

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti Duarte Coelho

Planejamento racional de nanopartículas lipídicas como estratégia de liberação controlada de fármacos para uso anti-HIV pediátrico

Recife

2017

Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti Duarte Coelho

Planejamento racional de nanopartículas lipídicas como estratégia de liberação controlada de fármacos para uso anti-HIV pediátrico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria de La Salette Reis

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Coelho, Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti Duarte

Planejamento racional de nanopartículas lipídicas como estratégia de liberação controlada de fármacos para uso anti-HIV pediátrico / Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti Duarte Coelho. – Recife: O Autor, 2017.

184 f.: il., fig, tab.

Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho

Coorientadora: Maria de La Sallette Reis

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências, apêndice e anexo

1. Nanotecnologia 2. Agentes antirretrovirais 3. Aids (doença) I. Soares Sobrinho, José Lamartine (orient.) II. Reis, Maria de La Sallette (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-293

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Professor Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Professora Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Professora Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazaba

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Professora Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Professora Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Professor Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti Duarte Coelho

Planejamento racional de nanopartículas lipídicas como estratégia de liberação controlada de fármacos para uso anti-HIV pediátrico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 23 / 02 / 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

Profa. Dra. Claudete Fernandes Pereira
Departamento de Química Fundamental – UFPE

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
Departamento de Química e Ciências dos Materiais - UFPI

Dedico esse trabalho a Deus por todas as oportunidades e pela vida em si. Aos mestres que transmitem seus melhores conhecimentos em prol de uma sociedade melhor. Aos meus pais e avós, que me deram educação, incentivos e asas para voar. Aos amigos que vibram e ficam felizes por mim. E a meu companheiro de tantos anos, Lucas Coelho, por seu constante suporte, amor e por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me dá a dádiva da vida, e que sempre é justo e bondoso me proporcionando sempre a oportunidade de evoluir, como na conclusão de mais esta etapa.

Aos meus pais, José Gilvan e Sandra e aos meus irmãos, Jéssica e Gabriel Cavalcanti, pelo apoio, carinho e incentivo dedicados. Aos meus avós maternos D. Zeza e Renato (*in memoriam*) e avós paternos (*in memoriam*) D. Carminha e Inácio, por terem sido presentes, bons exemplos de moral e terem contribuído em quem sou hoje.

Ao meu marido, Lucas Coelho, pelo constante apoio e cuidados há anos, bem como durante essa jornada, pelos projetos que compartilhamos e contruímos juntos em nossa relação e pela dávida do amor que agora se presenteia com a breve chegada de nosso primeiro filho(a).

Ao Professor José Lamartine Soares Sobrinho, meu orientador no Brasil, que acreditou no meu potencial, me deu a oportunidade de voltar a fazer pesquisa na academia e a liberdade para contribuir com o planejamento e execução deste trabalho.

À Professora Salette Reis, que me recebeu tão bem e me forneceu todo o necessário para a execução deste projeto na Universidade do Porto – Portugal. Além disso, me deu atenção, apoio e incentivo. Fazendo-se sempre presente e interessada pelo bom andamento do trabalho.

Ao Professor Costa Lima, então diretor do grupo GABAI-Requimte, por ter me aceitado no grupo, pela excelente recepção, pelo constante bom humor e incentivos.

À Cláudia Nunes, que esteve comigo em todos os momentos da minha pesquisa em Portugal, que foi mentora e amiga.

À todos os amigos do NCQMC-UFPE, em especial, a professora Monica Soares, Amanda Quintas, Camila Figueiredo, Maria Luiza, Flávia Lucena, João Pontes, Hannah Lyra, Camila Barros. E ao Prof Danilo Bedor e ao Daniel Castelo pelo apoio nos ensaios com o HPLC.

À todos os amigos do GABAI-Requimte, em especial, Sofia Lima, Daniela Lopes, Joana Magalhães, Catarina Pereira, Ana Neves, José Araújo, Inês Ramos, Sara Pinheiro, Luise Lopes, Alexandre Vieira, Catarina Alves, Virgínia Gouveia, Tiago Catelani, Dayana Bittar, Joana Boeing, Nadja Ferraz, Miguel Horta. Ao Dr Rui Fernandes, da UP pelas análises TEM.

Aos meus sogros, professores Antônio e Rosângela Coelho, pelos constantes incentivos e orientações. E aos amigos de longas datas e familiares, que fazem a jornada mais leve, pela companhia, sorrisos, abraços, paciência e incentivos.

Tenho consciência de ser autêntica e procuro superar todos os dias minha própria personalidade, despedaçando dentro de mim tudo que velho e morto, pois lutar é a palavra vibrante que levanta os fracos e determina os fortes.
O importante é semear, produzir milhões de sorrisos de solidariedade e amizade.
Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça.
Digo o que penso, com esperança.
Penso no que faço, com fé.
Faço o que devo fazer, com amor.
Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende!

Cora Coralina

RESUMO

Este trabalho apresenta o *design* racional de seis nanoformulações utilizando os fármacos antirretrovirais zidovudina (AZT), lamivudina (3TC) e nevirapina (NVP), destinados a terapêutica da AIDS pediátrica via administração oral, dose única diária. Para cada um destes fármacos foi desenvolvido duas nanoformulações otimizadas por abordagem *Quality by Design*, com a finalidade comparativa da técnica produtiva ou mesmo da estrutura nanométrica. Todos os carreadores nanoestruturados foram do tipo lipídico e preferencialmente procurou-se utilizar os mesmos excipientes. Especificamente para a AZT foram obtidos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) por duas técnicas produtivas diferentes, sendo uma a homogeneização a quente por ultrasonicação e outra por uma técnica inédita para produção de nanopartículas lipídicas, desenvolvida neste trabalho e alvo de pedido de patente (109791P), em que utiliza apenas o equipamento microondas e caracteriza-se por ser *one-pot*, etapa única ou duas etapas produtivas, prático, rápido, econômico e *eco-friendly*. Para a NVP foram também desenvolvidas NLC por estes dois métodos com finalidade comparativa e visando aprofundar os conhecimentos da nova técnica produtiva desenvolvida agora aplicada a um fármaco hidrofóbico que é a NVP, uma vez que diverge da AZT que é relativamente hidrofílico. No caso da 3TC foram desenvolvidas duas nanoformulações com estruturas nanométricas bem diferentes entre si, e conseqüentemente com métodos de produção também. Uma foi do tipo NLC enquanto a outra foi uma nanoestrutura nova, desenvolvida neste trabalho, a qual foi denominada de nanopartículas lipídicas múltiplas (MLN), baseada nas partículas lipídicas múltiplas (MLP) recentemente reportadas na literatura científica, porém aqui alcançado o incremento da redução para a escala nanométrica. Todas as nanoformulações otimizadas foram caracterizadas físico-química pelos mesmos parâmetros: tamanho médio de partícula, polidispersão (PDI), potencial zeta e capacidade de carregamento do fármaco. Apresentaram um perfil adequado para administração oral (tamanho de partícula das NLC entre 50 a 300 nm e MLN com média de 450nm, tanto as NLC quanto a MLN entregaram PDI abaixo de 0,3 e potencial zeta > |20| mV e negativo). Além disso, foi comprovado a obtenção, o tamanho das partículas e as morfologias pelo TEM, sendo todas as NLC desenvolvidas com forma esférica e a MLN também esférica com a presença dos variados vacúolos aquosos. As formulações foram fisicamente estáveis pela avaliação preliminar de 30 a 45 dias e são biocompatíveis em células Jurkat T, modelos para as células linfócito T, hospedeiras do HIV. Os estudos de liberação dos fármacos de cada nanoformulação mostraram uma liberação controlada em meio fisiológico igual ou superior a 24 horas. Através de uma análise geral pode-se indicar como mais promissoras as nanoformulações MLN-3TC, M-NLC-AZT e a M-NLC-NVP, sendo estas duas últimas obtidas pela técnica por microondas. Maiores estudos, como o desenvolvimento de ADF com o pó liofilizado para resuspensão no momento da administração oral, bem como o incremento com estratégias de *targetting* podem ser uma abordagem terapêutica interessante.

Palavras-chave: nanopartículas lipídicas, *Quality by Design*, *design* experimental, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas lipídicas múltiplas, microondas.

ABSTRACT

This work presents the rational design of six nanoformulations using the antiretroviral drugs zidovudine (AZT), lamivudine (3TC) and nevirapine (NVP), intended for pediatric AIDS therapy via oral administration, once daily. For each of these drugs, two nanoformulations optimized by Quality by Design approach were developed, with the comparative purpose of the productive technique or even the nanometric structure. All of the nanostructured carriers were of the lipid type and preferred to use the same excipients. Specifically for AZT, nanostructured lipid loaders (NLC) were obtained by two different production techniques, one being the hot homogenization by ultrasound and the other by an new technique for the production of lipid nanoparticles, developed in this work and target of a patent application (109791P), which uses only the microwave equipment and is characterized by being one-pot, single step or two steps productive, practical, fast, economical and eco-friendly. For NVP, NLC were also developed by these two methods for comparative purposes and aiming to deepen the knowledge of the new production technique developed and now applied to a non-hydrophilic drug which is NVP as it diverges from AZT which is relatively hydrophilic. In the case of 3TC, two nanoformulations were developed with very different nanometric structures, and consequently with production methods as well. One was of the NLC type while the other was a new nanostructure developed in this work, which was denominated multiple lipid nanoparticles (MLN), based on the multiple lipid particles (MLP) recently reported in the scientific literature, but in this work reached the reduction increment to the nanometer scale. All optimized nanoformulations were characterized physico-chemical by the same parameters: particle mean size, polydispersity (PDI), zeta potential and loading capacity of the drug. They presented a suitable profile for oral administration (NLC particle size between 50 to 300 nm and MLN with a mean of 450 nm, both NLC and MLN delivered PDI below 0.3 and potential zeta $> |20|$ mV and negative). In addition, the obtaining, particle size and morphologies were proven by TEM, with all NLC being spherical in shape and MLN also spherical with the presence of the various aqueous vacuoles. The formulations were physically stable by the preliminary evaluation of 30 to 45 days performed and are biocompatible in Jurkat T cells, models for the T lymphocytes cell, HIV hosts. Drug release studies of each nanoformulation showed a controlled release in physiological medium equal to or greater than 24 hours. By a general analysis, the MLN-3TC, M-NLC-AZT and M-NLC-NVP nanoformulations can be indicated more promising, the latter two being obtained by microwave technique. Further studies, such as the development of ADF with the lyophilized powder for resuspension at the time of administration, as well as the increment with targeting strategies can be an interesting therapeutic approach.

Keywords: lipid nanoparticles, Quality by Design, experimental design, nanostructured lipid carriers, multiple lipid nanoparticles, microwave.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Algumas estruturas de nanopartículas. Adaptado da dissertação de mestrado (RIBEIRO, 2013).

Figura 2. Emulsão múltipla (W/O/W) e as etapas de preparação. Adaptado de artigo (MCCLEMENTS, 2015).

DESENVOLVIMENTO

Artigo I

Figura 3. Diagrama da abordagem QbD dessa pesquisa

Figura 4. Diagrama Ishikawa de parâmetros críticos de produção de MLN e NLC. * Ultraturrax é usado somente na produção de MLN.

Figura 5. Diagrama da técnica de MLN.

Figura 6. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a) e tamanho de partícula (b) para *design* fatorial completo 2^3 do estudo da formulação NLC-3TC.

Figura 7. Gráficos de superfície de resposta para as respostas: capacidade de carregamento (a) e tamanho médio de partícula (b) do estudo de formulação de NLC-3TC.

Figura 8. Validação dos valores experimentais da formulação NLC-3TC selecionada com seus resultados previstos. (●) LC (%) e (■) Tamanho de Partícula (nm).

Figura 9. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a), tamanho de partícula (b) e PDI (c) para o *design* fatorial completo 2^3 com replicação do ponto central do estudo de formulação de MLN-3TC.

Figura 10. Gráfico de Superfície Resposta para as respostas: LC (a) e tamanho médio de partícula (b) do estudo de formulação de MLN-3TC.

Figura 11. Validação dos valores experimentais da formulação MLN selecionada com os seus resultados previstos. (○) LC (%) e (○) tamanho de partícula (nm).

Figura 12. Perfil de liberação *in vitro* da NLC-3TC (▲) e MLN-3TC (●). (a) simulando o ambiente gástrico e a temperatura corporal (pH 1,2 a 37 °C), e (b) simulando o ambiente

fisiológico e a temperatura corporal (pH 7,4 a 37 °C). Os dados são a média e Desvio Padrão para n = 2.

Figura 13. O modelo de Higuchi aplicado à cinética de liberação em ambiente gástrico simulado (pH 1,2) (A) e ambiente fisiológico (pH 7,4) (B). O NLC-3TC é representado por ▲ e MLN-3TC por ●.

Figura 14. Imagens TEM das formulações NPs: (A) NLC-3TC, amplificação: 100.000x; (B) MLN-3TC, amplificação: 100 000x; (C) MLN-3TC, amplificação: 25 000x.

Figura 15. Estabilidade de armazenamento comparativa das formulações NLC-3TC e MLN-3TC por um período de 30 ou 45 dias. As barras representam o tamanho das nanopartículas (esquerda do eixo Y) e os marcadores de potencial zeta (direita do eixo Y). Os valores representam como média de 3 resultados independentes e respectivo desvio padrão.

Figura 16. Viabilidade de células Jurkat T. Citotoxicidade *in vitro* de 3TC livre e 3TC encapsulado NLC e MLN após 24 horas de incubação. Dados expressos como média ± DP (n = 3).

Artigo II

Figura 17. Fluxograma da abordagem QbD deste trabalho.

Figura 18. Diagrama de Ishikawa de parâmetros críticos tanto para a homogeneização a quente seguida de ultrasonicação como para a nova técnica assistida por microondas. *Parâmetros só são aplicados à técnica de microondas.

Figura 19. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a), Tamanho de Partícula (b) e PDI (c) para o *design* fatorial completo 2³ do estudo da formulação NLC-AZT.

Figura 20. Gráfico de superfície de resposta para a resposta LC do *design* experimental para NLC-AZT.

Figura 21. Porcentagens de capacidade de carregamento obtidas pelos modelos matemáticos e condições experimentais. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (p > 0,05).

Figura 22. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a), tamanho de partícula (b) e PDI (c) para o *design* fatorial completo 2³ de formulação estudo M-NLC-AZT.

Figura 23. Gráfico de superfície de resposta para as respostas: LC (a), tamanho de partícula (b) e PDI (c) do estudo de formulação M-NLC-AZT.

Figura 24. Validação dos valores experimentais da formulação M-NLC-AZT selecionada com os seus resultados previstos. ● PDI e ■ LC (%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (p > 0,05).

Figura 25. Perfil de liberação do AZT *in vitro* (NLC-AZT (▲) e M-NLC-AZT (●)). (a) simulando o ambiente gástrico e a temperatura corporal (pH 1,2 a 37 °C) e (b) simulando o ambiente fisiológico e a temperatura corporal (pH 7,4 a 37 °C). Os dados são a média e DP para n = 2.

Figura 26. O modelo de Higuchi aplicado à liberação em ambiente gástrico simulado (pH 1,2) (A) e ambiente fisiológico (pH 7,4) (B). NLC-AZT é representado por ▲ e M-NLC-AZT por ●.

Figura 27. Imagens TEM de formulações de NPs: (A) NLC-AZT, amplificação: 25.000x; (B) M-NLC-AZT, amplificação: 100.000x

Figura 28. Estabilidade de armazenamento comparativa das formulações NLC-AZT e M-NLC-AZT no tempo máximo de 45 dias. As barras representam o tamanho das nanopartículas (à esquerda do eixo Y) e os marcadores do potencial zeta (à direita do eixo Y) no tempo zero e em 45 dias. Os valores são média de 3 resultados independentes e respectivo DP.

Figura 29. Viabilidade de células Jurkat T. Citotoxicidade *in vitro* de AZT livre, NLC-AZT e M-NLC-AZT e respectivos placebos, após 24 h de incubação. Dados expressos como média ± DP (n = 3).

Artigo III

Figura 30. Abordagem QbD para o desenvolvimento das nanoformulações da NVP.

Figura 31. Diagrama de Ishikawa de parâmetros críticos tanto para a homogeneização a quente seguida de ultrasonicação como para a nova técnica assistida por microondas. *Esses parâmetros são apenas aplicados a nova técnica por microondas.

Figura 32. Fluxograma do método de produção assistido por microondas: *one-pot* em duas etapas.

Figura 33. Fluxograma do método de produção assistido por microondas: *one-pot* em única etapa.

Figura 34. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas (a) LC, (b) tamanho de partícula e (c) PDI do planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} do estudo da formulação NLC-NVP.

Figura 35. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas tamanho de partícula (a) e PDI (b) do planejamento fatorial completo 2^3 do estudo da formulação M-NLC-NVP.

Figura 36. Perfil de liberação da NVP *in vitro* na NLC-NVP (▲) e este estudo está em andamento para a M-NLC-NVP (●), (a) simulando o meio gástrico e temperatura corporal (pH 1,2 a 37 ° C), e (b) simulando o meio fisiológico e temperatura corporal (pH 7,4 a 37 °C). Os dados são a média e DP para n = 2.

Figura 37. Imagens TEM das formulações das NPs: (A) NLC-NVP, amplificação: 100.000 X; (B) M-NLC-NVP, amplificação: 25.000 X.

Figura 38. Estabilidade de armazenamento comparativa das formulações NLC-NVP e M-NLC-NVP ao tempo (0, 7, 15, 22 e 30 dias). As barras representam o tamanho das nanopartículas (eixo Y esquerdo) e os marcadores de potencial zeta (eixo Y direito) no tempo zero a 30 dias. Os valores são média de 3 resultados independentes e respectivo SD.

Figura 39. Viabilidade de células Jurkat T. Citotoxicidade *in vitro* da NVP livre e da NVP incorporada em NLC e M-NLC em 24 hr de incubação. Dados expressos como média ± DP (n=3).

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Formulações com 3TC, AZT e NVP atualmente utilizadas na terapêutica anti-HIV

DESENVOLVIMENTO

Artigo I

Tabela 2. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* fatorial completo 2^3 do estudo de formulação de NLC-3TC.

Tabela 3. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central do estudo de formulação de NLC-3TC.

Tabela 4. Os parâmetros ANOVA de LC e tamanho médio de partícula respondem à caracterização da adequação em modelos de formulação NLC.

Tabela 5. Níveis codificados e os valores reais das variáveis em *design* fatorial completo 2^3 com replicação do ponto central do estudo da formulação de MLN-3TC.

Tabela 6. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central para construir a superfície resposta do estudo de formulação de MLN-3TC.

Tabela 7. Os parâmetros ANOVA das respostas LC e tamanho de partícula para caracterização dos ajustes dos modelos da formulação MLN.

Tabela 8. Parâmetros das formulações finais NLC-3TC e MLN-3TC, depois da otimização QbD.

Tabela 9. Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE de formulações otimizadas de NLC e MLN.

Artigo II

Tabela 10. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central do estudo da formulação NLC-AZT.

Tabela 11. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central do estudo da formulação M-NLC-AZT.

Tabela 12. Parâmetros das formulações finais NLC-AZT e M-NLC-AZT, depois da otimização QbD.

Tabela 13. Tamanho de Partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE das formulações otimizadas de NLC da AZT.

Artigo III

Tabela 14. Estudo de solubilidade da NVP em vários lipídios.

Tabela 15. Níveis codificados e os valores reais das variáveis independentes no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}_{III} do estudo da formulação NLC-NVP.

Tabela 16. Níveis codificados e os valores reais das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3 do estudo da formulação de M-NLC-NVP.

Tabela 17. Parâmetros das formulações finais NLC-NVP e M-NLC-NVP, depois da otimização QbD.

Tabela 18. Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE das formulações otimizadas NLC da NVP.

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ABS	Absorbância
ADF	Associação dose fixa combinada
ANOVA	Análise da varância
AP	<i>Aqueous phase</i> , fase aquosa
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
BCS	<i>Biopharmaceutical classification system</i> , sistema de classificação biofarmacêutica
CO ₂	Dióxido de carbono
DLS	Dynamic light scattering
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
dm / dt	Variação de massa em relação ao tempo
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i> , Iniciativa de drogas para doenças negligenciadas
DOE	<i>Design of experiments</i> , Planejamento de experimentos
DP	Desvio padrão
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> , calorimetria exploratória diferencial
DTG	<i>Derivative thermogravimetry</i> , Termogravimetria derivada
EE	Eficiência de encapsulação
EPC	<i>Egg phosphatidylcholine</i>
F	Teste estatístico F
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , serum bovino fetal
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FM	Fase móvel
FMEA	<i>Failure modes and effects analysis</i>
g/mol	Grama por mol
GL	Graus de liberdade, em estatística

GRAS	Geralmente reconhecidas como seguras
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> , vírus da imunodeficiência humana.
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i> , balanço hidrofílico-lipofílico
HPH	Homogeneização a alta pressão
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
hr	Horas
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ICH	International conference of harmonization
IFAs	Insumos farmacêuticos ativos
INPI	Instituto nacional de propriedade intelectual
Kcps	<i>Kilo count-per-second</i> , diz respeito a intensidade de luz espalhada
kDa	Kilodaltons
KHz	Quilohertz
kV	Kilovolt
L	Litro
LC	Loading capacity, capacidade de carregamento
LDC	<i>Lipid-drug conjugates</i> , conjugados lipídio-droga
LL	<i>Liquid lipid</i> , lipídio líquido
LNPs	<i>Lipid nanoparticles</i> , nanopartículas lipídicas
Log P	Coefficiente de partição em octanol/água
LP	<i>Lipid phase</i> , fase lipídica
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
M	Molaridade
média Z	Diâmetro hidrodinâmico médio
mg	Miligrama
mim	Minutos
mL	Mililitro
MLN	<i>Multiple lipid nanoparticles</i> , nanopartículas lipídicas múltiplas
MLP	<i>Multiple lipid particles</i> , partículas lipídicas múltiplas
Mm	Milímetros
MTT	<i>Methylthiazoletetrazolium</i>
NLC	<i>Nanostructured lipid carriers</i> , carreadores lipídicos nanoestruturados

nm	Nanômetros
NNRTI	<i>Non Nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i> , inibidores de transcriptase reversa não análogos a nucleosídeo
NPs	Nanopartículas
NRTI	<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i> , inibidores de transcriptase reversa análogos a nucleosídeo
NVP	Nevirapina
OMS	Organização mundial da saúde
p	value Probabilidade de significância estatística
PDI	<i>Polydispersity index</i> , taxa de polidispersividade 567890
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
QbD	<i>Quality by Design</i>
QM	Quadrados médios, em estatística
R	Resolução entre os picos cromatográficos
Rpm	Rotações por minuto
RS	<i>Response surface</i> , superfície de resposta
RSM	<i>Response surface methodology</i> , metodologia de superfície de resposta
SL	<i>Solid lipid</i> , lipídio sólido
SLN	<i>Solid lipid nanoparticle</i> , nanopartículas lipídicas sólidas
SQ	Soma dos quadrados, em estatística
T	Temperatura
t	Tempo
T onset	Temperatura inicial da reação
T-80	Tween 80
TA	Temperature ambiente
TARV	Terapia antirretroviral
TDF	Tenofovir
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> , microscopia eletrônica de transmissão
TF	Fator de assimetria entre os picos cromatográficos
TG	Termogravimetria
TR	Tempo de retenção do último pico cromatográfico

UV	Ultra-violeta
UV-Vis	Ultra-violeta visível
W/O/W	<i>Water/oil/water</i> , água/óleo/água
Zeta Potencial	zeta
µg	micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
<	Inferior a
>	Superior a
ΔH	Varição de energia entálpica
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
r^2	Coefficiente de correlação linear
$T_f - T_i$	Intervalo em temperatura da reação
v:v	Volume por volume
x	Multiplicação
β	Razão de aquecimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Características físico-químicas dos fármacos de escolha	27
2.1.1	Lamivudina	27
2.1.2	Zidovudina	27
2.1.3	Nevirapina.....	28
2.2	Formulações atualmente disponíveis e utilizadas na terapêutica anti-HIV	28
2.3	<i>Quality by Design</i> (QbD)	30
2.4	Nanotecnologia aplicada a formulações terapêuticas	31
2.4.1	Nanopartículas lipídicas.....	32
2.4.2	Vias de administração e farmacocinética.....	33
2.4.3	Propriedades físico-químicas das nanopartículas	34
2.4.4	Preparação de LNPs.....	35
2.4.5	Nanoformulações desenvolvidas com os fármacos 3TC, AZT e NVP	37
2.5	Emulsões Múltiplas	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	Geral	41
3.2	Específicos	41
4	DESENVOLVIMENTO: Materiais, Métodos, Resultados e Discussão.	42
4.1	Artigo I - Nanopartículas Lipídicas Múltiplas (MLN), uma nova geração de nanopartículas lipídicas para sistema de liberação de drogas: <i>design</i> experimental de lamivudine-MLN	43
4.2	Artigo II - Otimização de carreadores lipídicos nanoestruturados para <i>delivery</i> de Zidovudina usando uma síntese inovadora assistida por microondas.	78
4.3	Artigo III - Carregador lipídico nanoestruturado com Nevirapina: uma síntese assistida por microondas usando abordagem <i>quality by design</i>	109
5	CONCLUSÕES	137

6 PERSPECTIVAS	139
REFERÊNCIAS	
APÊNDICE	
ANEXO	

1. INTRODUÇÃO

A epidemia mundial do vírus da imunodeficiência humana (HIV) reivindicou menos vidas em 2015 dentre quase duas décadas, ou seja, cerca de 1,1 milhão de mortes, o que significou redução em 45% quando comparado ao ano de 2005, além das pessoas HIV-positivas agora viverem vidas mais saudáveis. Essa redução e melhor qualidade de vida é fruto dos recentes avanços no acesso da terapia anti-retroviral (TARV). Além disso, foi confirmado que a TARV previne a transmissão do HIV. Tendo inclusive sido alcançados progressos na prevenção e eliminação da transmissão de mãe para filho e na manutenção das mães - cerca de 8 em cada 10 mulheres grávidas vivendo com HIV (1,1 milhão) receberam antirretrovirais (ARVs) em 2015 (WHO, 2016a).

Além disso, em 2015 houve o menor número de novos casos desta epidemia da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), conhecida internacionalmente como AIDS, desde 1991. Entretanto, o HIV / AIDS continua a ser um dos desafios de saúde pública mais significativos do mundo, particularmente nos países de rendimento baixo e médio (WHO, 2016a).

A OMS tem forte atuação no combate a AIDS e reforça que os países precisam cumprir o seu compromisso de acabar com a epidemia de AIDS como ameaça à saúde pública até 2030, tendo sido estabelecido para isso um novo plano estratégico 2016-2021 (WHO, 2016b). As mortes relacionadas com o HIV são ainda inaceitavelmente elevadas (WHO, 2016a).

Estima-se que 18,2 milhões pessoas estavam recebendo tratamento contra o HIV em meados de 2016. No entanto, globalmente, apenas 46% dos 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS em 2015 estavam recebendo TARV (WHO, 2016a).

O *Drugs for Neglected Diseases Initiative* – DNDi, coloca a AIDS pediátrica na lista de doenças negligenciadas. As estatísticas do ano de 2015 são que dos 36 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS, 1,8 milhão são crianças menores de 15 anos de idade e 150.000 novas infecções pediátricas, com cerca de 300 crianças mortas por dia. Sem tratamento um

terço das crianças infectadas morrem no primeiro ano de vida. Sendo que ainda 90% das crianças são infectadas por transmissão vertical (durante a gestação) (DNDI, 2015).

As opções de tratamento atuais para as crianças soropositivas são insuficientes. Uma terapia de primeira linha melhorada para crianças com menos de 3 anos de idade deve idealmente ser segura, fácil de administrar, bem tolerada e palatável, estável ao calor, facilmente dispersível e dosificada uma vez por dia ou menos. Deve também ter um risco mínimo de desenvolver resistência, ser compatível com medicamentos contra a tuberculose e acessível (DNDI, 2015).

Em 2016 a OMS passou a recomendar que todos portadores de HIV devem ser iniciados na TARV removendo todas as limitações anteriores para iniciação, como: idade, parâmetros imunológicos e clínicos. Além disso, há agora uma recomendação para considerar a adição de testes de nascimento para o bebê exposto ao HIV, o que pode resultar no aumento da necessidade por opções TARV no período neonatal (UNICEF; WHO, 2016).

Os regimes terapêuticos de primeira linha preferidos e alternativos para crianças de 0 a 3 anos e de 3 a 10 anos não foram alterados de 2013 a 2016. Sendo os regimes de primeira linha recomendados para menores de 3 anos de idade, baseado em LPV/r: ABC + 3TC + LPV/r; AZT + 3TC + LPV/r e baseados em NNRTI: ABC + 3TC + NVP; TDF + 3TC + NVP; AZT + 3TC + NVP (WHO, 2016c).

Os fármacos NVP e AZT/3TC permanecem na “optimal paediatric ARV formulary list” enquanto a associação AZT/3TC/NVP nesta atualização foi transferida para a lista “limited – use paediatric ARV formulary list” (UNICEF; WHO, 2016).

A profilaxia com duas drogas contendo AZT e NVP para lactentes com alto risco de infecção pelo HIV é agora recomendada por até 12 semanas (UNICEF; WHO, 2016).

O Ministério da Saúde do Brasil tem seus Guias e Diretrizes de Tratamento da Infecção pelo HIV na Pediatria, sendo o mais recente o de 2014 com atualização em 2015 (MS, 2014). Neste a recomendação de terapia inicial para HIV em pediatria é a combinação de três drogas antirretrovirais, incluindo duas classes de fármacos diferentes. A experiência acumulada ao longo da última década permite concluir que essa é a melhor estratégia para

maximizar a supressão da replicação viral, preservar e/ou restaurar o sistema imune, retardar a progressão da doença e aumentar a sobrevida (MS, 2014).

Destaca-se ainda a discrepância entre a meia vida dos fármacos (que é curta nos NRTI e longa nos NNRTI) e a baixa barreira genética dos NNRTI, onde uma simples mutação genética pode induzir resistência a toda esta classe farmacológica, conduzindo ao esgotamento precoce das possibilidades de tratamento disponíveis. Adicionalmente, efeitos adversos importantes e frequentes já estão bem caracterizados (MS, 2014).

O campo geral deste trabalho está inserido na área da tecnologia farmacêutica, aplicada ao desenvolvimento de formulações antirretrovirais orais, dose única diária e com possibilidade de associação para a terapêutica da AIDS pediátrica, utilizando três fármacos já bem consolidados e indicados para a TARV pediátrica abaixo de 3 anos de idade. Dentro da tecnologia farmacêutica, foi especificamente aplicada a nanotecnologia, razão de apresentar inúmeras vantagens como estratégia de *drug delivery*, como: tamanho das partículas, baixa toxicidade, estabilidade física, liberação controlada do fármaco, excelente tolerabilidade, mascaramento de propriedades organolépticas desfavoráveis do fármaco, ferramenta tecnológica para incrementar algumas propriedades físico-químicas, como por exemplo, a solubilidade do fármaco e melhoramento da biodisponibilidade (MUCHOW et al., 2008; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012; MANSOUR et al., 2016).

Esta proposta está assim alinhada com o então compromisso por parte da OMS para alcançar o acesso universal à prevenção, diagnóstico, tratamento, cuidados e apoio – programa 2011-2015 do setor de saúde em HIV/AIDS (WHO, 2011). Atual compromisso OMS de erradicar esta epidemia até 2030 (WHO, 2016b). Bem como, está em consonância com a Estratégia Nacional para Ciência, Tecnologia e Inovação, MCTI 2012-2015, do governo federal

que objetiva desenvolver o país estabelecendo programas prioritários, entre eles, fármacos e complexo industrial da saúde (MCTI, 2012).

Além da nanotecnologia está inserida nas áreas do conhecimento tecnologicamente estratégicas e reconhecidas como tais pelo Governo Federal Brasileiro através da estratégia

nacional de ciência, tecnologia e inovação de anos anteriores sendo a versão atual a de 2016-2019, em que reforça especificamente através da Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN), a qual engloba um conjunto de ações que objetivam criar, integrar e fortalecer as atividades governamentais e os agentes atuantes nas áreas de nanociências e nanotecnologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características físico-químicas dos fármacos de escolha

Neste trabalho foram utilizados 3 fármacos antirretrovirais utilizados na terapêutica da síndrome da imunodeficiência humana, sendo a 3TC e AZT pertencentes a classe dos inibidores da transcriptase reversa análoga a nucleosídeo (NRTI), enquanto a NVP pertencente a classe dos inibidores da transcriptase reversa não análoga a nucleosídeo (NNRTI) (IARC, 2000; MS, 2014; UNICEF; WHO, 2016; WHO, 2016a, 2016c).

2.1.1. Lamivudina

Fórmula molecular $C_8H_{11}N_3O_3S$; Massa molar de 229,3 g/mol. Apresenta enantiômero, sendo 0,3% (+) e predominantemente (-). Apresenta-se como pó branco a quase branco e pode exibir polimorfismo. São reportadas o total de 10 impurezas. Ponto de fusão de 160 a 162 °C. pKa de 4,3. Vários valores de LogP são reportados na literature, variando de -1,46 a 0,06. Facilmente solúvel em água (cerca de 70 mg/mL em 25 °C), ligeiramente solúvel em metanol e etanol, insolúvel em acetona. Facilmente solúvel em ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M (IARC, 2000; WHO, 2006; STRAUCH et al., 2011).

Classe Biofarmacêutica: I/III alta solubilidade e alta permeabilidade / alta solubilidade e baixa permeabilidade (LINDENBERG et al., 2004).

2.1.2. Zidovudina

Fórmula molecular $C_{10}H_{13}N_5O_4$. Massa molar de 267,2 g/mol. Apresenta-se como pó branco ou marrom e pode exibir polimorfismo. São reportadas o total de 4 impurezas. Ponto de fusão de 120 a 122 °C. pKa de 9,68. logP de 0,05. Ligeiramente solúvel em água (cerca de 25 mg/mL em 25 °C); solúvel em etanol (aproximadamente 67 mg/mL) (IARC, 2000; WHO, 2007).

Classe Biofarmacêutica: I, alta solubilidade e alta permeabilidade (LINDENBERG et al., 2004).

2.1.3. Nevirapina

Fórmula molecular $C_{15}H_{14}N_4O$ (forma anidra) ou $C_{15}H_{14}N_4O, \frac{1}{2} H_2O$ (hemi-hidratado). Massa molar de 266,3 g/mol (forma anidra) ou 275,3 (hemi-hidratado). Apresenta-se como pó branco a quase branco. São reportadas o total de 3 impurezas. Ponto de fusão de 247 a 249 °C. pKa de 2,8. LogP de 2,5. Praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em diclorometano, ligeiramente solúvel em metanol e etanol. É altamente solúvel em pH < 3, mas a solubilidade aquosa diminui para aproximadamente 0,1 mg/mL em pH neutro (IARC, 2000; ANTUNES et al., 2008; WHO, 2009; SANGANWAR et al., 2010).

Classe Biofarmacêutica: II, baixa solubilidade e alta permeabilidade (LINDENBERG et al., 2004).

2.2. Formulações atualmente disponíveis e utilizadas na terapêutica anti-HIV

Relacionados aos fármacos deste trabalho, 3TC, AZT e NVP, existem algumas formulações disponíveis em uso no tratamento de pessoas acometidas com HIV/AIDS (WHO, 2013; MS, 2014; UNICEF; WHO, 2016), contudo não é observado a disponibilidade de nanoformulação, com qualquer um desses três fármacos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Formulações com 3TC, AZT e NVP atualmente utilizadas na terapêutica anti-HIV

Fármacos	Medicamentos
Lamivudina	comprimido de 150 mg ou 300 mg; solução oral 10 mg/mL.
Zidovudina	cápsula de 100 mg ou 200 mg (podem ser abertas e o conteúdo disperso em água); comprimido de 300 mg ou 60 mg; solução oral 10 mg/mL; solução injetável 10 mg/mL.

Nevirapina	suspensão oral 10 mg/mL; comprimido 200 mg ou 50 mg.
Associações destes fármacos	comprimido AZT + 3TC de 100/300 mg + 150 mg ou 60 mg + 30 mg; solução injetável AZT + 3TC de 100/300 mg + 150 mg; - comprimido AZT + 3TC + NVP de 60 + 30 + 50 mg ou 300 + 150 + 200 mg.

Foi ainda realizado, em novembro de 2016, busca em bancos de dados do Espacenet e INPI, para as combinações de palavras em inglês e português dos insumos farmacêuticos (IFAs): AZT, 3TC e NVP. Como resultado foi observado apenas 7 propriedades intelectuais. Tais pedidos estão compreendidos no período de 2000 - 2011. Referem-se a formas de processo e formulações medicamentosas com esses fármacos e suas associações para formas farmacêuticas sólidas tradicionais (comprimidos, comprimidos revestidos, grânulos), sendo alguns desses com características de fácil desintegração e/ou dissolução ou, ainda, comprimidos dose única diária, via oral, com a associação desses três fármacos, onde o AZT + 3TC são de liberação controlada, enquanto o NVP é de liberação imediata.

Uma destas patentes pertencente a Fundação Oswaldo Cruz (Brasil), de 2006; outra é da Universidade da Geórgia (EUA), de 2009; e as outras são de indústrias: Lupin (Indiana) – produtor de IFA e medicamentos; SHANGHAI DESANO (China) – fornecedor de IFAs; SHIRE BIOCHEM (inglesa e multinacional) – medicamentos para doenças raras, dentre elas AIDS, e outras linhas; HETERO DRUGS (Indiana e multinacional) – produtora de IFAs e medicamentos, tem um programa aprovado pela OMS de combate ao HIV; AUROBINDO PHARMA (indiana e multinacional) – produtora de IFAs e medicamentos, apresenta um programa específico para ARVs / HIV com visão de ajudar a OMS alcançar as metas para esta doença. Essa indústria produz 43 tipos de antirretrovirais, dentre eles os comprimidos ADF de 3TC 150mg + AZT 300mg + NVP 200mg. Contudo, nenhuma patente foi encontrada relacionada a proposta desse projeto.

2.3. *Quality by Design (QbD)*

Desde a publicação dos *Quality Guidelines* Q8, Q9, Q10 no início do século XXI, as agências reguladoras FDA, Europeias, bem como o próprio ICH, tem aumentado a abrangência e ênfase dos princípios de QbD alinhado ao “gerenciamento do risco – identificação e controle de pontos críticos” no ambiente farmacêutico em diferentes formas de aplicação, seja no desenvolvimento e otimização de produtos e processos analíticos ou produtivos (KHAMANGA; WALKER, 2011).

Dentro da abordagem QbD existem metodologias e ferramentas como o *design of experiments* (DOE), como o planejamento fatorial e composto central, existe ainda os fluxogramas, diagrama de Ishikawa, ferramenta estatísticas e metodologia Superfície de Resposta (RSM). Estes têm conferido redução de tempo e custo com aumento da quantidade e qualidade de informação desses estudos, que são desde o início conduzidos de forma planejada e racionalizada (ICH, 2005, 2009a, 2009b; BARROS-NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, 2010; RODRIGUES, MARIA ISABEL; LEMA; CÁRITA, 2014).

A metodologia superfície de resposta (RSM) diz respeito a performance de experimentos na região de melhores condições conhecidas, ajustando o modelo matemático de resposta para os dados experimentais e otimizando o modelo de resposta estimado (KRISHNA et al., 2016). Desta forma é possível elaborar o *design space* - uma combinação multidimensional e interação de fatores que demonstram prover segurança da qualidade. Um benefício chave da construção do *design space* é um ganho significativo na flexibilidade das condições de trabalho, por estarem contidas em um espaço em que variações não são consideradas mudanças, tendo como consequência a não necessidade de iniciar um novo processo de aprovação de alterações de registro frente a agências regulatórias (ICH, 2009a).

A convencional prática de modificação de um único fator por vez pode resultar em uma otimização pobre, pois como outros fatores são mantidos em níveis constantes, não são avaliados possíveis efeitos de interação entre todos os fatores envolvidos (BARROS-NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, 2010). Comparando com o método tradicional de experimentos, o DOE e RMS têm vantagens diferenciadas como o uso de um

número mínimo de experimentos, curto tempo de operação e possibilidade de gerar dados que podem ser analisados estatisticamente para fornecer informações valiosas das interações dos parâmetros experimentais (BARROS-NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, 2010; KRISHNA et al., 2016).

A abordagem QbD pode ser aplicada para desenvolver e otimizar métodos experimentais por HPLC, tais como resolução e tempo de análise (KARMARKAR et al., 2011; KHAMANGA; WALKER, 2011; KRISHNA et al., 2016), bem como para desenvolver formulações farmacêuticas, como as nanoformulações (GONZALEZ-MIRA et al., 2011; SEVERINO; SANTANA; et al., 2012; CARBONE et al., 2012; FERREIRA et al., 2015).

2.4. Nanotecnologia aplicada a formulações terapêuticas

Nanotecnologia é uma área da ciência responsável pelo *design* e estudo das nanopartículas (NPs), estruturas em nanoescala, ou seja, 1 nm a 1000 nm, o que confere a estas partículas propriedades físico-químicas específicas (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

Nos últimos 20 anos diferentes tipos de NPs têm sido desenvolvidas e investigadas (**Figura 1**), como: NPs lipídicas, NPs poliméricas, NPs magnéticas, NPs de ouro - para estudo da internalização de NPs e lipossomas; ainda outras nanoestruturas - como os nanocristais de fármacos, têm sido estudados (MOHANRAJ; CHEN, 2006; BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012).

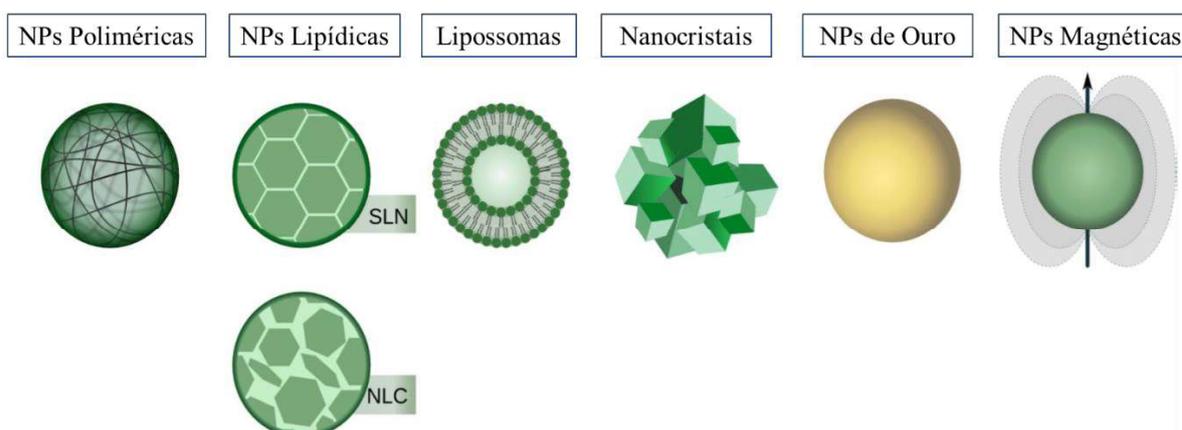


Figura 1. Algumas estruturas de nanopartículas. Adaptado da dissertação de mestrado (RIBEIRO, 2013).

NPs podem ser aplicadas para fins terapêuticos e diagnósticos, para tanto, o fármaco ou composto de interesse estará presente nas NPs por encapsulação, ligação covalente ou adsorção de superfície. As NPs podem melhorar a biodisponibilidade, reduzir os efeitos secundários, a toxicidade dos fármacos e a frequência de dosagem, o que conduz finalmente ao aumento da adesão do paciente e melhor eficácia do tratamento (MOGHIMI et al., 2005).

