ND	ND
MCC200	7:3	0,1001	3,52	0,0039	0,52	14,91
		$\pm 0,0002$	$\pm 0,01$	$\pm 0,0013$	$\pm 0,03$	$\pm 0,71$
	5:5	0,1005	7,48	0,0330	1,09	14,57
		$\pm 0,0001$	$\pm 0,01$	$\pm 0,0289$	$\pm 0,56$	$\pm 7,50$
	3:7	ND	ND	ND	ND	ND

*ND: Não determinado

A partir dos resultados de absorvância encontrados em 511 nm, foi possível encontrar a concentração de Oil Red ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras nas proporções 7:3, 5:5 e 3:7.

Inicialmente realizou-se a leitura do branco para verificar a interferência analítica sobre as leituras de absorvância. Foi possível observar o valor de 12 $\mu\text{g/mL}$ foram provenientes de uma variação reportada na curva analítica.

As amostras com Oil Red foram analisadas por UV-Vis e demonstraram bons resultados de recuperação. É interessante destacar os valores de maiores e menores concentrações de DLT:NL. Nas amostras com amido pré-gelatinizado foram encontrados valores de 118,46% (7:3) e 95,71 % (3:7). Nas amostras com celulose microcristalina 102 foram encontrados valores de 115,02 % (7:3) e 87,01 (3:7). Nas amostras com celulose microcristalina 200 foram encontrados valores de 158,65 % (7:3) e 90,39% (3:7). A partir desses resultados observa-se que a concentração das amostras são menores conforme a maior concentração das nanopartículas, demonstrando uma possível interferência residual dos diluentes na leitura.

Os placebos (formulações sem Oil Red) também foram lidos e demonstraram valores diferentes de 0,0 %, confirmando a pequena interferência dos demais excipientes e variação analítica nos resultados de absorvância. Nas amostras com amido pré-gelatinizado foram encontrados valores de 14,59% (7:3) e ND (3:7). Nas amostras com celulose microcristalina 102 foram encontrados valores de 18,65% (7:3) e ND (3:7). Nas amostras com celulose microcristalina 200 foram encontrados valores de 14,91% (7:3) e 14,57% (5:5) e ND (3:7).

Considerando os valores encontrados, todas as amostras demonstraram resultados adequados, com foco nas amostras de proporção 5:5, que tiveram resultados mais aproximados à 100%.

4.10. Avaliação da capacidade de dessorção (liberação) das NL a partir das misturas de NL-OR e NL-BR.

Para que a incorporação de nanopartículas lipídicas em diluentes para formas farmacêuticas sólidas tenha aplicação prática deve ser garantido que as nanoestruturas sofram dessorção das partículas de diluentes para formas sólidas, sendo liberadas para o meio aquoso e, conseqüentemente, tornam-se disponíveis para serem absorvidas íntegras, liberem seus conteúdos, ou mesmo sofram digestão.

Para verificação da capacidade de dessorção das nanopartículas lipídicas, amostras das misturas de NL com e sem OR em diluentes para formas farmacêuticas sólidas foram dispersas em água purificada por agitação vigorosa em agitador de tubos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para favorecer a sedimentação das partículas de diluente a fim de facilitar a avaliação das dispersões de nanopartículas por difração a laser. Dos dados de tamanho de partícula coletados para o intervalo de 40 nm a 2,5 mm foram selecionados os valores percentuais para os tamanhos de 500 e 1000 nm em volume passante e 100 e 300 nm para número passante. Os dados coletados são apresentados nas Tabelas 2.21 e 2.22.