2.4.1. Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas (NPLs, ou do inglês LNPs) apresentam uma matriz lipídica sólida e é constituída por excipientes biocompatíveis e biodegradáveis reconhecidas por autoridades regulatórias como seguras (GRAS) ou ao menos excipientes já utilizados em produtos farmacêuticos. Além disso, existem técnicas de produção que não utilizam solventes orgânicos. Os métodos produtivos são relativamente fáceis, baratos e escalonáveis. Além de permitirem a formação de comprimidos e cápsulas como formas farmacêuticas finais. As NPLs são capazes de aumentar a estabilidade dos fármacos, protegendo moléculas susceptíveis a fotodegradação, hidrólise e oxidação. (MUCHOW et al., 2008; PARDEIKE et al., 2009; MISHRA et al., 2009; DAS et al., 2011; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012).

As nanopartículas lipídicas sólidas “solid lipid nanoparticles” (SLN) e os carreadores lipídicos nanoestruturados “nanostructured lipid carriers” (NLC) são os dois principais tipos de LNPs. Tendo ainda os conjugados lipídio-droga (LDC do inglês).

As SLN são preparadas com lipídios sólidos a temperatura ambiente e corporal e têm uma estrutura cristalina bem organizada, ficando os fármacos inseridos entre as cadeias de ácidos graxos, as camadas lipídicas e suas imperfeições. Devido a sua estrutura, não são capazes de englobar grandes quantidades de fármacos e pode ocorrer a expulsão do fármaco durante o armazenamento relacionado as transições polimórficas, uma vez que a estrutura matricial cristalina das SLN tende a reorganizar suas imperfeições (WISSING; MÜLLER, 2003; PARDEIKE et al., 2009; DAS et al., 2011; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012).

As NLC são preparadas com lipídios sólidos e líquidos, sendo essa mistura sólida na temperatura ambiente e corporal. Devido a inclusão do lipídio líquido, a estrutura matricial apresenta imperfeições, conseqüentes da maior distância entre as cadeias de ácido gordo dos glicerídeos, o que de modo geral facilita a inclusão dos fármacos e proporciona uma liberação mais controlada quando comparado a SLN (MUCHOW et al., 2008; PARDEIKE et al., 2009; DAS et al., 2011; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012).

Os LDCs são mais destinados ao incremento da biodisponibilidade oral de fármacos hidrofílicos, pois ocorre melhora da permeabilidade e absorção devido ao aumento da lipofilicidade através da conjugação (por ligação covalente ou formação de um sal) entre o fármaco hidrofílico com um composto lipídico. Os LDCs também conferem maior proteção contra a degradação enzimática de fármacos lábeis (MUCHOW et al., 2008).

2.4.2. Vias de administração e farmacocinética

As NPs podem ser administradas por várias vias (intravenosa, cutânea, subcutânea, inalatória, intraperitoneal ou oral). Variando de acordo com a via de administração e com cada formulação, as NPs terão absorções variadas, e podem ou não serem metabolizadas e entrarem nas células, onde podem permanecer por tempo indeterminado. Diferentes graus de excreção ocorrerem. Assim, durante este percurso, desde o ponto de administração até o local de atividade antiviral, a nanoformulação pode encontrar numerosas “barreiras” biológicas. Entre elas: degradação enzimática, degradação ácida do pH gástrico para administração oral, baixa estabilidade *in vivo*, barreiras epiteliais e endoteliais (como a hematoencefálica), membranas celulares, imunológicas (barreiras de opsonização e absorção pelo sistema reticuloendotelial – RES), barreiras extracelulares (mucina e matriz extracelular), barreiras intracelulares (aprisionamento dentro de endossomas, bombas de efluxo) (MARCATO; DURÁN, 2008; ALBANESE et al., 2012).

A administração desses desafios podem ser abordados através da otimização das propriedades físicas das nanoformulações (carga e tamanho) e ou modificação de sua

superfície (funcionalizando ligantes ou agentes) (MARCATO; DURÁN, 2008; ALBANESE et al., 2012).

A administração oral é a via escolhida para o desenvolvimento das NPs deste trabalho. É a via mais utilizada, correspondendo a mais de 60% dos fármacos no mercado devido a maior conveniência de administração, adesão do paciente e facilidade de produção – não é necessário condições estéreis (DEVANE, 2009; GAMBOA; LEONG, 2013).

O encapsulamento de fármacos em nanopartículas pode ajudar a proteger os fármacos contra o ambiente gastrointestinal severo (pH e enzimas) e também aumentar a mucoadesão e a retenção no trato gastrointestinal, levando a uma melhor absorção e biodisponibilidade, bem como a uma liberação mais controlada do fármaco (KRITI SONI MANAVI KAPUR, KANCHAN KOHLI; CHAKRABORTY et al., 2009; GAMBOA; LEONG, 2013).

2.4.3. Propriedades físico-químicas das nanopartículas

O tamanho e a carga têm importante influência na estabilidade, biodistribuição e eficácia de uma nanopartícula. Dependendo do seu tamanho pode ou não, por exemplo, atravessar a barreira endotelial, ser sequestrada pelo baço, ficar presa em tecidos linfáticos ou eliminada pelos rins. O tamanho de uma nanopartícula também determina o mecanismo pelo qual ela entra na célula e em que células se localizam.

O tamanho também influencia significativamente a opsonização de nanopartículas por proteínas do plasma. Também afeta a biodisponibilidade e o tempo de circulação. Partículas < 5-10 nm são removidas por depuração renal enquanto > 200 nm são sequestradas pelo baço. Partículas até 70 nm podem penetrar capilares enquanto entre 35-120 nm localizam-se nos gânglios linfáticos. A carga da superfície de uma nanopartícula influencia a passagem pelas membranas celulares e condiciona também o tempo de estabilidade de prateleira (UNER, 2006; ALBANESE et al., 2012).

2.4.4. Preparação de LNPs

Vários métodos podem ser usados para produzir LNPs (ELDEM et al., 1991; MEHNERT; MÄDER, 2001; CORTESI et al., 2002; HOU et al., 2003; WISSING et al., 2004; HU et al., 2005; GASCO, 2007; MUCHOW et al., 2008; DAS et al., 2011; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012; FERREIRA et al., 2015)

A) Homogeneização a Alta Pressão (HPH): Este método pode ser realizado tanto em temperaturas altas (HPH quente) como baixas (HPH frias):

1. HPH quente: tanto o lipídio como o fármaco são fundidos e depois combinados com uma solução aquosa de surfactante à mesma temperatura. Por agitação a alta velocidade desta solução é formada uma pré-emulsão quente que pode, então, ser processada num homogeneizador de alta pressão com temperatura controlada formando uma nanoemulsão. O arrefecimento da nanoemulsão até à temperatura ambiente leva à sua recristalização formando LNs;

2. HPH frio: o lipídio e o fármaco também são fundidos em conjunto e depois são rapidamente colocados em nitrogênio líquido formando micropartículas de lipídios sólidos. Uma pré-suspensão é formada por agitação a alta velocidade das partículas numa solução de surfactante aquosa fria. A pré-suspensão é, então, homogeneizada à temperatura ambiente conduzindo à formação de LNPs;

B) Homogeneização de alto corte (*High Shear Homogenization*): os lipídios são fundidos a temperaturas ligeiramente acima do seu ponto de fusão, posterior adição da solução aquosa com surfactante à mesma temperatura e formação de uma emulsão por um dispositivo de homogeneização de alto cisalhamento (ultra-turrax e/ou ultrasonicação).

C) Microemulsão: os lipídios sólidos são fundidos e depois o fármaco é dissolvido neles. Uma solução de surfactante e co-surfactante a uma temperatura acima da temperatura de fusão dos lipídios sólidos é, então, adicionada com agitação suave para se obter uma microemulsão. Esta microemulsão é então dispersa em água fria com agitação suave

formando gotículas de nanoemulsão ultrafina que imediatamente cristalizam para formar LNPs. O excesso de água pode então ser removido;

D) Emulsificação-evaporação de solvente: os lipídios são dissolvidos num solvente orgânico imiscível com água e depois, sob agitação contínua, emulsionados numa fase aquosa contendo tensioativos. Durante a emulsificação o solvente orgânico evapora-se e o lipídio precipita formando LNPs;

E) Difusão de solventes: esta técnica utiliza solventes orgânicos miscíveis em água que estão saturados com água para assegurar o equilíbrio termodinâmico inicial de ambos os líquidos. A emulsão de óleo-em-água transitória é colocada em água sob agitação contínua, levando à solidificação da fase dispersa e formação de LNPs devido à difusão do solvente orgânico;

F) Injeção de solvente: dissolvem-se os lipídios num solvente miscível em água ou numa mistura de solventes miscíveis com água e depois, utilizando uma agulha de injeção, a solução é rapidamente injectada numa solução aquosa com tensioativo;

G) Emulsão dupla: w / o / w (água / óleo / água) o método de emulsão dupla é baseado no método de emulsão-evaporação de solvente. Esse método utiliza um surfactante durante a encapsulação de fármaco hidrofílico na fase aquosa interna de uma emulsão dupla, evitando a transferência do fármaco para a fase aquosa externa durante a evaporação do solvente;

H) Agitação a alta velocidade e / ou ultrasonicação: as micropartículas lipídicas são produzidas por *spray congealing*, essas partículas são, então, utilizadas para produzir *nanopellets* lipídicas por agitação a alta velocidade ou sonicação;

I) Secagem por aspersão: as micropartículas são produzidas por *spray drying*, através da prévia dissolução dos lipídios e fármacos em solvente orgânico. Para aumentar a propriedade de fluxo do produto pulverizado, utiliza-se, por exemplo, lecitina juntamente com o lipídio. Por este motivo foi desenvolvido o congelamento por aspersão *spray congealing*. O uso de diferentes velocidades de resfriamento pode ocasionar a cristalização do lipídio em diferentes formas polimórficas.

2.4.5. Nanoformulações desenvolvidas com os fármacos 3TC, AZT e NVP

O fármaco 3TC foi utilizado no desenvolvimento de NP polimérica por *spray drying* (TSHWEU et al., 2013), NP polimérica revestida com albumina pelo método de dupla emulsão por evaporação de solvente (WANG et al., 2012), NP especificamente de quitosana direcionado com glicirrizina (MISHRA et al., 2014), NP polimérica com ácido polimetacrílico (TAMIZHRASI et al., 2009).

Para a AZT várias NPs foram desenvolvidas, sendo a maior parte NPs poliméricas (MAINARDES et al., 2009, 2010; MAINARDES; GREMIÃO, 2012; KUMBHAR; POKHARKAR, 2013; CHRISTOPER et al., 2014), como também NPs poliméricas especificamente de quitosana e de alginato (NESALIN; SMITH, 2012; HARILALL et al., 2013; MONTASSIR DAHMANE, EL; TAOURIRTE, 2013; BARBI et al., 2015), NP polimérica com a pró-droga AZT conjugada com ácido ursodesoxicólico (DALPIAZ et al., 2014) e NPs lipídicas do tipo SLN (SINGH et al., 2010; PURVIN et al., 2014).

NPs poliméricas com a associação AZT + 3TC foram encontradas, sendo o trabalho de Sankar et al, 2012 também o desenvolvimento de SLN com esta associação (KUO; CHUNG, 2005; KUO; CHEN, 2006; SANKAR et al., 2012).

A maior parte dos trabalhos relacionado a NVP foi de: nanosuspensões (SHEGOKAR et al., 2011; SHEGOKAR, R; SINGH, 2011; SHEGOKAR, RANJITA; SINGH, 2011), NPs poliméricas (KUO et al., 2011) e um trabalho com NPs lipídicas dos tipos SLN e NLC revestidos com albumina (KUO; CHUNG, 2011).

Até então não foram encontradas nanopartículas lipídicas, do tipo NLC, com as características, excipientes e processos produtivos proposto neste trabalho. Para além das nanoformulações serem desenhadas, na medida do possível, com o mesmo surfactante, semelhantes lipídios e características das NPs, em razão de corroborar com uma futura possibilidade de associação terapêutica ou ADF.

2.5. Emulsões Múltiplas

As emulsões múltiplas (particularmente W1/O/W2) consistem em gotículas de água (W1) contidas em gotas maiores de óleo (O), estabilizadas por um emulsificante lipofílico, que por sua vez está disperso em uma fase aquosa (W2), estabilizadas por emulsificante hidrofílico. As duas fases aquosas – uma interna e outra externa, podem apresentar composição distintas entre si. Geralmente, o diâmetro médio das gotas da fase aquosa interna é de cerca de 100 a 1000 nm, enquanto que o das gotas de óleo é de cerca de 1 a 100 μm (GARTI, 1997a, 1997b; GARTI; BISPERINK, 1998; GARTI; BENICHO, 2004; MUSCHIOLIK, 2007; DICKINSON, 2011; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013; MLCLEMENTS, 2014; KAIMAINEN et al., 2015).

Têm sido um dos sistemas de liberação de fármacos mais comumente estudados para encapsulamento e proteção de componentes bioativos hidrofílicos devido a alta eficácia de encapsulação possível de se obter. A estrutura das emulsões múltiplas permite ainda a encapsulação de ativos hidrofílicos e / ou hidrofóbicos e / ou anfifílicos, pois se localizarão na(s) fase(s) a depender de suas polaridades. Entretanto, as preparações das emulsões múltiplas são mais complicadas, mais dispendiosas e menos robustas, além dessa estrutura ser altamente susceptível a instabilidades de degradação (separação gravitacional, floculação, coalescência e *creaming*), que culminam na ruptura da estrutura, com a consequente saída do componente bioativo do meio aquoso interno para o externo (MUSCHIOLIK, 2007; ASERIN, 2008; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013; MLCLEMENTS, 2015).

A produção das emulsões W1/O/W2 ocorre em duas etapas. A primeira referente a formação da emulsão W1/O, por homogeneização dessas duas fases, sendo o emulsificante lipofílico presente na fase oleosa. Na segunda etapa ocorre a homogeneização da W1/O formada com a W2, sendo nesta etapa presente o emulsificante hidrofílico (**Figura 2**). Diferentes homogeneizadores podem ser utilizados: misturadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, moinhos coloidais, ultrassons e homogeneizadores de membrana. Entretanto é importante que a homogeneização da segunda etapa seja menos intensa do que a da primeira para evitar o rompimento ou a expulsão das gotas W1 da estrutura (ASERIN, 2008; MLCLEMENTS, 2014; KAIMAINEN et al., 2015; KOVÁCS et al., 2015).

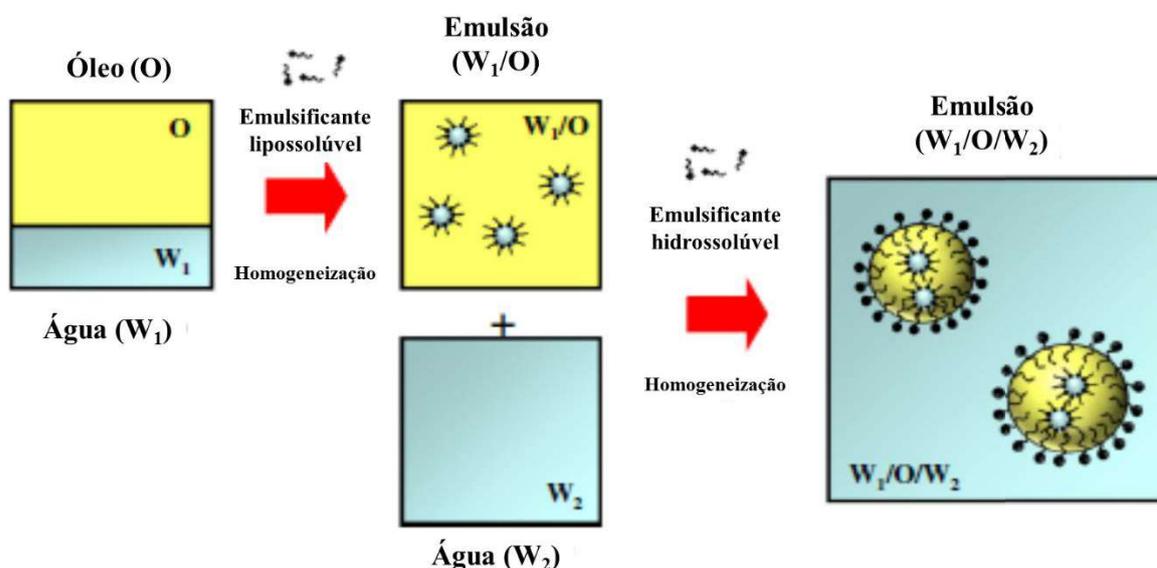


Figura 2. Emulsão múltipla (W/O/W) e as etapas de preparação. Adaptado de artigo (MCCLEMENTS, 2015).

O tamanho das gotas W₁ e O das emulsões múltiplas podem ser controlados variando o tipo e concentração dos emulsionantes, as condições de homogeneizações e as razões das fases aquosa e oleosa (MEZZENGA et al., 2004; LEAL-CALDERON et al., 2012).

É possível alterar o estado físico das diferentes fases, por exemplo, as fases aquosas podem ser gelificadas (SURH et al., 2007), já a fase oleosa pode ser solidificada controlando o tipo de gordura utilizada e a temperatura (VLADISAVLJEVIĆ; WILLIAMS, 2005).

Uma nova geração de partículas lipídicas, denominadas de partículas lipídicas múltiplas (MLP), apresentam tamanho micrométrico, e algumas características de emulsões múltiplas (W/O/W), de SLN e NLC. A MLP não tem a fase aquosa externa, como apresentam as emulsões múltiplas, mas a qualquer momento pode ser dispersa em fase aquosa com a consequente formação de W/O/W. Além disso, a MLP é produzida com adição de lipídio sólido ao lipídio líquido da fase oleosa, o que confere o estado semissólido da preparação MLP a temperatura ambiente. Com estas modificações, a MLP reduz a passagem de água e substâncias solúveis em água entre a fase aquosa interna e externa, bem como revela maior estabilidade de armazenamento e possibilidade da forma farmacêutica final ser uma dispersão

ou um creme. Na obtenção é necessário processo de emulsificação dupla (duas etapas) (ZHAO et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Obter nanoformulações orais pediátricas, respaldado em QbD, com os fármacos 3TC, AZT e NVP.

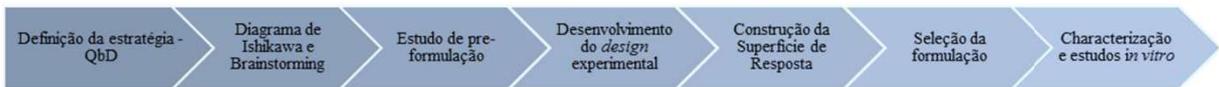
3.2. Específicos

- Produzir de nanopartículas para cada um dos 3 fármacos (AZT, 3TC, NVP);
- Caracterizar as nanopartículas quanto a: capacidade de carregamento, eficiência de nanoencapsulação, tamanho e polidispersão (por dispersão dinâmica de luz), carga (por dispersão eletroforética de luz);
- Realizar análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM);
- Realizar estudo preliminar de estabilidade das nanoformulações desenvolvidas;
- Avaliar os perfis de liberação dos fármacos nas nanopartículas em meios simuladores dos fluidos corporais;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* frente as células Jurkat T, modelos para linfócitos T.

4. DESENVOLVIMENTO: Materiais, Métodos, Resultados e Discussão.

Aqui está explanado todo o trabalho desenvolvido, a partir do estado da arte na área de tecnologia farmacêutica, especificamente nanotecnologia, estruturado com abordagem *quality by design*, aplicada aos fármacos antirretrovirais lamivudina (3TC), zidovudina (AZT) e nevirapina (NVP).

4.1. Artigo I - Nanopartículas Lipídicas Múltiplas (MLN), uma nova geração de nanopartículas lipídicas para sistema de liberação de drogas: *design* experimental de lamivudine-MLN



Fluxograma da abordagem QbD dessa pesquisa

Superfície Resposta do tamanho de partícula da MLN

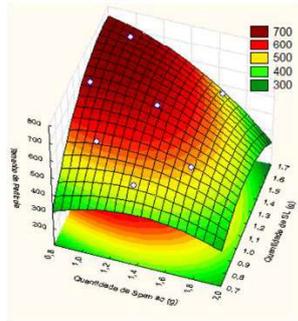
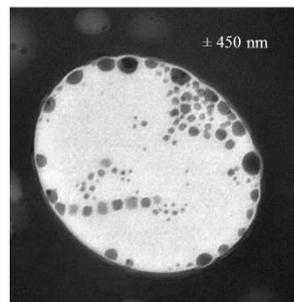
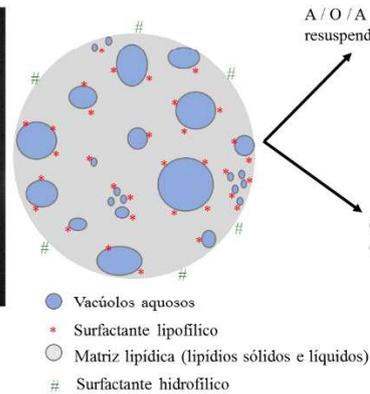


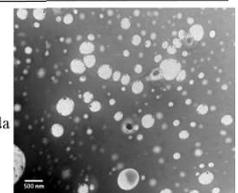
Imagem por TEM da MLN



Estrutura da MLN



A / O / A resuspendida



O / A creme



Publicado na *Pharmaceutical Research*

DOI: 10.1007/s11095-017-2136-0

Artigo

Nanopartículas Lipídicas Múltiplas (MLN), uma nova geração de nanopartículas lipídicas para sistema de liberação de drogas: *design* experimental de lamivudina-MLN

Palavras-chave: Nanopartículas Lipídicas; MLN; NLC; *Quality by Design* (QbD); lamivudina (3TC).

INTRODUÇÃO

Nanopartículas lipídicas (LNP) são geralmente compostas de uma matriz fisiológica ou lipídios relacionados fisiologicamente, caracterizadas por sua versatilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (PARDEIKE et al., 2009; DAS et al., 2011; BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). LNP exibem mais vantagens quando comparadas com outros sistemas de liberação de droga, incluindo estabilidade cinética melhorada, solubilidade de droga e liberação de droga controlada (PARDEIKE et al., 2009; DAS et al., 2011; BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). Além disso, formulações de LNP atuais têm boa relação custo-benefício, sendo simples de escalar de acordo com os processos industriais, o que aumenta o interesse de pesquisadores nesse nanocarreadores (SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012). LNP emergiram em 1991 com o desenvolvimento de sua primeira geração, nanopartículas lipídicas sólida (SLN) (GASCO, 1993; LUCKS; MÜLLER, 1996). Daí em diante, a pesquisa para a melhoria de suas propriedades físico-química, assim como das suas aplicações biomédicas cresceram exponencialmente. A segunda geração de LNP, os

carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), foram desenvolvidos para superar as limitações potenciais das SLN (ALI KHAN et al., 2013). De fato, matrizes de NLC são menos ordenadas e tem imperfeições entre os lipídio líquido e lipídio sólido, fornecendo mais espaços para a incorporação de fármacos (MUCHOW et al., 2008). Nesse contexto, esse trabalho objetivou desenvolver uma terceira geração de LNP, as nanopartículas lipídicas múltiplas (MLN), a qual promete tornar-se a base de um novo sistema de liberação de fármacos. De fato, o *design* dessas novas nanopartículas foi baseado nas principais características das partículas lipídicas múltiplas (MLP) (ZHAO et al., 2015). A produção de MLP requer o uso de um processo de emulsificação duplo, entregando ao final partículas de tamanho micrométricos. Além disso, as MLP não têm a fase líquida externa como as emulsões múltiplas, mas podem formar emulsões múltiplas A/O/A depois de dispersas em água. Assim, MLP previnem a passagem da água e de substâncias solúveis em água entre as fases aquosas internas e externa, pode ser sólida a temperatura ambiente (TA) e revela estabilidade de armazenamento prolongada (ZHAO et al., 2015). A principal diferença entre MLP e MLN é o tamanho, uma vez que MLN são muito menores, sendo o seu tamanho na faixa nanométrica, como o seu nome implica. Essa modificação requereu a otimização dos métodos de produção, os quais foram baseados em método de homogeneização a quente combinado com alto cisalhamento e ultrasonificação. A diminuição do tamanho das partículas em relação as MLP podem conferir as MLN uma série de vantagens terapêuticas, tais como: aumento da absorção e da biodisponibilidade do fármaco, liberação de fármaco controlado, redução dos efeitos colaterais, proteção do fármaco contra degradação química e enzimática e aumento do tempo de residência no trato gastrointestinal (MUCHOW et al., 2008; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012). Processo de ultrasonicação é rápido e altamente reprodutível se os parâmetros operacionais, tais como tempo e força de ultrasonicação, forem otimizados. A ponta de ultrasonicação são muito fáceis de limpar, perdas de amostras são insignificantes e podem ser usadas para produção em alta escala (CHATURVEDI; KUMAR, 2012).

O *design* de MLN pode ser adequado tanto para administração tópicos (como um semissólido) ou de administração oral (depois da resuspensão). Adicionalmente, tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos podem ser incorporados em MLN bem como em MLP (ZHAO et al., 2015). Fármacos hidrofílicos ficaram localizadas em vacúolos aquosos, enquanto que fármacos lipofílicos na matriz lipídica. Outra possibilidade é carregar simultaneamente fármacos hidrofílicos e lipofílicos na mesma estrutura de MLN, uma vez que cada um estará localizado onde tiver mais afinidade na estrutura da MLN.

Esse trabalho apresenta a primeira formulação de MLN já produzida. Um fármaco hidrofílico, lamivudina (3TC), foi selecionado para ser encapsulado. Uma formulação NLC-3TC fo também planejanda, desenvolvida e otimizada com finalidade comparativa. A abordagem *Quality by Design* (QbD) foi aplicada tanto para o desenvolvimento de MLN como de NLC para identificar os fatores mais críticas para cada método de produção, especialmente para a produção de MLN, e seleção das condições mais adequadas para a produção das formulações. De fato, a abordagem QbD no desenvolvimento de produtos e processos alinhados com o Gerenciamento de Risco (identificação e controle de pontos críticos) têm sido internacionalmente recomendados (ICH, 2005, 2009a). Portanto, *design* de experimento (DOE), fluxogramas, diagrama de Ishikawa, ferramentas estatísticas e FMEA (Failure Modes and Effects Analysis) têm sido usados, reduzindo tanto o tempo e os custos, além de aumentar a quantidade e a qualidade da informação nesses estudos (ICH, 2005, 2009a, 2009b; BARROS-NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, 2010; RODRIGUES, MARIA ISABEL; LEMA; CÁRITA, 2014). Os parâmetros otimizados através do estudo foram o tamanho de partícula, polidispersão e capacidade de carregamento. O desenvolvimento de formulações foram também estudas com o intuito de avaliar a morfologia, liberação de fármaco, estabilidade de armazenamento e seus efeitos na viabilidade de células Jukart T.

Lamivudina é um inibidor de transcriptase reversa análoga a nucleosídeo (ITRN) aplicado como um potente agente antirretroviral do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BEDSE et al., 2009; STRAUCH et al., 2011). 3TC é um fármaco da classe I/III com solubilidade alta e permeabilidade baixa/alta no trato gastrointestinal, de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) (LINDENBERG et al., 2004). Como a penetração de fármacos antirretrovirais nos sítios reservatórios de vírus é restrita, uma alta dose é requerida com conseqüente intolerância e toxicidade. Adicionalmente, muitos antirretrovirais, incluindo 3TC, não conseguem alcançar adequadamente ou residir nesses sítios em concentrações suficientes para a duração necessária de exercer as respostas terapêuticas (VYAS et al., 2006). Assim, melhorias das propriedades farmacodinâmicas do 3TC seria desejável para reduzir a concentração e o número de dosagens e conseqüentemente reduzir os efeitos colaterais. Nesse sentido, esse trabalho objetivou o *design* e o desenvolvimento de uma nova geração de carreadores lipídicos, a MLN, a qual encapsula a 3TC e deve ser capaz de superar algumas desvantagens associadas a administração do 3TC.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Lamivudina (Northeast® lote 00019). O lipídio sólido Compritol® ATO 888 foi gentilmente ofertados por Gattefossé (Nanterre, France). Miglyol®-812 foi obtido da Acofarma (Madrid, Spain) é o ácido oleico da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Sorbitano (Span® 80) e Polysorbato 80 (Tween® 80) foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Germany). Tampão Hepes foi comprador da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Todas as soluções foram preparadas usando água duplamente deionizada (condutividade inferior a $0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$). A linha de células Jurkat T (linfoma humano) foi obtido de ATLC (Philadelphia, PA, United States of America, USA). Soro bovino fetal (FBS), a mistura dos antibióticos penicilina-estreptomicina e RPMI 164 foram compradas de Gibco® (Paisley, UK).

MÉTODOS

Design experimental

A abordagem QbD visou projetar um produto de qualidade e que seu processo de fabricação proporcionasse consistentemente o desempenho pretendido às formulações NLC-3TC e MLN-3TC (**Figura 3**).

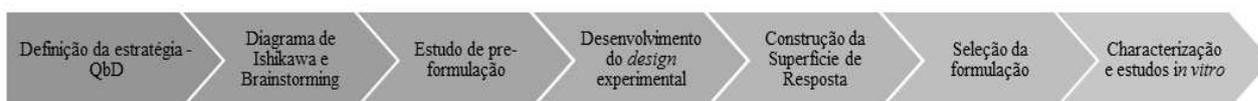


Figura 3. Diagrama da abordagem QbD dessa pesquisa

A lista de fatores críticos envolvidos em cada produção de nanopartículas é mostrada no diagrama de Ishikawa (**Figura 4**). Três variáveis críticas independentes e quantitativas foram selecionadas para cada *design* experimental - NLC e MLN (NLC: tempo de sonicação, quantidade de Tween 80 e quantidade de lipídio sólido; MLN: quantidade de lipídio sólido, de fase aquosa e de Span80). Os níveis inferiores (-1) e superiores (+1) de cada variável foram escolhidos com base nos estudos de pré-formulação. Todas as outras variáveis de cada processo - NLC e MLN, foram fixados.

A metodologia de *design* experimental seguida foi o *design* fatorial completo e um composto central - com replicação de pontos centrais (nível 0) e quatro axiais ($\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,4142$ ou $\sqrt{2}$), foram aplicados para avaliar os efeitos de variáveis independentes e suas interações nas variáveis dependentes. A análise de superfície de resposta (RS) foi aplicada para identificar as condições que proporcionaram formulações otimizadas de NLC e MLN.

As variáveis dependentes dos experimentos foram: tamanho médio de partícula (restrições: 200 - 400 nm para NLC e 300 - 600 nm para MLN); Índice de polidispersão (PDI) (restrições: minimizar até 0,3); e capacidade de carregamento (LC) (restrições: maximizar). Os experimentos foram realizados aleatoriamente. O software Statistica 8.0 (Statsoft®, Inc.) foi empregado para fazer o design da matriz, análise estatística e gráficos. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e os valores de **p** abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

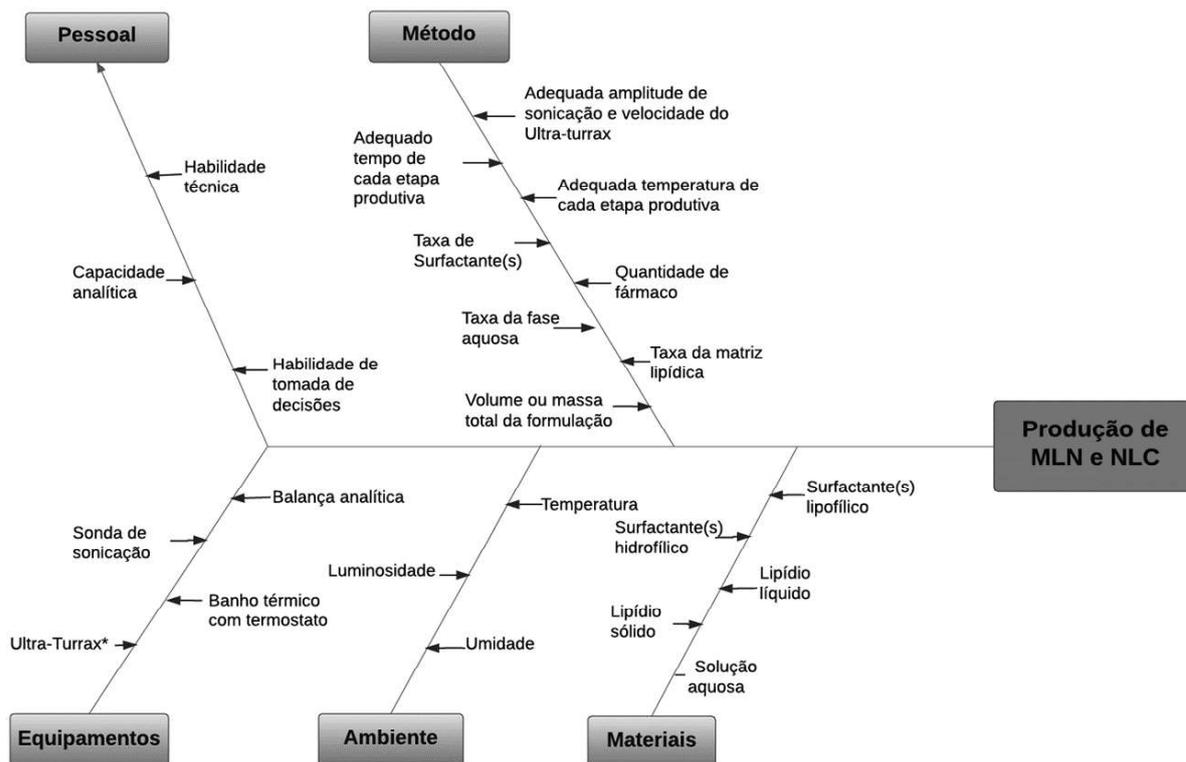


Figura 4. Diagrama Ishikawa de parâmetros críticos de produção de MLN e NLC. * Ultra-turrax é usado somente na produção de MLN.

Preparação de NLC

NLC foram preparados por um processo convencional de homogeneização a quente seguido de ultrasonicação (FERREIRA et al., 2015).

Resumidamente, a fase lipídica constituída pelo lipídio sólido Compritol® ATO 888, o lipídio líquido ácido oleico, o surfactante Tween® 80 e, opcionalmente, o fármaco hidrofílico 3TC foram fundidos a uma temperatura acima da fase de transição (a 80 ° C) num banho térmico digital. A fase aquosa pré-aquecida a 80°C (tampão Hepes pH 7,4) foi vertida na fase lipídica fundida e homogeneizada por sonicador de tipo sonda (VCX130 com CV-18, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) com amplitude de frequência de 40%, 130 KHz, durante 10 minutos, para se obter uma nanoemulsão. Em seguida, a formulação foi deixada para arrefecer à temperatura ambiente (TA), permitindo que a fase oleosa interior se solidificasse formando NLC.

Preparação MLN

As MLN foram preparadas por um método de homogeneização a quente combinado com alto cisalhamento e ultrasonicação (**Figura 5**).

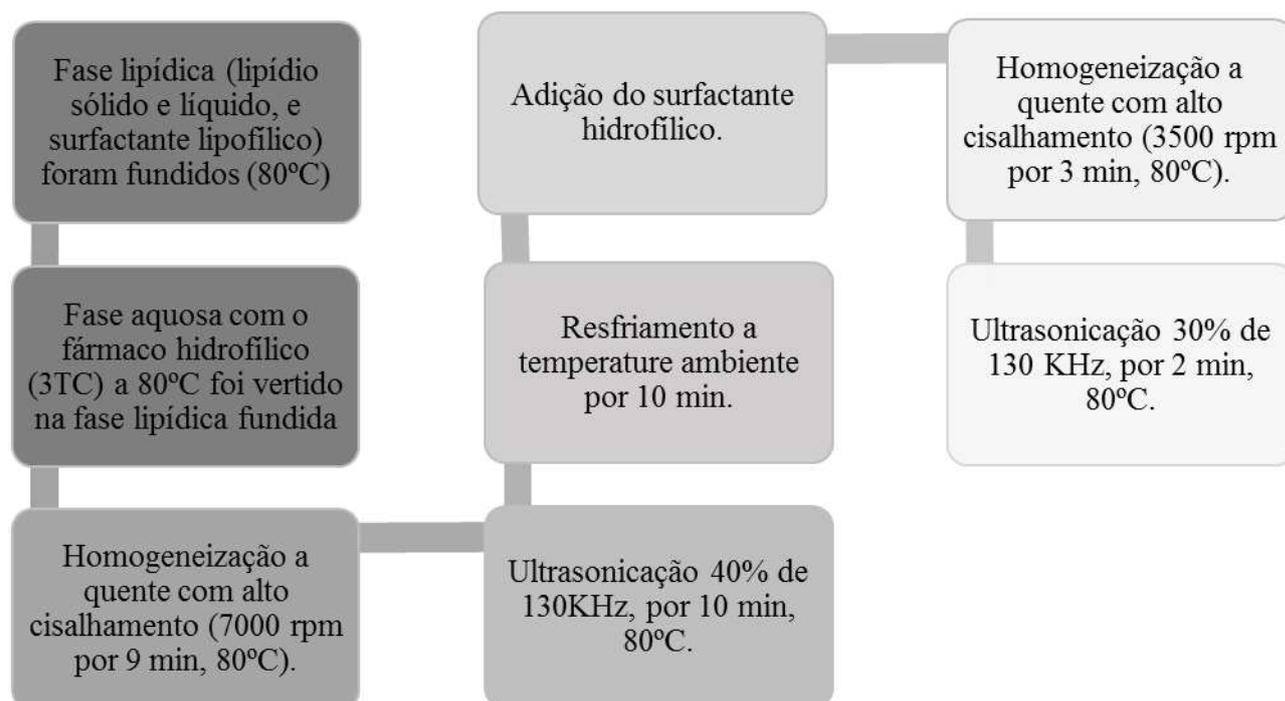


Figura 5. Diagrama da técnica de MLN.

Primeiramente, a fase lipídica constituída pelo lipídio sólido Compritol® ATO 888, o lipídio líquido Miglyol®-812 e o surfactante lipofílico Span® 80 foram fundidos acima da temperatura de transição de fase (80°C) num banho de água digital. A fase aquosa pré-aquecida (tampão Hepes pH 7,4) contendo o fármaco hidrófilo 3TC dissolvido (312 mg), foi vertida na fase lipídica fundida. Estas fases foram homogeneizadas a quente por alto cisalhamento num Ultra-Turrax T25 (Janke e Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanha) a 7000 rpm por 9 minutos seguido de sonicação do tipo sonda com frequência de amplitude de 40%, 130 KHz, durante 10 minutos.

A emulsão primária foi deixada arrefecer à TA durante 10 minutos. Em seguida, o surfactante hidrofílico Tween® 80 foi adicionado à emulsão primária e aquecido a 80 °C sob

agitação de alto cisalhamento, a 3500 rpm durante 3 minutos, seguido por sonicator do tipo sonda com frequência de amplitude de 30%, 130 KHz durante 2 minutos. Finalmente, a formulação foi arrefecida à TA e a MLN foi obtida com um aspecto final semissólido (creme). A formulação foi armazenada a 4°C até à utilização posterior. A formulação final foi obtida através de sua emulsificação depois de ser dispersa em aquosa (1:100 mg:µL).

Medidas de tamanho médio de partícula e índice de polidispersão (PDI)

A análise de tamanho de partícula foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando um analisador de tamanho de partícula (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). Antes das medições, todas as amostras foram diluídas (1:200 para NLC e 1:1000 para MLN) utilizando água duplamente deionizada para produzir uma intensidade de dispersão adequada (300-500 Kcps). Os dados DLS foram analisados a 25°C e com um ângulo de incidência de luz fixa de 90°. O diâmetro hidrodinâmico médio (média Z) e o PDI (uma medida da variação da distribuição do tamanho de partícula) foram determinados. A média Z e PDI das amostras analisadas foram obtidas calculando a média de dez corridas, de ao menos três formulações independentes.

Medições de potencial zeta

O potencial zeta (zeta) foi medido determinando a mobilidade electroforética utilizando um analisador de potencial zeta (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). As amostras foram diluídas (1:200 para NLC e 1:1000 para MLN) com água duplamente deionizada e foram analisadas a 25 °C. O zeta de cada amostra foi obtido calculando a média de seis corridas (cada uma com dez ciclos), de ao menos três formulações independentes.

Determinação da morfologia

A morfologia otimizada de NLC e MLN foi avaliada por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM). As amostras foram preparadas colocando 10 μ L de suspensões numa grelha de malha de cobre e deixadas em repouso durante 1 a 2 minutos à TA. Após este período, o excesso foi removido com papel de filtro. Para contraste, 10 μ L de solução de acetato de uranilo a 1% foram colocados na grelha e deixados em repouso durante 5 segundos. Após este período, o excesso foi removido com papel de filtro. As amostras foram observadas num JEM-1400 *Transmission Electron Microscope* (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) com uma voltagem de aceleração de 80 kV.

Eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (LC)

A quantidade de 3TC presente nas formulações foi determinada utilizando um método indireto. As suspensões de nanopartículas (NPs) foram diluídas 200x e filtradas com filtros *Amicon® Ultra Centrifugal Filters Ultracell-50 kDa* (EMD Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 3400 rpm durante 15 minutos a 18°C usando uma centrífuga Heraeus™ Multifuge™ X1R (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os sobrenadantes resultantes foram recolhidos para quantificação 3TC a 270 nm, que é o comprimento de onda de absorção máxima de 3TC em solução aquosa (tampão HEPES pH 7,4) num Espectrofotómetro V-660 UV / Vis (Jasco Inc., Easton, MD, EUA). Uma curva de calibração de 3TC em solução aquosa (tampão HEPES pH 7,4) foi utilizada para determinar a sua concentração.

A capacidade de carregamento (LC) e a eficiência de encapsulamento (EE) são expressas em percentagem. LC é a quantidade de 3TC encapsulado em comparação com a quantidade de excipientes (lipídios e surfactantes), enquanto EE refere-se à quantidade de 3TC encapsulado em comparação com a quantidade total de fármaco inicialmente adicionada.

EE foi calculada como se segue:

$$EE (\%) = \frac{(\text{quantidade total de fármaco} - \text{fármaco não encapsulado})}{\text{quantidade total de fármaco}} \times 100$$

LC foi calculada da seguinte forma:

$$LC (\%) = \frac{(\text{quantidade total de fármaco} - \text{fármaco não encapsulado})}{\text{quantidade total de excipientes}} \times 100$$

Ensaio de liberação de fármaco *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando uma técnica de difusão de saco de diálise de celulose (Float-a-Lyzer®G2, SpectrumLaboratories, Inc., CA, EUA, Alemanha) com 1,5 mL das formulações otimizadas NLC ou MLN. Para mimetizar o percurso das partículas no corpo após administração oral, as amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação gentil (placa de agitação quente IKA®-Werke RT15-P, Alemanha). Para simular o trânsito do estômago para o intestino, as amostras foram incubadas primeiro durante 4 h em 76 mL de fluido gástrico simulado (solução de HCl, pH 1,2). Então, o meio de liberação substituído por 76 mL de fluido fisiológico (uma solução tampão contendo dihidrogenofosfato de potássio, pH 7,4, como descrito na *United States Pharmacopeia*, USP-NP 26) até ao final da experiência. Em intervalos de tempo regulares, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e o mesmo volume de tampão novo foi substituído para manter as condições *sink*. A liberação de 3TC foi quantificada por espectroscopia UV / Vis.

A quantidade do fármaco nas amostras foram determinadas usando curvas de calibração obtidas nas mesmas condições experimentais e os resultados representam os valores médios de duas formulações distintas. Os modelos matemáticos para a avaliação da cinética de liberação do fármaco: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Peppas-Korsmeyer e

Hixon-Crowell foram ajustados aos dados experimentais (Barzegar-Jalali et al., 2008). O coeficiente de determinação (R^2) foi calculado para determinar o modelo de melhor ajuste.

Estudos de estabilidade de armazenamento

Um estudo foi realizado mantendo as formulações em frascos de vidro a 4 °C durante um período máximo de 45 dias de armazenamento para as formulações otimizadas de NLC e MLN. Os indicadores de estabilidade durante o armazenamento em comparação com o dia de produção foram: tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta.

Estudos de Citotoxicidade

As células Jurkat T foram cultivadas em RPMI 1640 (GIBCO, Paisley, UK) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 1% de penicilina-estreptomicina, a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. As células Jurkat T foram plaqueadas em placas de 96 poços a 10⁵ células por poço e foram tratadas com até 2,0 mg/mL de LNP durante 24 horas. A viabilidade das células tratadas e de controle foi avaliada pelo ensaio de metiltiazol tetrazólio (MTT). Em resumo, 10 µL de uma solução de 5 mg/mL de MTT foi adicionada aos poços e incubou-se a 37 °C durante 3 horas. A reação foi parada utilizando 100 µL de SDS a 10% (peso/volume) durante 16 horas. O crescimento celular foi avaliado por medição da absorbância a 545 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplaca (Synergy™ HT, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos como a percentagem da atividade metabólica das células tratadas relativamente às células não tratadas, e todas as experiências foram realizadas em quadruplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Screening preliminar

Uma triagem preliminar foi realizada com base na abordagem QbD para fixar alguns parâmetros. O Tween 80 foi escolhido como surfactante hidrofílico, uma vez que ele é amplamente utilizado como surfactante estérico com baixa toxicidade. O tampão Hepes (pH 7,4) foi escolhido como fase aquosa.

Em relação ao NLC, foram realizados estudos preliminares de formulação com alguns lipídios sólidos e líquidos e diferentes proporções entre a fase lipídica e a fase aquosa. A seleção baseou-se nos critérios de que a mistura de lipídios deveria aumentar a solubilidade de 3TC. Deste modo, Compritol®ATO 888 e o ácido oléico foram os lipídios sólido e líquido selecionados, respectivamente. A proporção de 300 mg de lipídio total para 12 mL de solução aquosa foi escolhida. As quantidades de 3TC e de Tween-80 foram selecionadas com base na maior LC. Além disso, a quantidade de 2 mg de 3TC a 300 mg de fase lipídica foi selecionada como uma quantidade média onde a saturação foi alcançada sem precipitação do fármaco durante ou imediatamente após a preparação dos ensaios de formulação.

A produção de MLN requer o uso de dois diferentes tipos de surfactantes, uma primeira etapa com um surfactante lipofílico e depois um hidrofílico, na qual esta classificação é determinada pela medida do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) (GRIFFIN, 1949, 1954). Alguns surfactantes lipofílicos (Span 80, Span 40, fosfatidilcolina de ovo - EPC, mistura de Span 80 e EPC) foram testados. Assim, o Span 80 proporcionou o melhor resultado de LC; enquanto o lipídio líquido mais adequado para as formulações foi Miglyol®-812. A metodologia foi otimizada (levando em consideração o tempo de processo em cada etapa, velocidade ultra-turrax, amplitude de sonicação, tempo de resfriamento). Dados preliminares indicam que os procedimentos de emulsificação devem ser realizados em banho quente (80 - 90 °C), com uma massa total mínima de produção da MLN de 11 g, para assegurar uma boa homogeneização durante o processo produtivo.

Posteriormente, um *design* experimental foi aplicado com aos fatores críticos encontrados no estudo preliminar, para aprofundar a compreensão da relevância desses fatores neste estudo e para melhorar as respostas de interesse. Essa abordagem permitiu a comparação de formulações otimizadas em nanoescala, carregando o mesmo fármaco, otimizadas pelas mesmas ferramentas QbD, utilizando excipientes similares e, sempre que possível, condições análogas. Ambas as formulações selecionadas têm estrutura de matriz diferente: uma é baseada em uma nanopartícula lipídica tradicional, NLC, e a outra é uma nova nanopartícula lipídica desenvolvida e apresentada neste trabalho, a qual chamamos de MLN.

***Design* experimental, otimização e validação**

Foram realizadas investigações para estabelecer as condições que proporcionaram as seguintes restrições: máxima LC, mínima PDI (até 0,3) e tamanho médio de partícula entre 200 a 400 nm para NLC e 300 a 600 nm para MLN.

Otimização da produção de NLC através da técnica de homogeneização a quente seguida pela ultrasonicação

Após os estudos de pré-formulação, foram selecionados três fatores críticos quantitativos para a otimização das respostas (LC, tamanho médio de partícula e PDI). Portanto, o *design* fatorial completo 2^3 foi realizado para permitir uma avaliação simultânea de diferentes combinações dos fatores e seus níveis máximos e mínimos, que foram: tempo de sonicação (2 - 20 minutos); quantidade do surfactante (Tween 80, 25 - 100 mg); e quantidade de lipídio sólido (SL) (200 - 270 mg). As características deste *design* experimental estão ilustradas na **Tabela 2**. É de notar que a quantidade de lipídios totais foi mantida a 300 mg ao longo do estudo.

Tabela 2. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no design fatorial completo 2^3 do estudo de formulação de NLC-3TC.

Ensaio	Variáveis Independentes		
	Tempo de Sonicação (min)	Quantidade de Tween 80 (mg)	Quantidade de SL (mg)
1	-1 (2)	-1 (25)	+1 (270)
2	+1 (20)	-1 (25)	+1 (270)
3	-1 (2)	+1 (100)	+1 (270)
4	+1 (20)	+1 (100)	+1 (270)
5	-1 (2)	-1 (25)	-1 (200)
6	+1 (20)	-1 (25)	-1 (200)
7	-1 (2)	+1 (100)	-1 (200)
8	+1 (20)	+1 (100)	-1 (200)

Para a resposta PDI, nenhum dos fatores nos intervalos selecionados foi estatisticamente significativo. Para as respostas LC e tamanho médio de partícula, os efeitos individuais dos fatores são ilustrados no gráfico de Pareto (**Figura 6**). O comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. Os efeitos de todos os parâmetros foram padronizados (cada efeito foi dividido pelo seu erro padrão). A sequência em que as barras são exibidas corresponde à ordem da importância do efeito. Quando a linha vertical atravessou uma barra de efeito, no gráfico, indica que esse efeito é estatisticamente significativo com 95% de confiabilidade ($p = 0,05$).

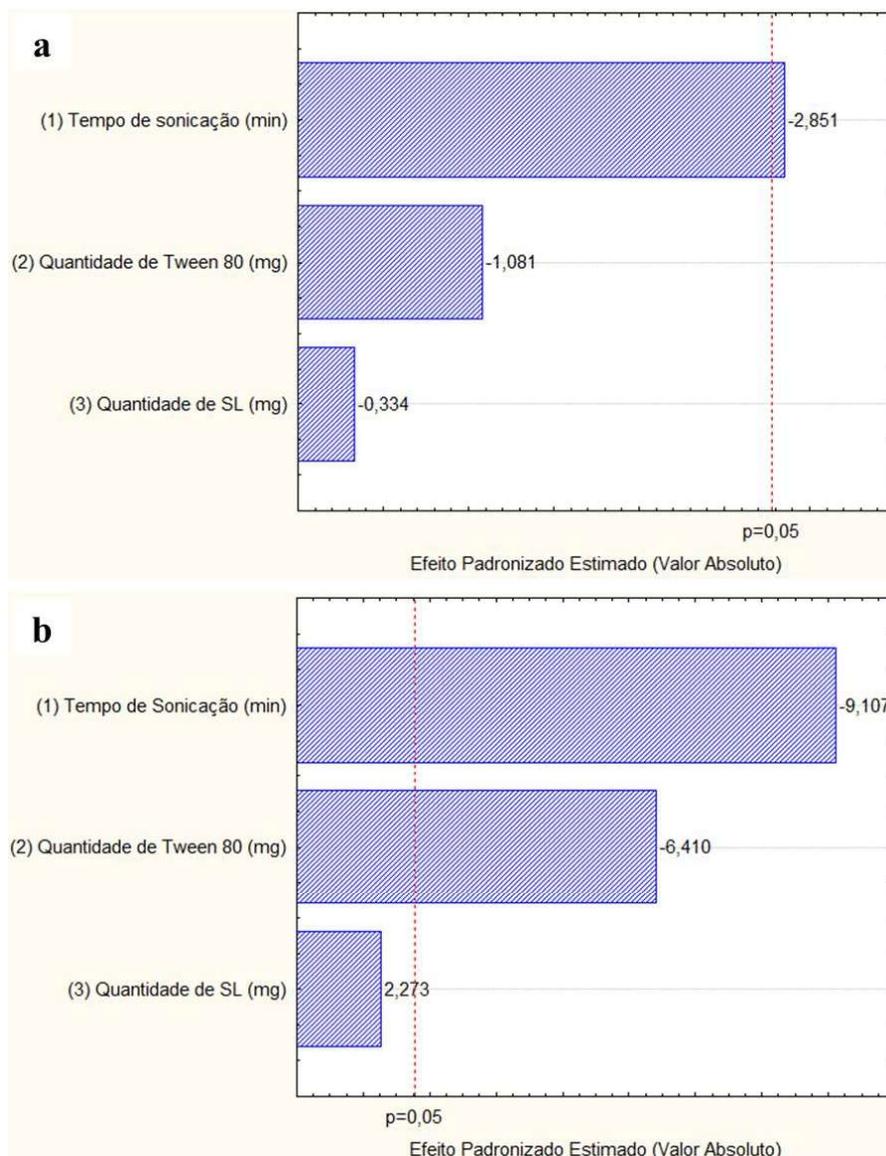


Figura 6. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a) e tamanho de partícula (b) para *design* fatorial completo 2^3 do estudo da formulação NLC-3TC

Através do gráfico de Pareto e análise multivariada foi possível perceber que o fator de tempo de sonicação é estatisticamente significativo para ambas as respostas analisadas, assim para a LC máxima o nível inferior (-1) é indicado, enquanto que para um tamanho mínimo a indicação é o oposto. Consequentemente, um estudo foi conduzido a fim de tentar reconciliar uma condição que satisfaça ambas as respostas, tanto quanto possível, tendo a resposta LC como uma prioridade. Para tanto, foi utilizado um *design* composto central (**Tabela 3**), resultando em 11 experimentos (com pontos axiais e replicação do ponto central) para análise da influência dos dois fatores mais significativos e suas interações para as respostas LC e tamanho de partícula. As condições experimentais selecionadas foram: tempo de sonicação,

no intervalo de 30 segundos a 24 minutos; e quantidade de Tween 80, na gama de 9,5 mg a 115,5 mg.

Tabela 3. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central do estudo de formulação de NLC-3TC.

Ensaio	Variáveis Independentes	
	Tempo de sonicação (min)	Quantidade de Tween 80 (mg)
1	-1 (2)	-1 (25)
2	+1 (20)	-1 (25)
3	-1 (2)	+1 (100)
4	+1 (20)	+1 (100)
5	$-\sqrt{2}$ (0,5)	0 (62,5)
6	$+\sqrt{2}$ (23,7)	0 (62,5)
7	0 (11)	$-\sqrt{2}$ (9,5)
8	0 (11)	$+\sqrt{2}$ (115,5)
9*	0 (11)	0 (62,5)
10*	0 (11)	0 (62,5)
11*	0 (11)	0 (62,5)

* Replicação dos pontos centrais

Os dados foram analisados utilizando ANOVA (**Tabela 4**) e gráficos Superfície Resposta (SR) foram construídos para cada variável dependente (**Figura 7**). A quantidade de fator SL não foi estatisticamente significativa para nenhuma das respostas do estudo. Por este motivo, este fator foi estabelecido em 235 mg, um valor intermediário entre os níveis alto e baixo anteriormente avaliados.

Tabela 4. Os parâmetros ANOVA de LC e tamanho médio de partícula respondem à caracterização da adequação em modelos de formulação NLC.

	Graus de Liberdade (GL)	Soma dos Quadrados (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F	<i>P</i>	r^2
LC						
Regressão	5	0,024	0,005	57,026	0,00021	0,983
Residual	5	0,000	0,000			
Total	10	0,024				
Tamanho Médio de Partícula						
Regressão	5	118118,113	23623,623	311,716	0,00001	0,997
Residual	5	378,929	75,786			
Total	10	118497,042				

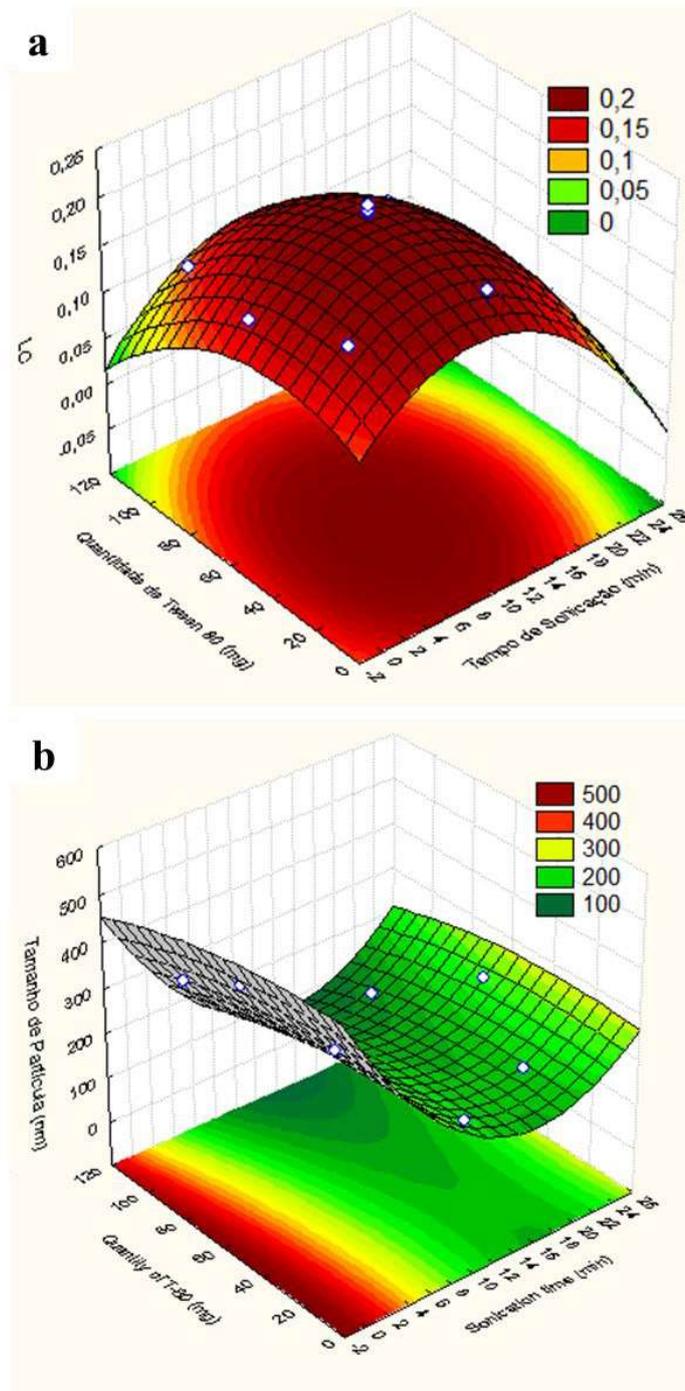


Figura 7. Gráficos de superfície de resposta para as respostas: capacidade de carregamento (a) e tamanho médio de partícula (b) do estudo de formulação de NLC-3TC.

Um modelo quadrático estatisticamente significativo, representando 98% e 99% da variância para as respostas LC e Tamanho Partícula, respectivamente, foi ajustado aos dados. Estes modelos descrevem a correlação entre os valores das respostas observadas e das respostas previstas. O modelo de regressão quadrática é dado pelas seguintes equações:

$$LC = 0,12847 + 0,01182x - 0,00068x^2 + 0,00147y - 0,00002y^2 + 0,00003xy$$

$$\text{Tamanho Partícula} = 477,038 - 39,072x + 1,191x^2 + 0,157y - 0,008y^2$$

Nestas equações, x e y representam tempo de sonicação e quantidade de Tween 80, respectivamente. A partir da análise da metodologia Superfície Resposta e suas funções, foram selecionados 10 minutos de tempo de sonicação e 44 mg de quantidade de Tween 80. Com estes valores, o ponto ótimo para LC e um valor satisfatório para tamanho de partícula foram obtidos para a formulação NLC-3TC. A resposta PDI também foi satisfatória para essas condições selecionadas ($< 0,3$). Os valores observados para as respostas LC e tamanho de partícula da formulação otimizada foram considerados em boa concordância com os valores previstos pelos modelos teóricos, que foram 0,22% para LC e 203 nm tamanho de partículas (Figura 8).

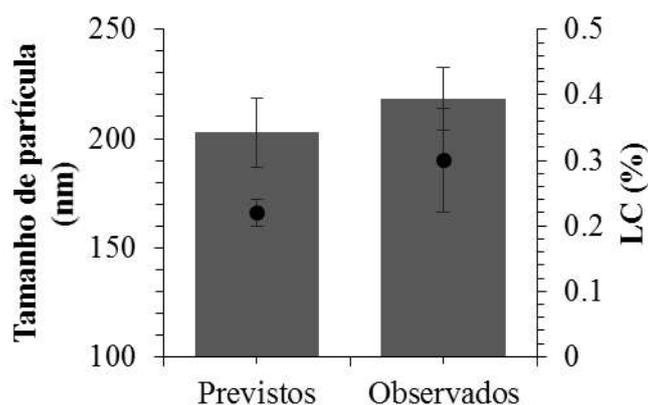


Figura 8. Validação dos valores experimentais da formulação NLC-3TC selecionada com seus resultados previstos. (●) LC (%) e (■) Tamanho de Partícula (nm).

Otimização da produção de MLN através da técnica de homogeneização a quente por alto cisalhamento e ultrasonicação

Alguns fatores foram previamente fixados como o resultado do estudo de pré-formulação. Um *design* fatorial completo 2^3 com replicação do ponto central foi feito para analisar a influência e significância de três fatores críticos quantitativos para a otimização de LC, tamanho médio de partícula e PDI.

Os fatores selecionados e seus intervalos foram: quantidade de lipídio sólido, 1 - 1,6 g; quantidade de fase aquosa (AP), 4 - 5,2 g; quantidade de Span 80, 1 - 1,7 g. A matriz deste *design* experimental pode ser visualizada na **Tabela 5**. Observe que o fator "quantidade de Span 80" está, em outro ponto de vista, na taxa de 1:4 do Span 80 para a fase lipídica no nível baixo e 1:2,4 do Span 80 para a fase lipídica no nível alto.

Tabela 5. Níveis codificados e os valores reais das variáveis em *design* fatorial completo 2^3 com replicação do ponto central do estudo da formulação de MLN-3TC.

Ensaio	Variáveis Independentes		
	Quantidade de SL (g)	Quantidade de AP (g)	Quantidade de Span 80(g)
1	-1 (1)	-1 (5,2)	-1 (1)
2	+1 (1,6)	-1 (5,2)	-1 (1)
3	-1 (1)	+1 (4)	-1 (1)
4	+1 (1,6)	+1 (4)	-1 (1)
5	-1 (1)	-1 (5,2)	+1 (1,7)
6	+1 (1,6)	-1 (5,2)	+1 (1,7)
7	-1 (1)	+1 (4)	+1 (1,7)
8	+1 (1,6)	+1 (4)	+1 (1,7)
9*	0 (1,2)	0 (4,6)	0 (1,3)
10*	0 (1,2)	0 (4,6)	0 (1,3)
11*	0 (1,2)	0 (4,6)	0 (1,3)

* Replicação dos pontos centrais (0)

Para as respostas LC, tamanho de partícula e PDI, todos os fatores e quase todas as suas interações foram estatisticamente significativos, em 95% de confiança, através do gráfico de Pareto e análise multivariada com valores p calculados = 0,05 (**Figura 9**). Os fatores "quantidade de Span 80" e "quantidade de SL" foram os dois mais significativos para as respostas LC e tamanho de partícula; enquanto que para PDI os dois fatores mais significativos foram "quantidade de AP" e "quantidade de SL", mas com efeitos estimados inferiores aos apresentados pelos fatores significativos de LC e tamanho de partícula.

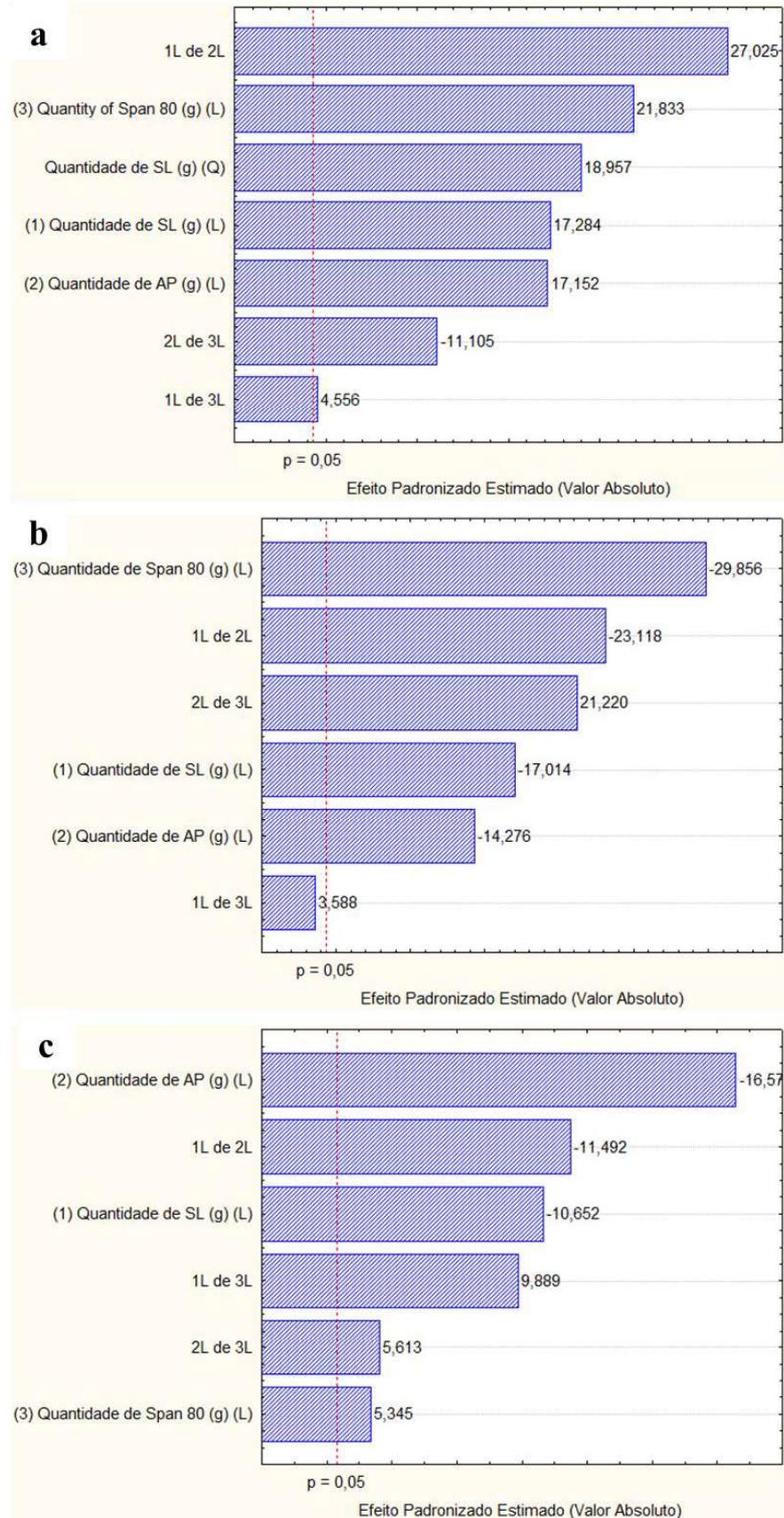


Figura 9. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a), tamanho de partícula (b) e PDI (c) para o *design* fatorial completo 2^3 com replicação do ponto central do estudo de formulação de MLN-3TC.

Por esta razão, os fatores "quantidade de Span 80" e "quantidade de SL" foram selecionados para a construção dos gráficos Superfície Resposta das variáveis dependentes nesse estudo. Assim, a matriz do *design* experimental (**Tabela 6**) foi completada com outras condições importantes, como os pontos axiais e maior replicação do ponto central, para melhor avaliar a influência dos dois fatores mais significativos e suas interações.

Tabela 6. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central para construir a superfície resposta do estudo de formulação de MLN-3TC.

Ensaio	Variáveis Independentes	
	Quantidade de Span 80 (g)	Quantidade de SL (g)
1	-1(1)	-1 (1)
2	-1(1)	+1 (1,6)
3	+1 (1,7)	-1 (1)
4	+1 (1,7)	+1 (1,6)
5	$-\sqrt{2}$ (0,9)	0 (1,2)
6	$+\sqrt{2}$ (1,8)	0 (1,2)
7	0 (1,3)	$-\sqrt{2}$ (0,8)
8	0 (1,3)	$+\sqrt{2}$ (1,7)
9*	0 (1,3)	0 (1,2)
10*	0 (1,3)	0 (1,2)
11*	0 (1,3)	0 (1,2)
12*	0 (1,3)	0 (1,2)
13*	0 (1,3)	0 (1,2)

* Replicação dos pontos centrais

Por sua vez, o fator "quantidade de AP" foi fixado ao nível (-), nomeadamente, 5,2 mL, uma vez que foi indicado para os melhores resultados para todas as três respostas. ANOVA dos modelos são demonstrados em (**Tabela 7**) para as duas respostas significativas.

Tabela 7. Os parâmetros ANOVA das respostas LC e tamanho de partícula para caracterização dos ajustes dos modelos da formulação MLN.

	Graus de Liberdade (DF)	Soma dos Quadrados (SS)	Média dos Quadrados (MS)	F	<i>p</i>	r^2
LC						
Regressão	5	0,836	0,167	10,946	0,00332	0,887
Residual	7	0,107	0,015			
Total	12	0,943				
Tamanho de Partícula						
Regressão	5	78539,903	15707,981	17,547	0,00078	0,926
Residual	7	6266,294	895,185			
Total	12	84806,197				

Através do ajuste dos dados experimentais foi possível plotar as Superfícies de Respostas para cada resposta, como retratado na **Figura 10** para as respostas LC e tamanho de partícula, com a finalidade de identificar as melhores condições na faixa avaliada.

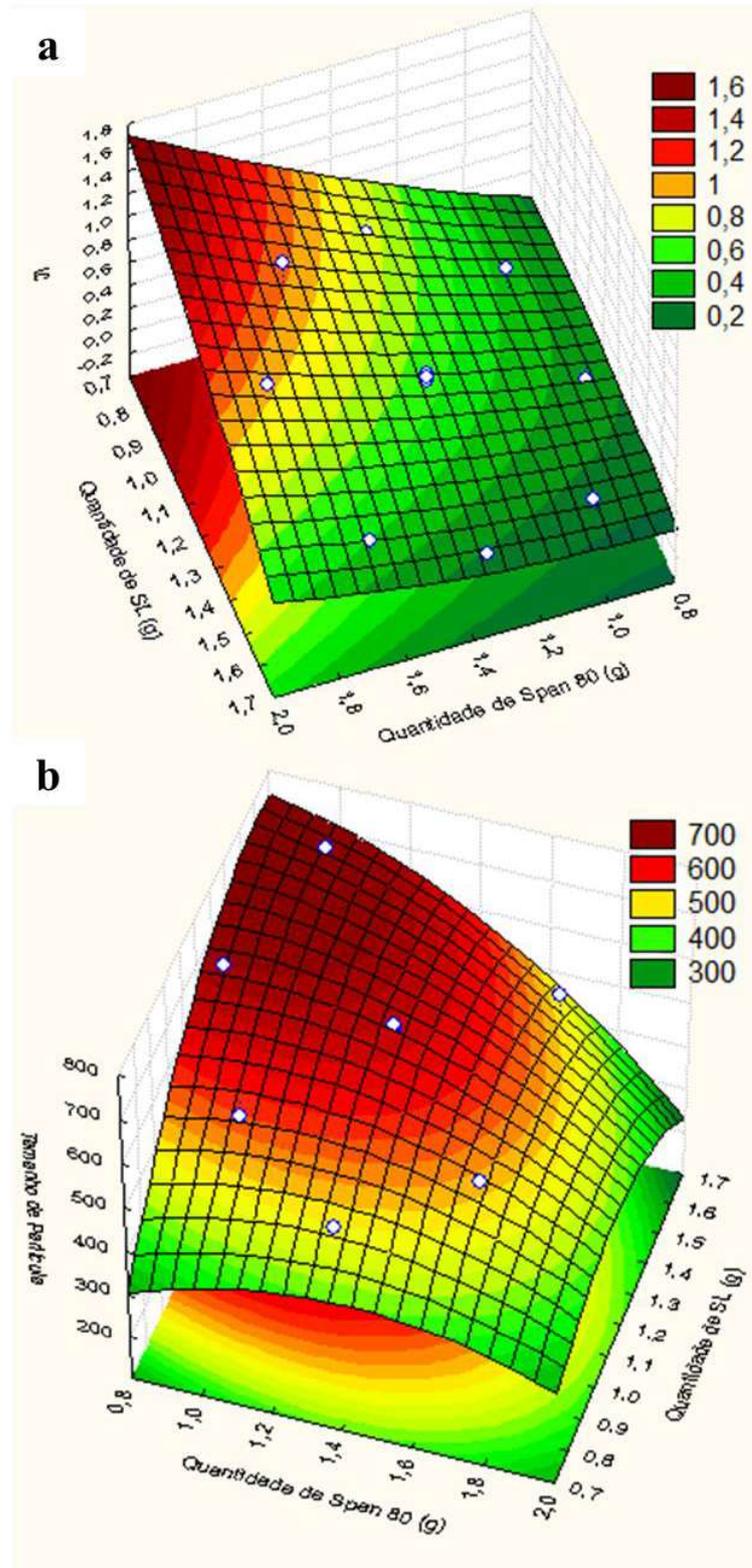


Figura 10. Gráfico de Superfície Resposta para as respostas: LC (a) e tamanho médio de partícula (b) do estudo de formulação de MLN-3TC.

Um modelo quadrático estatisticamente significativo, representando 89% e 93% da variância para as respostas LC e tamanho de partícula, respectivamente, foi ajustado aos

dados. Estes modelos descrevem a correlação entre os valores observados e os previstos. Os modelos de regressão quadrática obtidos são os seguintes:

$$LC = -1,451 + 1,297x + 0,247x^2 + 1,669y - 0,403y^2 - 0,991xy$$

$$\text{Tamanho Partícula} = -1274,130 + 1018,634x - 252,033x^2 + 2032,589y - 515,587y^2 - 438,016xy$$

Onde x e y são "quantidade de Span 80" e "quantidade de SL", respectivamente. Os requisitos para as formulações otimizadas foram satisfeitos a partir da análise da metodologia Superfície Resposta e sua função de desejabilidade. A formulação otimizada foi de 1,8 g de Span 80 e 1 g de SL, conseqüentemente 3 g de LL (razão 1:3). Esses valores simultaneamente otimizam as duas respostas de interesse neste estudo (LC e tamanho de partícula), e além disso, para entregaram uma resposta PDI abaixo 0,3. Os valores experimentais de LC (1,08 %) e tamanho de partícula (450 nm) da formulação otimizada MLN foram analisados e foram considerados de boa concordância com os valores previstos pelos modelos teóricos, que foram 1,17% para LC e 471 nm para tamanho de partícula (**Figura 11**).

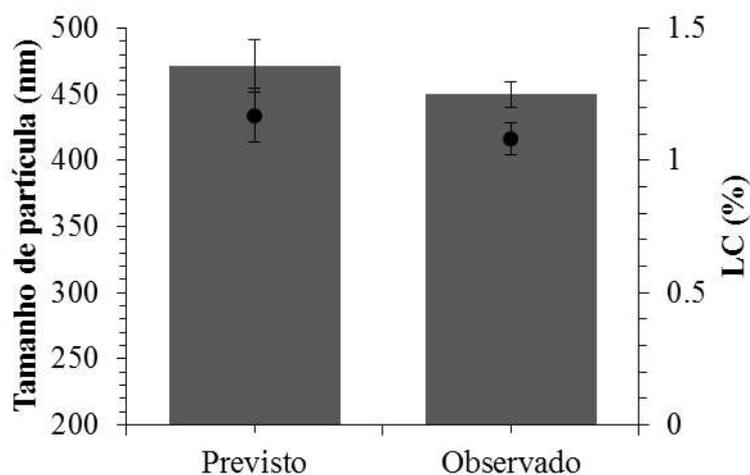


Figura 11. Validação dos valores experimentais da formulação MLN selecionada com os seus resultados previstos. (●) LC (%) e (■) tamanho de partícula (nm).

Caracterização físico-química das formulações otimizadas

As formulações 3TC finais otimizadas estão sumarizadas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Parâmetros das formulações finais NLC-3TC e MLN-3TC, depois da otimização QbD.

Parâmetros	Formulações 3TC selecionadas	
	NLC-3TC	MLN-3TC
Lipídio sólido	235 mg Compritol	1000 mg Compritol
Lipídio líquido	65 mg Ác oleico	3000 mg Miglyol
Surfactante	43,6 mg Tween 80	1800 mg Span 80 e 657 mg Tween 80
Fármaco	2 mg 3TC	312 mg 3TC
Fase aquosa	12 mL; pH 7,4.	5,2 mL; pH 7,4
Temperatura de produção	80 °C	80 a 90 °C
Tempo de produção	10 min	1ª etapa: ultraturrax: 9 min a 7000 rpm, e sonicação: 4 min a 40%. Intervalo de 10 min.
Configurações do equipamento	Sonicador: 130 KHz a 40 %	2ª etapa: ultraturrax: 3 min a 3500 rpm, e sonicação: 2 min a 30 %.
Resfriamento	TA	TA

Foram obtidas suspensões de NLC translúcidas esbranquiçada e de baixa densidade e um creme de MLN de alta viscosidade e esbranquiçado.

As formulações otimizadas de NLC e MLN foram caracterizadas em termos de tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, capacidade de carregamento e eficiência de encapsulamento (**Tabela 9**). Estas propriedades podem influenciar a estabilidade e atividades farmacológicas das formulações.

Tabela 9. Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE de formulações otimizadas de NLC e MLN.

Formulações	Tamanho de Partícula (nm)	PDI	Zeta (mV)	LC (%)	EE (%)
NLC-3TC-P*	229 ± 2	0,264 ± 0,01	-43 ± 0,7	-	-
NLC-3TC	218 ± 4	0,231 ± 0,01	-45 ± 2	0,30 ± 0,01	34 ± 1
MLN-3TC-P*	426 ± 9	0,202 ± 0,01	-25 ± 0,4	-	-
MLN-3TC	450 ± 10	0,299 ± 0,01	-21 ± 2	1,08 ± 0,06	20 ± 2

Média ± desvio padrão (DP) (n = 3). * Formulações Placebo.

Para todas as formulações desenvolvidas, o diâmetro médio da nanopartícula está dentro da gama manométrica (200 – 500 nm), o qual é considerado adequado para administração oral e absorção gastrointestinal. Adicionalmente, foi reportado que as partículas acima de 200 nm são mais facilmente incorporadas pelos macrófagos (SCHÖLER et al., 2002; MARTINS et al., 2012), que são, juntamente com os linfócitos, células-alvo no tratamento da infecção por HIV. Considerando os perfis de distribuição de tamanho, os valores da PDI são todos abaixo de 0,3, o que reflete populações NP relativamente monodispersas (LIPPACHER et al., 2001; BLOCK, 2010; MITRI et al., 2011).

Os valores de potencial zeta refletem a estabilidade física. A repulsão eletrostática entre partículas com carga elétrica negativa ou positiva elevada evita a ocorrência de agregação porque elas tendem a se repelir (FENG; HUANG, 2001; WISSING; MULLER, 2002; MITRI et al., 2011). Normalmente, a agregação de partículas é menos provável de ocorrer para partículas que apresentam Zeta pronunciada, $> |30|$ mV, pois são normalmente consideradas fisicamente estáveis e cerca de $|20|$ mV é aceitável (SOUTO et al., 2004; MISHRA et al., 2009). Quando as partículas, além da estabilização eletrostática, recebem estabilização estérica, como nestes casos com Tween 80, também valores em torno de $|20|$ mV, são suficientes para a estabilidade (MITRI et al., 2011). Foi descrito que as partículas carregadas negativamente têm uma absorção celular reduzida, devido à repulsão eletrostática entre elas e a membrana celular, no entanto mostram menos citotoxicidade do que as NP catiônicas, as quais provaram ser capazes de romper a membrana celular e conseqüentemente levar à morte celular (EKAMBARAM et al., 2012).

A diferença entre os valores de potencial zeta para os placebos das formulações de NLC e de MLN são provavelmente devido a diferença do lipídio líquido usado: ácido oleico na NLC e Miglyol 812 na MLN. Ácido oleico é um ácido carboxílico com pKa de 5,0. Com isso, em pH 7,4, o grupo hidroxil é completamente desprotonado. Como a parte carregada da molécula não tem afinidade para a matriz lipídica, este grupo deve estar localizado na interface da partícula. Por outro lado, o Miglyol 812, o qual é composto por uma mistura de triglicerídeos (ésteres) de ácidos graxos de 6 a 14 cadeias de carbono, não é carregado, sendo localizado na mistura lipídica e não influencia o potencial zeta.

O aumento do valor do potencial zeta na NLC após o carregamento do fármaco também é um sinal de sua localização interfacial, uma vez que o 3TC é carregado negativamente a pH 7,4. No caso da MLN, e uma vez que se espera que o 3TC esteja nos vacúolos aquosos internos, o potencial zeta não aumenta.

As formulações otimizadas exibiram um tamanho de partícula satisfatório (218 nm para NLC-3TC; 450 nm para MLN-3TC), PDI abaixo 0,3 e potencial zeta $> |20|$ e negativo.

O LC da formulação MLN-3TC foi 3,5 vezes maior do que o NLC-3TC, que é associado com a estrutura das MLN. Os vacúolos aquosos de diferentes tamanhos contidos na matriz lipídica das MLN permitem uma capacidade carregamento maior de fármacos hidrofílicos, como a 3TC (solubilidade máxima em água: 70 mg/mL a 20 °C), uma vez que estes fármacos estão solubilizados nestes vacúolos. Diferentemente, as NLC dificultam a incorporação de fármacos hidrofílicos, uma vez que a sua estrutura é constituída apenas por uma matriz lipídica. No entanto, pode ser encontrado na literatura exemplos onde o carregamento de fármacos hidrofílicos foi alcançado em NLC (SARMENTO et al., 2007; SINGH et al., 2010; SHAH et al., 2012; FRIAS et al., 2016).

Ambas as formulações tinham baixa EE, provavelmente relacionada com os altas quantidade de 3TC usadas no desenvolvimento das formulações. Entretanto, foi dada prioridade à otimização da resposta LC nos *design* experimentais. Além disso, geralmente EE e LC são inversamente proporcionais, uma vez que a LC tende a aumentar com o aumento da quantidade total de fármaco empregado na formulação até atingir um patamar, enquanto que EE necessariamente aumenta com a diminuição da quantidade total de fármaco empregue na formulação.

Os efeitos da composição lipídica, da interação entre os lipídios selecionados e o estabilizador, o grau de cristalização de cada lipídio e, neste caso, a estrutura diferente das NPs e diferentes processos de produção, afetam todas essas propriedades mencionadas acima das NPs. Assim, a aplicabilidade das NLC ou o MLN dependerá das características do fármaco, via de administração e finalidade da formulação, e concepção do desenvolvimento da formulação.

Ensaio de liberação de 3TC *in vitro*

Os perfis de liberação *in vitro* da 3TC a partir da MLN, NLC e fármaco livre foram investigados em duas condições designadas para simular ambientes fisiológicos e gástricos. Esses estudos visaram avaliar se os sistemas desenvolvidos permitiram dois dos objetivos das formulações: proteção 3TC através do trato gástrico e manter constante a concentração plasmática 3TC na corrente sanguínea, o que, em última análise, poderia permitir uma administração diária.

Os perfis de liberação em ambas as condições miméticas são mostrados na **Figura 12**.

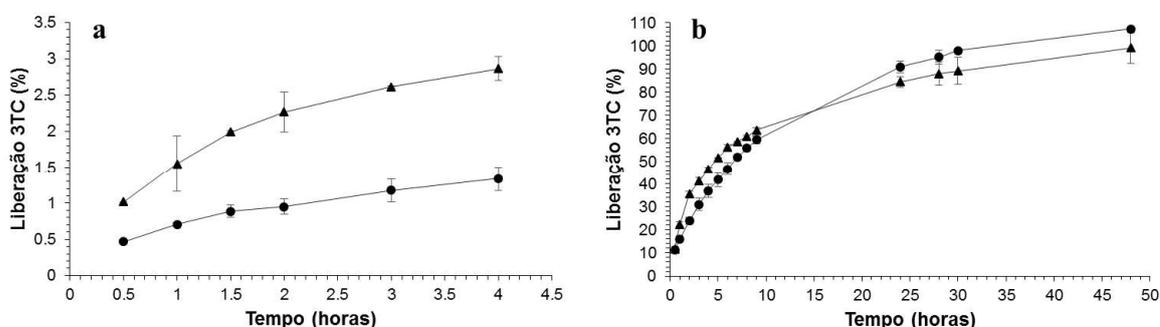


Figura 12. Perfil de liberação *in vitro* da NLC-3TC (▲) e MLN-3TC (●). (a) simulando o ambiente gástrico e a temperatura corporal (pH 1,2 a 37 °C), e (b) simulando o ambiente fisiológico e a temperatura corporal (pH 7,4 a 37 °C). Os dados são a média e Desvio Padrão para n = 2.

A liberação observada da 3TC no ambiente gástrico foi de cerca de 1,3% e 2,9% em 4 horas para MLN-3TC e NLC-3TC, respectivamente. Em ambiente fisiológico, depois de 30 horas, as liberações acumuladas de 98% para MLN-3TC e 89% para NLC-3TC foram alcançadas; tendo a liberação total ocorrendo entre 30 a 48 horas para ambas as formulações.

Desde o tempo zero, foi observada uma liberação mais controlada da formulação MLN-3TC em ambos os ambientes, possivelmente associada à inserção do fármaco hidrofílico 3TC nos vacúolos aquosos desta partícula. Enquanto o NLC-3TC apresentou uma “liberação explosiva” bem conhecida, em ambiente fisiológico, nos primeiros tempos do estudo de liberação (a liberação atingiu 36% em 2 horas). De fato, a adição do fármaco nas camadas exteriores das partículas podem resultar em aprisionamento superficial, que nesse caso é favorecido por algumas condições do método de produção, tais como, alta temperatura, taxa de arrefecimento da formulação, e características físico-químicas do fármaco (MÜLLER

R. H. et al., 1995; MUHLEN A., ZUR; MEHNERT W., 1998; MUCHOW et al., 2008). Isso pode explicar a taxa de liberação maior da NLC-3TC comparada a MLN-3TC.

Os resultados da liberação foram analisados utilizando modelos matemáticos para a cinética de liberação do fármaco. A liberação de 3TC das LNP, para ambas as condições estudadas, foi melhor ajustada ao modelo Higuchi ($R^2 > 0,98$, **Figura 13**). Deste modo, a liberação de 3TC de ambas as formulações é conduzida por difusão controlada. Analisando as constantes da taxa de liberação (K_H), dada pela inclinação dos perfis lineares é possível observar que em condições ácidas K_H é muito maior para a formulação NLC-3TC (1,42). No entanto, e uma vez que o tempo de exposição destas partículas a este pH é esperado no máximo 4 horas, o fármaco liberado dentro deste período de tempo não é muito alto (3%). Enquanto, a formulação de MLN-3TC revelou ser gastro resistente, com um máximo de liberação de fármaco de 1,2%. Nas condições de pH 7,4, o K_H para MLN é ligeiramente inferior ao do NLC, o que novamente pode refletir a presença de 3TC nos vacúolos aquosos que atrasam a difusão. Esta liberação controlada, pode eventualmente permitir uma dosagem diária, uma vez que a liberação do fármaco é mantida, permitindo uma concentração constante de fármaco no plasma.