Tabela 2.21. Dados referentes à porcentagem de partículas liberadas com OR nas misturas de DLT:NL-OR para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

Amostra	Proporção DLT:NL	Porcentagem de partículas em volume passante (%)		Porcentagem de partículas em número passante (%)	
		≤500 nm	≤1000 nm	≤100 nm	≤300 nm
APG	10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
	7:3	0,00	0,00	0,00	0,00
	5:5	5,60	10,85	78,57	89,09
	3:7	0,00	0,00	0,00	0,00
MCC102	10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
	7:3	4,73	12,85	91,48	95,56
	5:5	4,65	11,93	67,54	80,71
	3:7	ND	ND	ND	ND
MCC200	10:0	ND	ND	ND	ND
	7:3	2,81	9,94	89,76	93,99
	5:5	7,69	22,77	88,82	94,47
	3:7	3,77	10,69	90,64	94,97
NL-OR	----	28,98	46,27	91,44	97,43

Destaque azul representa os melhores resultados.

Tabela 2.22. Dados referentes à porcentagem de partículas liberadas sem OR nas misturas de DLT:NL-BR, para os diluentes de formas farmacêuticas sólidas amido pré-gelatinizado (APG), celulose microcristalina 102 (MCC102) e 200 (MCC200).

Amostra	Proporção DLT:NL	Porcentagem de partículas em volume passante (%)		Porcentagem de partículas em número passante (%)	
		≤500 nm	≤1000 nm	≤100 nm	≤300 nm
APG	10:0	ND	ND	27,01	83,32
	7:3	31,04	46,72	96,44	98,74
	5:5	ND	ND	ND	ND
	3:7	12,89	21,21	82,69	93,59
MCC102	10:0	ND	ND	12,76	39,14
	7:3	44,72	62,44	96,91	99,02
	5:5	31,56	50,81	95,62	98,35
	3:7	0,00	0,00	0,00	0,00
MCC200	10:0	4,28	16,48	28,52	57,43
	7:3	27,91	46,64	95,10	98,09
	5:5	3,90	9,72	92,72	96,36
	3:7	0,00	0,00	0,00	0,00
NL-BR	----	95,06	100,00	93,07	99,33

A partir da avaliação das dispersões de nanopartículas por difração a laser, considerando os tamanhos de partícula selecionados entre 500 e 1000 nm em volume passante e 100 e 300 nm para número passante, foi possível avaliar e comparar as amostras com e sem Oil Red, incorporadas ou não nos diluentes.

Para a análise de volume passante, as formulações com Oil Red sem incorporação aos diluentes demonstraram que 28,98% das partículas em volume passante possuíam tamanho ≤ 500 nm e 46,27% resultados ≤ 1000 nm. Em relação ao número passante de partículas, 91,44% apresentaram resultados ≤ 100 nm e 97,43% apresentaram resultados ≤ 300 nm.

Para a análise de volume passante, as formulações sem Oil Red (branco / placebo) sem incorporação aos diluentes demonstraram que 95,06% das partículas possuíam resultados ≤ 500 nm e 100,00 % resultados ≤ 1000 nm. Em relação ao número passante de partículas, 93,07% apresentaram resultados ≤ 100 nm e 99,33% apresentaram resultados ≤ 300 nm.

Comparando os resultados das formulações com e sem Oil Red sem incorporação aos diluentes APG, MCC102 e MCC200, é possível verificar que a presença de Oil Red não interfere no número passante, que demonstraram similaridade nos dois casos. Isso acontece pois as nanopartículas conseguem encapsular e se conformar a necessidade do bioativo, simulado pelo corante Oil Red. Quando as amostras foram adicionadas aos diluentes APG, MCC102 e MCC200, todas as porcentagens de volume e número passante foram menores. Entre os diluentes MCC200 demonstrou melhores resultados. Nas amostras com Oil Red, apresentou resultados maiores que os demais diluentes em todos os aspectos avaliados (porcentagem de partículas em volume passante ≤ 500 nm e ≤ 1000 nm e porcentagem em número passante ≤ 100 nm e ≤ 300 nm), demonstrando liberar mais nanopartículas em meio aquoso. Esse fenômeno se explica pois o MCC200 possui maior tamanho de partícula e maior porosidade, possibilitando a dessorção das nanopartículas mais facilmente.