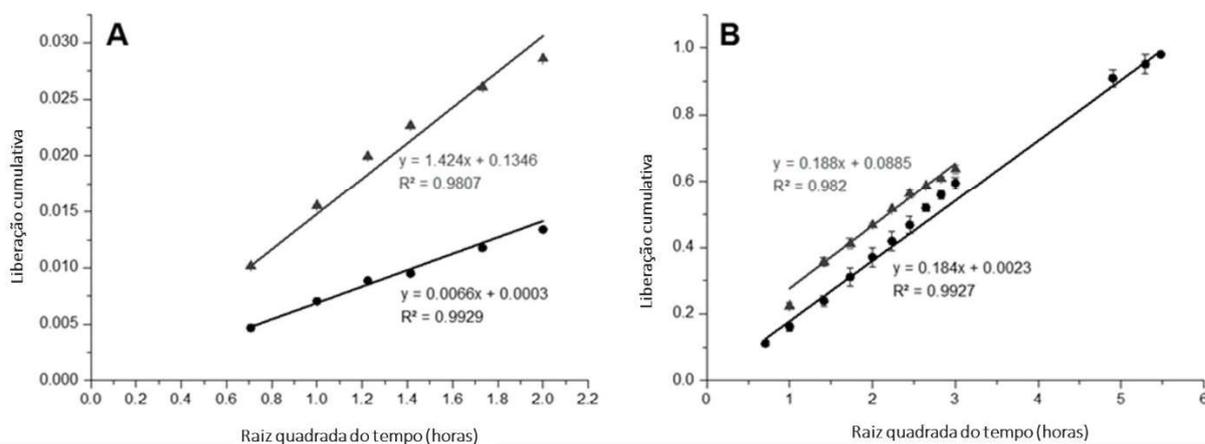


Figura 13. O modelo de Higuchi aplicado à cinética de liberação em ambiente gástrico simulado (pH 1,2) (A) e ambiente fisiológico (pH 7,4) (B). O NLC-3TC é representado por ▲ e MLN-3TC por ●.

Determinação morfológica

As imagens obtidas por TEM das formulações MLN e NLC revelaram forma esférica e estão de acordo com os resultados de tamanho obtidos por DLS. Especificamente para a

MLN foi evidenciado os espaços ocupados pelos vacúolos aquosos de tamanhos variados inseridos na matriz lipídica (**Figura 14**). A discreta variação nos resultados de Tamanho de Partícula por TEM pode estar associada aos processos de preparação de amostras que são diferentes do DLS e pelo facto de o DLS medir o diâmetro hidrodinâmico. A detecção do tamanho das nanopartículas por DLS foi realizada em meios aquosos, o que significa que as nanopartículas lipídicas são altamente hidratadas. Além disso, a técnica DLS detecta flutuações nos sinais luminosos causados pelo movimento Browniano das partículas para calcular o tamanho (MEHNERT; MÄDER, 2001). Enquanto durante a preparação de amostras para técnica TEM, tanto a superfície da água como a água presente dentro da matriz de nanopartículas são removidas por sublimação (DUBES et al., 2003).

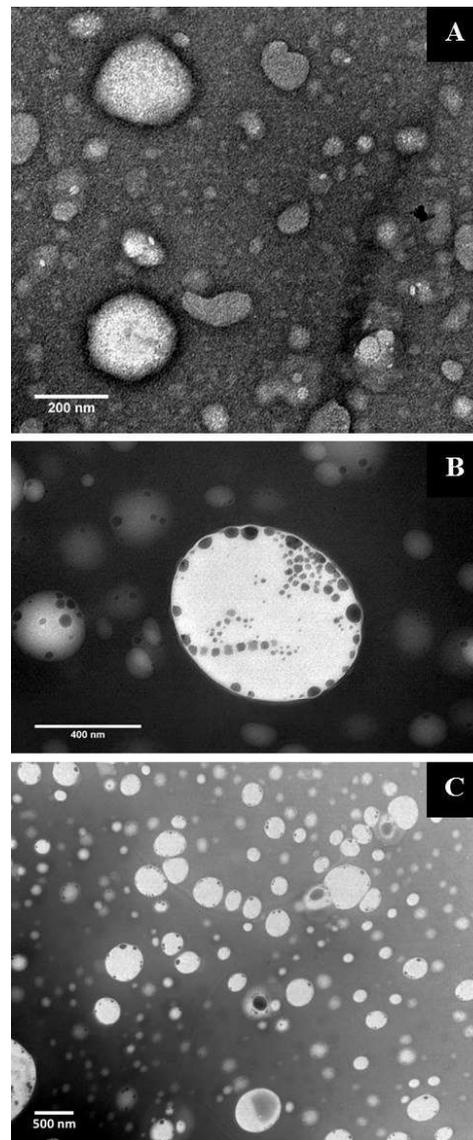


Figura 14. Imagens TEM das formulações NPs: (A) NLC-3TC, amplificação: 100.000x; (B) MLN-3TC, amplificação: 100 000x; (C) MLN-3TC, amplificação: 25 000x.

Estudo de estabilidade

Estudos de estabilidade das formulações MLN-3TC e NLC-3TC foram realizados para avaliar a integridade de suas propriedades estruturais ao longo do tempo. Particularmente, tamanho de partícula, PDI e potencial zeta foram avaliados – por um período máximo de 45 dias, armazenado como suspensões aquosas a 4 °C e protegido da luz (**Figura 15**). Assim, ao final dos 45 dias, a formulação MLN-3TC alterou o tamanho inicial de 450 nm para 457 nm, o PDI de 0.299 para 0.328 e o potencial zeta de -21 mV para -38 mV. Nenhuma dessas alterações foram consideradas significativas. A formulação de NLC-3TC, no período avaliado de 30 dias, apresentou uma variação da resposta tamanho de partícula de 218 nm para 209 nm, PDI de 0.231 para 0.299 e potencial zeta de -45 mV para -49 mV. Novamente, nenhuma das alterações foi considerada significativas. Assim, as formulações podem ser usadas nestas condições, por pelo menos um mês para NLC-3TC e 45 dias para MLN-3TC.

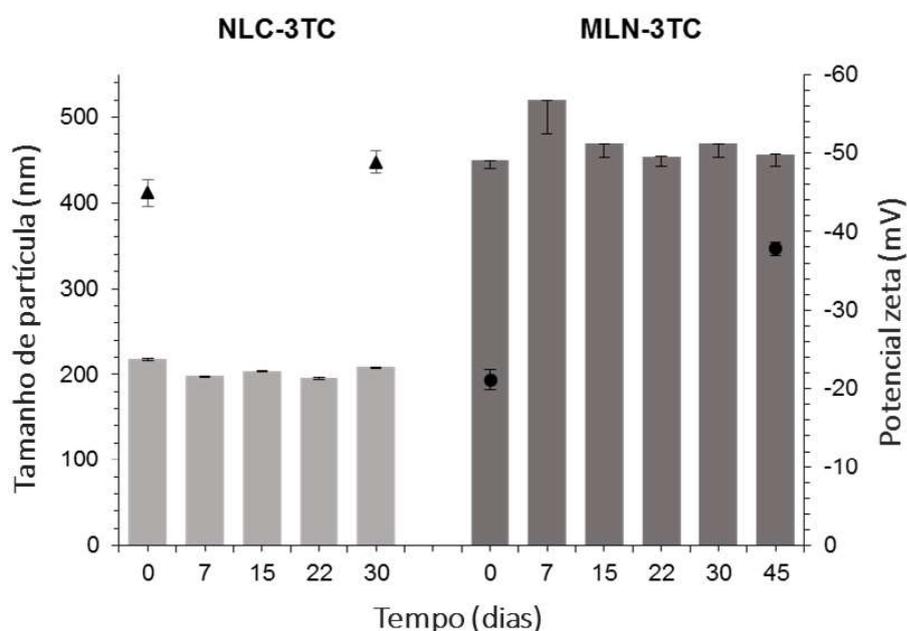


Figura 15. Estabilidade de armazenamento comparativa das formulações NLC-3TC e MLN-3TC por um período de 30 ou 45 dias. As barras representam o tamanho das nanopartículas (esquerda do eixo Y) e os marcadores de potencial zeta (direita do eixo Y). Os valores representam como média de 3 resultados independentes e respectivo desvio padrão.

Estudos de citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* de 3TC e 3TC encapsulada em NLC e MLN foi determinada por MTT utilizando células Jurkat T, como modelo de linfócitos T, células hospedeiras de HIV. O efeito do aumento da concentração do fármaco na viabilidade celular é mostrado na **Figura 16**. A NLC-3TC conduz ligeiramente ($p > 0,05$) para uma menor viabilidade que a NLC sem o 3TC encapsulado ou ainda 3TC livre, indicando que o sistema de liberação do fármaco tem baixa citotoxicidade. A baixa solubilidade de 3TC dificultou a determinação da IC_{50} , sem comprometer a viabilidade celular por dimetilsulfóxido - DMSO (solvente utilizado). As formulações NLC e MLN apresentaram baixa citotoxicidade para a concentração de 2 mg/mL nos lipídios, equivalente a 10 $\mu\text{g/mL}$ de 3TC, o que facilita uma posterior investigação anti-HIV. Foi relatado que a 3TC induz uma baixa citotoxicidade em relação às células cultivadas (LI et al., 2010).

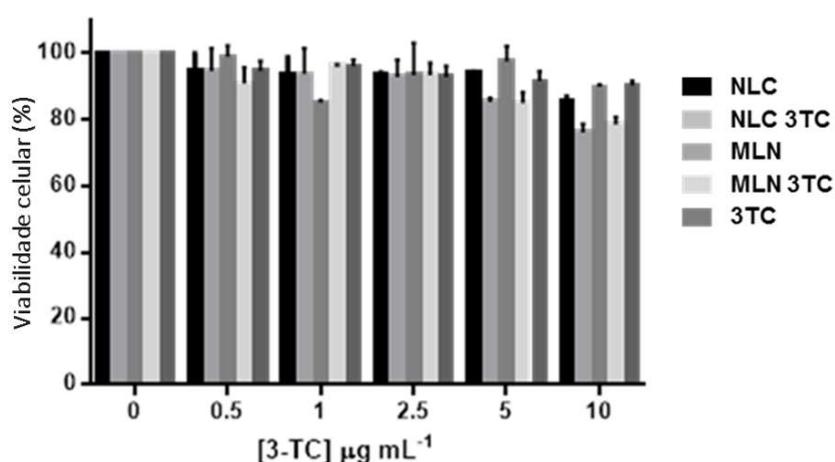


Figura 16. Viabilidade de células Jurkat T. Citotoxicidade *in vitro* de 3TC livre e 3TC encapsulado NLC e MLN após 24 horas de incubação. Dados expressos como média \pm DP (n = 3).

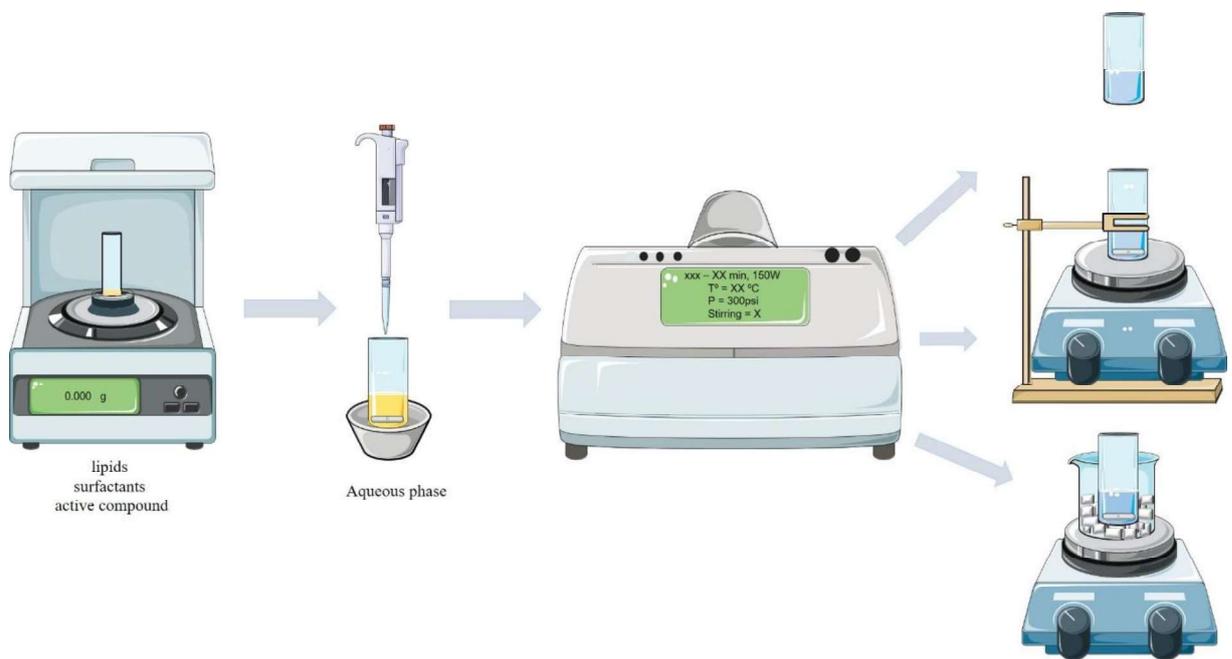
CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma nova geração de nanopartículas lipídicas, as MLN. Neste contexto, foi desenvolvida uma formulação MLN-3TC, juntamente com uma formulação NLC-3TC para fins de comparação. Ambas as

formulações foram desenvolvidas com base em um *design* fatorial completo e composto central. As formulações otimizadas apresentaram características adequadas para serem utilizadas para administração oral. De fato, apenas cerca de 1,3% de MLN-3TC é liberado após 4 horas em fluido gástrico simulado. Em pH 7,4 a liberação é também controlada por um processo de difusão, permitindo uma liberação controlada durante cerca de 45 horas. Além disso, ambas as formulações apresentaram baixa citotoxicidade em relação aos linfócitos T - células hospedeiras do HIV.

Globalmente, os resultados revelam que MLN apresentam uma maior LC e estabilidade de armazenamento do que NLC, que esclarece um pouco mais sobre o seu potencial. De fato, a presença de um grande número de vacúolos aquosos múltiplos de MLN explica a LC mais elevada. Embora seja também possível conseguir este tipo de vacúolos em outras gerações de LNP, requer um processo de emulsão dupla que envolva o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos. Adicionalmente, como as MLN são obtidas como um produto semissólido, não requer etapas adicionais de evaporação de água ou separação que são frequentemente necessárias na maioria das formulações, o que simplifica o *scale-up* deste tipo de formulação.

4.2. Artigo II - Otimização de carreadores lipídicos nanoestruturados para *delivery* de Zidovudina usando uma síntese inovadora assistida por microondas.



Submetido ao Journal of Colloid and Interface Science

Artigo

Otimização de carreadores lipídicos nanoestruturados para liberação controlada de Zidovudina através de uma inovadora produção assistida por microondas.

INTRODUÇÃO

As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas pela primeira vez no início dos anos 90. Hoje, eles estão entre as nanopartículas mais atraentes para a liberação de fármacos, devido à combinação de algumas características, tais como tamanho de partícula, baixa toxicidade, estabilidade física, propriedades de liberação controlada, alta capacidade de carregamento de droga e excelente tolerabilidade (MOGHIMI et al., 2005; CHAKRABORTY et al., 2009; SEVERINO; ANDREANI; et al., 2012). As nanopartículas lipídicas são preparadas como arranjos coloidais com uma matriz lipídica sólida sendo mantidas juntas por um surfactante. Seus constituintes são excipientes reconhecidos como seguros e conhecidos como biocompatíveis, portanto, essas nanopartículas são Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) (Muchow et al., 2008; Severino et al., 2012). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de nanopartículas lipídicas. A homogeneização a alta pressão e a microemulsão são as principais técnicas utilizadas para preparar nanopartículas lipídicas que encapsulam diferentes tipos de fármacos, contudo, estas permanecem com desvantagens particulares, tais como entradas de alta energia e aquecimento térmico ineficiente em técnicas de homogeneização (SHAH et al., 2015) e o risco de contaminação de metal quando os ultrassons são utilizados em técnicas de microemulsão (BETTS et al., 2013).

Por esta razão, diferentes procedimentos de produção de nanopartículas lipídicas têm sido amplamente investigados nos últimos anos (última década). De facto, Shah *et al.* em um trabalho anterior, utilizou energia de microondas para substituir o calor térmico no passo de

aquecimento dos constituintes para produzir nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), o que gerou muitas vantagens para esse fim (SHAH et al., 2014). Confirmou que a substituição do processo de aquecimento térmico por um processo de aquecimento por microondas com temperatura controlada produziu SLN com tamanhos de partículas menores, uma pequena polidispersão, maior eficiência de encapsulamento e de capacidade de carregamento e maior estabilidade física (SHAH et al., 2014).

No entanto, o processo envolve um segundo passo de produção que requer a dispersão imediata da formulação feita na água fria numa proporção de 1:50, o que diminui profundamente o rendimento do processo e torna-o demorado. Assim, neste trabalho, apresentamos uma nova metodologia, *one-pot* e única etapa, para a obtenção de nanopartículas lipídicas que utiliza apenas o reator de microondas. Esta técnica inclui algumas vantagens, tais como: é rentável, segura e reproduzível; pode ser facilmente escalável (*scale-up*); não precisa de solventes orgânicos; e gera diâmetro de partículas pequenos com um índice de polidispersão (PDI) geralmente abaixo de 0,3. Em reconhecimento a importância da abordagem *Quality by Design* (QbD) no desenvolvimento dos produtos e processos alinhados a Gestão de Riscos, a identificação e o controle de pontos críticos (ICH, 2005, 2009a), essas ferramentas foram utilizadas nesse estudo.

O fármaco encapsulado, AZT, é um inibidor da transcriptase reversa análoga a nucleosídeo (NRTI) aplicado como um primeiro agente antirretroviral e mais amplamente utilizado contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sozinho ou associado a outros fármacos antivirais. O AZT é um fármaco de classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) do sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) (LINDENBERG et al., 2004) com solubilidade em água de 25 mg / mL a 20°C (IARC, 2000) e log P próximo de zero (THOMAS; PANCHAGNULA, 2003). O AZT apresenta várias desvantagens, tais como: baixa biodisponibilidade oral (KLECKER RW JR FAU - COLLINS et al., 1987), toxicidade dependente da dose, toxicidade da medula óssea resultando em granulocitopenia e anemia (RICHMAN et al., 1987; LUTTON et al., 1990; CHOW; HAMBURGER, 1991). Além disso, os fármacos utilizados na terapia antirretroviral não podem atingir, em concentrações eficientes, o sistema nervoso central (SNC) que continua a ser um importante reservatório do HIV. Assim, a encapsulação de AZT em nanopartículas lipídicas pode melhorar a captação linfática, evitar o metabolismo hepático de primeira passagem e sua administração controlada

pode reduzir a necessidade de altas doses e evitar a toxicidade dependente da dose (PHILLIPS; TSOUKAS, 1992; CHAKRABORTY et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar as melhores condições experimentais para o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) por dois métodos diferentes de microemulsão: homogeneização a quente convencional seguida de ultrasonicação (FERREIRA et al., 2015) e técnica de microondas de uma etapa (CAVALCANTI et al., 2016), ambos como potenciais sistemas de liberação para o antirretroviral para Zidovudina (AZT).

Um estudo preliminar foi realizado para selecionar alguns parâmetros críticos e ajustar outros. Em todo o estudo, foi aplicado um *design* de experimentos (DOE). Nomeadamente, um *design* fatorial, um *design* composto central e uma superfície de resposta para selecionar a melhor formulação para cada método de produção. As principais respostas, ao longo do estudo, foram tamanho de partícula, PDI e capacidade de carregamento. As formulações desenvolvidas otimizadas foram caracterizadas quanto à morfologia, liberação de fármaco *in vitro*, estabilidade de armazenamento e seu efeito sobre a viabilidade de células Jurkat T.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Zidovudina (Ítaca®, lote HVZ0210304). O Lipídio sólido Precirol® ATO 5 foi fornecido por Gattefossé (Nanterre, França). O lipídio líquido Miglyol - 812 foi adquirido da Acofarma (Madrid, Espanha). O Polysorbato 80 (Tween® 80) foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida por processo de osmose inversa com uma condutividade inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Milli-Q, Sartorius Arium® pro, Sartorius Weighing Technology, Gettingen, Alemanha). A linhagem celular Jurkat T (linfoma humano) foi obtida da ATLC (Filadélfia, PA, Estados Unidos da América (EUA)). Foram obtidos soro bovino fetal (FBS), mistura de antibióticos penicilina-estreptomicina e RPMI 164 da Gibco® (Paisley, RU).

MÉTODOS

Screening preliminar

Antes da construção do *design* experimental, foram fixados dois parâmetros: o tensioativo Tween 80® - por ser um surfactante estérico com baixa toxicidade e pH 5,5, da água deionizada dupla, pois o pKa da AZT é 9,68 (IARC, 2000), o que pode indicar predominância da molecular do AZT no pH selecionado, facilitando sua permanência na fase lipídica. Os estudos de pré-formulação foram realizados com diferentes lipídios sólidos e líquidos em diferentes proporções entre a fase lipídica e a fase aquosa (1:20 a 1:50 p/p). A seleção baseou-se nos critérios de que a mistura lipídica deveria aumentar a solubilidade do AZT. Os lipídios testados foram: Precirol® ATO 5, Compritol® ATO 888, Gelucire®, Cetil palmitato, ácido oleico e Miglyol®.

Design e otimização experimental

A abordagem QdD deste estudo visou otimizar formulações NLC-AZT e M-NLC-AZT (**Figura 17**) e seus processos de fabricação: homogeneização a quente seguida de ultrasonicação e nova técnica assistida por microondas, respectivamente.

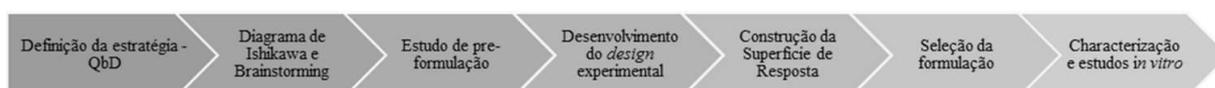


Figura 17. Fluxograma da abordagem QbD deste trabalho.

Os diagramas de Ishikawa foram aplicados para identificar e selecionar os parâmetros críticos envolvidos em cada metodologia de produção (**Figura 18**). As variáveis independentes quantitativas independentes selecionadas para o *design* experimental de NLC-

AZT foram tempo de sonicação, quantidades de Tween 80® e de lipídios sólidos. Para M-NLC-AZT as variáveis independentes críticas foram as quantidades de Tween 80® e de lipídio sólido. Os níveis inferiores (-1) e superiores (+1) de cada parâmetro crítico selecionado foram escolhidos com base nos estudos de pré-formulação e na pesquisa bibliográfica. Todas as outras variáveis foram fixadas em níveis fixos.

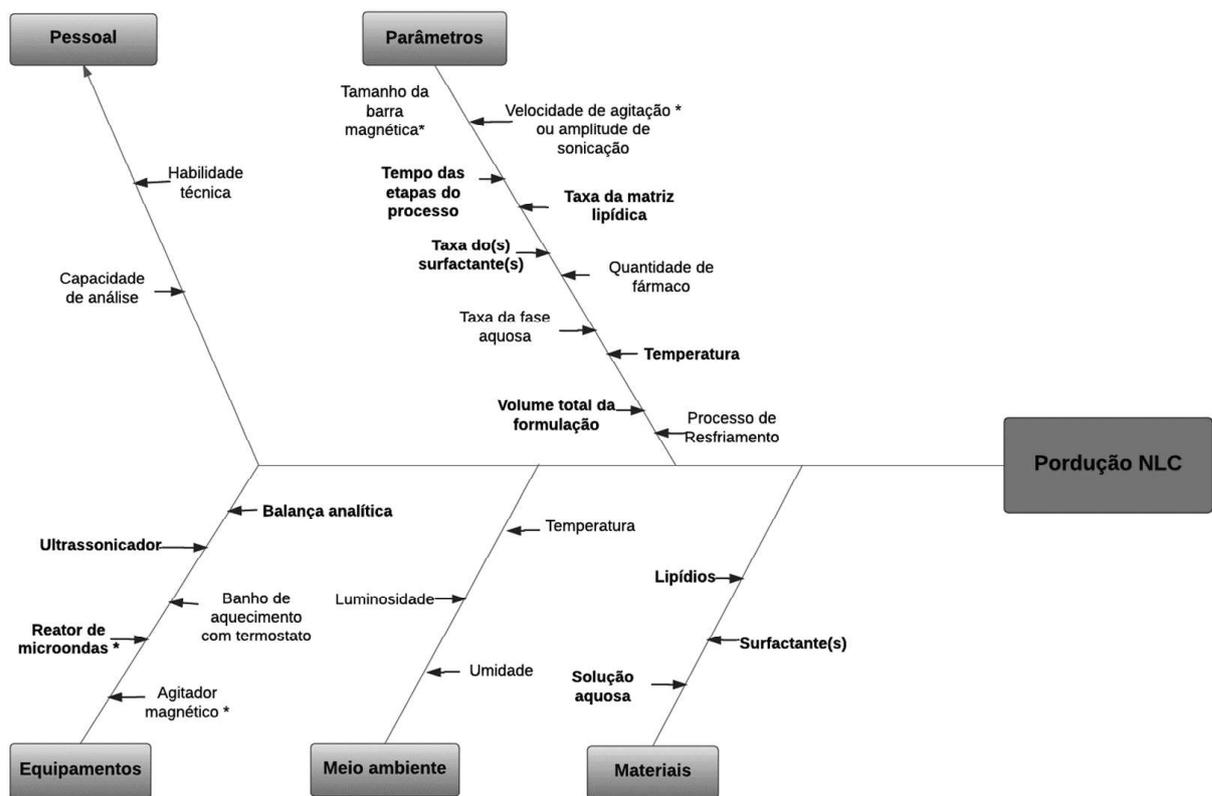


Figura 18. Diagrama de Ishikawa de parâmetros críticos tanto para a homogeneização a quente seguida de ultrasonicação como para a nova técnica assistida por microondas. *Parâmetros só são aplicados à técnica de microondas

A metodologia do *design* experimental foi o *design* fatorial completo ou composto central, com replicação de pontos centrais (nível 0). Quatro axiais foram aplicados ($\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,4142$ ou $\sqrt{2}$) para avaliar os efeitos de variáveis independentes e suas interações em variáveis dependentes. As experiências foram realizadas aleatoriamente. A análise da superfície de resposta (SR) foi aplicada para identificar as condições que proporcionaram formulações otimizadas de NLC-AZT e M-NLC-AZT.

As variáveis dependentes escolhidas do experimento foram tamanho médio de partícula (restrições: 100 a 300 nm), PDI (restrições: minimizar até 0,3) e capacidade de carregamento (restrições: maximizar).

O software Statistica 8.0 (Statsoft®, Inc.) foi utilizado para fazer o *design* da matriz, análise estatística, gráficos, modelos matemáticos e construção SR. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA com nível de confiança de 95 % (p-valores < 0,05).

Preparação de NLC

NLC foram preparados por duas diferentes técnicas de microemulsão: homogeneização a quente convencional seguida de um método de ultrasonicação e o método em única etapa por microondas.

Homogeneização a quente seguido por método de ultrasonicação

A fase lipídica constituída pelo lipídio sólido Precirol® ATO 5, o lipídio líquido Miglyol®-812, o estabilizador Tween® 80 e, opcionalmente, o AZT, foram fundidos a 80 °C, uma temperatura elevada, acima da temperatura de transição de fase de Precirol® ATO 5. A fase fundida lipídica foi então dispersa em água ultrapura pré-aquecida também a 80 °C e sonicada durante 2 a 20 min com uma frequência de amplitude de 50 %, 130KHz (modelo VCX130 com CV-18, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA). Arrefeceu-se então até à temperatura ambiente (TA), permitindo que a fase oleosa interna se solidificasse estabelecendo a dispersão de NLC na fase aquosa.

Método assistido por microondas

O método assistido por microondas pode ser descrito por ser uma síntese *one-pot* e única etapa (CAVALCANTI et al., 2016). Resumidamente, todos os componentes, Precirol® ATO 5, Miglyol®-812, Tween® 80, água ultrapura, opcionalmente AZT foram colocados em recipientes de vidro de borossilicato (35 mL) e aquecidos a 90 °C durante 10 min com agitação constante (cerca de 900 rpm) em um reator de microondas (CEM Discover SP®, 2,45 GHz,

0-300 W, ActiVent™ usando o software Synergy™). Após, foi rapidamente resfriado a 70 °C pelo sistema de reator de microondas, sob uma corrente de N₂. Finalmente, as formulações foram esfriadas à TA.

Medições do tamanho médio de partícula e do índice de polidispersão (PDI)

A análise do tamanho de partícula foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando um analisador de tamanho de partícula (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). Antes das medições, todas as amostras foram diluídas (1: 200) utilizando água ultrapura para dar uma intensidade de dispersão adequada (Kcps 300-500). Os dados DLS foram analisados a 25 °C com um ângulo de incidência de luz fixa de 90 °. O diâmetro hidrodinâmico médio (Z médio) e o PDI foram determinados como uma medida da largura da distribuição de tamanho de partícula. O tamanho de partícula e o PDI das amostras analisadas foram obtidos calculando a média de dez corridas.

Medições do potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado por medição da mobilidade electroforética das nanopartículas utilizando um analisador de potencial zeta (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). As amostras foram diluídas (1:200) com água ultrapura e foram analisadas a 25 °C. O potencial zeta (ou simplesmente, zeta) da amostra foi obtido calculando a média de seis corridas (cada uma com dez ciclos).

Determinação da morfologia

A morfologia de NLC-AZT otimizado e M-NLC-AZT foi avaliada por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM). As amostras foram preparadas colocando 10 µL de suspensões de NLC pré-diluídas (100x) numa grelha de malha de cobre e deixadas em

repouso durante 2 min à TA. Após este período, o excesso foi removido com papel de filtro. Para contraste, foram colocados 10 µL de solução de acetato de uranilo a 1% (m/v) sobre a grelha e deixados em repouso durante 5 segundos. Após este tempo, o excesso foi removido com papel de filtro. As amostras foram observadas num JEM-1400 *Transmission Electron Microscope* (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) com uma tensão de aceleração de 80 kV.

Capacidade de carregamento (LC) e eficiência de encapsulamento (EE)

A quantidade de AZT presente nas formulações foi determinada utilizando um método indireto. As suspensões de nanopartículas lipídicas foram diluídas 200x e filtradas com Filtros Amicon® Ultra Centrifugal Filters Ultracell-50 kDa (EMD Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 3400 xg durante 15 min, a 18 °C utilizando uma centrífuga Heraeus™ Multifuge™ X1R (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O sobrenadante resultante foi coletado, para quantificação de AZT, com comprimento de onda de 266 nm (pico máximo de absorvência de AZT) num Espectrofotómetro V-660 UV / Vis (Jasco Inc., Easton, MD, EUA). Foi utilizada uma curva de calibração de AZT em água ultrapura para determinar a sua concentração.

A capacidade de carregamento (LC) e a eficiência de encapsulamento (EE) são expressas em percentagem. LC é a quantidade de AZT encapsulado em comparação com a quantidade total de lipídio, enquanto EE refere-se à quantidade de AZT encapsulado em comparação com a quantidade total de fármaco adicionado. A capacidade de carregamento (LC) foi calculada da seguinte forma:

$$LC (\%) = \frac{(\text{quantidade total de fármaco} - \text{fármaco não encapsulado})}{\text{quantidade total de excipientes}} \times 100$$

A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada como:

$$EE (\%) = \frac{(\text{quantidade total de fármaco} - \text{fármaco não encapsulado})}{\text{quantidade total de fármaco}} \times 100$$

Medição da liberação de fármaco *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando uma técnica de difusão de saco de diálise de celulose (Float-a-Lyzer®G2, SpectrumLaboratories, Inc., CA, EUA, Alemanha) cheia com 1,5 mL das formulações otimizadas de NLC-AZT. A fim de imitar o percurso das partículas no corpo após administração oral, as amostras foram colocadas a 37 °C sob 300 rpm de agitação (placa de agitação quente IKA®-Werke RT15-P, Alemanha). Para simular o trânsito do estômago para o intestino, as amostras foram colocados primeiro durante 4 h em 76 mL de fluido gástrico simulado (solução de HCl, pH 1,2) e depois colocados em 76 mL de uma solução tamponada contendo dihidrogenofosfato de potássio, pH 7,4, como descrito em Farmacopeia dos Estados Unidos, USP-NP 26 (USP, 2008), até o final do experiência. Em intervalos de tempo regulares, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e o mesmo volume de tampão novo foi adicionado para manter as condições *sink*. A liberação de AZT foi quantificada por espectroscopia UV / Vis.

A quantidade de fármaco nas amostras foi determinada por curvas de calibração obtidas com as mesmas condições experimentais e os resultados representam os valores médios de duas execuções. Para avaliar os principais mecanismos responsáveis pela liberação de AZT, modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais, a saber ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Peppas-Korsmeyer e Hixon-Crowell (BARZEGAR-JALALI et al., 2008). O coeficiente de regressão (r^2) foi calculado para determinar o modelo de melhor ajuste.

Estudos de estabilidade

Para avaliar a estabilidade de formulações de NLC-AZT otimizadas, realizou-se um estudo de armazenamento de curto prazo a 4 °C por um período de 45 dias. Os indicadores de estabilidade de armazenamento foram tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta e LC.

Estudos de citotoxicidade

As células Jurkat T foram cultivadas em RPMI 1640 (GIBCO, Paisley, UK) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado pelo calor e 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂. As células Jurkat T foram colocadas em placas de 96 poços a 10⁵ células por poço e foram tratadas com NLC e as formulações NLC-AZT até 2,0 mg/mL em Lipídio equivalente a 15 µM em AZT durante 24 horas. A viabilidade das células tratadas e de controle (não tratadas e 0,2 % (v/v) Triton X-100) foram avaliadas pelo ensaio de metiltiazol tetrazólio (MTT). Em resumo, 10 µL de uma solução de 5 mg/mL de MTT foram adicionados aos poços e incubou-se a 37 °C durante 3 h. Parou-se a reação utilizando 100 µL de SDS a 10 % (m/v) durante 16 h. O crescimento celular foi avaliado por medição da absorbância a 545 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplaca (Synergy™ HT, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos como a percentagem da atividade metabólica das células tratadas em relação células não tratadas, e todas as experiências foram realizadas em quadruplicada. O software GraphPad Prism (versão 6, GraphPad Software, EUA) foi utilizado para a análise estatística dos resultados usando o teste t de Student (não pareado) e o teste de ANOVA unidirecional. Todos os demais resultados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatísticas significativas quando $p < 0,05$ (nível de confiança de 95 %).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudos preliminares

Entre os lipídios testados, o lipídio sólido Precirol® ATO 5 e o lipídio líquido Miglyol® 812 foram selecionados, pois sua mistura proporcionou a melhor solubilização do AZT. A razão entre a fase lipídica e fase aquosa de 1:40 p/p foi selecionada para o método convencional. Para o método assistido por microondas, esta razão não foi satisfatória para as

respostas de Tamanho de Partículas e PDI. Para este caso, foi selecionada a razão de fase lipídica para fase aquosa de 1:50 p/p.

Adicionalmente, no método assistido por microondas outros parâmetros foram avaliados tais como tempo, síntese e temperaturas de resfriamento. Os parâmetros selecionados foram: 10 min, 90 °C para síntese e resfriamento rápido a 70 °C no sistema de microondas. A força da agitação, o tamanho da barra magnética, o recipiente de microondas selecionado (35 mL) e o volume total da formulação foram fixados com base no conhecimento previamente adquirido no desenvolvimento desta metodologia (CAVALCANTI et al., 2016).

A quantidade de AZT foi diferente para cada técnica de produção. No método convencional o fármaco é colocado em fase lipídica e aquecido depois, assim foi selecionada uma quantidade de saturação do fármaco naquela fase lipídica (2 mg ou 0,7 % m/m de fase lipídica). Como o método assistido por microondas é uma reação *one-pot*, todos os componentes foram colocados no mesmo recipiente, ao mesmo tempo. Neste caso selecionou-se uma quantidade maior de fármaco (15 % m/m de fase lipídica) para ser possível aumentar a LC.

Design experimental, otimização e validação

Foram realizados estudos para estabelecer as condições que para proporcionar LC máximo, PDI mínimo e tamanho partículas entre 100 a 300 nm em todas as formulações de NLC-AZT.

Produção de NLC por homogeneização a quente seguido por método de ultrasonicação

Em primeiro lugar, foi construído um *design* fatorial completo 2^3 que permitiu a avaliação de três fatores críticos quantitativos e suas interações nos níveis mais baixo e mais alto selecionados: tempo de sonicação (2 e 20 min); quantidade de Tween® 80 (T-80) (25 e

100 mg) e; quantidade de lipídio sólido (SL) (200 e 270 mg). Foram realizadas oito experiências randomizadas. Vale ressaltar que a quantidade de lipídios totais foi mantida constante em 300 mg ao longo do estudo.

Os efeitos individuais e das interações dos fatores para cada resposta são representados nos gráficos de Pareto (**Figura 19**) e também foi confirmado através de gráfico de probabilidades – forma distinta de representar a mesma análise, porém aqui apresentamos apenas os gráficos de Pareto. Através do gráfico de Pareto e da análise multivariada foi possível perceber que o tempo sonicação e quantidade de Tween 80 foram os fatores mais significativos, com impacto negativo na LC, indicando que os melhores resultados de LC foram obtidos quando esses fatores foram ajustados aos seus valores mais baixos, ou seja, no nível (-1).

O efeito individual da quantidade de SL também foi significativo, indicando o nível mais elevado (+1), mas com menor extensão, próximo ao limite de significância estatística. O comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. Os efeitos de todos os parâmetros e interações foram padronizados (cada efeito foi dividido por seu erro padrão). A ordem em que as barras são exibidas corresponde à ordem da importância do efeito. Quando a linha vertical atravessa uma barra de efeito, no gráfico, indica que esse efeito é estatisticamente significativo com 95 % de confiabilidade ($p = 0,05$).

Para a resposta tamanho de partícula, apenas o fator quantidade de Tween 80 foi significativo, com impacto negativo, bem como a indicação para otimizar a resposta LC. Enquanto para a resposta PDI, quaisquer fatores foram estatisticamente significativos.

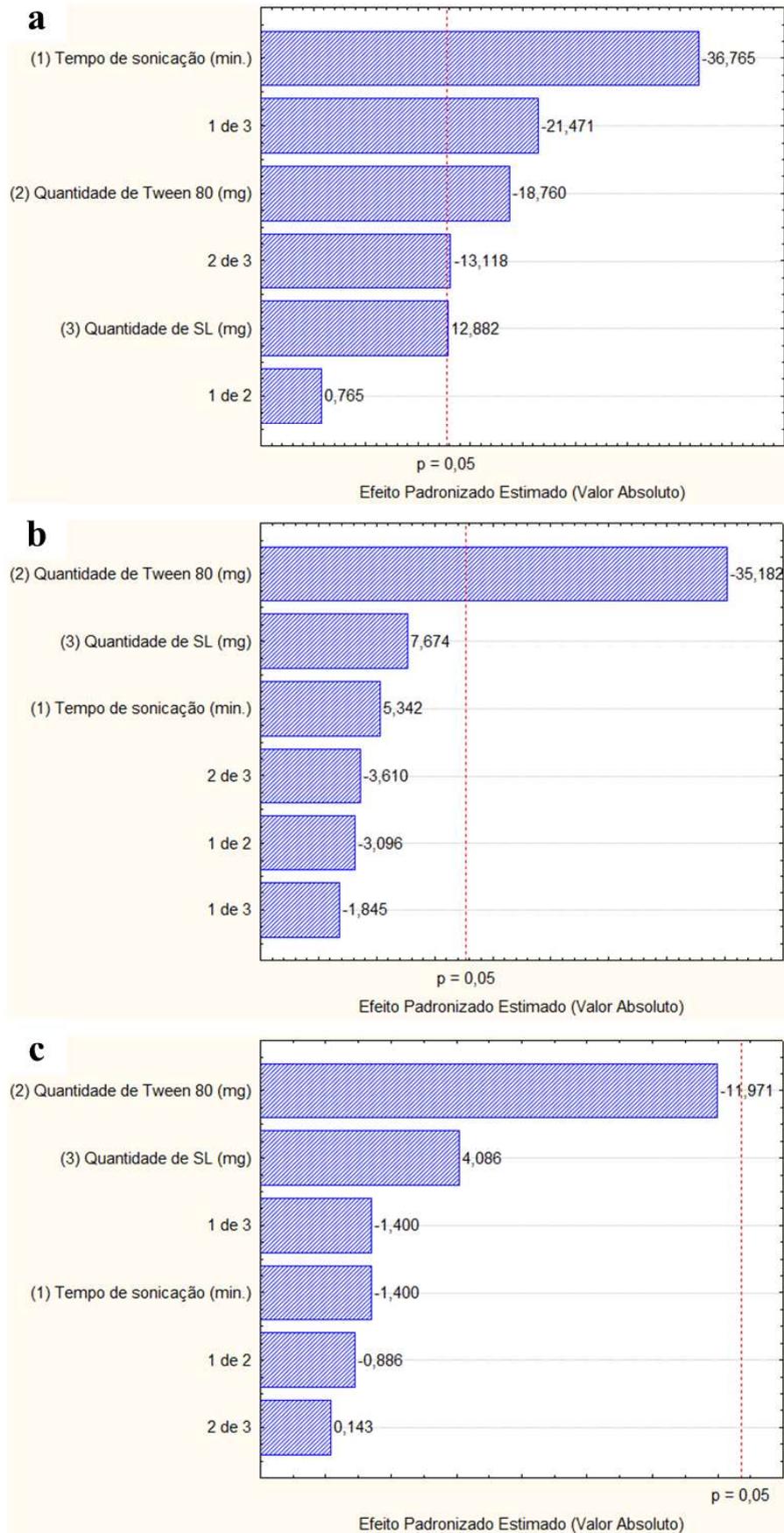


Figura 19. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a), Tamanho de Partícula (b) e PDI (c) para o *design* fatorial completo 2^3 do estudo da formulação NLC-AZT.

Por estas razões, apenas a resposta LC foi selecionada para ser otimizada e a quantidade do fator SL foi fixada em 250 mg e conseqüentemente 50 mg de lipídio líquido, valor intermediário entre os níveis alto e baixo previamente avaliados. Dessa forma, foi utilizado um *design* composto central (**Tabela 10**), resultando em 13 experimentos (com pontos axiais e replicação do ponto central) para análise.

Tabela 10. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central do estudo da formulação NLC-AZT.

Ensaio	Variáveis Independentes	
	Tempo de Sonicação (min)	Quantidade de Tween 80 (mg)
1	-1 (2)	-1 (25)
2	-1 (2)	+1 (100)
3	+1 (20)	-1 (25)
4	+1 (20)	+1 (100)
5	$-\sqrt{2}$ (0,5)	0 (62,5)
6	$+\sqrt{2}$ (23,7)	0 (62,5)
7	0 (11)	$-\sqrt{2}$ (9,5)
8	0 (11)	$+\sqrt{2}$ (115,5)
9*	0 (11)	0 (62,5)
10*	0 (11)	0 (62,5)
11*	0 (11)	0 (62,5)
12*	0 (11)	0 (62,5)
13*	0 (11)	0 (62,5)

* Replicações do ponto central

Assim, foi avaliada a influência e significância dos dois fatores mais críticos e suas interações para a resposta LC (que são a quantidade de T-80, na faixa de 9,5 a 115,5 mg e tempo de sonicação, na faixa de 30 segundos a 24 min). Os dados foram analisados utilizando ANOVA e gráfico SR foi construído para identificar as condições ótimas para a variável dependente LC (**Figura 20**).

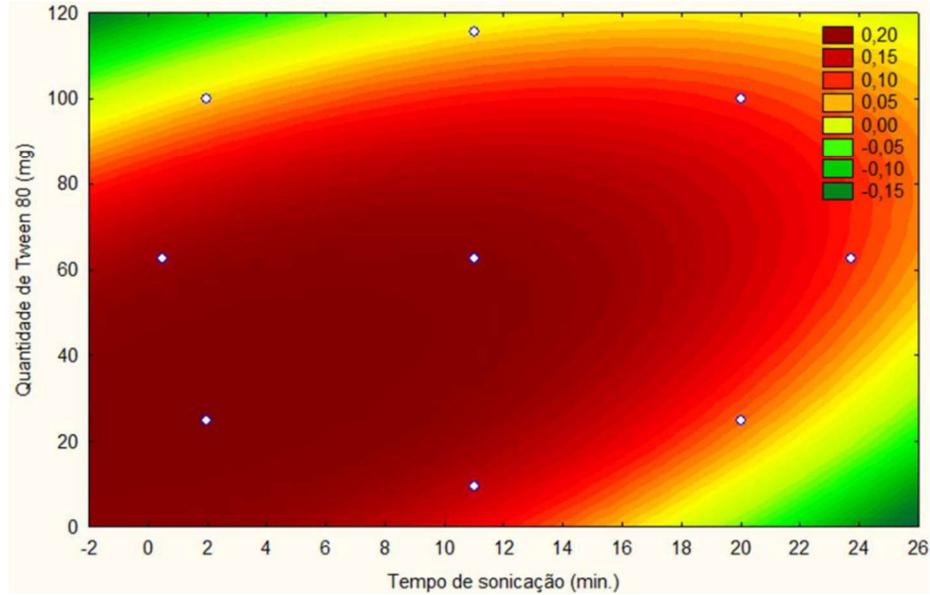


Figura 20. Gráfico de superfície de resposta para a resposta LC do *design* experimental para NLC-AZT.

Um modelo quadrático estatisticamente significativo, representando 84 % da variância ($r^2 = 0,84$), foi ajustado aos dados. Este modelo descreve a correlação entre os valores das respostas observadas e previstas. O modelo de regressão quadrática é dado pela equação abaixo:

$$LC = 0,21485 - 0,00313x - 0,00049x^2 + 0,00233y - 0,00004y^2 + 0,00017xy$$

Onde x e y são o tempo de sonicação e a quantidade de T-80, respectivamente.

A partir da análise da metodologia SR e sua função desejável, foram selecionados 2 min e 20 seg de tempo de sonicação e 31 mg de quantidade de Tween 80. Com estes valores prevê-se que se obtém um valor LC ótimo para a formulação desenvolvida NLC-AZT. As respostas tamanho de partícula e PDI também foram satisfatórias para estas condições selecionadas. O valor experimental da resposta LC para a formulação otimizada foi considerado em boa concordância com o valor previsto nos modelos (**Figura 21**).

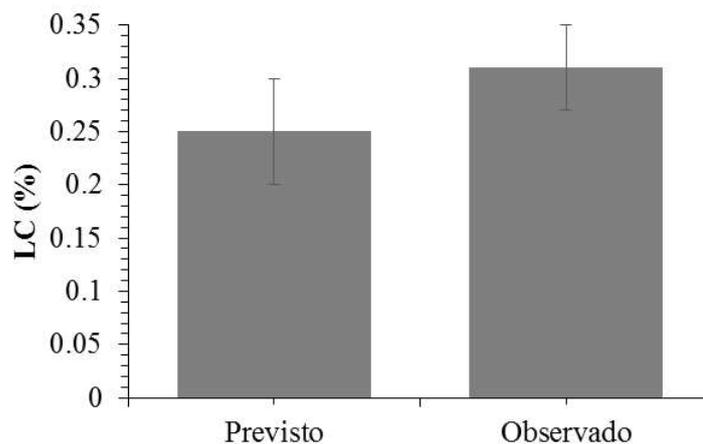


Figura 21. Porcentagens de capacidade de carregamento obtidas pelos modelos matemáticos e condições experimentais. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$).

Produção de NLC por método de microondas de única etapa

Alguns parâmetros foram previamente fixados em resultado dos estudos de pré-formulação e possibilitou a seleção de dois fatores críticos quantitativos e seus níveis mais baixo (-1) e superior (+1) que foram: quantidade de SL, na faixa de 63,3 a 86,7 mg e quantidade de Tween 80, de 79,3 a 220,7 mg. O *design* composto central foi realizado, resultando em 13 experimentos (com pontos axiais e replicação do ponto central), para analisar a influência e significância dos fatores selecionados e construir a SR. Foram realizadas experiências aleatórias, de acordo com a matriz de *design* apresentada na **Tabela 11**, considerando diferentes combinações dos fatores para cada experimento. Vale destacar que a quantidade de lipídios totais foi mantida a 100 mg ao longo do estudo.

Tabela 11. Níveis codificados e os valores reais das variáveis no *design* composto central do estudo da formulação M-NLC-AZT

Ensaio	Variáveis independentes	
	Quantidade Tween 80 (mg)	Quantidade de SL (mg)
1	-1 (100)	-1 (66,7)
2	-1 (100)	+1 (83,3)
3	+1 (200)	-1 (66,7)
4	+1 (200)	+1 (83,3)
5	$-\sqrt{2}$ (79,3)	0 (75)
6	$+\sqrt{2}$ (220,7)	0 (75)
7	0 (150)	$-\sqrt{2}$ (63,3)
8	0 (150)	$+\sqrt{2}$ (86,7)
9*	0 (150)	0 (75)
10*	0 (150)	0 (75)
11*	0 (150)	0 (75)
12*	0 (150)	0 (75)
13*	0 (150)	0 (75)

* Replicações do ponto central

Para as respostas LC e tamanho de partícula todos os fatores (quadrático e linear) e suas interações foram estatisticamente significativas. Enquanto que para a resposta PDI apenas os fatores quadráticos foram estatisticamente significativos, com 95 % de confiança. Os resultados podem ser vistos na **Figura 22** através do gráfico de Pareto e análise multivariada com valores de p calculados = 0,05.

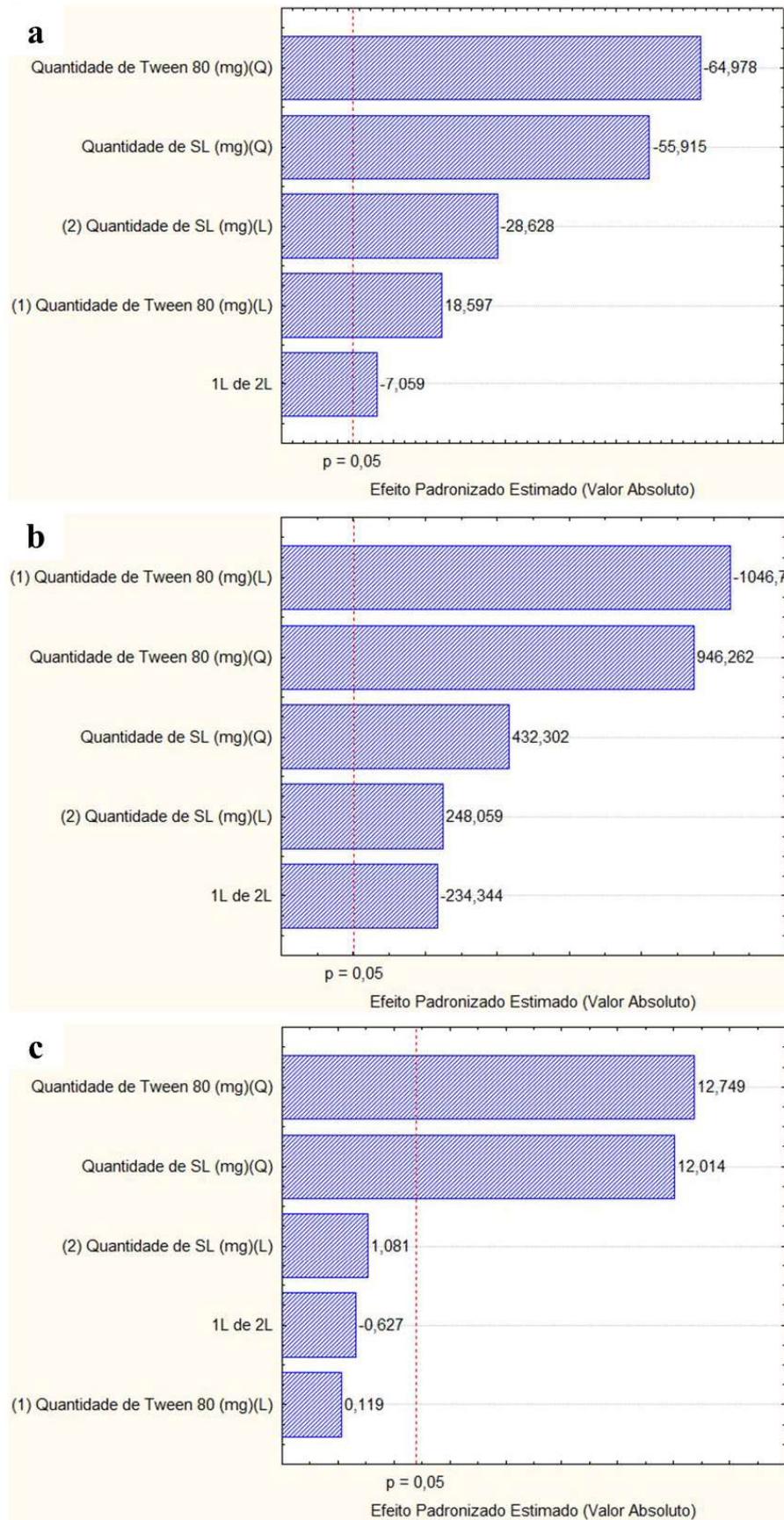


Figura 22. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas LC (a), Tamanho de Partícula (b) e PDI (c) para o *design* fatorial completo 2^3 de formulação estudo M-NLC-AZT.

A ANOVA foi utilizada para analisar a relevância dos modelos para cada resposta. Ao ajustar os dados experimentais foi possível plotar o gráfico SR para LC, tamanho de partícula e PDI e assim identificar as melhores condições na faixa avaliada neste estudo **Figura 23**.

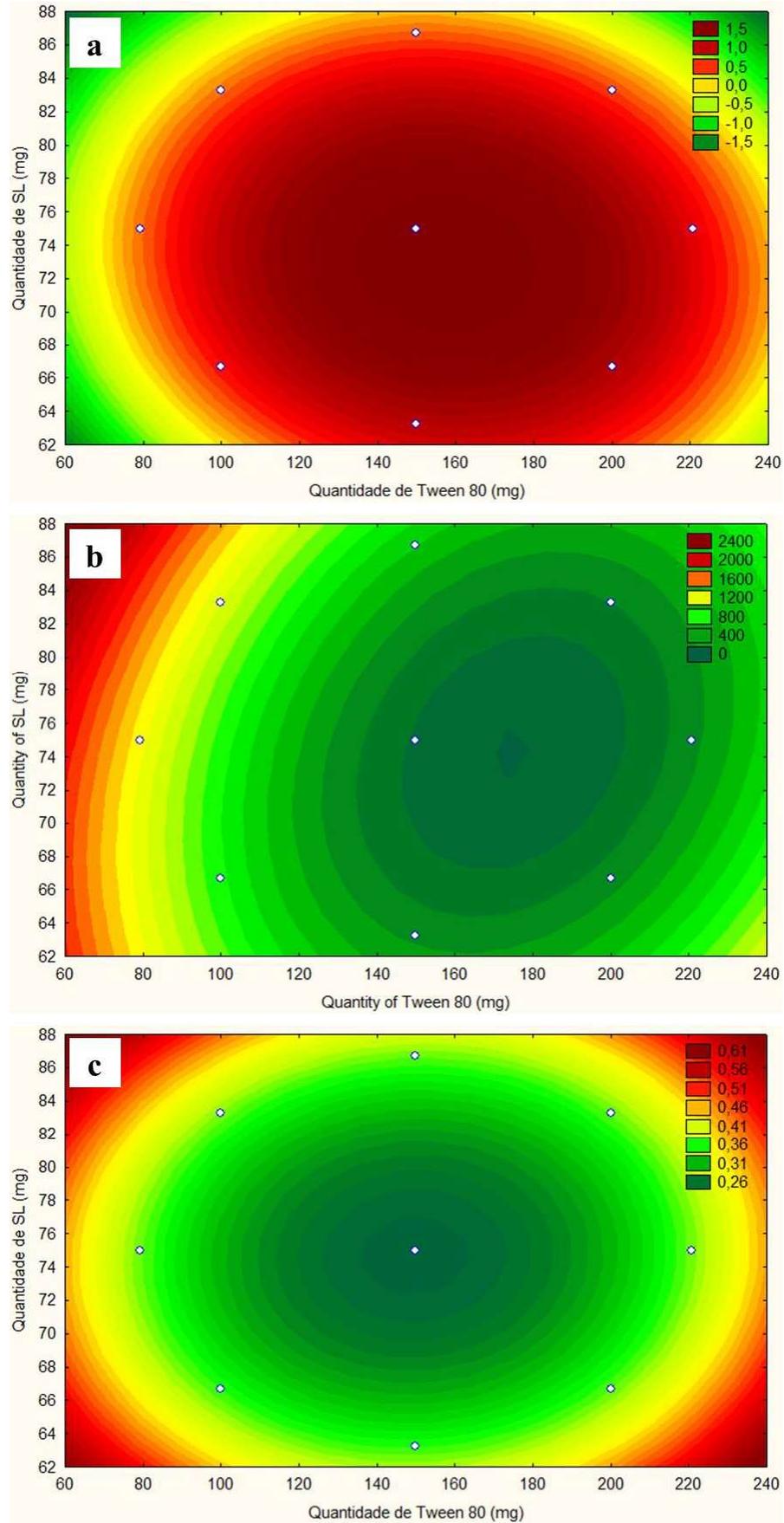


Figura 23. Gráfico de superfície de resposta para as respostas: LC (a), Tamanho de Partícula (b) e PDI (c) do estudo de formulação M-NLC-AZT.

Um modelo quadrático estatisticamente significativo (r^2), representando 95 % e 93 % da variância para as respostas LC e PDI, respectivamente, foi ajustado aos dados. Estes modelos descrevem a correlação entre os valores das respostas observadas e das respostas previstas. O modelo quadrático da resposta tamanho de partícula não foi considerada porque $r^2 < 0,8$, portanto a metodologia SR foi utilizada apenas como indicativo para otimização dessa resposta. O modelo de regressão quadrática obtido é descrito pelas equações abaixo:

$$LC = -45.91882 + 0.08973x - 0.00024x^2 + 1.11305y - 0.00741y^2 - 0,00021xy$$

Onde x e y são quantidade de Tween 80 e quantidade de SL, respectivamente.

$$PDI = 6.02791 - 0.00751x + 0.00003x^2 - 0.14017y + 0.00095y^2 - 0.00001xy$$

Onde x e y são quantidade de Tween 80 e quantidade de SL, respectivamente.

Os valores críticos das formulações otimizadas foram satisfeitos a partir da análise da metodologia SR e da sua função de desejabilidade que foram 158 mg de Tween 80 e 73 mg SL para resposta LC e 150 mg Tween 80 e 75 mg SL para resposta PDI. A resposta tamanho de partícula foi também satisfatória para estas condições selecionadas.

A partir da análise da metodologia SR, foi possível determinar as condições do processo para otimizar simultaneamente todas as respostas de interesse neste estudo, uma vez que os valores críticos para cada resposta foram semelhantes. Deste modo, a quantidade de Tween 80 foi fixada em 158 mg e a quantidade de SL em 75 mg (e 25 mg de lipídio líquido) para a formulação otimizada M-NLC-AZT. Os valores experimentais das respostas de LC e tamanho de partícula da formulação otimizada M-NLC-AZT foram analisadas e considerados de boa concordância com os valores preditos dos modelos (**Figura 24**).

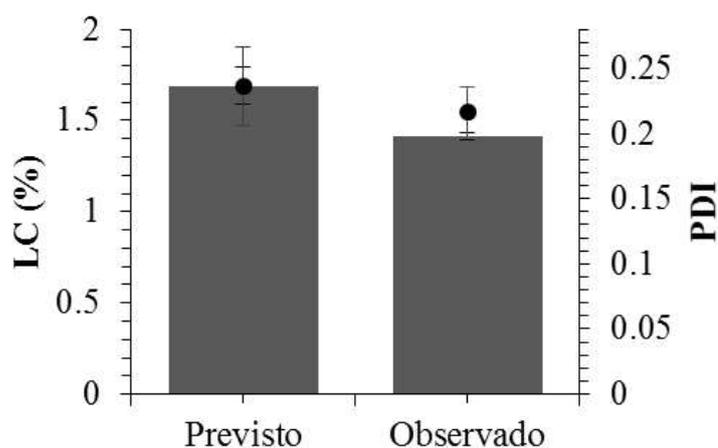


Figura 24. Validação dos valores experimentais da formulação M-NLC-AZT selecionada com os seus resultados previstos. ● PDI e ■ LC (%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Caracterização físico-química das formulações otimizadas

As formulações AZT finais otimizadas estão sumarizadas na **Tabela 12**.

Tabela 12. Parâmetros das formulações finais NLC-AZT e M-NLC-AZT, depois da otimização QbD.

Parâmetros	Formulações AZT selecionadas	
	NLC-AZT	M-NLC-AZT
Lipídio sólido	250 mg Precirol ato 5	75 mg Precirol ato 5
Lipídio líquido	50 mg Miglyol	25 mg Miglyol
Surfactante	31 mg Tween 80	158 mg Tween 80
Fármaco	2 mg AZT	15 mg AZT
Fase aquosa	12 mL	5 mL
Temperatura de produção	80 °C	90 °C
Tempo de sonicação ou de microondas	2 min e 20 s	10 min
Configurações do equipamento	Sonicador: 130 KHz a 50 %	Microondas: 300 W, 200 psi e agitação máxima
Resfriamento	TA	Choque térmico para 70 °C e então à TA

As características translúcidas esbranquiçadas e de baixa densidade das suspensões de NLC foram obtidas por ambos os métodos. As formulações foram caracterizadas em termos de tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta, LC e eficiência de encapsulamento (EE) (**Tabela 13**). Todas essas propriedades podem influenciar a estabilidade da formulação e também influenciar suas futuras interações com células e tecidos (SUSSMAN et al., 2008; SPERLING; PARAK, 2010).

Tabela 13. Tamanho de Partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE das formulações otimizadas de NLC da AZT.

Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)	LC (%)	EE (%)
NLC-P*	307 ± 2	0,206 ± 0,02	-34,7 ± 0,32	-	-
NLC-AZT	266 ± 4	0,168 ± 0,01	-29,3 ± 1,24	0,31 ± 0,04	44 ± 3
M-NLC-P*	85 ± 2	0,260 ± 0,01	-15 ± 2	-	-
M-NLC-AZT	113 ± 3	0,216 ± 0,01	-20,5 ± 0,9	1,41 ± 0,02	22 ± 2

Média ± desvio padrão (DP) (n = 3). * Formulações placebo.

O diâmetro médio das formulações está na faixa nanométrica, adequado para absorção oral, dérmica e gastrointestinal (RIEUX, DES et al., 2007). É descrito na literatura que, acima de 200 nm, as partículas são mais facilmente incorporado pelos macrófagos, os quais são, em conjunto com os linfócitos, células-alvo para a abordagem proposta (SCHÖLER et al., 2002; MARTINS et al., 2012). Em contraste, partículas com tamanho médio abaixo de 200 nm têm potencialmente mais tempo de circulação do que partículas maiores e do que partículas menores (< 20 - 30 nm, excreção renal) (MOGHIMI et al., 2001; GAUMET et al., 2008). De um modo geral, as nanopartículas com tamanho médio entre 50 e 250 nm são consideradas sistemas de liberação de fármacos promissores, uma vez que têm potencial para melhorar a terapia devido à sua capacidade para superar barreiras biológicas e liberar a droga incorporada em concentrações terapêuticas (ALEXIS et al., 2008). Para as formulações de NLC otimizadas os valores de PDI variam entre 0,168 ± 0,01 e 0,260 ± 0,01. Os valores de PDI abaixo de 0,3 são indicativos de diâmetros monodispersos e uniformes de populações de nanopartículas (BLOCK, 2010).

O potencial zeta é um fator chave na avaliação da estabilidade física das dispersões coloidais, uma vez que é uma função da carga superficial que dá a magnitude das interações eletrostáticas repulsivas entre as partículas (KOMATSU et al., 1995). A carga superficial de

NLC e NLC-AZT foi de $-34,7 \pm 0,32$ mV e $-29,3 \pm 1,24$ mV, respectivamente. Enquanto que para M-NLC e M-NLC-AZT foram -15 ± 2 mV e $-20,5 \pm 0,9$ mV, respectivamente.

Em geral, a agregação de partículas ou floculação é menor com um potencial zeta elevado $> |30|$ mV, embora cerca de $|20|$ mV é aceitável (MÜLLER et al., 2001; SOUTO et al., 2004; MISHRA et al., 2009) especialmente quando as partículas recebem uma estabilização estérica, como nestes casos com Tween 80 (MITRI et al., 2011). Devido à repulsão eletrostática entre NPs e a membrana celular, partículas carregadas negativamente podem reduzir a captação celular. Contudo, eles mostraram menos citotoxicidade do que as nanopartículas catiônicas normalmente associadas à ruptura da membrana celular e consequentemente morte celular (EKAMBARAM et al., 2012).

As formulações otimizadas exibiram tamanho de partícula satisfatório (NLC 100 a 300 nm), PDI abaixo 0,3 e potencial Zeta $> |20|$ e negativo. M-NLC-AZT obtida pela nova técnica, apresentou valor LC de aproximadamente 5 vezes maior que o NLC-AZT. Isto significa que a matriz lipídica formada pela nova técnica proporciona uma maior liberação de droga, um LC mais elevado. Ambas as formulações tinham baixa EE, provavelmente relacionada com o elevado valor da quantidade de AZT utilizada no desenvolvimento destas formulações, especialmente em M-NLC-AZT. A prioridade foi dada à otimização da resposta LC nos *design* experimentais e geralmente as respostas EE e LC foram inversamente proporcionais.

Os diferentes processos de produção e a proporção de constituintes afetaram todas as propriedades estudadas da NLC. Deste modo, relativamente aos dois métodos de microemulsão apresentados, um pode ser mais adequado do que o outro, dependendo das características do fármaco, via de administração e *design* do desenvolvimento da formulação.

Ensaio de liberação do AZT *In vitro*

A solubilidade do fármaco na matriz lipídica torna-se um fator de controle muito importante para a liberação do fármaco a partir da NLC (PINTO et al., 2014), uma vez que o fármaco é incorporado na matriz lipídica do sistema de nanopartículas quer em solução dissolvida ou dispersa (MÜLLER et al., 2002).

O perfil de liberação de AZT *in vitro* para o fármaco livre, NLC-AZT e M-NLC-AZT foi investigado em duas condições definidas para simular ambientes fisiológicos e gástricos. Os resultados mostram 52 % de liberação de AZT livre em 4 h de meio gástrico simulado e para o ambiente fisiológico simulado indicação de 98 % de liberação em apenas 4 h. Um incremento na liberação controlada, para cerca de 40 %, da AZT em meio gástrico simulado foi conseguido para ambas as formulações. Em ambiente fisiológico as formulações apresentaram um incremento ainda mais significativo na liberação controlada, > 30 h e 24 h para liberação de cerca de 100 % do fármaco em NLC-AZT e M-NLC-AZT, respectivamente (**Figura 25**). As formulações NLC exibiram a bem conhecida liberação de explosão nos primeiros tempos do estudo em ambiente fisiológico (cerca de 50 % em 5 h).

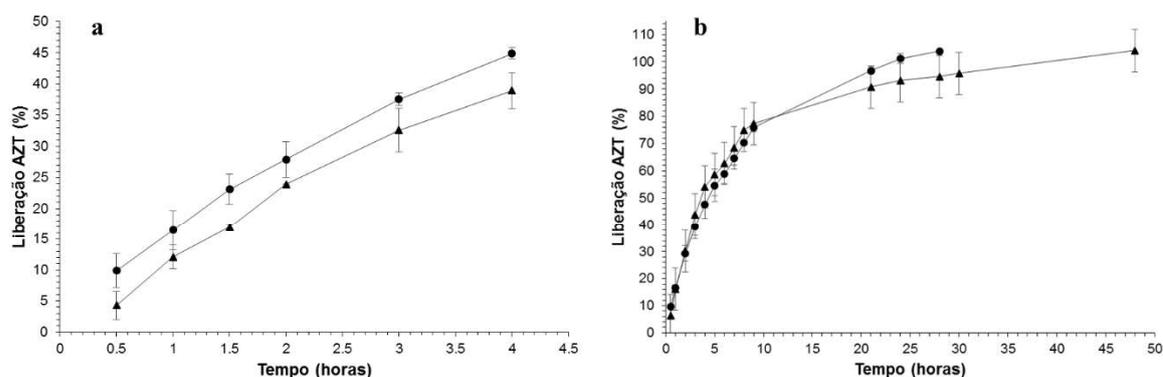


Figura 25. Perfil de liberação do AZT *in vitro* (NLC-AZT (▲) e M-NLC-AZT (●)). (a) simulando o ambiente gástrico e a temperatura corporal (pH 1,2 a 37 °C) e (b) simulando o ambiente fisiológico e a temperatura corporal (pH 7,4 a 37 °C). Os dados são a média e DP para n = 2.

Os resultados da liberação foram analisados utilizando modelos matemáticos para a cinética de liberação de fármaco. A liberação de AZT da NLC, nos dois métodos e nas condições estudadas, foi melhor ajustada ao modelo de Higuchi ($R^2 > 0,98$, **Figura 26**).

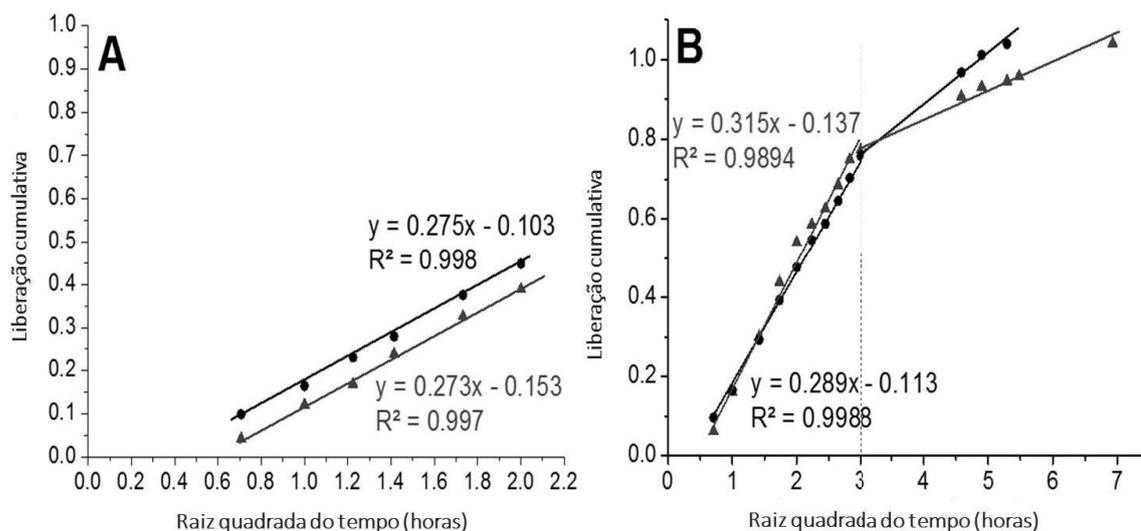


Figura 26. O modelo de Higuchi aplicado à liberação em ambiente gástrico simulado (pH 1,2) (A) e ambiente fisiológico (pH 7,4) (B). NLC-AZT é representado por ▲ e M-NLC-AZT por ●.

Deste modo, a liberação de AZT a partir de ambas as formulações é conduzida por difusão controlada. A inclinação de cada linearização corresponde às constantes de velocidade de liberação (K_H). Os valores de K_H são muito semelhantes entre os dois meios (pH 1,2 e 7,4), o que significa que a liberação de AZT não é dependente do pH. No pH 7,4, é possível ver que a liberação de AZT de ambas as formulações, segue dois regimes: um até 10 h e outro a partir desse momento. Embora o segundo regime também seja controlado por difusão, este é um processo muito mais lento, o que possivelmente corresponde à liberação de AZT que está mais perto do núcleo da NLC.

Morfologia

As imagens obtidas por TEM das formulações otimizadas de NLC revelaram uma forma esférica e permitiram verificar os resultados obtidos por DLS (**Figura 27**). Observou-se uma ligeira redução no tamanho das partículas quando se utilizou a técnica microscópica em relação aos dados do DLS, o que era esperado uma vez que o DLS mede o diâmetro hidrodinâmico e detecta flutuações nos sinais luminosos causados pelo movimento browniano das partículas para calcular o tamanho (MEHNERT; MÄDER, 2001).

Adicionalmente, a detecção do tamanho de partícula por DLS foi realizada em meio aquoso, o que significa que as partículas lipídicas são altamente hidratadas. Enquanto que durante a preparação de amostras para técnica TEM, tanto a água superficial como a água presente na matriz de nanopartículas são removidas por evaporação, o que leva a uma contração das partículas e, assim, determinando um tamanho ligeiramente inferior (DUBES et al., 2003).

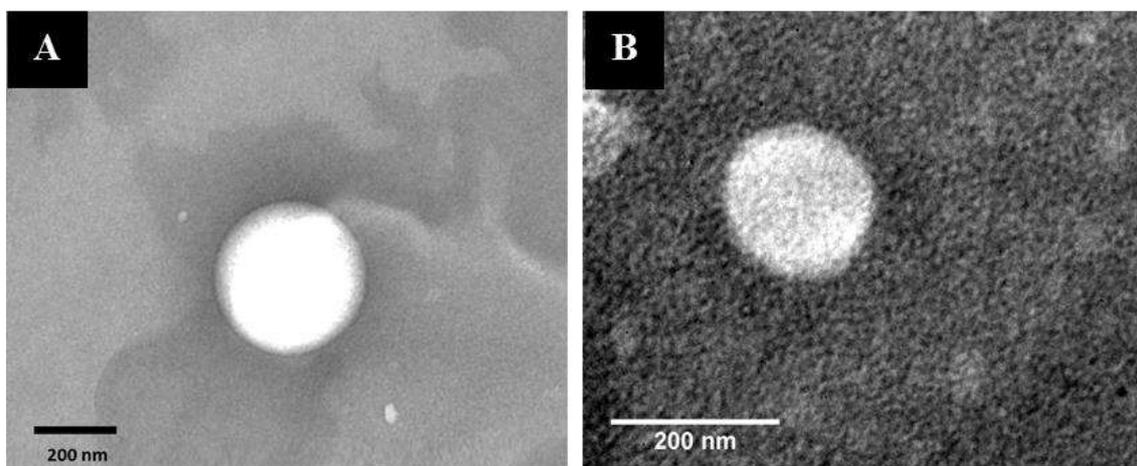


Figura 27. Imagens TEM de formulações de NPs: (A) NLC-AZT, amplificação: 25.000x; (B) M-NLC-AZT, amplificação: 100.000x

Estudos de estabilidade

A estabilidade física das formulações de NLC otimizadas, quanto ao tamanho de partícula, PDI e potencial zeta, mostram que as formulações foram capazes de manter suas propriedades até 45 dias quando armazenadas como suspensões aquosas a 4 °C e protegidas da luz (**Figura 28**).

Assim, as formulações de NLC-AZT mantiveram o tamanho entre 100 a 300 nm, PDI de até 0,3 e potencial Zeta $> |20|$ e negativo. Não se verificou qualquer alteração significativa em qualquer formulação para o mesmo período.

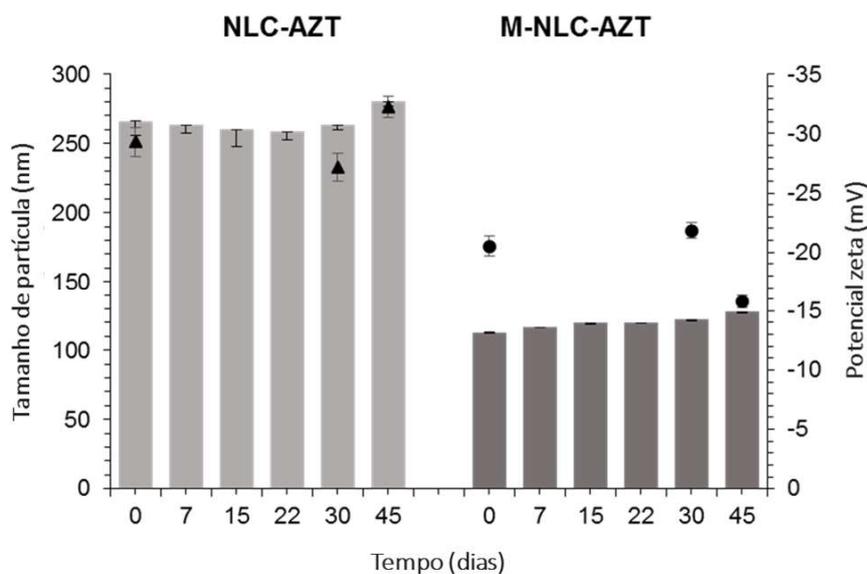


Figura 28. Estabilidade de armazenamento comparativa das formulações NLC-AZT e M-NLC-AZT no tempo máximo de 45 dias. As barras representam o tamanho das nanopartículas (à esquerda do eixo Y) e os marcadores do potencial zeta (à direita do eixo Y) no tempo zero e em 45 dias. Os valores são média de 3 resultados independentes e respectivo DP.

Estudos de citotoxicidade

A viabilidade das células Jurkat T foi estudada na presença de NLC-AZT, M-NLC-AZT e AZT livre. O placebo de NLC preparado pelas duas metodologias estudadas, numa concentração de 2 mg/mL, não diminuiu a viabilidade das células T Jurkat (**Figura 29**).

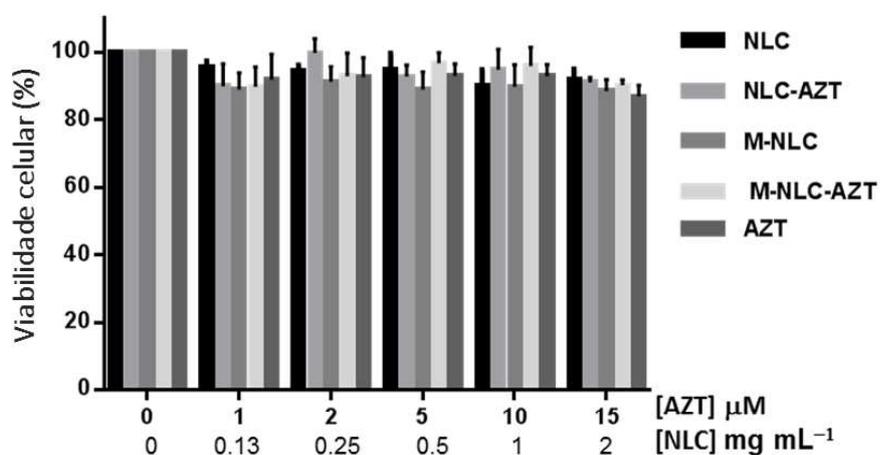


Figura 29. Viabilidade de células Jurkat T. Citotoxicidade *in vitro* de AZT livre, NLC-AZT e M-NLC-AZT e respectivos placebos, após 24 h de incubação. Dados expressos como média \pm DP (n = 3).

Também, a exposição de células Jurkat T a concentrações terapêuticas de AZT (1 a 10 μM) (FRANCKE et al., 2000) como solução livre ou incorporada em NLC (NLC-AZT e M-NLC-AZT) não induziu qualquer efeito significativo na viabilidade celular. Foi relatado que a toxicidade celular de AZT requer concentrações de 10 a 15 vezes mais elevadas, como observado anteriormente em HeLa, MT4 e células T humanas cells (CHIU; DUESBERG, 1995; LIOTARD et al., 2006). Ambas as metodologias produzem formulações de NLC-AZTs biocompatíveis com as células alvo de AZT no contexto da terapia de HIV.

CONCLUSÕES

Uma abordagem inovadora, em uma etapa, para o desenvolvimento de NLC por um método assistido por microondas é relatada neste trabalho. Embora tenha sido previamente utilizado o microondas na formulação de nanopartículas lipídicas, este é, até onde sabemos, o primeiro trabalho que relata sua aplicação para o desenvolvimento de NLC.

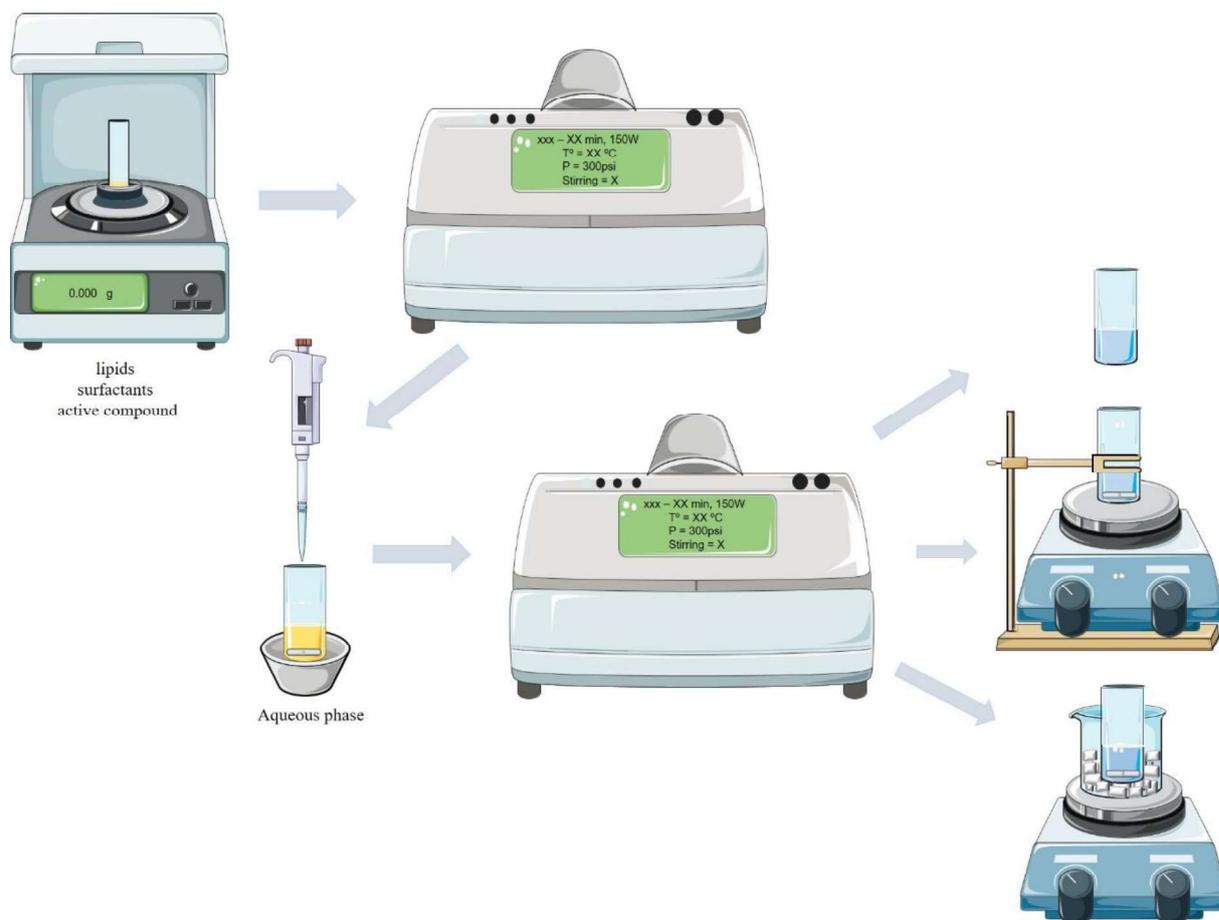
Além disso, este método modificado é menos demorado e permite uma mínima influência do operador, o que proporciona resultados reprodutíveis para cada síntese e permite o *scale-up*. A utilização de um único passo representa o valor agregado desta nova metodologia.

Foi confirmado que a substituição do processo de homogeneização a quente convencional seguido por ultrassom, por um único processo de aquecimento por microondas com temperatura controlada, produz NLC: com tamanhos de partícula menores, PDI equivalente, maior capacidade de carregamento; além da estabilidade física, biocompatibilidade em linfócitos Jurkat T e liberação controlada do fármaco estudado.

Adicionalmente, todos os processos foram otimizados de acordo com uma metodologia QbD que maximizou as características de ambas as formulações. A fim de validar completamente este novo método para o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos baseados em nanopartículas lipídicas, outras formulações com diferentes componentes e fármacos devem ser testadas.

Por fim, em relação à liberação de AZT, ambas as formulações otimizadas são adequadas para a sua administração oral e são consideradas seguras, o que as torna portadoras potenciais para a administração de AZT.

4.3. Artigo III - Carregador lipídico nanoestruturado com Nevirapina: uma síntese assistida por microondas usando abordagem *quality by design*



Será submetido a Nanotechnology

Artigo

Carregador lipídico nanoestruturado com Nevirapina: produção assistida por microondas usando abordagem *quality by design*.

INTRODUÇÃO

O tratamento padrão atual para as pessoas com o vírus da imunodeficiência (HIV) compreende a combinação de três ou mais drogas antirretrovirais tomadas diariamente para a vida, conhecido como Highly Active Antiretroviral Treatment (HAART). Apesar dos seus benefícios, o tratamento farmacológico é comprometido pelas suas propriedades físico-químicas inerentes, biodistribuição geral e diminuição da captação celular (CHATTOPADHYAY et al., 2008). Nesse contexto, muitas estratégias de entrega de drogas baseadas em nanotecnologia emergiram nos últimos anos (MAMO et al., 2010; GOMES et al., 2014). Particularmente, as nanopartículas lipídicas demonstraram ser bem sucedidas no aumento dos níveis de fármaco dos nódulos linfáticos e no prolongamento do tempo de residência no plasma de alguns fármacos antirretrovirais como o indinavir, lopinavir, ritonavir e tenofovir (KINMAN et al., 2003; FREELING et al., 2015). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver, avaliar e comparar as melhores condições experimentais de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), como potenciais sistemas de administração para o medicamento antirretroviral Nevirapina (NVP), produzido por dois métodos diferentes: homogeneização a quente convencional seguida de ultrasonicação (FERREIRA et al., 2015) e técnica de microondas (CAVALCANTI et al., 2016).

A NVP é um inibidor da transcriptase reversa não análogo a nucleosídeo (NNRTI), aplicado como agente antirretroviral como parte da terapia de primeira linha para tratar o HIV em pacientes adultos e pediátricos, isoladamente ou associado a outros fármacos anti-virais (PALELLA et al., 1998; HHS, 2014). A NVP é um fármaco de classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica - baixa solubilidade e elevada permeabilidade no

trato gastrointestinal (LINDENBERG et al., 2004) com solubilidade em água de 0,1 mg / mL (IARC, 2000; WHO, 2009) e log P 2,5 (THOMAS; PANCHAGNULA, 2003).

O fármaco NVP pode ser metabolizado e induzir mutagenicidade e hepatocarcinogenicidade, síndrome de Stevens-Johnson, erupção cutânea grave, eosinofilia, granulocitopenia, linfadenopatia e disfunção renal (POLLARD et al., 1998; ANTUNES et al., 2008). Algumas abordagens já foram utilizadas para resolver os problemas associados à baixa solubilidade e baixa biodisponibilidade da NVP e incluem micronização, solubilização com co-solventes, uso de intensificadores de permeação, soluções oleosas, dispersões de surfactantes, formação de sal e técnicas de precipitação (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008). Além disso, algumas formulações nanométricas já foram desenvolvidas e incluem nanosuspensões (SHEGOKAR et al., 2011; SHEGOKAR, R; SINGH, 2011; SHEGOKAR, RANJITA; SINGH, 2011; SHEGOKAR; SINGH, 2012), nanopartículas poliméricas (KUO et al., 2011) e SLN e NLC revestidos com albumina (KUO; CHUNG, 2011).

Este novo método de preparação de nanoemulsões, apresentado neste trabalho, utiliza apenas o reator de microondas para a obtenção de nanopartículas lipídicas (neste caso, NLC) e inclui algumas vantagens como ser *one-pot*, em uma ou duas etapas de síntese, rápido, prático, econômico, *eco-friendly* e seguro, além das possibilidades de scaling up, a não utilização de solventes orgânicos e a produção de partículas de pequeno diâmetro com um baixo índice de polidispersão (PDI), geralmente abaixo de 0,3 (LIPPACHER et al., 2001; MEHNERT; MÄDER, 2001; MUCHOW et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2016).