5.CONCLUSÃO

Com a análise dos dados do DoE, foram definidos como parâmetros de formulação a utilização de 8% de tensoativos (%TA), sem adição de lauril sulfato de sódio (0% para %LSS) e 10 % de fase oleosa (%FO). Para os parâmetros de processo de homogeneização de alta pressão serão utilizadas pressão de cerca de 12.500 psi, temperatura de 70°C, durante 15 minutos de processamento.

Após escolha dos parâmetros foram preparadas novas amostras para demonstrando ser possível obter nanopartículas de aproximadamente 700,00 nm para formulações com e sem Oil Red. Considerando os valores encontrados no teste de recuperação do Oil Red todas amostras demonstraram resultados adequados, com foco nas amostras de proporção 5:5, que tiveram resultados aproximados à 100%. Por fim, o teste de dessorção demonstrou melhores resultados para o diluente MCC200. A partir dos resultados de caracterização, foi escolhida a proporção de DLT:NL de 5:5 de MCC200. Os resultados demonstram que foi possível preparar uma plataforma de carreadores lipídicos para veiculação de bioativos e transformá-los em pó após a adição de diluentes de formas sólidas para veiculação em pós e cápsula.

6.REFERÊNCIAS

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. **Oxford University Press**, chap. 3, p. 42-52, 2003.

BONIFÁCIO, B.V. *et al.* Nanotechnology – based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, n.9, p.1-15, 2014.

SCHWARZ, C. *et al.* Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. **J. Controlled Release**, p. 83-96, 2004.

COURIEL, B. Freeze Drying: Past, Present and Future, PDA J. **Pharm. Sci. Technol.**, p. 352-357, 2008.

DESHMUKH, P.K. *et al.* Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self-assembly systems: targeting and biosensory applications. **J. Control Release**, p. 294-306, 2013.

DIMER, F. A, *et al.* Impactos da Nanotecnologia Na Saúde: Produção De Medicamentos. **Quimica Nova**, p. 1520-1526, 2013.

FHIONNLAOICH *et al.* DoE-It-Yourself: Um estudo de caso para implementar o design de experimentos na síntese de nanopartículas, **University College London**, 2019.

RIBEIRO, J.L.; CATEN, C.T., Projeto de experimentos. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção**, 2003.

JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; KEPPLER, B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, n. 146, p. 1-53, 2003.

LUIZ *et al.* Projetos de experimentos (DoE) para desenvolver e otimizar nanopartículas como sistemas de entrega de medicamentos, **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, v.165, p. 127-148, 2021.

MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 363, 2008.

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

MOHAMMED, A.R.; COOMBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Amino acids as cryoprotectants for Liposomal delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 30, p. 406- 413, 2007.

NICOLAS, J. COUVREUR, P. **Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v.1, p.111, 2009.

PADOVANI, G.C. *et al.* Advances in dental materials through nanotechnology: facts, perspectives and toxicological aspects. **Trends Biotechnol.**, p. 621, 2015.

PUBCHEM. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oil-red-O>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SALAGER, J. L. Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para Obtener las Propiedades Deseadas. **Cuaderno FIRP S747- B**, 1999.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEVERINO, P. *et al.* Processo de obtenção de nano e micropartículas de quitosana encapsulando 4-metilesculetina e produto obtido. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, 2017.

SILVA, L.P., Aplicação da metodologia Design of Experiment (DoE) para otimizar o processo de compressão de comprimidos mastigáveis emu na indústria farmacêutica, **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, v. 9, n.11., 2020.

SILVA, M.S. *et al.* Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v.190, p. 366-374, 2011.

SHERKEY, P. *et al.* Handbook of Pharmaceutical Excipients, **Pharmaceutical Press**, 6. ed.rev., 2009.

WAGHMARE, A. *et al.* Solid lipid nanoparticles: A promising drug delivery system. **Int. Res. J. Pharm.**, p. 100-107, 2012.

ZHANG, Z.; FENG, S. In vitro investigation on poly (lactide) – Tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy. **Biomacromolecules**, v.7, n.4, p. 1139 -1146, 2006.