Uma vez que é um método muito recente, a formulação otimizada com os dois métodos foi desenvolvida e comparada em termos de características físico-químicas, estabilidade de armazenamento, perfil de liberação da NVP e seu efeito na viabilidade de células T Jurkat. A otimização de todas as formulações seguiu sistemática abordagem *quality by design*, QbD, que enfatiza a identificação, compreensão da influência e interação de parâmetros críticos (nomeados também de fatores ou variáveis independentes) de produtos e processos também alinhados com a Gestão de Risco, assim obtendo a quantidade máxima de informação a partir dos dados experimentais com o número menor de experimentos (ICH, 2005, 2009a; BARROS-NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, 2010; ARAUJO et al., 2010; SEVERINO; SANTANA; et al., 2012; RODRIGUES, MARIA ISABEL; LEMA; CÁRITA, 2014; KOVÁCS et al., 2016).

As respostas-chave ao longo do estudo foram tamanho médio de partícula, polidispersão e capacidade de carga, uma vez que podem condicionar a absorção de nanopartículas, toxicidade e eficácia terapêutica, respectivamente. Todo o projeto foi concebido com o objetivo de evitar o metabolismo hepático e reações adversas e melhorar a biodisponibilidade e eficácia da NVP.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

A nevirapina (mais de 101% de pureza) foi adquirida de Farmanguinhos (Rio de Janeiro, Brasil). Compritol® ATO 888 e Precirol® ATO 5 foram fornecidos por Gattefossé (Nanterre, França), ácido esteárico por Merck (Darmstadt, Alemanha), Miglyol®-812 de Acofarma (Madrid, Espanha) e ácido oleico de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O polissorbat 80 (Tween® 80) foi fornecido por Merck (Darmstadt, Alemanha). O tampão Hepes foi adquirido a partir de Sigma-Aldrich e a água desionizada dupla foi obtida por um processo de osmose inversa com uma condutividade inferior a 0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Milli-Q, Sartorius, Arium® pro, Sartorius Weighing Technology, Gettingen, Alemanha).

MÉTODOS

Planejamento experimental

Uma abordagem *Quality by Design* (QbD) foi desenvolvida para selecionar as condições para a produção otimizada de formulações NLC carregadas com NVP usando (i) homogeneização a quente seguida pelo método de ultrasonicação (NVP-NLC) e (ii) método de produção assistido por microondas (M-NLC-NVP) (**Figura 30**). *Brainstorms* e os

diagramas de Ishikawa foram estabelecidos para identificar e selecionar os parâmetros críticos envolvidos neste estudo (**Figura 31**).

A metodologia de *Design* de Experimentos (DOE) envolvendo o planejamento fatorial completo e fracionário foi aplicado a fatores críticos qualitativos e quantitativos. Para o planejamento experimental de NLC-NVP as variáveis independentes críticas selecionadas foram: lipídio sólido, lipídio líquido, quantidade de Tween 80 e tempo de sonicação. Para o delineamento experimental da M-NLC-NVP, as variáveis independentes quantitativas foram: lipídio sólido, lipídio líquido e processo de produção (em um ou duas etapas produtivas). Os níveis inferiores (-1) e superiores (+1) de cada parâmetro crítico selecionado foram escolhidos com base nos estudos de pré-formulação. Todas as outras variáveis foram fixadas. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

As variáveis dependentes escolhidas do experimento foram: tamanho médio de partícula (restrição: 50 a 400 nm), índice de polidispersão (restrição: minimizar até 0,3) e capacidade de carga (restrição: maximizar). O software Statistica 8.0 (Statsoft®, Inc.) foi empregado para fazer o design da matriz experimental, todas análises estatísticas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA com nível de confiança de 95 % (p-valores < 0,05).

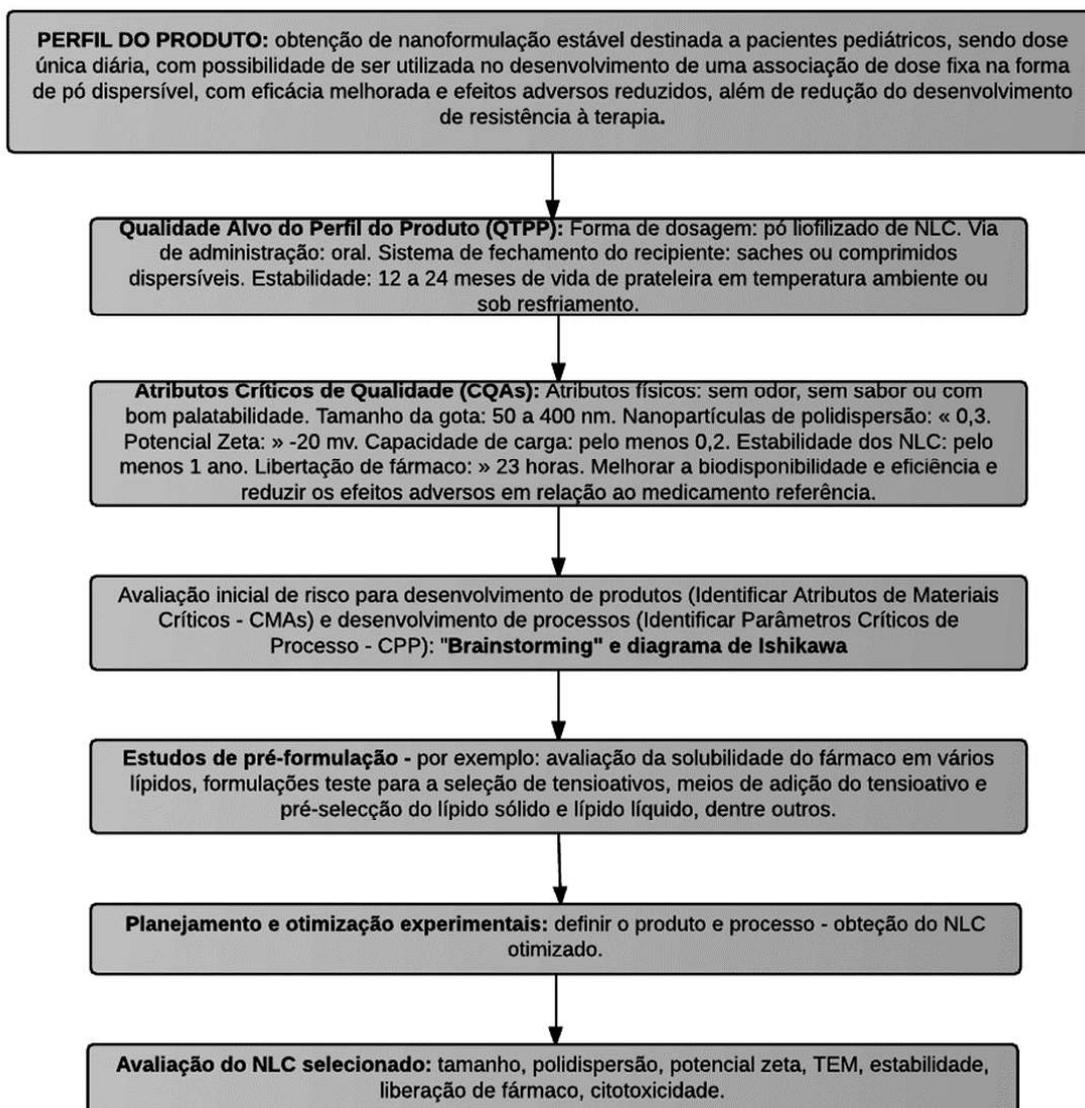


Figura 30. Abordagem QbD para o desenvolvimento das nanoformulações da NVP.

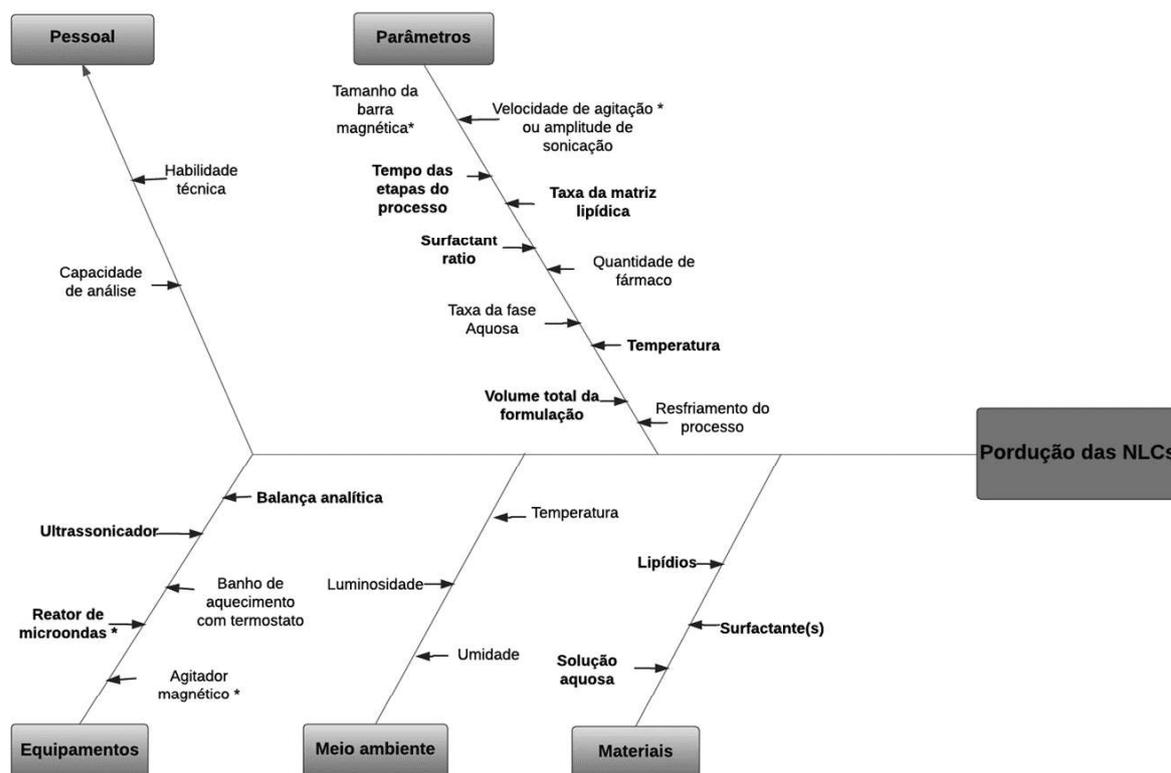


Figura 31. Diagrama de Ishikawa de parâmetros críticos tanto para a homogeneização a quente seguida de ultrasonicação como para a nova técnica assistida por microondas. *Esses parâmetros são apenas aplicados a nova técnica por microondas.

Preparação de NLC

NLC foram preparados por duas técnicas de produção diferentes: um método convencional baseado na homogeneização a quente seguida de um método de ultrasonicação e um novo procedimento produtivo assistido por microondas.

Homogeneização a quente seguido por método de ultrasonicação

A fase lipídica constituída pelo lipídio sólido Precirol® ATO 5 ou ácido esteárico, o lipídio líquido Miglyol®-812 ou ácido oleico, o estabilizador Tween® 80 (T-80) e, opcionalmente, o fármaco NVP foram fundidos a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase lipídica (a 80 °C). Em seguida, a fase lipídica derretida foi dispersa em fase aquosa previamente aquecida a 80 °C (tampão Hepes ajustado com NaOH 1 M pH 8,7) e foi

homogeneizada com um sonicador tipo sonda (modelo VCX130 com CV-18, Sonics & Materials, Newtown, CT, EUA) (FERREIRA et al., 2015) durante 2 a 20 min com uma amplitude de frequência de 80 %, 130 KHz, para se obter uma nanoemulsão. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente, permitindo que a fase oleosa interior se solidificasse formando NLC disperso na fase aquosa.

Método de produção assistido por microondas

Um método de produção assistido por microondas (CAVALCANTI et al., 2016) foi aplicado nesta pesquisa, com duas variações comparativas: única etapa e duas etapas produtivas. Ambos são do tipo *one-pot*.

Processo de produção *one-pot* em duas etapas: Os componentes, Compritol® ATO 888 ou Precirol® ATO 5, Miglyol®-812 ou ácido oleico, T80 e, opcionalmente, o fármaco NVP foram colocados num tubo de vidro de borossilicato (volume 35 mL) e aquecido a 90 °C durante 10 min com agitação constante (cerca de 900 rpm) num reator de microondas (CEM Discover SP®, 2,45 GHz, 0-300 W, tecnologia ActiVent™, sistema de arrefecimento ativo PowerMAX™ com gás comprimido N₂ e operado por um Computador usando o software Synergy™). Em seguida, adicionou-se tampão Hepes pH 8,7 ao mesmo recipiente de vidro de borossilicato e foi novamente aquecido a 90 °C durante 10 min com agitação constante (cerca de 900 rpm) no reator de microondas (**Figura 32**).

Processo de produção *one-pot* em uma etapa: Todos os componentes, Compritol® ATO 888 ou Precirol® ATO 5, Miglyol®-812 ou ácido oleico, T80, tampão Hepes pH 8,7 e, opcionalmente, o fármaco NVP foram colocados no tubo de vidro de borossilicato (volume 35 mL) e aquecido a 120 °C durante 20 min com agitação constante (cerca de 900 rpm) no reator de microondas (**Figura 33**).

A formulação obtida por ambas as metodologias foi rapidamente arrefecida a 70 °C pelo sistema do reator de microondas e depois deixada a arrefecer à temperatura ambiente, permitindo que a fase oleosa interna se solidificasse formando NLC dispersas na fase aquosa.

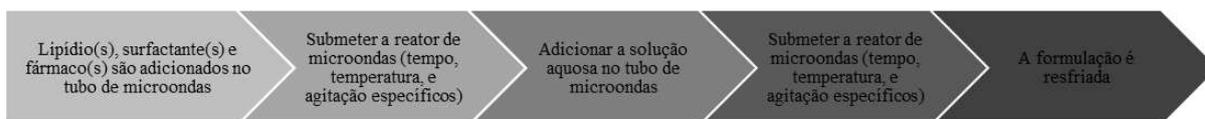


Figura 32. Fluxograma do método de produção assistido por microondas: *one-pot* em duas etapas.

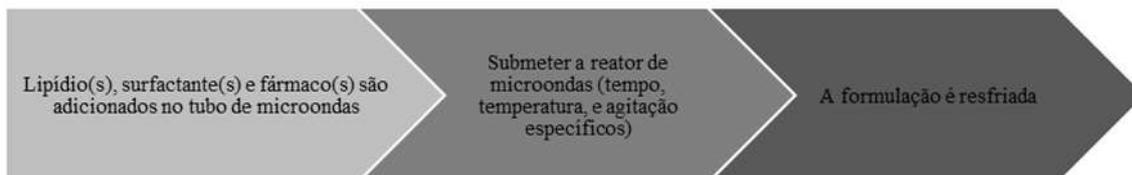


Figura 33. Fluxograma do método de produção assistido por microondas: *one-pot* em única etapa.

Determinação do tamanho médio das partículas e do índice de polidispersão (PDI)

A análise do tamanho de partícula foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando um analisador de tamanho de partícula (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA) a 25 °C e com um ângulo de incidência de luz fixa de 90 °. Antes das medições, todas as amostras foram diluídas (1:200) utilizando água deionizada dupla para atingir a intensidade de dispersão apropriada (Kcps 300-500). O diâmetro hidrodinâmico médio (média Z) e o PDI foram determinados como uma medida da largura da distribuição de tamanho de partícula e foram obtidos calculando a média de dez corridas.

Medições de potencial zeta

O potencial zeta foi avaliado por medição da mobilidade electroforética utilizando um analisador de potencial zeta (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). As amostras diluídas (1:200 com água deionizada dupla) e analisadas a 25 °C. O valor potencial zeta de uma amostra foi determinado pela média de seis corridas (cada uma com dez ciclos).

Morfologia por microscopia eletrônica de transmissão

Utilizou-se microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para determinar a morfologia das formulações NVP-NLC otimizadas. As amostras foram preparadas colocando 10 µL de suspensões de NLC previamente diluídas (100 x) numa grelha de malha de cobre e deixadas em repouso durante 1 a 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso foi removido com papel de filtro e 10 µL de solução de acetato de uranilo a 1 % (p / v) foi colocada na grelha durante 30 segundos. Após a remoção do excesso de agente de contraste, as amostras foram observadas num JEM-1400 Transmission Electron Microscope (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) com uma tensão de aceleração de 80 kV.

Capacidade de carregamento (LC) e eficiência de encapsulamento (EE)

A quantidade de NVP carregada dentro das nanopartículas lipídicas foi determinada utilizando um método indireto. As suspensões de NLC foram diluídas 200x e filtradas com Amicon® filtros ultra centrífugas Ultracell-50 kDa (EMD Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 3400 xg durante 15 min, 18 °C utilizando uma centrífuga Heraeus™ Multifuge™ X1R (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O sobrenadante foi recolhido para quantificação de NVP a 283 nm de comprimento de onda (um dos picos de absorção de NVP) em solução aquosa (tampão Herpes pH 8,7), num Espectrofotómetro V-660 UV / Vis (Jasco Inc., Easton, MD, EUA). Foi utilizada uma curva de calibração de NVP em solução aquosa (tampão Herpes pH 8,7) para determinar a sua concentração.

LC é a quantidade de NVP encapsulada em comparação com a quantidade de fase lipídica (aqui foi considerado lipídios e surfactante), enquanto que EE refere-se à quantidade de NVP encapsulada em comparação com a quantidade de droga adicionada.

A capacidade de carregamento (LC) foi calculada da seguinte forma:

$$LC (\%) = \frac{(\text{quantidade total de fármaco} - \text{fármaco não encapsulado})}{\text{quantidade total de excipientes}} \times 100$$

A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada como:

$$EE (\%) = \frac{(\text{quantidade total de fármaco} - \text{fármaco não encapsulado})}{\text{quantidade total de fármaco}} \times 100$$

Medição da liberação de fármaco *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando uma técnica de difusão de saco de diálise de celulose (Float-a-Lyzer®G2, SpectrumLaboratories, Inc., CA, EUA, Alemanha) cheia com 1,5 mL das formulações de NLC de Nevirapina otimizadas. Para imitar o percurso das partículas no corpo após administração oral, as amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação gentil (placa de agitação quente IKA®-Werke RT15-P, Alemanha). Para simular o trânsito do estômago para o intestino, as amostras foram incubadas primeiro durante 4 h em 76 mL de fluido gástrico simulado (solução de HCl, pH 1,2) e depois colocadas em 76 mL de fluido fisiológico (uma solução tampão contendo dihidrogenofosfato de potássio, pH 7,4, como descrito na United States Pharmacopeia, USP-NP 26) até ao final da experiência (USP, 2008). Em intervalos de tempo regulares, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e o mesmo volume de tampão fresco foi substituído para manter as condições *sink*. A liberação de NVP foi quantificada por espectroscopia UV / Vis a 200-500 nm.

Os resultados foram os valores médios de duas repetições e a quantidade de fármaco nas amostras foi determinada por curvas de calibração obtidas com as mesmas condições experimentais. Os modelos matemáticos para avaliação da cinética de liberação de fármaco: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Peppas-Korsmeyer e Hixon-Crowell foram ajustados aos dados experimentais (BARZEGAR-JALALI et al., 2008). O coeficiente de regressão (R^2) foi calculado para determinar o modelo de melhor ajuste.

Estudo de estabilidade

Para avaliar a estabilidade física de NLC de Nevirapina otimizados, realizou-se um breve estudo a 4 °C por um período de 30 dias de armazenamento. Os indicadores de estabilidade de armazenamento foram: tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta e LC.

Estudos celulares

Os linfócitos humanos T, células Jurkat T, foram cultivados em RPMI 1640 (GIBCO, Paisley, UK) suplementado com 10 % de soro de bovino fetal inativado pelo calor, 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂. As células de Jurkat T foram plaqueadas em placas de 96 poços a 105 células por poço e foram tratadas com até 2,0 mg/mL de NLC, em concentração de lipídios, durante 24 h. As células foram expostas a NVP e a formulações NLC-NVP durante 24 h e a viabilidade foi avaliada através do ensaio de metiltiazol tetrazólio (MTT). Para as células não tratadas e tratadas com NVP, adicionaram-se 10 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL e incubou-se ainda durante 3 horas a 37 °C. Parou-se a reação utilizando 100 µL de SDS a 10 % durante 16 h. O crescimento celular foi avaliado por medição da absorbância a 545 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplaca (Synergy™ HT, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos como a percentagem da atividade metabólica das células tratadas relativamente às células não tratadas, e todas as experiências foram realizadas em quadruplicado. O software GraphPad Prism (versão 6, GraphPad Software, EUA) foi utilizado para a análise estatística dos resultados usando o teste t de Student (não pareado) e o teste de ANOVA unidirecional. Todos os demais resultados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatísticas significativas quando $p < 0,05$ (nível de confiança de 95 %).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudos preliminares

Para verificar a integridade do NVP, o fármaco em água desionizada dupla foi exposto a ultrasonicação ou energia de microondas. A avaliação por espectroscopia UV/Vis mostrou espectros idênticos e em quantidade de NVP equivalente às amostras antes do teste de energia, não se observando, portanto, qualquer evidência de degradação.

Foi feito um estudo de solubilidade da NVP em vários lipídios sólidos (SL) e lipídios líquidos (LL) para selecionar os lipídios para as formulações NLC (**Tabela 14**). Precitol® ATO 5, ácido esteárico, Compritol® ATO 888 e superpolistrato foram pré-selecionados como SL, e o ácido oleico e Miglyol® foram os LL escolhidos.

A mistura (NVP mais um lipídio) foi submetida a aquecimento até à fusão completa do lipídio, então permaneceu por mais 2 minutos e misturada manualmente. Em seguida, uma avaliação visual da solubilidade do fármaco no lipídio foi realizada imediatamente. A quantidade de NVP foi padronizada em 2 mg, pois é a quantidade média em que a saturação foi evidente na fase lipídica (LP) e no processo de produção a NVP foi adicionada nesta fase.

Tabela 14. Estudo de solubilidade da NVP em vários lipídios

Lipídios	Resultados	Metodologia
Ácido esteárico	solúvel	1:100 NVP:Lipídio
Precitol® ato 5	solúvel	
Cetyl Palmitate Pellets	não solúvel	
Dynasan® 116	não solúvel	
Apifil®	não solúvel	
Witepsol® E 76	não solúvel	
Witepsol® S 58	não solúvel	
Witepsol® 551	não solúvel	
Softisan® 100	não solúvel	
Compritol® 888 ato	solúvel	
Superpolystrate	solúvel	
Miglyol® 812	não solúvel	
Ácido oleico	solúvel	

Adicionalmente, foram investigados diferentes surfactantes (Tween® 60 e Tween® 80), ambos surfactantes estéricos com baixa toxicidade e amplamente utilizados, na fase

aquosa (AP) e na fase lipídica (LP). O Tween® 80 (T-80) adicionado em LP durante a preparação entregou os melhores resultados de LC, sendo selecionado para a preparação das NLC.

Para a homogeneização a quente seguida pelo método de ultrasonicação, foi selecionada a razão SL: LL, 5: 1 (300 mg de lipídio total). A AP (14 mL) foi 46 vezes (p/p) maior que os lipídios totais para evitar alta densidade, particularmente com precitol® ATO 5. Para os outros SL, o AP foi suficiente em 23 vezes (p/p) maior do que os lipídios totais e foi então estabelecida para 7 mL de AP. A amplitude da ultrasonicação foi fixada em 80 % de 130 KHz. No final da produção de NLC-NVP o pH de AP foi ajustado com NaOH 1 M para pH 8,7, porque foram testados diferentes pH (5,5, 6,7, 7,7 e 8,7) e a resposta de LC foi melhorada com pH 8,7. Provavelmente a este pH a NVP estaria predominantemente na forma molecular com afinidade aumentada para a matriz lipídica, uma vez que pKa 2,8 (SANGANWAR et al., 2010).

Para o método assistido por microondas foi selecionado para planejamento fatorial os SL: Precitol® ATO 5 e Compritol® ATO 888. A razão 1:50 (100 mg LP: 5 mg ou mL AP) foi testada e selecionada. Adicionalmente, foi estabelecida a relação 3:1 (75 mg SL: 25 mg LL) e razão 1:1,5 (100 mg LP: 150 mg T-80) com base nas respostas de tamanho de partícula, PDI e LC. Outros parâmetros do processo produtivo foram também avaliados: tempo e temperatura da metodologia de uma e duas etapas, arrefecimento da formulação (a 70°C em sistema de microondas e conclusão do arrefecimento à temperatura ambiente), a força da agitação (cerca de 900 rpm), o tamanho da barra magnética, o recipiente de microondas selecionado (35 mL) e o volume total da formulação. Alguns desses parâmetros foram fixados com base no *know-how* adquirido anteriormente no desenvolvimento deste método produtivo (CAVALCANTI et al., 2016).

Design Experimental para produção de NLC

As investigações foram conduzidas para estabelecer as condições que proporcionaram um tamanho de NLC de 50 - 400 nm, o valor PDI mais baixo e o LC máximo.

Produção de NLC por homogeneização a quente seguido por método de ultrasonicação

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário de 2_{IV}^{4-1} , o que possibilitou a avaliação simultânea de quatro fatores críticos entre o intervalo estudado (níveis inferiores e superiores). Oito experimentos randomizados foram realizados considerando as diferentes combinações de dois fatores qualitativos e dois quantitativos e seus níveis: SL (ácido esteárico e Precirol® ATO 5), LL (Miglyol® 812 e ácido oleico), quantidade de T-80 (50 e 75 mg), tempo de sonicação (10 e 20 min) (**Tabela 14**). O volume de AP foi "bloqueado" em 14 mL para ensaios com precirol® ATO 5 e 7 mL para ensaios com ácido esteárico.

Tabela 15. Níveis codificados e os valores reais das variáveis independentes no planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} do estudo da formulação NLC-NVP.

Ensaio	Variáveis independentes			
	Lipídio sólido	Lipídio líquido	Quantidade de T-80 (mg)	Tempo de sonicação (min)
1	-1 (Precirol)	-1 (Miglyol)	-1 (50)	+1 (20)
2	+1(ác. esteárico)	-1 (Miglyol)	-1 (50)	-1 (10)
3	-1 (Precirol)	+1 (ác. oléico)	-1 (50)	+1 (20)
4	+1(ác. esteárico)	+1 (ác. oléico)	-1 (50)	-1 (10)
5	-1 (Precirol)	-1 (Miglyol)	+1 (75)	-1 (10)
6	+1(ác. esteárico)	-1 (Miglyol)	+1 (75)	+1(20)
7	-1 (Precirol)	+1 (ác. oléico)	+1 (75)	-1 (10)
8	+1(ác. esteárico)	+1 (ác. oléico)	+1 (75)	+1 (20)

Os dados do design experimental fornecem os efeitos individuais e de interação de cada fator para cada resposta e aqui estão demonstrados nos gráficos de Pareto (**Figura 34**). Análise multivariada e os gráficos de Pareto revelaram que os fatores qualitativos SL e LL foram os fatores mais significativos na resposta LC. O melhor resultado LC foi obtido com o Precirol® ATO 5 como SL, equivalente ao nível inferior (-1), e o LL foi o ácido oleico, equivalente ao nível mais alto (+1). Para a resposta tamanho de partícula somente o fator LL teve um impacto significativo, indicando o Miglyol® 812 (nível -1) como a melhor opção para minimizar esta resposta. No caso da resposta PDI, o fator SL foi o único com

significância estatística e indicou ácido esteárico como fator que minimiza essa resposta. No entanto, nem sempre a melhor condição para a otimização de uma resposta de interesse será a mesma condição de otimização para outras respostas.

Assim, a resposta LC foi selecionada como resposta prioritária e, conseqüentemente, o Precirol® ATO 5 como SL e o ácido oleico como LL foram selecionados. Os efeitos individuais dos fatores tempo de sonicação e quantidade de T-80 não foram estatisticamente significativos para qualquer resposta (tamanho de partícula, PDI ou LC). Portanto, esses fatores foram ajustados em nível inferior para T-80 (50 mg) e nível superior (20 min) para o tempo de sonicação, uma vez que levam ao melhor resultado LC.

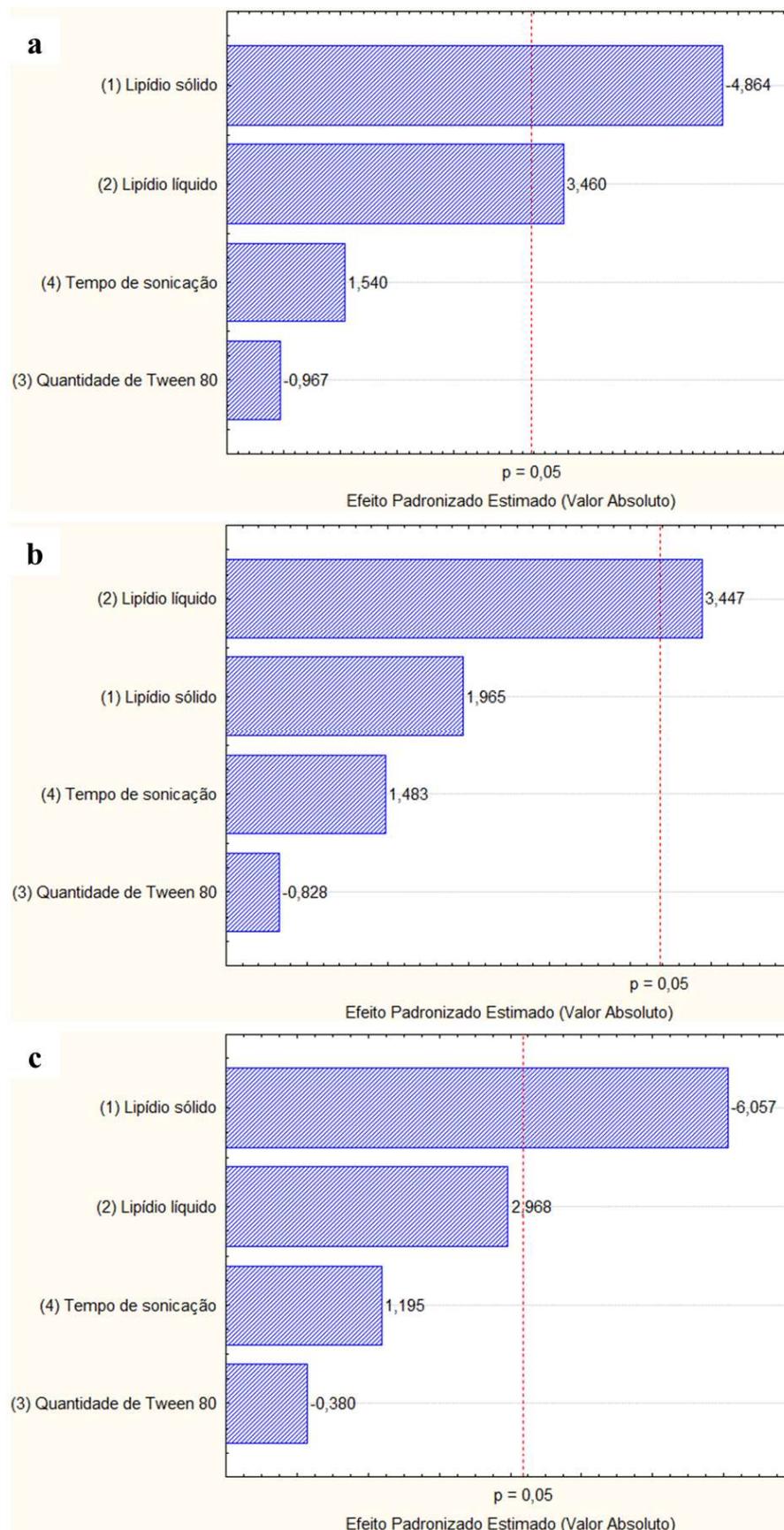


Figura 34. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas (a) LC, (b) tamanho de partícula e (c) PDI do planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} do estudo da formulação NLC-NVP.

O ajuste do pH da AP para pH 8,7 resultou em uma melhora para todas as respostas de interesse, com Precirol® ATO 5 como SL. No caso do ácido esteárico como SL não é possível trabalhar com pH básico, uma vez que é incompatível com este SL devido ao seu pKa (RAYMOND C ROWE et al., 2009). Por conseguinte, para produzir NLC-NVP utilizando homogeneização a quente seguido de ultrasonicação, a formulação selecionada foi composta por uma razão SL: LL de 5: 1 (250 mg de Precirol® ATO 5 e 50 mg de ácido oleico), com 20 min de sonicação a 80 % de amplitude; na presença de 50 mg de T-80, 2 mg de NVP adicionado na LP e 14 mL de AP pH 8,7 (tampão Hepes).

Método de produção assistido por microondas

Como resultado dos estudos de pré-formulação foi possível fixar alguns parâmetros e selecionar três fatores críticos qualitativos e seus intervalos (níveis -1 e +1) como: SL (Compritol® ATO 888 e Precirol® ATO 5), LL (Miglyol® 812 e ácido oleico) e o processo de produção de *one-pot* (em uma ou duas etapas). É digno de nota que o processo de produção em "etapa única" foi conduzido a 120 °C durante 20 min, enquanto que o processo em "duas etapas" foi a 90 °C durante 10 min seguido por outro passo de 90 °C durante 10 min, como descrito na sessão de métodos (**Figura 32** e **Figura 33**).

Inicialmente, foi aplicado um planejamento fatorial completo 2³, para permitir a análise simultânea de influência e significância de fatores selecionados, em suas faixas para as respostas de interesse deste estudo (tamanho de partícula, PDI e LC). Assim, oito experimentos randomizados foram realizados, de acordo com a matriz de experimentos apresentada na (**Tabela 16**).

Tabela 16. Níveis codificados e os valores reais das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2³ do estudo da formulação de M-NLC-NVP.

Ensaio	Variáveis independentes		
	Lipídio sólido	Lipídio líquido	Processo produtivo
1	-1 (Compritol)	-1 (Miglyol)	-1 (uma etapa)
2	+1 (Precirol)	-1 (Miglyol)	-1 (uma etapa)
3	-1 (Compritol)	+1 (ác. oléico)	-1 (uma etapa)
4	+1 (Precirol)	+1 (ác. oléico)	-1 (uma etapa)
5	-1 (Compritol)	-1 (Miglyol)	+1 (duas etapas)
6	+1 (Precirol)	-1 (Miglyol)	+1 (duas etapas)
7	-1 (Compritol)	+1 (ác. oléico)	+1 (duas etapas)
8	+1 (Precirol)	+1 (ác. oléico)	+1 (duas etapas)

Com base nos gráficos de Pareto e análise multivariada foi possível observar que os fatores LL e SL foram estatisticamente significativos para a resposta PDI, indicando que para minimizar o PDI o LL Miglyol® 812 e o SL Compritol® 888 ATO foram as melhores opções. Para a resposta tamanho de partícula, somente o fator LL foi significativo, com partículas menores que 400 nm quando LL estava no nível inferior (-1) (**Figura 35**). Em resumo, o SL e o LL foram definidos como Compritol® 888 ATO e Miglyol® 812, respectivamente. Para a resposta LC, utilizando os resultados que deram respostas aceitáveis de tamanho de partícula e PDI, foi possível identificar o processo de produção em duas etapas como o mais adequado para as respostas de interesse nesse estudo. Assim, para produzir M-NLC-NVP utilizando o método de produção assistido por microondas, a formulação selecionada deve ter uma relação SL:LL de 3:1 (75 mg de Compritol® 888 ATO e 25 mg de Miglyol® 812), utilizando o processo de produção *one-pot* em duas etapas (cada etapa a 90 °C durante 10 minutos com agitação magnética elevada - de cerca de 900 rpm), incluindo 150 mg de tensoativo T-80, 2 mg de NVP adicionada em LP (na primeira etapa do processo produtivo) e 5 mL de AP pH 8,7 (tampão Hepes).

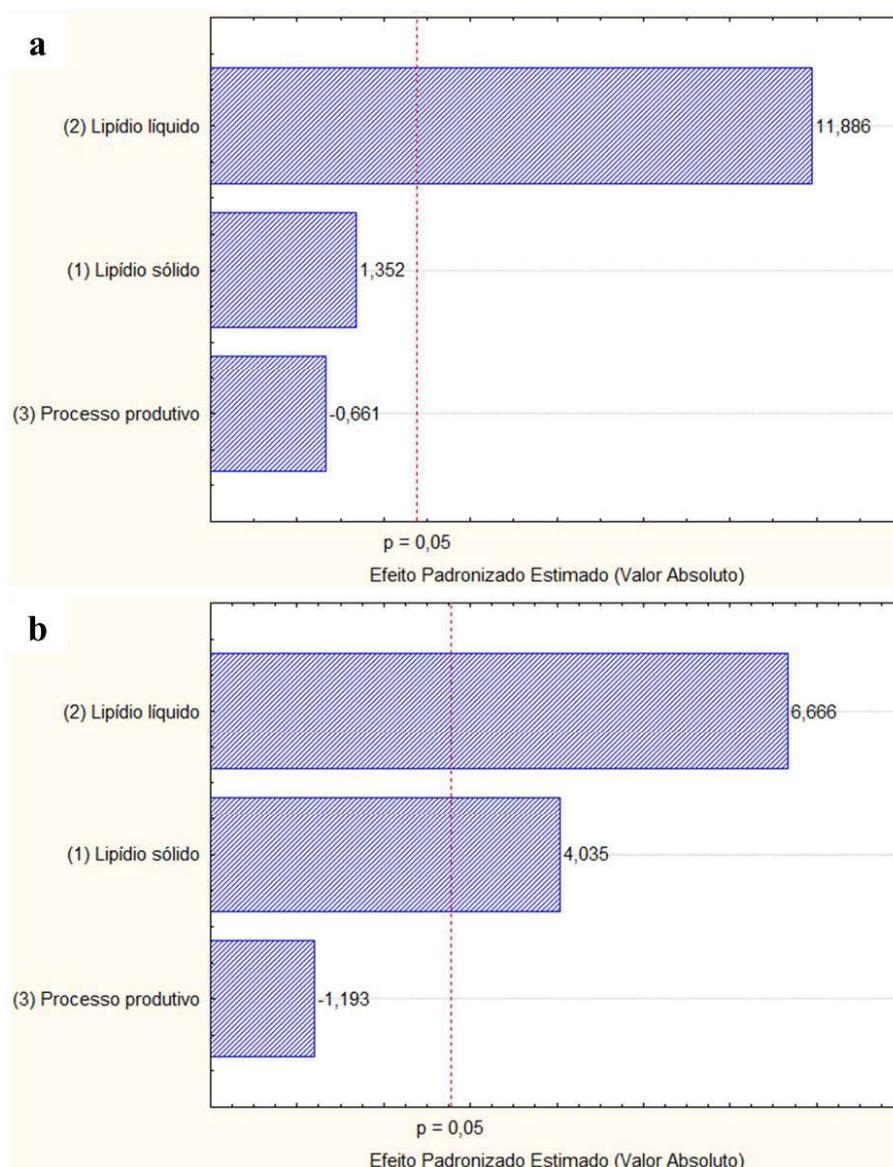


Figura 35. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas tamanho de partícula (a) e PDI (b) do planejamento fatorial completo 2^3 do estudo da formulação M-NLC-NVP.

Caracterização físico-química das formulações otimizadas

As formulações NVP finais otimizadas estão sumarizadas na **Tabela 17**.

Tabela 17. Parâmetros das formulações finais NLC-NVP e M-NLC-NVP, depois da otimização QbD.

Parâmetros	Formulações NVP selecionadas	
	NLC-NVP	M-NLC-NVP
Lipídio sólido	250 mg Precirol ato 5	75 mg Compritol
Lipídio líquido	50 mg Ác. oleico	25 mg Miglyol

Surfactante	50 mg Tween 80	150 mg Tween 80
Fármaco	2 mg NVP	1 mg NVP
Fase aquosa	14 mL; pH 8,7	5 mL; pH 8,7
Temperatura de produção	80 °C	90 °C
Tempo de sonicação ou de microondas	10 min	1ª etapa: 10 min; 2ª etapa: 10 min
Configurações do equipamento	Sonicador: 130 KHz, 80 %	Microondas: 300 W, 200 psi e agitação máxima
Resfriamento	TA	Choque térmico para 70 °C e então à TA

As nanopartículas lipídicas obtidas através de ambos os métodos de produção otimizados foram translúcidas esbranquiçadas e exibiram propriedades de baixa densidade. A caracterização físico-química incluiu o tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE e estão listados na **Tabela 18**. É bem aceito que esses dados podem refletir estabilidade da formulação e interações biológicas (SUSSMAN et al., 2008; SPERLING; PARAK, 2010).

As formulações NLC otimizadas apresentaram um intervalo de tamanhos de partícula de $107,0 \pm 0,6$ a $115,4 \pm 4,4$ nm para o método de homogeneização a quente seguido de ultrasonicação, e a incorporação de NVP não produziu qualquer diferença estatística significativa. Para as formulações M-NLC, os tamanhos de partículas foram de $58,9 \pm 0,3$ a $69,3 \pm 1,4$ nm, para as formulações placebo e com o fármaco, respectivamente. A gama dos tamanhos nanométricos das formulações NLC é apropriada para absorção biológica por administração oral ou dérmica (RIEUX, DES et al., 2007). Adicionalmente, partículas com tamanho inferior a 250 nm são consideradas como bons sistemas de administração de fármacos, uma vez que podem interagir com barreiras biológicas e melhorar o potencial terapêutico do fármaco (ALEXIS et al., 2008).

Tabela 18. Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE das formulações otimizadas NLC da NVP.

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Zeta (mV)	LC (%)	EE (%)
NLC-NVP-P*	115 ± 4	$0,255 \pm 0,01$	-49 ± 2	-	-

NLC-NVP	107 ± 1	0,242 ± 0,01	-41 ± 1	0,47 ± 0,05	75 ± 4
M-NLC-NVP-P*	59 ± 0,3	0,184 ± 0,01	-33 ± 1	-	-
M-NLC-NVP	69 ± 2	0,263 ± 0,01	-21 ± 2	0,20 ± 0,01	42 ± 3

Média ± desvio padrão (DP) (n = 3). * Formulações placebo.

Para as formulações de NLC otimizadas os valores de PDI obtidos estão abaixo de 0,3, indicando a formação de populações uniformes e monodispersas (BLOCK, 2010).

A carga de superfície de uma nanopartícula desempenha um papel crucial na estabilidade física das suspensões coloidais, pois reflete a extensão das interações eletrostáticas repulsivas entre as nanopartículas (KOMATSU et al., 1995). A NLC produzida por homogeneização a quente seguida de ultrasonicação apresentou valores de potenciais zeta de $-49,6 \pm 2,4$ e $-41,2 \pm 1,4$ mV para formulações de placebo e de carga de fármaco, respectivamente. Enquanto que para as formulações M-NLC os valores de potencial zeta obtidos estão entre $-33,3 \pm 0,7$ (placebo) e $-21,2 \pm 1,8$ mV (carregado com NVP). Valores de potenciais Zeta superiores a $|30|$ mV são considerados um bom indicador da estabilidade coloidal com menor tendência para a agregação de nanopartículas, embora cerca de $|20|$ mV é aceitável (MÜLLER et al., 2001; SOUTO et al., 2004; MISHRA et al., 2009) especialmente quando as partículas recebem uma estabilização estérica (MITRI et al., 2011), como utilizados neste trabalho com o Tween 80.

Além disso, nanopartículas carregadas negativamente exercem repulsão eletrostática com a membrana celular, resultando em menos citotoxicidade em comparação com nanopartículas catiônicas (EKAMBARAM et al., 2012).

A NVP não é hidrofílica, mas também tem muita dificuldade de solubilizar em lipídios, apresentando uma lista restrita de possíveis solubilizantes para este fármaco (IARC, 2000; WHO, 2009; SANGANWAR et al., 2010). Devido a esta característica é possível que a NVP tenha uma certa afinidade pelo composto anfifílico T-80. A técnica de microondas requer uma quantidade maior de surfactante, neste caso foi usado 3 vezes mais surfactante do que na técnica de homogeneização a quente seguida de ultrasonicação, ao mesmo tempo apresentou resposta LC 2 vezes menor. Além disso, o LC de ambas as formulações foi baixo, considerando fármaco não hidrofílico, contudo a quantidade de saturação deste fármaco no meio de preparação era muito restrita. Teoricamente, espera-se um desempenho ainda melhor

da técnica de microondas para fármacos mais lipofílicos, especialmente com a aplicação da metodologia de duas etapas, que permite que o fármaco lipofílico seja previamente envolvido e solubilizado pelos compostos lipídicos e também com o(s) surfactante(s) antes da adição da AP, e sua consequente formação de nanoestruturas.

Reunindo os resultados físico-químicos globais, pode-se inferir que o método de homogeneização a quente seguida por ultrasonicação resultou em melhor formulação de NLC carregada com NVP. Recentemente, o método de síntese assistida por microondas em etapa única foi aplicado com sucesso a um fármaco hidrofílico, resultando em respostas 5 vezes maiores quando comparado com o método de homogeneização a quente seguido por ultrasonicação (CAVALCANTI et al., 2016).

Ensaio de liberação de NVP *in vitro*

A solubilidade do fármaco na matriz lipídica torna-se um fator de controle muito importante para a liberação de fármaco a partir de NLC (PINTO et al., 2014) uma vez que o fármaco é incorporado na matriz lipídica de sistemas de nanopartículas quer em forma dissolvida ou dispersa (WISSING; MULLER, 2002).

Foi conduzido sob as mesmas condições, o perfil de liberação *in vitro* do fármaco livre e este foi muito semelhante ao perfil de liberação das formulações de NLC. O qual indicou liberação de 3 % da NVP em 4 horas de meio gástrico simulado e para o meio fisiológico simulado indicou liberação de 99 % em apenas 30 horas.

O objetivo é que estas formulações sejam de administração única diária e o perfil de liberação do fármaco livre já tem esta característica, favorecida pelas suas características físico-químicas, por ser um fármaco não hidrofílico. Foi observado certo aumento do perfil de liberação de NVP quando encapsulado na matriz lipídica na formulação NLC desenvolvida (**Figura 36**). Para a formulação NLC-NVP houve um aumento sutil proporcionado pela matriz lipídica, que em 30 horas teve a taxa de liberação acumulativa de 86 % da NVP - sendo a sua liberação total compreendida entre 30 a 48 horas. *Enquanto que este estudo para a formulação M-NLC-NVP está em andamento e estará contido na versão final deste artigo.*

Bem como, o modelo matemático para a cinética de liberação do fármaco será feito na sequencia para ambas as formulações desenvolvidas.

Tais partículas são conhecidas por apresentarem uma liberação de explosão inicial (MÜLLER R. H. et al., 1995). Isto não foi observado na formulação NLC-NVP, sugerindo uma boa distribuição do fármaco nas matrizes lipídicas destas nanopartículas (MUCHOW et al., 2008).

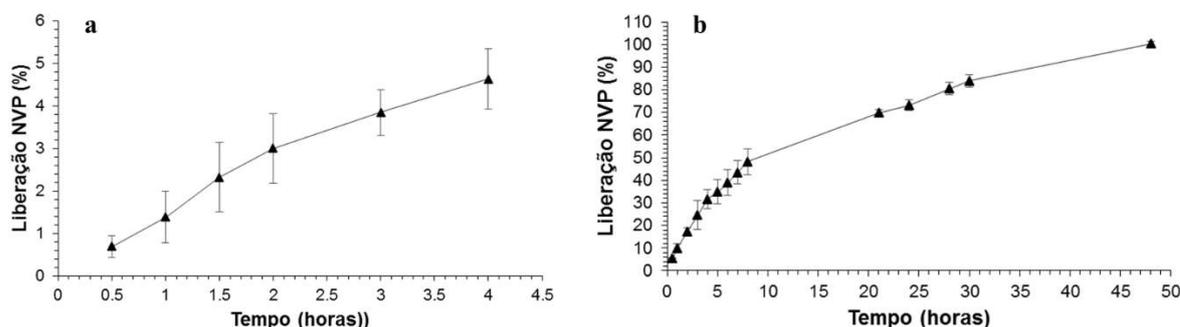


Figura 36. Perfil de liberação da NVP *in vitro* na NLC-NVP (▲) e este estudo está em andamento para a M-NLC-NVP (●), (a) simulando o meio gástrico e temperatura corporal (pH 1,2 a 37 ° C), e (b) simulando o meio fisiológico e temperatura coporal (pH 7,4 a 37 °C). Os dados são a média e DP para n = 2.

Morfologia avaliada por TEM

As formulações otimizadas de NLC foram visualizadas por TEM e as imagens obtidas revelaram forma esférica (**Figura 37**). Para a preparação das amostras para análise TEM, a água é removida por evaporação, o que leva ao encolhimento das partículas, e um tamanho diminuído (DUBES et al., 2003). Na detecção do tamanho de partícula por DLS, as partículas lipídicas são altamente hidratadas porque é realizada em meio aquoso. Além disso, a técnica DLS não mede diretamente o diâmetro de partícula, mas detecta flutuações nos sinais de luz causados pelo movimento browniano de partículas para calcular o tamanho (MEHNERT; MÄDER, 2001). Assim, os processos de preparação das amostras e a própria técnica são completamente diferentes, o que pode levar a essas pequenas diferenças.

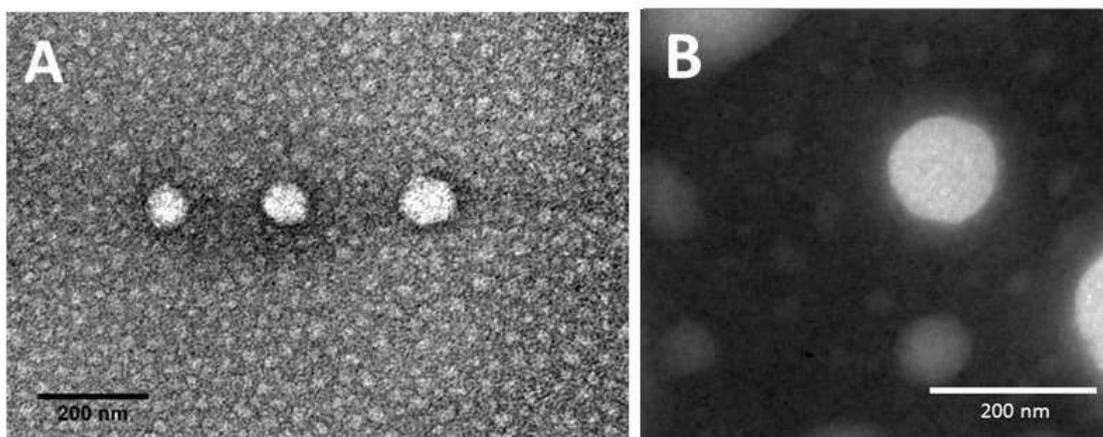


Figura 37. Imagens TEM das formulações das NPs: (A) NLC-NVP, amplificação: 100.000 X; (B) M-NLC-NVP, amplificação: 25.000 X.

Estudo de estabilidade

As formulações de NLC foram armazenadas como suspensões aquosas a 4 °C e protegidas da luz durante um período de 30 dias e foram avaliadas durante um período de tempo estudado quanto à estabilidade física (tamanho de partícula, PDI e potencial zeta). As formulações foram capazes de manter as suas propriedades com tamanho entre 50 a 400 nm, PDI até 0,3 e potencial Zeta $> |20|$ e negativo, além de não ser observada nenhuma alteração visual (**Figura 38**). Entretanto, para a resposta LC foi observada o decaimento de 50 % de LC para a formulação NLC-NVP, enquanto que a formulação M-NLC-NVP permaneceu estável durante os 30 dias do estudo.

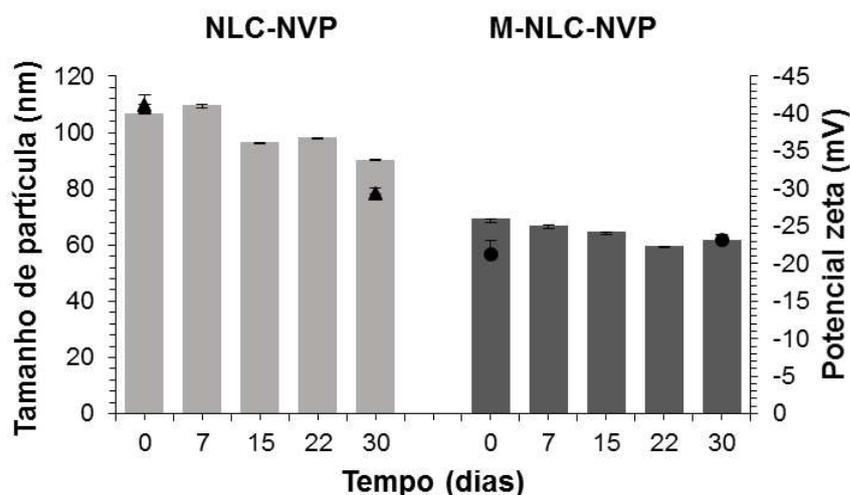


Figura 38. Estabilidade de armazenamento comparativa das formulações NLC-NVP e M-NLC-NVP ao tempo (0, 7, 15, 22 e 30 dias). As barras representam o tamanho das nanopartículas (eixo Y esquerdo) e os marcadores de potencial zeta (eixo Y direito) no tempo zero a 30 dias. Os valores são média de 3 resultados independentes e respectivo SD.

Estudo de citotoxicidade

A viabilidade das células Jurkat T com o tratamento de nanopartículas lipídicas carregadas de fármaco está representada na **Figura 39**. A viabilidade celular não foi influenciada pelo aumento da concentração de lipídios de nanopartículas de placebo, de NLC nem M-NLC. Na presença de NVP incorporada nas NLC a viabilidade celular diminuiu para cerca de 80 % quando a concentração atingiu 20 $\mu\text{g/mL}$. Resultados semelhantes foram observados para as células T tratadas com NVP livre. Isto sugere que a NVP incorporada permanece capaz de influenciar as células como em sua forma livre. Efeito idêntico para nanopartículas de imunolipossomas carregadas com niverapina e saquinavir (RAMANA et al., 2014).

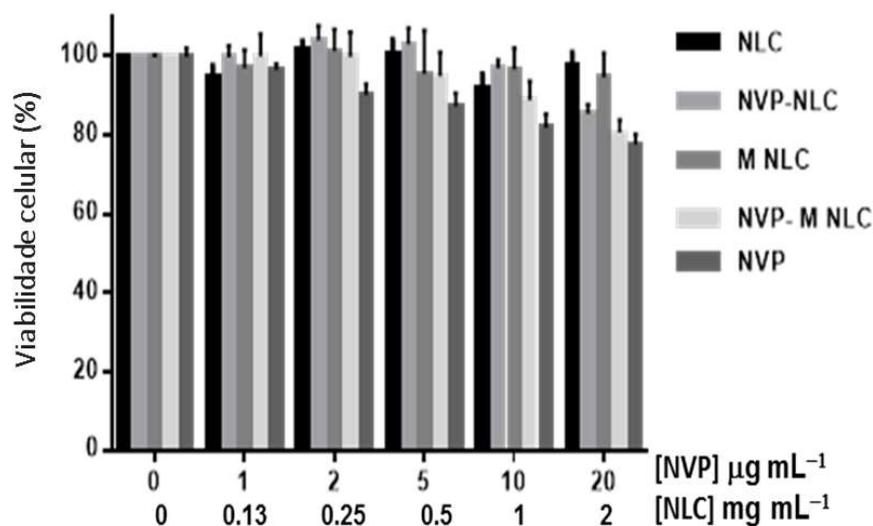


Figura 39. Viabilidade de células Jurkat T. Citotoxicidade *in vitro* da NVP livre e da NVP incorporada em NLC e M-NLC em 24 hr de incubação. Dados expressos como média \pm DP (n=3).

Conclusões

Nesta pesquisa, uma nova estratégia de delivery para NVP no tratamento do HIV foi desenvolvida e otimizada com base em nanopartículas lipídicas. As formulações NLC foram desenvolvidas para viabilizar a administração oral, com o objetivo de melhorar a adesão do paciente e o sucesso desta terapia. Uma abordagem QbD foi implementada para o desenvolvimento e otimização das formulações NLC carregadas com NVP usando os métodos de produção: homogeneização a quente seguida de ultrasonicação e método de síntese assistido por microondas. As NLC otimizadas apresentaram tamanho de partícula variando de 50 a 110 nm e PDI $<$ 0,3, de acordo com o procedimento de produção, o qual é considerado adequado para administração oral. Além disso, as NLC exibiram potencial zeta negativo $>$ -20 mV, sugerindo uma boa estabilidade física. A EE da NVP foi elevada, sendo cerca de 75 % para a formulação NLC produzida pelo método de homogeneização a quente seguida por ultrasonicação e 45 % pelo método de síntese assistido por microondas. As imagens TEM revelaram que todas as formulações NLC apresentaram uma morfologia esférica e os dados estão em boa concordância com o tamanho de partícula obtido por DLS. Estudos de biocompatibilidade em linfócitos T humanos mostram que as formulações de NLC placebo não induzem toxicidade nas células, tal como observado com a NVP livre e com a NVP

incorporada nas NLC. O estudo de estabilidade preliminar mostrou que apenas a formulação obtida por síntese por microondas permaneceu estável durante o tempo de acompanhamento. Em conclusão, os resultados globais sugerem que a formulação NLC otimizada produzida por método de síntese assistida por microondas representa carreadores adequados para a administração oral de NVP.

5. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidas o total de seis nanoformulações com respaldo da abordagem *Quality by Design* (QbD). Com isso, para cada um dos três fármacos indicados na terapêutica de HIV/AIDS pediátrica – a AZT, 3TC e NVP foram desenvolvidas duas nanoformulações com a finalidade de avaliação comparativa de diferentes metodologias empregadas na obtenção destas e ou na nanoestrutura em si.

Na avaliação foram considerados uma série de parâmetros como características físico-químicas, liberação do fármaco, estabilidade, citotoxicidade, bem como fatores relacionados a técnica de produção, quanto a praticidade, ausência de solventes orgânicos, utilização de excipientes seguros e de baixo custo, processos rápidos, seguros e econômicos.

Através de uma análise geral considerando todas as nanoformulações desenvolvidas pode-se indicar a MLN-3TC, M-NLC-AZT e a M-NLC-NVP como as mais promissoras. Entretanto, em caso de desenvolvimento de futura associação de dose fixa (ADF), dose única diária, como pó liofilizado para imediata ressuspensão, talvez seja mais apropriado utilizar a NLC-3TC ao invés da MLN-3TC. Outra alternativa pode ser a utilização do creme MLN-3TC em que nele já estejam dispersos os pós liofilizados tanto da M-NLC-AZT quanto da M-NLC-NVP em concentrações apropriadas a terapêutica pediátrica HIV/AIDS, sendo necessário apenas a resuspensão desse creme de ADF no momento da administração oral. A partir destas nanoformulações selecionadas poderá também ser pertinentes a aplicação de estratégias de *targetting* para otimizar o direcionamento na terapêutica, o que conseqüentemente reflete na maior efetividade e redução dos efeitos adversos.

Assim, para além dos objetivos inicialmente planejados, este trabalho ainda permitiu ramificações. Parte do conhecimento desenvolvido apresentou potencial para proteção intelectual e um pedido de privilégio de patente em parceria com a Universidade do Porto foi realizado. Este pedido de patente diz respeito a um novo processo produtivo de nanopartículas lipídicas com as características de ser prático, econômico, *one-pot* e *eco-friendly*. Além do desenvolvimento de uma nova nanoestrutura lipídica, a nanopartículas lipídicas múltiplas (MLN), que apresenta características intermediárias entre as emulsões múltiplas, as MLPs, e entre as NLC e SLN – o que confere a este novo carregador nanoestruturado várias vantagens.

Sendo possível vastas possibilidades de aplicações tanto da nova técnica de produção quanto da nova nanoestrutura lipídica desenvolvidas.

6. PERSPECTIVAS

As nanoformulações lipídicas desenvolvidas neste trabalho podem ainda ser otimizadas quanto ao direcionamento de entrega destes fármacos por estratégias de “*targeting*” sendo o GP120 um importante antígeno do HIV responsável pela interação com células linfócitos T, uma das principais células hospedeiras do HIV. Assim possivelmente reduziria ainda mais os efeitos secundários e aumentaria a eficácia das nanoformulações.

Uma associação dose fixa (ADF) pode ser desenvolvida a partir das nanoformulações selecionadas. Para tanto já foram realizados testes preliminares de liofilização para todas as NLC desenvolvidas e todas foram liofilizadas com sucesso (crioprotector aerosil, proporção de 2% m/m), merecendo maiores estudos quanto a esta etapa no sentido de otimização e quanto a um estudo mais aprofundado de estabilidade em condições de temperatura ambiente, exposto e não exposto a luz, e por um maior tempo de acompanhamento.

Também se faz necessário um estudo de biodisponibilidade e eficácia clínica das nanoformulações desenvolvidas e/ou da possível ADF.

Relacionado a nova técnica produtiva de nanopartículas lipídicas por microondas uma vasta gama de aplicações é visualizada quanto a obtenção de NLC e SLN para outros fármacos de diferentes características físico-químicas, ou mesmo como forma comparativa de nanoformulações já existentes obtidas por técnicas já tradicionais ou até em substituição de técnicas mais complexas e dispendiosas.

Quanto a nova nanoestrutura, as MLN, vários compostos ativos, tanto com características hidrofílicos quanto lipofílicos ou ambos, podem ser testados para serem encapsulados - uma vez que a estrutura da MLN assim permite. Além das possibilidades de se empregar compostos de administração oral e tópica ou transdérmica, por poder ser administrado como suspensão ou como creme.

REFERÊNCIAS

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual review of biomedical engineering**, v. 14, p. 1–16, 2012. Annual Reviews.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505–515, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/mp800051m>>. .

ALI KHAN, A.; MUDASSIR, J.; MOHTAR, N.; DARWIS, Y. Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 2733–2744, 2013. New Zealand.

ANTUNES, A. M. M.; DUARTE, M. P.; SANTOS, P. P.; et al. Synthesis and Characterization of DNA Adducts from the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Nevirapine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 7, p. 1443–1456, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx8000972>>. .

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; SANTOS FILHO, M. DOS; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International journal of pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303–314, 2003. Elsevier.

ARAUJO, J.; GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 393, n. 1–2, p. 167–175, 2010. Netherlands.

ASERIN, A. **Multiple emulsion: technology and applications**. John Wiley & Sons, 2008.

BARBI, M. DA S.; CARVALHO, F. C.; KIILL, C. P.; et al. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for zidovudine nasal delivery. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 865–874, 2015. American Scientific Publishers.

BARROS-NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, R. E. B. **Como fazer experimentos**. 4th ed. Bookman, 2010.

BARZEGAR-JALALI, M.; ADIBKIA, K.; VALIZADEH, H.; et al. Kinetic analysis

of drug release from nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 167–177, 2008. Canadian Society for Pharmaceutical Sciences.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497–508, 2012. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2012.673278>>. .

BEDSE, G.; KUMAR, V.; SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MSn. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 55–63, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708508005621>>. .

BETTS, J. N.; JOHNSON, M. G.; RYGIWICZ, P. T.; KING, G. A.; ANDERSEN, C. P. Potential for metal contamination by direct sonication of nanoparticle suspensions. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 32, n. 4, p. 889–893, 2013. Wiley Online Library.

BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; SCHOUBBEN, A.; RICCI, M.; ROSSI, C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 454–477, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X07000427>>. .

BLOCK, I. D. Particle Sizing by 3D Cross-Correlation DLS in Highly Scattering Samples. .

BRUNS, R. E. Effects of experimental conditions on the estimation of kinetic parameters of the thermal decomposition of AZT using factorial design. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, n. 3, p. 697–701, 2005. Springer (Kluwer Academic Publishers). Disponível em: <<http://www.akademai.com/doi/abs/10.1007/s10973-005-0598-5>>. .

BYRN, S. R. .; PFEIFFER, R. R. .; STOWELL, J. G. **Solid-state chemistry of drugs**. 2nd ed. 1999.

CARBONE, C.; TOMASELLO, B.; RUOZI, B.; RENIS, M.; PUGLISI, G. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 110–117, 2012. Disponível em: <<file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412000025>>. .

CAVALCANTI, S. M. T. .; NUNES, C.; REIS, S.; SOARES-SOBRINHO, J. L. Obtenção de Nanopartículas Lipídicas por Microondas. , 2016. Portugal.

CHADHA, R.; ARORA, P.; GARG, M.; BHANDARI, S.; JAIN, D. S.

Thermoanalytical and spectroscopic studies on different crystal forms of nevirapine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2133–2142, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10973-012-2666-y>>. .

CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; MISHRA, B.; SINGH, S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 1–15, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641109001660>>. .

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

CHATURVEDI, S. P.; KUMAR, V. Production techniques of lipid nanoparticles: a review. **Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.**, v. 3, p. 525–541, 2012.

CHAVES, L. L.; ROLIM, L. A.; GONÇALVES, M. L. C. M.; et al. Study of stability and drug-excipient compatibility of diethylcarbamazine citrate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2179–2186, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10973-012-2775-7>>. .

CHIU, D. T.; DUESBERG, P. H. The toxicity of azidothymidine (AZT) on human and animal cells in culture at concentrations used for antiviral therapy. **Genetica**, v. 95, n. 1–3, p. 103–109, 1995. Springer.

CHOW, F.-P. R.; HAMBURGER, A. W. In vivo evaluation of the anemia induced by azidothymidine (AZT) in a murine model of AIDS. **European Journal of Haematology**, v. 47, n. 2, p. 91–97, 1991. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.1991.tb00128.x>>. .

CHRISTOPER, G. V. P.; RAGHAVAN, C. V.; SIDDHARTH, K.; KUMAR, M. S. S.; PRASAD, R. H. Formulation and optimization of coated PLGA–Zidovudine nanoparticles using factorial design and in vitro in vivo evaluations to determine brain targeting efficiency. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 2, p. 133–140, 2014. Elsevier.

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

DALPIAZ, A.; CONTADO, C.; MARI, L.; et al. Development and characterization of PLGA nanoparticles as delivery systems of a prodrug of zidovudine obtained by its conjugation with ursodeoxycholic acid. **Drug delivery**, v. 21, n. 3, p. 221–232, 2014. Taylor

& Francis.

DAS, S.; CHAUDHURY, A.; PHARMSCITECH, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011.

DEVANE, L. C. Principles of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology**. 3rd ed., p.181–200, 2009. Washington, DC: American Psychiatric Pub.

DICKINSON, E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. **Food Biophysics**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2011. Springer.

DNDI. About Paediatric HIV. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/paediatric-hiv/>>. .

DUBES, A.; PARROT-LOPEZ, H.; ABDELWAHED, W.; et al. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 279–282, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641103000201>>. .

EKAMBARAM, P.; SATAHALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. Solid lipid nanoparticles: Review. **Scientific Reviews Chemical Communications**, v. 2, n. 1, p. 80–102, 2012.

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

FENG, S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 1, p. 53–69, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365900003643>>. .

FERREIRA, M.; CHAVES, L. L.; LIMA, S. A. C.; REIS, S. Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with methotrexate: A tool for inflammatory and cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1–2, p. 65–72, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315300314>>. .

FORD, JAMES L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical thermal analysis: Techniques and applications**. Willey Interscience, 1989.

FRANCKE, S.; OROSZ, C. G.; HAYES, K. A.; MATHES, L. E. Effect of zidovudine on the primary cytolytic T-lymphocyte response and T-cell effector function. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1900–1905, 2000. Am Soc Microbiol.

FREELING, J. P.; KOEHN, J.; SHU, C.; SUN, J.; HO, R. J. Y. Anti-HIV drug-combination nanoparticles enhance plasma drug exposure duration as well as triple-drug combination levels in cells within lymph nodes and blood in primates. **AIDS research and human retroviruses**, v. 31, n. 1, p. 107–114, 2015. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.

FRIAS, I.; NEVES, A. R.; PINHEIRO, M.; REIS, S. Design, development, and characterization of lipid nanocarriers-based epigallocatechin gallate delivery system for preventive and therapeutic supplementation. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3519, 2016. Dove Press.

GAMBOA, J. M.; LEONG, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 6, p. 800–810, 2013. Elsevier.

GARTI, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 222–235, 1997a. Elsevier.

GARTI, N. Double emulsions—scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123, p. 233–246, 1997b. Elsevier.

GARTI, N.; BENICHO, A. Recent developments in double emulsions for food applications. **Food emulsions**, v. 35, 2004. Dekker: New York.

GARTI, N.; BISPERINK, C. Double emulsions: progress and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 3, n. 6, p. 657–667, 1998. Elsevier.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. , 5. Oct. 1993. Google Patents. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US5250236>>. .

GASCO, M. R. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 377–378, 2007. Elsevier.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107002895>>. .

GIRON, D. Thermal Analysis, Microcalorimetry and Combined Techniques for the Study of Pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 56, n. 3, p. 1285–1304, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1010194020563>>. .

GOMES, M. J.; NEVES, J. D.; SARMENTO, B. Nanoparticle-based drug deliver improve the efficacy of antiretroviral therapy in the central nervous system. In **Nanomedicine**, v. 9, p. 1757–1769, 2014. Citeseer.

GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; SOUTO, E. B.; CALPENA, A. C.; GARCÍA, M. L. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. **Nanotechnology**, v. 22, n. 4, p. 45101, 2011. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0957-4484/22/i=4/a=045101>>. .

GRANGEIRO, S. **Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas Farmacêuticas Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho próximo**, 2011. Universidade Federal de Pernambuco.

GRANGEIRO, S.; STRATTMANN, R. R.; ALBURQUERQUE, M. M.; et al. In vitro evaluation of dissolution profiles and thermal properties of some commercial formulations of nevirapine tablets. **acta farmacêutica bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 76, 2006. COLEGIO DE FARMACEUTICOS.

GRIFFIN, W. C. CLASSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE AGENTS BY “HLB.” **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311–326, 1949.

GRIFFIN, W. C. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 5, p. 249–256, 1954.

GROSA, G.; GROSSO, E. DEL; RUSSO, R.; ALLEGRONE, G. Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 798–803, 2006. Disponível em: <<file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506000628>>. .

HARILALL, S.; CHOONARA, Y. E.; MODI, G.; et al. Design and pharmaceutical evaluation of a nano-enabled crosslinked multipolymeric scaffold for prolonged intracranial release of zidovudine. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 470–485, 2013.

HHS. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. , 2014. <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>.

HORVATH, C.; MELANDER, W.; MOLNAR, I.; MOLNAR, P. Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 14, p. 2295–2305, 1977. ACS Publications.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid

lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, n. 10, p. 1781–1785, 2003. Elsevier.

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

IARC. Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents - monograph 76. (WHO, Ed.), 2000. Lyon, France. Disponible em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol76/mono76.pdf>>. .

ICH. Quality Risk Management Q9. (ICH, Ed.), 2005. International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

ICH. pharmaceutical development - Q8(R2). (ICH, Ed.), 2009a. International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

ICH. Pharmaceutical Quality System - Q10. , 2009b. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073517.pdf>: International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 64–74, 2013. Elsevier.

JUNGHANNS, J.-U. A. H.; MÜLLER, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 295–310, 2008. Dove Medical Press. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2626933/>>. .

KAIMAINEN, M.; MARZE, S.; JÄRVENPÄÄ, E.; ANTON, M.; HUOPALAHTI, R. Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 899–904, 2015. Elsevier.

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine, stavudine and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, n. 1, p. 41–45, 2006. Disponible em: <<file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006007653>>. .

KARMAKAR, S.; GARBER, R.; GENCHANOK, Y.; et al. Quality by design (QbD) based development of a stability indicating HPLC method for drug and impurities. **Journal of chromatographic science**, v. 49, n. 6, p. 439–446, 2011. Oxford University Press.

KHAMANGA, S. M.; WALKER, R. B. The use of experimental design in the development of an HPLC–ECD method for the analysis of captopril. **Talanta**, v. 83, n. 3, p. 1037–1049, 2011. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010008854>. .

KINMAN, L.; BRODIE, S. J.; TSAI, C. C.; et al. Lipid–drug association enhanced HIV-1 protease inhibitor indinavir localization in lymphoid tissues and viral load reduction: A proof of concept study in HIV-2287-infected macaques. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 34, n. 4, p. 387–397, 2003. LWW.

KLECKER RW JR FAU - COLLINS, J. M.; COLLINS JM FAU - YARCHOAN, R.; YARCHOAN R FAU - THOMAS, R.; et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine: a novel pyrimidine analog with potential application for the treatment of patients with AIDS and related diseases. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, n. 4, p. 407–412, 1987.

KOMATSU, H.; KITAJIMA, A.; OKADA, S. Pharmaceutical Characterization of Commercially Available Intravenous Fat Emulsions : Estimation of Average Particle Size, Size Distribution and Surface Potential Using Photon Correlation Spectroscopy. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 43, n. 8, p. 1412–1415, 1995.

KOVÁCS, A.; ERŐS, I.; CSÓKA, I. Optimization and development of stable w/o/w cosmetic multiple emulsions by means of the Quality by Design approach. **International journal of cosmetic science**, 2015. Wiley Online Library.

KOVÁCS, A.; ERŐS, I.; CSÓKA, I. Optimization and development of stable w/o/w cosmetic multiple emulsions by means of the Quality by Design approach. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 2, p. 128–138, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/ics.12248>. .

KRISHNA, M. V.; DASH, R. N.; JALACHANDRA REDDY, B.; et al. Quality by Design (QbD) approach to develop HPLC method for eberconazole nitrate: Application oxidative and photolytic degradation kinetics. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, Supple, p. S313–S322, 2016. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610312001792>. .

KRITI SONI MANAVI KAPUR, KANCHAN KOHLI, B. K. K. Lipid Nanoparticles: Future of Oral Drug Delivery and their Current Trends and Regulatory Issues. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, n. 1, p. 1–18.

KUMBHAR, D. D.; POKHARKAR, V. B. Physicochemical investigations on an engineered lipid–polymer hybrid nanoparticle containing a model hydrophilic active,

zidovudine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 714–725, 2013. Disponível em: <[file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775713006006](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775713006006)>. .

KUO, Y.-C.; CHEN, H.-H. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate–sulfopropylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the in vitro blood–brain barrier. **International journal of pharmaceutics**, v. 327, n. 1, p. 160–169, 2006. Elsevier.

KUO, Y.-C.; CHUNG, C.-Y. Transport of Zidovudine-and Lamivudine-Loaded Polybutylcyanoacrylate and Methylmethacrylate-Sulfopropylmethacrylate Nanoparticles across the In Vitro Blood-Brain Barrier: Characteristics of the Drug-D. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 36, n. 6, p. 627–638, 2005. 臺灣化學工程學會.

KUO, Y.-C.; CHUNG, J.-F. Physicochemical properties of nevirapine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 2, p. 299–306, 2011. Elsevier.

KUO, Y.-C.; LIN, P.-I.; WANG, C.-C. Targeting nevirapine delivery across human brain microvascular endothelial cells using transferrin-grafted poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 6, p. 1011–1026, 2011. Future Medicine.

LAVRA, Z. M. M.; ROLIM NETO, P. J.; SILVA, R. M. F. DA; MEDEIROS, F. P. M. DE. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência . **Química Nova** , 2008. scielo .

LEAL-CALDERON, F.; HOMER, S.; GOH, A.; LUNDIN, L. W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 30–41, 2012. Elsevier.

LI, Q.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; et al. Synthesis of Lamivudine stearate and antiviral activity of stearic acid-g-chitosan oligosaccharide polymeric micelles delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3–4, p. 498–507, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098710003015>>. .

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641104000438>>. .

LIOTARD, J.-F.; MEHIRI, M.; GIORGIO, A. DI; et al. AZT and AZT-monophosphate prodrugs incorporating HIV-protease substrate fragment: synthesis and evaluation as specific drug delivery systems. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 17, n. 4, p. 193–213, 2006. SAGE Publications.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1–2, p. 9–12, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300006232>>. .

LIU, J.; GONG, T.; FU, H.; et al. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1–2, p. 333–344, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308000215>>. .

LUCKS, S.; MÜLLER, R. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - sln). , 20. Mar. 1996. Google Patents. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/EP0605497B1?cl=en>>. .

LUTTON, J. D.; MATHEW, A.; LEVERE, R. D.; ABRAHAM, N. G. Role of heme metabolism in AZT-induced bone marrow toxicity. **American Journal of Hematology**, v. 35, n. 1, p. 1–5, 1990. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ajh.2830350102>>. .

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D. Nanoencapsulation and Characterization of Zidovudine on Poly (L-lactide) and Poly (L-lactide)—Poly (ethylene glycol)-Blend Nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 12, n. 11, p. 8513–8521, 2012. American Scientific Publishers.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; BRUNETTI, I. L.; FONSECA, L. M. DA; KHALIL, N. M. Zidovudine-loaded PLA and PLA–PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 1, p. 257–267, 2009. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.21406>>. .

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA–PEG blend nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 395, n. 1, p. 266–271, 2010. Elsevier.

MAMO, T.; MOSEMAN, E. A.; KOLISHETTI, N.; et al. Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 269–285, 2010. Future Medicine.

MANSOUR, H.; PARK, C.-W.; BAWA, R. Design and Development of Approved

Nanopharmaceutical Products. **Handbook of Clinical Nanomedicine**, Pan Stanford Series on Nanomedicine. p.233–272, 2016. Pan Stanford. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1201/b19915-12>>. .

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216–2229, 2008. American Scientific Publishers.

MARTINS, S.; THO, I.; REIMOLD, I.; et al. Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: Formulation design, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 49–62, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517312009398>>. .

MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds**. CRC Press, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in colloid and interface science**, v. 219, p. 27–53, 2015. Elsevier.

MCTI. Estratégia nacional de ciência, tecnologia e inovação 2012 - 2015. , 2012.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X01001053>>. .

MEZZENGA, R.; FOLMER, B. M.; HUGHES, E. Design of double emulsions by osmotic pressure tailoring. **Langmuir**, v. 20, n. 9, p. 3574–3582, 2004. ACS Publications.

MISHAL, A.; SOBER, D. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of metronidazole benzoate and diloxanide furoate as bulk drug and in suspension dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 819–823, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708505003717>>. .

MISHRA, D.; JAIN, N.; RAJORIYA, V.; JAIN, A. K. Glycyrrhizin conjugated chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of lamivudine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1082–1093, 2014. Wiley Online Library.

MISHRA, P. R.; SHAAL, L. AL; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 182–189, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308008685>>. .

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSEMI, C.; MÜLLER, R. H. Lipid

nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1–2, p. 267–275, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311004030>>. .

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 283–318, 2001. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/53/2/283.abstract>>. .

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal**, v. 19, n. 3, p. 311–330, 2005. FASEB.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006. Faculty of Pharmacy, University of Benin.

MONTASSIR DAHMANE, M. R. EL; TAOURIRTE, M. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-HIV drug Zidovudine. **Bull. Korean Chem. Soc**, v. 34, n. 5, p. 1333, 2013. Citeseer.

MS. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes. , 2014.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 12, p. 1394–1405, 2008. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03639040802130061>>. .

MUHLEN A., ZUR; MEHNERT W. Drug release and release mechanism of prednisolone loaded Solid Lipid Nanoparticles. (Govi, Ed.)**Pharmazie**, v. 53, n. 8, 1998. Eschborn, ALLEMAGNE.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3–19, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X00001186>>. .

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supple, p. S131–S155, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02001187>>. .

MÜLLER R. H.; MEHNERT W.; LUCKS J.-S.; et al. Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. (Elsevier, Ed.)**European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, n. 1, 1995.

MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4, p. 213–220, 2007. Elsevier.

NESALIN, J. A. J.; SMITH, A. A. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing zidovudine. **Asian J Pharm Sci**, v. 7, n. 1, p. 80–84, 2012.

OLIVEIRA, G. G. G. DE; FERRAZ, H. G.; SEVERINO, P.; SOUTO, E. B. Compatibility studies of nevirapine in physical mixtures with excipients for oral HAART. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 2, p. 596–602, 2013. Elsevier.

PALELLA, F. J.; DELANEY, K. M.; MOORMAN, A. C.; et al. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 853–860, 1998. Massachusetts Medical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199803263381301>>. .

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308006996>>. .

PHILLIPS, N. C.; TSOUKAS, C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. **Blood**, v. 79, n. 5, p. 1137, 1992. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/79/5/1137.abstract>>. .

PINTO, M. F.; MOURA, C. C.; NUNES, C.; et al. A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 519–526, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731400790X>>. .

POLLARD, R. B.; ROBINSON, P.; DRANSFIELD, K. Safety profile of nevirapine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of human immunodeficiency virus infection. **Clinical Therapeutics**, v. 20, n. 6, p. 1071–1092, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291898801057>>. .

PRIANO, L.; ESPOSTI, D.; ESPOSTI, R.; et al. Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery systems. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 7, n. 10, p. 3596–3601, 2007. United States.

PURVIN, S.; VUDDANDA, P. R.; SINGH, S. K.; JAIN, A.; SINGH, S. Pharmacokinetic and tissue distribution study of solid lipid nanoparticles of Zidovudine in rats. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

RAJU, P. NARAYANA; PRAKASH, K.; NARASU, M. L. Compatibility Study of

Lamivudine with Various Cellulose Polymers. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, n. S1, p. S17–S20, 2009.

RAMANA, L. N.; ANAND, A. R.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M. Targeting strategies for delivery of anti-HIV drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 192, p. 271–283, 2014. Disponível em: <[file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914005835](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914005835)>. .

RAYMOND C ROWE; PAUL J SHESKEY; QUINN., M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. , 2009. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos . **Química Nova** , 2004. scielo .

RIBEIRO, R. L. D. **Development and Characterization of Nanocarrier Systems for the Delivery of Antitubercular Drugs**, 2013. Universidade do Porto.

RICHMAN, D. D.; FISCHL, M. A.; GRIECO, M. H.; et al. The Toxicity of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 4, p. 192–197, 1987. Massachusetts Medical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198707233170402>>. .

RIEUX, A. DES; FIEVEZ, V.; MOMTAZ, M.; et al. Helodermin-loaded nanoparticles: Characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium. **Journal of Controlled Release**, v. 118, n. 3, p. 294–302, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365906007115>>. .

RODRIGUES, MARIA ISABEL; LEMA, A. F.; CÁRITA. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3rd ed. Cárita, 2014.

ROLIM, L. A.; SANTOS, F. C. M. DOS; CHAVES, L. L.; et al. Preformulation study of ivermectin raw material. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 807–816, 2015. Springer.

SANGANWAR, G. P.; SATHIGARI, S.; BABU, R. J.; GUPTA, R. B. Simultaneous production and co-mixing of microparticles of nevirapine with excipients by supercritical antisolvent method for dissolution enhancement. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1–3, p. 164–174, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098709003534>>. .

SANKAR, V.; NILAYKUMAR NARESHKUMAR, P.; NISHIT AJITKUMAR, G.; DEVI PENMETS, S.; HARIHARAN, S. Comparative studies of lamivudine-zidovudine

nanoparticles for the selective uptake by macrophages. **Current drug delivery**, v. 9, n. 5, p. 506–514, 2012. Bentham Science Publishers.

SANTOS, G. F. DOS; LOCATELLI, G. O.; COELHO, D. A.; et al. Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 75, n. 2, p. 345–352, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10971-015-3705-5>>. .

SARMENTO, B.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SOUTO, E. B. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 743–749, 2007. Dove Medical Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676823/>>. .

SCHÖLER, N.; HAHN, H.; MÜLLER, R. H.; LIESENFELD, O. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 231, n. 2, p. 167–176, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517301008821>>. .

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 159, 2012. BioMed Central.

SEVERINO, P.; ANDREANI, T.; MACEDO, A. S.; et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/750891>>. .

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; SOUTO, E. B. Optimizing SLN and NLC by 22 full factorial design: Effect of homogenization technique. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1375–1379, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112001361>>. .

SHAH, M.; AGRAWAL, Y. K.; GARALA, K.; RAMKISHAN, A. Solid lipid nanoparticles of a water soluble drug, ciprofloxacin hydrochloride. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 74, n. 5, p. 434, 2012. Medknow Publications.

SHAH, R.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E.; HARDING, I. **Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability**. Springer, 2015.

SHAH, R. M.; MALHERBE, F.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E. A.; HARDING, I. H. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 428, p. 286–294,

2014.

Disponível

em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979714002768>>..

SHEGOKAR, R.; JANSCH, M.; SINGH, K. K.; MÜLLER, R. H. In vitro protein adsorption studies on nevirapine nanosuspensions for HIV/AIDS chemotherapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 3, p. 333–340, 2011. Elsevier.

SHEGOKAR, R.; SINGH, K. K. Nevirapine nanosuspensions for HIV reservoir targeting. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 6, p. 408–415, 2011. Govi-Verlag.

SHEGOKAR, R.; SINGH, K. K. Surface modified nevirapine nanosuspensions for viral reservoir targeting: In vitro and in vivo evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 421, n. 2, p. 341–352, 2011. Elsevier.

SHEGOKAR, R.; SINGH, K. K. Nevirapine nanosuspensions: stability, plasma compatibility and sterilization. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 5, p. 257–269, 2012. Springer.

SILVA, M. L. DE G. DA; FORTES, A. C.; OLIVEIRA, M. E. R.; et al. Palygorskite organophilic for dermopharmaceutical application. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2287–2294, 2014. Springer.

SINGH, A. V.; NATH, L. K. Evaluation of compatibility of lamivudine with tablet excipients and a novel synthesized polymer. **J Mater Environ Sci**, v. 2, n. 3, p. 243–250, 2011.

SINGH, S.; DOBHAL, A. K.; JAIN, A.; PANDIT, J. K.; CHAKRABORTY, S. Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of a Water Soluble Drug: Zidovudine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 650–655, 2010.

SOARES, M. F. DE L. R. **Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efaviraz**, 2011. Universidade Federal de Pernambuco.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 83–90, 2004. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S093964110400061X>>..

SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions of the**

Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 368, n. 1915, p. 1333, 2010. Disponível em: <<http://rsta.royalsocietypublishing.org/content/368/1915/1333.abstract>>. .

STRAUCH, S.; JANTRATID, E.; DRESSMAN, J. B.; et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: lamivudine. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011. United States.

SURH, J.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; MUN, S.; MCCLEMENTS, D. J. Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 175–184, 2007. ACS Publications.

SUSSMAN, E. M.; JAYAGOPAL, A.; HASELTON, F. R.; SHASTRI, V. P. Engineering of Solid Lipid Nanoparticles for Biomedical Applications. **New Delivery Systems for Controlled Drug Release from Naturally Occurring Materials**. v. 992, p.139–152, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bk-2008-0992.ch008>>. .

TAMIZHRASI, S.; SHUKLA, A.; SHIVKUMAR, T.; RATHI, V.; RATHI, J. C. Formulation and evaluation of lamivudine loaded polymethacrylic acid nanoparticles. **Int J Pharm Technol Res**, v. 1, p. 411–415, 2009.

THOMAS, N. S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 71–79, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098702002427>>. .

TSHWEU, L.; KATATA, L.; KALOMBO, L.; SWAI, H. Nanoencapsulation of water-soluble drug, lamivudine, using a double emulsion spray-drying technique for improving HIV treatment. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 11, p. 2040, 2013. Springer.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Die Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375–386, 2006. Germany.

UNICEF; WHO. IATT paediatric ARV formulary and limited - use list: 2016 update. , 2016.

USP, U. S. P. 31–NF 26. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. **Anais...** , 2008.

VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; WILLIAMS, R. A. Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. **Advances in colloid**

and interface science, v. 113, n. 1, p. 1–20, 2005. Elsevier.

VYAS, T. K.; SHAH, L.; AMIJI, M. M. Nanoparticulate drug carriers for delivery of HIV/AIDS therapy to viral reservoir sites. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 5, p. 613–628, 2006. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1517/17425247.3.5.613>>. .

WANG, B.; CHEN, G.; MAO, Z.; et al. Preparation and cellular uptake of PLGA particles loaded with lamivudine. **Chinese Science Bulletin**, p. 1–9, 2012. Springer.

WENDLANDT, W. W. **Thermal Analysis**. 3rd ed. Wiley-Interscience, 1986.

WHO. LAMIVUDINE: Final text for addition to The International Pharmacopoeia. , 2006. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/QAS_124rev2_Lamivudine.monofINAL.pdf>. .

WHO. ZIDOVUDINE: Final text for addition to The International Pharmacopoeia. , 2007. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/QAS_077Rev3_Zidovudine_monofINAL07.pdf>. .

WHO. NEVIRAPINE: Final text for revision of The International Pharmacopoeia. (W. H. Organization, Ed.), 2009. http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/Nevirapine-Final.pdf: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/Nevirapine-Final.pdf>. .

WHO. Global health sector strategy on HIV/AIDS 2011-2015. , 2011.

WHO. Model List of Essential Medicines for Children. , 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>>. .

WHO. Progress report 2016: prevent HIV, test and treat all. , 2016a.

WHO. Global health sector strategy on HIV 2016-2021. , 2016b.

WHO. The use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. , 2016c.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257–1272, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X04000456>>. .

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 81, n. 3, p. 225–233, 2002. Netherlands.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 1, p. 65–68, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302006841>>. .

XIANG, Q.; WANG, M.; CHEN, F.; et al. Lung-targeting delivery of dexamethasone acetate loaded solid lipid nanoparticles. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 4, p. 519–525, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02980228>>. .

ZHAO, G.; HU, C.; SUN, R.; et al. Development of novel composite antioxidant multiple lipid particles from combination of W/O/W multiple emulsions and solid lipid nanoparticles. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 7, p. 1056–1065, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400398>>. .

APÊNDICE

APÊNDICE A – Compilação das formulações selecionadas e suas características físico-químicas gerais

Abaixo (**Tabela 1**) encontra-se de forma sumarizada a composição e dados do procedimento produtivo para cada uma das formulações selecionadas para os fármacos utilizados nesse trabalho: AZT, NVP e 3TC. Desta forma, facilitando a comparação entre eles no que diz respeito ao padrão de excipientes utilizados e técnicas produtivas. Bem como, imagens obtidas (**Figura 1**) durante a etapa de desenvolvimento dessas formulações e uma tabela (**Tabela 2**) com as características físico-químicas gerais para cada um dessas formulações finais.

Tabela 1. Formulações finais selecionadas para os fármacos AZT, NVP e 3TC e dados gerais das condições produtivas empregadas para cada formulação.

Componentes	NLC-AZT	M-NLC-AZT	NLC-NVP	M-NLC-NVP	NLC-3TC	MLN-3TC
Lipídio sólido	250 mg Precirol ato 5	75 mg Precirol ato 5	250 mg Precirol ato 5	75 mg Compritol	235 mg Compritol	1000 mg Compritol
Lipídio líquido	50 mg Miglyol	25 mg Miglyol	50 mg Ác oleico	25 mg Miglyol	65 mg Ác oleico	3000 mg Miglyol
Surfactante	31 mg Tween 80	158 mg Tween 80	50 mg Tween 80	150 mg Tween 80	43,6 mg Tween 80	1800 mg Span 80 e 657 mg Tween 80
Fármaco	2 mg AZT 12 mL sol.	15 mg AZT 5 mL sol.	2 mg NVP 14 mL sol.	1 mg NVP 5 mL sol.	2 mg 3TC 12 mL sol.	312 mg 3TC 5,2 mL sol.
Fase aquosa	aquosa	aquosa	aquosa. pH 8,7	aquosa. pH 8,7	aquosa. pH 7,4.	aquosa pH 7,4
Temperatura do banho ou do micrrondas	80 °C	90 °C	80 °C	90 °C	80 °C	80 a 90 °C
Tempo de sonicação ou de microondas	2 min e 20 s	10 min	10 min	1ª etapa. 10 min; 2ª etapa.- 10 min	10 min	1ª etapa: ultraturrax: 9 min a 7000 rpm, e sonicação: 4 min a 40%. Intervalo de 10 min. 2ª etapa: ultraturrax: 3 min a 3500 rpm, e sonicação: 2 min a 30 %.
Potência de sonicação	130 KHz a 50 %	potência 300 W, pressão 200 psi e agitação máxima	130 KHz a 80 %	potência 300 W, pressão 200 psi e agitação máxima	130 KHz a 40 %	
Resfriamento	À TA	Choque térmico para 70 °C e à TA	À TA	Choque térmico para 70 °C e à TA	À TA	À TA

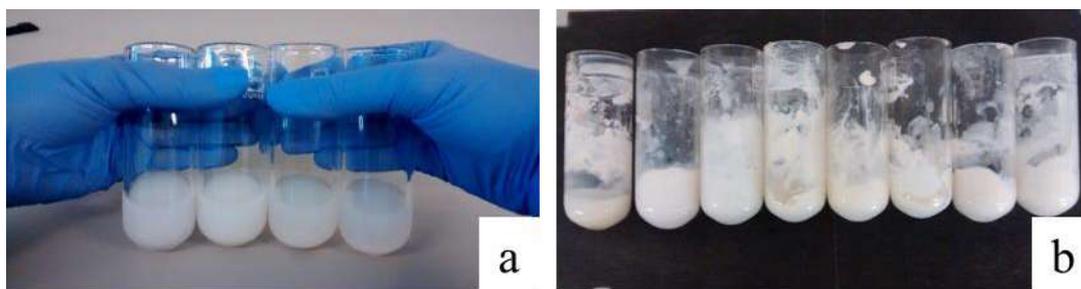


Figura 1. Imagens de formulações durante o processo de desenvolvimento. (a) formulações do tipo NLC com os 3 fármacos, (b) formulações MLN-3TC.

Tabela 2. Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, LC e EE de todas as formulações selecionadas.

Formulação	Size (nm)	Pdi	Zeta (mV)	LC (%)	EE (%)
NLC-AZT-P*	307 ± 2	0,206 ± 0,02	-35 ± 0,32	-	-
NLC-AZT	266 ± 4	0,168 ± 0,01	-29 ± 1,24	0,31 ± 0,04	44 ± 3
M-NLC-AZT-P*	85 ± 2	0,260 ± 0,01	-15 ± 2	-	-
M-NLC-AZT	113 ± 3	0,216 ± 0,01	-21 ± 0,9	1,41 ± 0,02	22 ± 2
NLC-3TC-P*	229 ± 2	0,264 ± 0,01	-43 ± 0,7	-	-
NLC-3TC	218 ± 4	0,231 ± 0,01	-44 ± 2	0,30 ± 0,01	34 ± 1
MLN-3TC-P*	426 ± 9	0,202 ± 0,01	-25 ± 0,4	-	-
MLN-3TC	450 ± 10	0,299 ± 0,01	-21 ± 2	1,08 ± 0,06	20 ± 2
NLC-NVP-P*	115 ± 4	0,255 ± 0,01	-49 ± 2	-	-
NLC-NVP	107 ± 1	0,242 ± 0,01	-41 ± 1	0,47 ± 0,05	75 ± 4
M-NLC-NVP-P*	59 ± 0,3	0,184 ± 0,01	-33 ± 1	-	-
M-NLC-NVP	69 ± 2	0,263 ± 0,01	-21 ± 2	0,20 ± 0,01	42 ± 3

Média ± desvio padrão (DP) (n = 3). * Formulações placebo.

APÊNDICE B - Pedido de Patente: Obtenção de nanopartículas lipídicas por microondas

Este é um processo produtivo desenvolvido durante este trabalho de doutorado e utilizado para obtenção das nanoformulações do tipo NLC com o fármaco AZT e com o fármaco NVP, ambos com características distintas de solubilidade. Sendo também testada com sucesso para obtenção de nanopartículas lipídicas do tipo SLN.

Esta metodologia foi alvo de pedido de patente conjunta entre as instituições Universidade do Porto (Portugal) e UFPE, pelo INPI Portugal, sob o número 109791P com vistas ao tratado de cooperação em matéria de patentes (PCT).



Campo das Cebolas - 1149-035 Lisboa - Portugal
Tel. +351 216618100 / Linha Azul. 808 200669 / Fax. +351 216675306 / Fax. +351 216660066 / E-mail. atm@inpi.pt / www.inpi.pt

Nº	CÓDIGO	DATA E HORA DE RECEÇÃO	MODALIDADE	PROCESSO RELACIONADO
20161000089276	0198	2016/12/13-16:19:21	PAT	109791 P

PAGAMENTO CONFIRMADO

1 REQUERENTES	
Código 340787 Nome UNIVERSIDADE DO PORTO Endereço PRAÇA GOMES TEIXEIRA, S/N, 4º, S. 463 Localidade PORTO Telefone 220 408 077 E-mail UPIN@REIT.UP.PT Atividade (CAE) NIF	Nacionalidade PORTUGUESA Código Postal 4099-002 Fax 220 408 378 Telemóvel
Código Nome UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE Endereço AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO Nº 1.235, CIDADE UNIVERSITÁRIA, RECIFE, PERNAMBUCO Localidade RECIFE, PERNAMBUCO Telefone +55 81 21268958 E-mail PATENTES_DINE.PROPESQ@UFPE.BR Atividade (CAE) NIF 127.044.2	Nacionalidade BR Código Postal (CEP) 50670-901 Fax

APÊNDICE C - Doseamento simultâneo de 3TC, AZT e NVP por *high performance liquid chromatography* (HPLC)

Um método pré estabelecido na literatura para doseamento simultâneo da 3TC, AZT, e NVP por HPLC (LAVRA et al., 2008) foi reproduzido aplicando-se ferramentas de planejamento fatorial. Fatores reconhecidamente críticos ao método HPLC foram selecionados. Este estudo visou ampliação do conhecimento da contribuição destes fatores e suas interações para as respostas de interesse. Com isso, adquiriu-se maior domínio do método que permitirá ajustes finos diante a uma possível formulação associação de dose fixa (ADF) com as nanoformulações desenvolvidas.

INTRODUÇÃO

Técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC da língua inglesa), destacam-se na química analítica pela capacidade de realizar análises quali-quantitativas em amostras farmacêuticas, sendo frequentemente utilizadas para determinação de fármacos em formulações farmacêuticas, especialmente nas que contêm mais de um constituinte ativo (RIBANI et al., 2004; KAPOOR et al., 2006).

O desenvolvimento de método analítico capaz de detectar e dosear simultaneamente mais de um composto químico apresenta maiores dificuldades, porém se faz necessário em casos associações dose fixa combinada (ADF) (MISHAL; SOBER, 2005; GROSA et al., 2006).

De todos os fatores mais influentes, os parâmetros críticos para a maioria das separações em HPLC são tempo de gradiente, temperatura, pH da fase aquosa e composição total da fase móvel e a fase estacionária (HORVATH et al., 1977).

MATERIAIS

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® equipado com bomba binária LC – 10 ADVP, auto-injetor SIL – 10 ADVP, detector UV SPD – 10 AVP, controlador de sistema SCL – 10 AVP e forno para coluna CTO – 10 ASVP. As colunas utilizadas neste estudo foram: coluna C18 (Waters®), 250 x 4,6 mm, partícula 5 µm, mantidas a 20 ± 3 °C. A fase móvel utilizada foi solução tampão fosfato 0,05M e acetonitrila (v:v) grau HPLC. pH da fase móvel ajustada com ácido fosfórico 85%. Espectrofotômetro UV (Cary 50 Varian®) no comprimento de onda selecionado de 270 nm. Volume de injeção de 20 µL. Foi utilizado o software Statistica 8.0 (Statsoft®, Inc.) foi empregado para fazer a matriz experimental, análises estatísticas - como ANOVA com $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos e para fazer os gráficos. Os fármacos utilizados e a proporção fixada foi 1 3TC (Northeast® lote 00019, teor 100.47%) : 1 AZT (Ítaca® lote HVZ0210304, teor 100.0%) : 0,25 NVP (cedida por Farmanguinhos - Brasil, teor 101%).

MÉTODO

Trabalho prévio é descrito de desenvolvimento e validação de metodologia analítica por HPLC para doseamento simultâneo dos fármacos lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada (LAVRA et al., 2008). Portanto, foi replicada a metodologia analítica descrita nesse trabalho com a seguinte coluna: C18 (250 x 4,6mm. Partícula 5µm).

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central e em réplica para cada ensaio, sendo um total de 20 ensaios randomizados. Através de uma análise crítica foram selecionados três fatores (variáveis) de interesse e seus níveis inferior (-) e superior (+), como pode ser visualizado na **Tabela 1** abaixo. Acredita-se, dentre vários outros fatores, que estes possam influenciar nos ensaios de HPLC de forma mais evidenciada para as respostas a serem analisadas pelo planejamento experimental em questão.

Tabela 1. Fatores e níveis selecionados no planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central

Fatores	Níveis			(
	(-)	0	(+)	
pH fase móvel	3,0	3,5	,0	4
Fase móvel	60:4	65:3	7	0
Fluxo (mL/min)	1,00	1,25	,50	1

Os fatores de saída de interesse, ou seja, as respostas selecionadas a serem analisadas foram:

- Resolução (R) entre os picos do 3TC-AZT e do AZT-NVP sempre maiores que 2.
- Fator de assimetria de cada pico do cromatograma (TF). A técnica de cromatografia estabelece o valor ideal de 1 (perfeita simetria do pico). Com isso, este estudo objetivou o valor de 1, ou mais próximo de 1, para esta resposta de cada pico.
- Tempo de retenção do último pico (TR). O último pico é o da NVP. Portanto equivale ao tempo total de cada ensaio. Assim, este estudo objetivou o menor tempo possível.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise geral resultante do planejamento realizado, podemos observar que condições ótimas experimentais são relativas para cada uma das respostas consideradas.

Por essa razão, para a resposta resolução entre os picos 3TC e AZT (R-3TC/AZT) foi evidenciado que obtinha a maior resolução entre estes picos cromatográficos quando os

fatores significativos se apresentavam nos níveis: composição da fase móvel (FM +), ou seja, 70:30, enquanto o fluxo da fase móvel estava no nível (Fluxo -), ou seja, 1,0 mL/min (**Figura 1 e Figura 2**).

O mesmo foi constatado para resposta R-AZT/NVP. Portanto, estes fatores são significativos e com indicação dos mesmos níveis quando se trata de resolução entre os picos. Em caso de ser necessária uma melhora entre as resoluções desses picos, pode-se aumentar o nível da fase móvel e/ou reduzir o fluxo. Sendo que qualquer influencia no fator FM tende a influenciar mais nessas respostas, pois o efeito principal FM foi bem maior que o efeito principal Fluxo para ambas as respostas (**Figura 3 e Figura 4**).

As condições ótimas observadas para a resposta (TR-NVP), tempo de retenção do último pico, apresentou os mesmos fatores significativos que as respostas R-3TC/AZT e R-AZT/NVP, porém com os níveis invertidos. Ou seja, para uma maior redução do tempo total da análise a indicação é: FM (-) e fluxo (+), em valores absolutos, FM 60:40 e fluxo de 1,5 mL/min (**Figura 5 e Figura 6**).

Para a resposta fator de assimetria dos picos (TF-AZT e TF-NVP), não foi evidenciado, na região experimental adotada, nenhum dos fatores nem interações como significativos. Contudo, para a resposta TF-3TC, dois fatores foram considerados estatisticamente significativos, são eles: FM (+) e pH (+), todavia com valores modulares muito baixos. Assim, essas respostas não foram consideradas para qualquer indicação de melhoria desta metodologia.

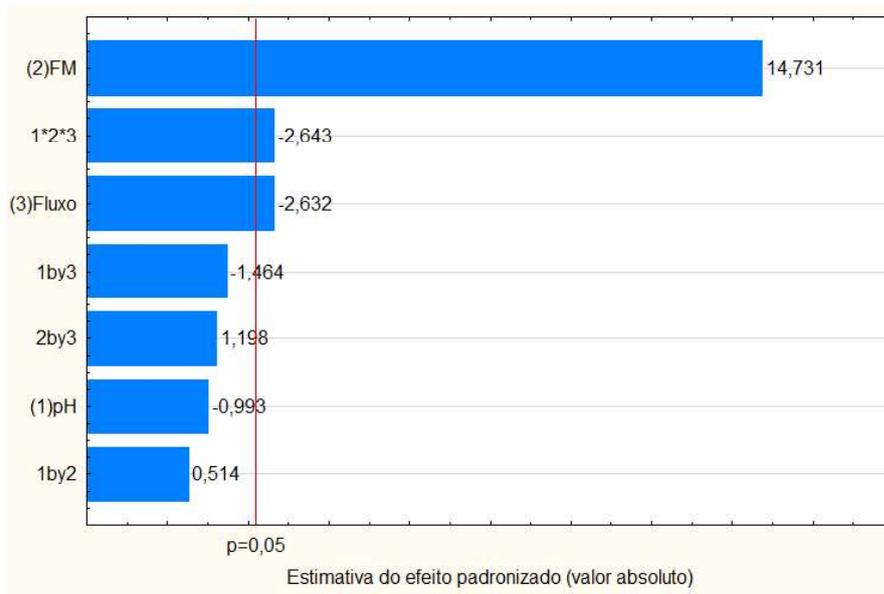


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a resposta R-3TC/AZT.

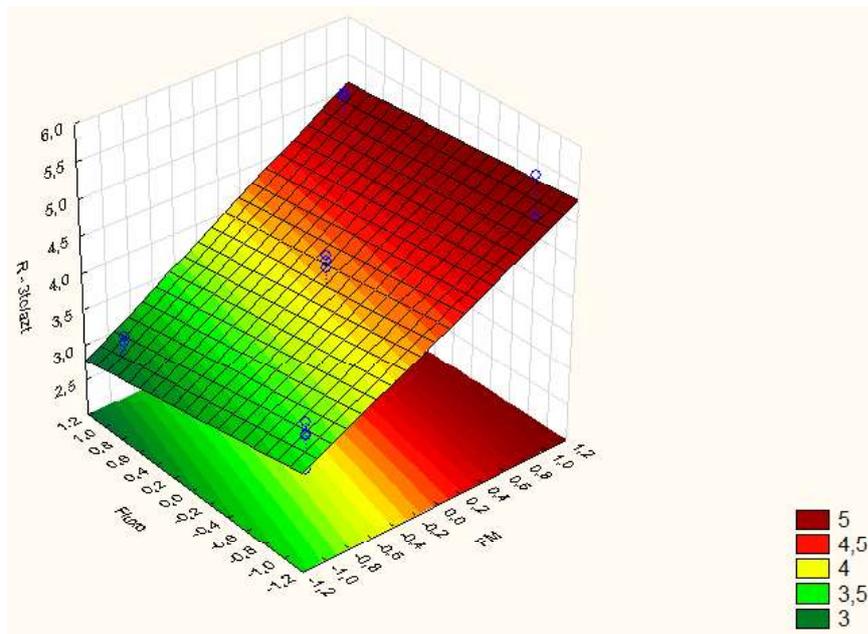


Figura 2. Gráfico superfície de resposta para a resposta R-3TC/AZT.

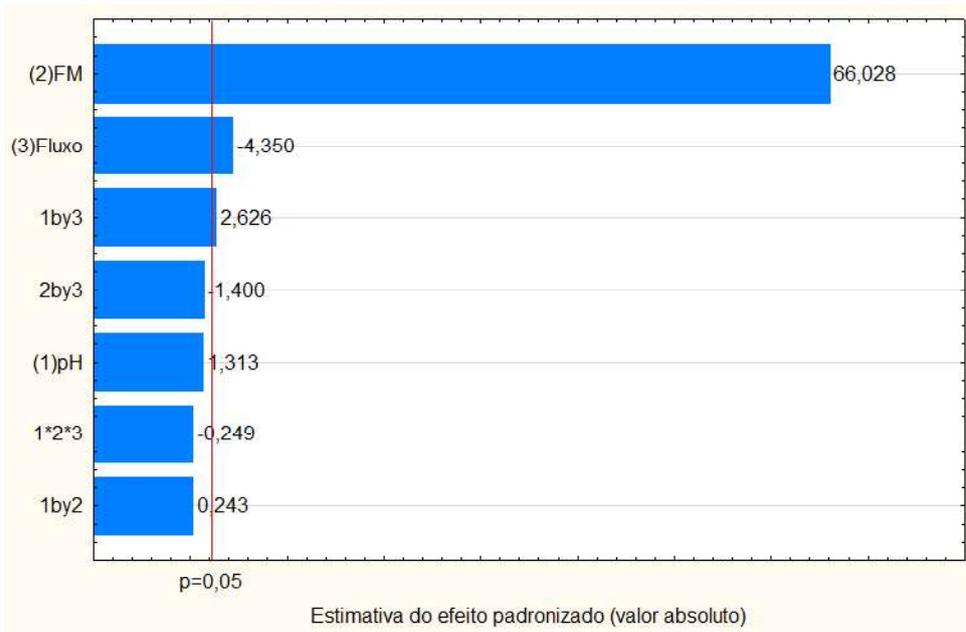


Figura 3. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a resposta R-AZT/NVP.

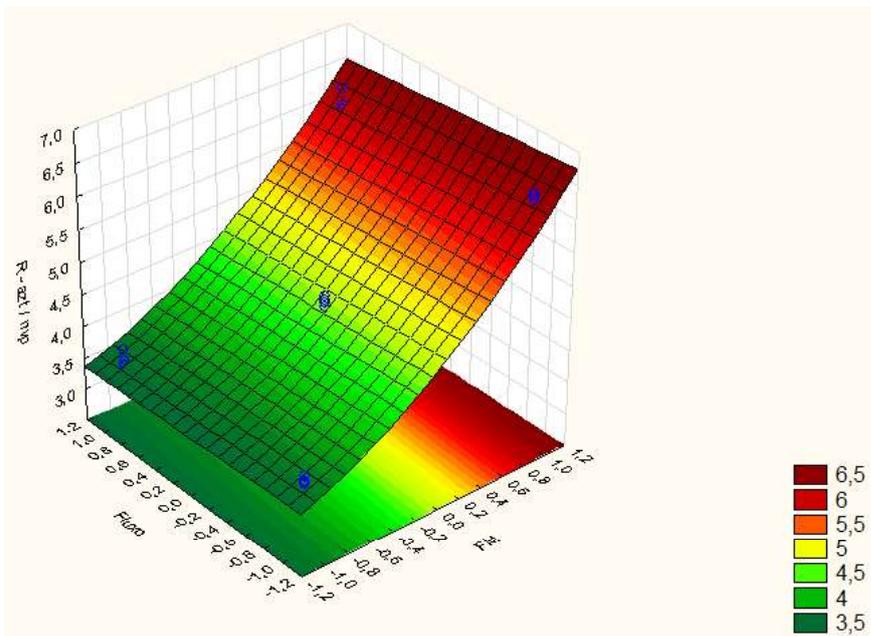


Figura 440. Gráfico superfície de resposta para a resposta R-AZT/NVP.

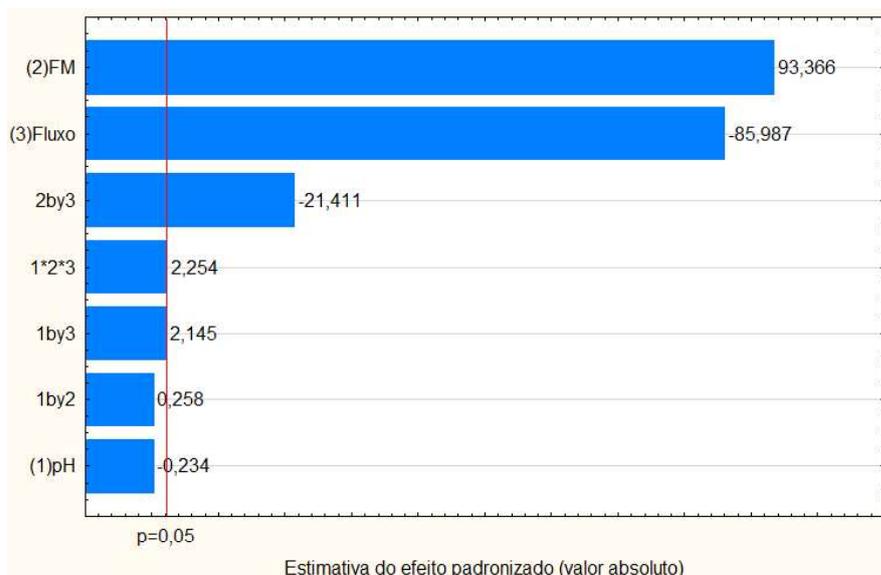


Figura 5. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a resposta TR-NVP.

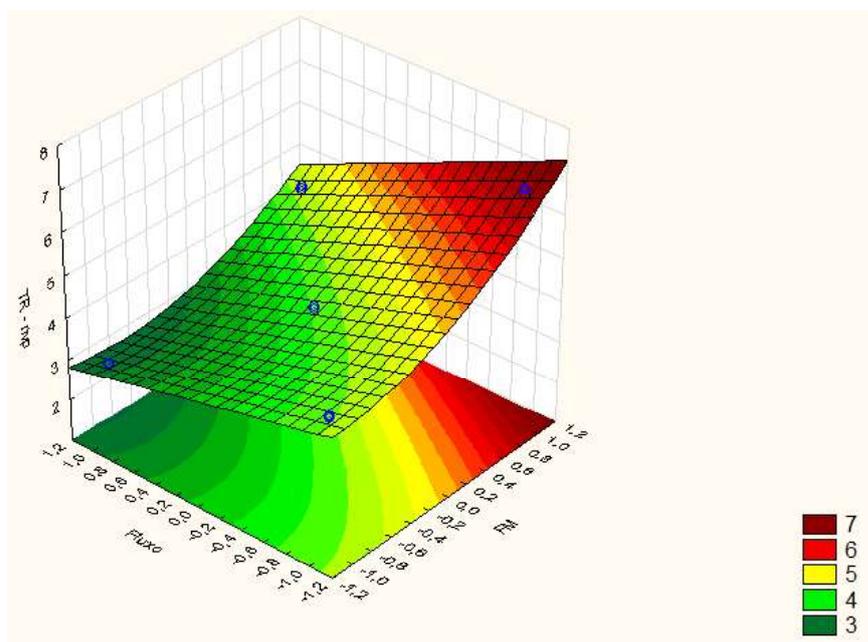


Figura 6. Gráfico superfície de resposta para a resposta TR-NVP.

Diante o estudo realizado este método de doseamento por HPLC, para os três fármacos associados, foi melhor compreendido e identificado fatores e níveis que podem ou não interferir de forma significativa nas condições avaliadas. Assim, foi evidenciado que o fator

composição da fase móvel é o mais crítico para as respostas consideradas. Das respostas analisadas, ambas as resoluções entre picos foram escolhidas como respostas prioritárias.

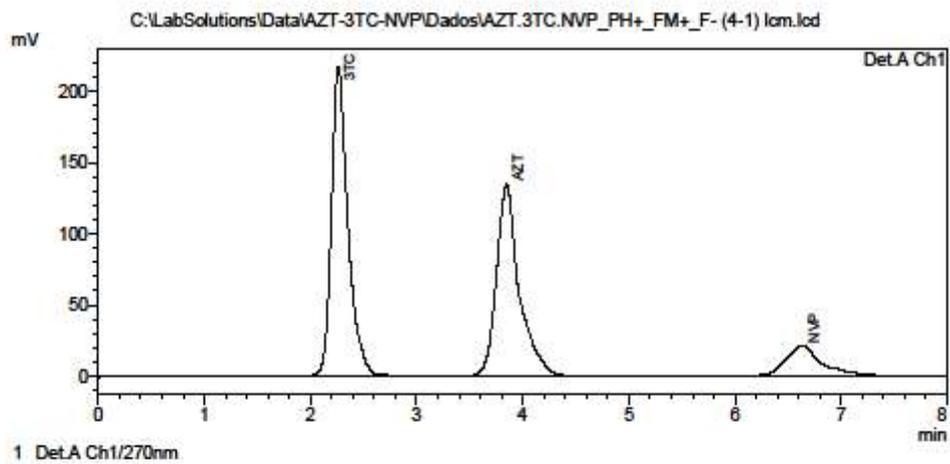
Com isso, a indicação fornecida através desse estudo direciona que sejam utilizadas o nível superior da composição da fase móvel, por ser o efeito de maior impacto para essas respostas, bem como o fluxo no nível inferior e o pH, embora não significativo, será fixado no nível superior devido a análise cúbica indicar este nível com obtenção de melhores respostas **(Figura 7)**.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\AZT-3TC-NVP\Dados\AZT.3TC.NVP_PH+_FM+_F-(4-1).lcm.lcd

Acquired by : Admin
 Sample Name : AZT.3TC.NVP_PH+_FM+_F-(4-1)
 Sample ID : AZT.3TC.NVP_PH+_FM+_F-(4-1)
 Vial # :
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : AZT.3TC.NVP_PH+_FM+_F-(4-1).lcm.lcd
 Method File Name : AZT-3TC-NVP.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 12/3/2014 8:44:06 PM
 Data Processed : 12/4/2014 2:17:58 PM

<Chromatogram>



Peak Table					
Detector A Ch1 270nm					
Name	Area	Resolution	Tailing Factor	Ret. Time	
3TC	2356629	0.000	1.417	2.258	
AZT	1991177	5.034	1.387	3.845	
NVP	510166	6.256	1.379	6.632	
	4857971				

C:\LabSolutions\Data\AZT-3TC-NVP\Dados\AZT.3TC.NVP_PH+_FM+_F-(4-1).lcm.lcd

Figura 7. Cromatograma com as condições melhores indicadas pelo *experimental design*

APÊNDICE D - Estudo de interação fármaco-fármaco

Foi realizado inicialmente um estudo de interação entre os fármacos deste projeto, como parte do estudo de pré-formulação, diante a uma possível formulação de associação de dose fixa (ADF) com as nanoformulações desenvolvidas.

INTRODUÇÃO

A análise térmica é um conjunto de técnicas em que uma propriedade física de uma substância e / ou dos seus produtos de reação é medido em função da temperatura, enquanto esta substância está sujeita a um programa de temperatura controlada (WENDLANDT, 1986; RAJU, P. NARAYANA; PRAKASH, K.; NARASU, 2009).

A análise térmica fornece ferramentas eficientes para a medição de propriedades termodinâmicas fundamentais como a entalpia, capacidades de calor e temperaturas de transições de fase (GRANGEIRO, 2011).

Técnicas termoanalíticas produzem resultados rápidos e reproduzíveis, são amplamente utilizadas nas ciências farmacêuticas para a caracterização de fármacos e excipientes. Aumentando a probabilidade de medicamentos serem desenvolvidos com a qualidade necessária a manter sua eficácia e segurança.

As principais aplicações de análise térmica na área farmacêutica incluem a caracterização de materiais, solvatos, hidratos, polimorfos, formas determinação de estudo de compatibilidade de pureza, interações entre fármacos e de fármaco / excipiente, estabilidade térmica e cinética (GIRON, 1999; BRUNS, 2005).

O Estudo de interação fármaco-fármaco no estado sólido é uma etapa fundamental no desenvolvimento de formas de dosagem sólidas em associações de dose fixa (ADF). As interações ocorridas entre as moléculas dos fármacos podem ser de ordem física e/ou química

determinadas ou não como incompatibilidades. Tais interações podem alterar a estabilidade e/ou biodisponibilidade dos fármacos, bem como, podem alterar as proporções e/ou velocidades de dissolução, influenciando a segurança e eficácia clínica do produto ADF (SOARES, 2011).

As reações físicas no estado sólido incluem transições polimórficas, formação de solvatos de diferentes estequiometrias; formação de formas solvatadas e não solvatadas, além de transições físicas de formas amorfas e cristalinas (BYRN et al., 1999). Dois tipos de interações químicas têm sido descritas entre fármaco-fármaco, as que correspondem as interações químicas intrínsecas da degradação dos fármacos, como hidrólise, oxidação e fotólise, mas sem grandes reações químicas covalentes; e as correspondentes à reações covalentes entre os fármacos (WENDLANDT, 1986).

Dentre técnicas termoanálíticas mais utilizadas estão a Termogravimetria (TG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

DSC é uma das técnicas bem estabelecidas na detecção de incompatibilidade entre fármacos e entre fármaco / excipiente. Tornou-se a técnica de primeira escolha na indústria farmacêutica para estudo de compatibilidade (SINGH; NATH, 2011).

Esta técnica envolve a aplicação de um sistema de aquecimento ou de resfriamento para medir variações de temperatura e de energia de uma amostra com relação a uma referência. Quando a amostra sofre um evento térmico, a diferença de fluxo de calor para uma amostra e a referência é monitorada em função do tempo e temperatura, enquanto a temperatura é programada numa atmosfera específica. Conseqüentemente, a temperatura e a energia associada a vários eventos térmicos como fusão, reações de oxidação e redução, de transição vítrea, ebulição, sublimação, decomposição, cristalização ou gel para a transição de cristal líquido pode ser avaliada. Quando tais eventos são avaliados para as misturas de fármacos e excipientes, possíveis interações podem ser discernidos (FORD, JAMES L.; TIMMINS, 1989; GIRON, 1999; BRUNS, 2005; RAJU, P. NARAYANA; PRAKASH, K.; NARASU, 2009).

Para estudo de compatibilidade, o uso de DSC interpreta as variações na temperatura de fusão associadas a entalpia como indicação de interação (SOARES, 2011). A presença de

formas polimórficas é sugerido por uma única endotérmica de fusão agudo diferente da amostra original em DSC e nenhuma perda de massa em TG (CHADHA et al., 2013).

TG é uma técnica de análise térmica em que a variação da massa da amostra é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa de temperatura controlada. Fornece informações sobre a composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo final. Dessa forma, permite determinar a temperatura em que os materiais começam a se decompor, além de proporcionar acompanhamento de reações de desidratação, oxidação, combustão e decomposição. Em termogravimetria derivada, a derivada da mudança da massa é registada como uma função do tempo (t) ou a temperatura (T), assim: dm / dt ou dm / dT . Em qualquer dos casos, a curva resultante é a primeira derivada da curva de TG, dando uma série de picos, em vez de uma curva (WENDLANDT, 1986).

Um patamar horizontal nas curvas TG dá um patamar horizontal correspondente na curva DTG porque $dm / dt = 0$. Um máximo na curva de DTG é obtido quando a curva TG tem um ponto de inflexão em que a massa está sendo perdida mais rapidamente (WENDLANDT, 1986).

MATERIAIS E MÉTODOS

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Avaliou-se o processo de fusão dos fármacos isolados, bem como, das misturas físicas binárias e ternária dos três fármacos: 3TC (Northeast® lote 00019, teor 100.47%), AZT (Ítaca® lote HVZ0210304, teor 100.0%) e NVP (cedida por Farmanguinhos - Brasil, teor 101%). Amostras de misturas físicas sólidas com 5mg foram colocadas em porta amostra de alumínio e aquecido até 300 °C, pois o ponto de fusão dos 3 fármacos são inferiores a 300 °C. As análises foram realizadas com razão de aquecimento (β) de 10 °C/min (SOARES, 2011; SILVA, DA et al., 2014; ROLIM et al., 2015). O Nitrogênio foi utilizado como gás de purga a uma taxa de fluxo de 50 mL/min. A calibração da amostra foi realizada com amostra de Índico e Zinco.

Termogravimetria (TG)

Avaliou-se a decomposição térmica dos fármacos isolados, bem como, das misturas físicas binárias e ternária dos três fármacos. Amostras de misturas físicas sólidas com 8mg foram colocadas em porta amostra de platina e aquecidas até 500 °C em termobalança, pois todos os 3 fármacos analisados apresentam seus principais eventos até antes de 500 °C (ARAÚJO et al., 2003; GRANGEIRO et al., 2006; BEDSE et al., 2009; OLIVEIRA, DE et al., 2013). As análises foram realizadas com razão de aquecimento de 10 °C/min (SOARES, 2011; CHAVES et al., 2013; SILVA, DA et al., 2014; ROLIM et al., 2015). Nitrogênio foi usado como gás de purga, com 60% de sua distribuição destinada à amostra e 40% à balança.

RESULTADOS E DICUSSÃO

Pode-se sugerir a ocorrência de interações apenas de natureza física entre os 3 fármacos associados. Não sendo possível confirmar qualquer interação de natureza química – como oxidação ou hidrólise - pelos dados obtidos, sendo necessário para esta finalidade análises adicionais e complementares (**Quadro 1**). Sem tais confirmações, as interações não podem ser associadas a incompatibilidades, podendo até serem consideradas vantajosas.

Assim, para a mistura física ternária o DSC revelou que a AZT teve o seu evento exotérmico antecipado, indicando possível aumento de sensibilidade térmica quando associado ao 3TC e NVP, enquanto que a 3TC apresentou-se com seu evento exotérmico praticamente indetectável, sugerindo que este fármaco fique miscível ao AZT (este perfil também foi observado na mistura binária AZT + 3TC). Enquanto a NVP tem seu pico característico na área dos eventos de decomposição da AZT e 3TC, entretanto ainda o evento exotérmico de decomposição da AZT também teve início um pouco antecipado e coincidente com o Tonset da NVP em 237 °C. Vale ressaltar que a NVP teve seu evento exotérmico antecipado quando associado a 3TC, entretanto esse comportamento não foi observado na mistura ternária (**Figura 1**).

Quanto ao TG da mistura ternária sugere-se três decaimentos onde a soma destes representa uma perda total de 63,8%, sendo essa faixa total mais alargada que quando comparada aos fármacos isolados ou em mistura binária (Figura 2 e Figura 3).

Quadro 1. Principais eventos de DSC e os T onset de TG para os fármacos AZT, 3TC, NVP e suas possíveis combinações.

X	DSC									TG		
	1° evento			2° evento			3° evento			1° evento	2° evento	3° evento
	Tonset °C	Tenset °C	ΔH	Tonset °C	Tenset °C	ΔH	Tonset °C	Tenset °C	ΔH	Tonset °C	Tonset °C	Tonset °C
AZT	117,43	129,37	-83,30 J/g	189,33	243,28	466,45 J/g	243,28	286,85	-148,32 J/g	187,83	247,19	NA
3TC	166,7	179,2	-108,81 J/g	194,09	210,25	13,11 J/g	Decomposição a partir 210	NA	NA	216,48	NA	NA
NVP	237,16	247,26	-122,92 J/g	245	320	Eventos de decomposição	NA			222,04	NA	NA
AZT + 3TC	109,71	123,58	-45,88 J/g	140,1	160,13	-3,54 J/g	160,13	179,31	14,75 J/g	197,57	249,04	NA
AZT + NVP	116,76	125,72	-48,54 J/g	156,66	245,99	Eventos de decomposição AZT	245,99	286,56	Decomposição AZT e fusão da NVP	197,25	274,29	287,33
3TC + NVP	167,07	177,72	-57,75 J/g	200,42	222,69	20,24 J/g	222,69	233,48	-11,17 J/g	216,16	NA	NA
AZT + 3TC + NVP	104,99	117,02	-25,50 J/g	134,85	158,62	-2,64 J/g	160,75	173,34	6,36 J/g	200,53	257,86	322,12

NA (não se aplica)

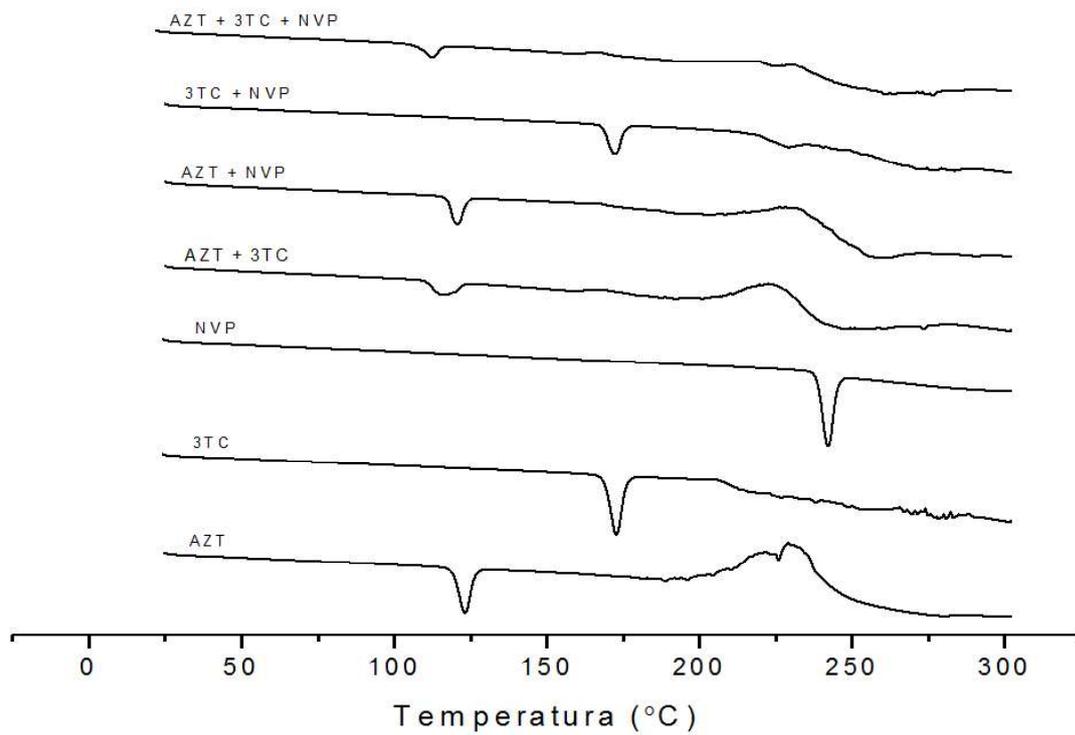


Figura 1. DSC dos fármacos AZT, 3TC, NVP e suas possíveis combinações.

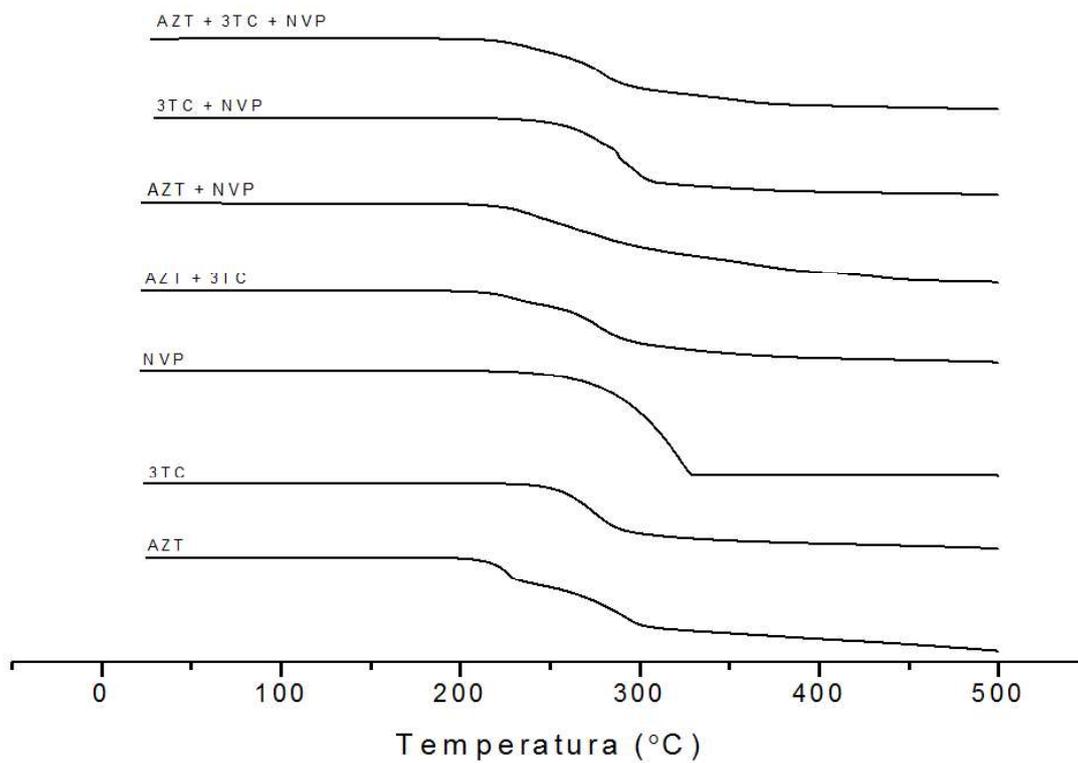


Figura 2. TG dos fármacos AZT, 3TC, NVP e suas possíveis combinações binária e ternária.

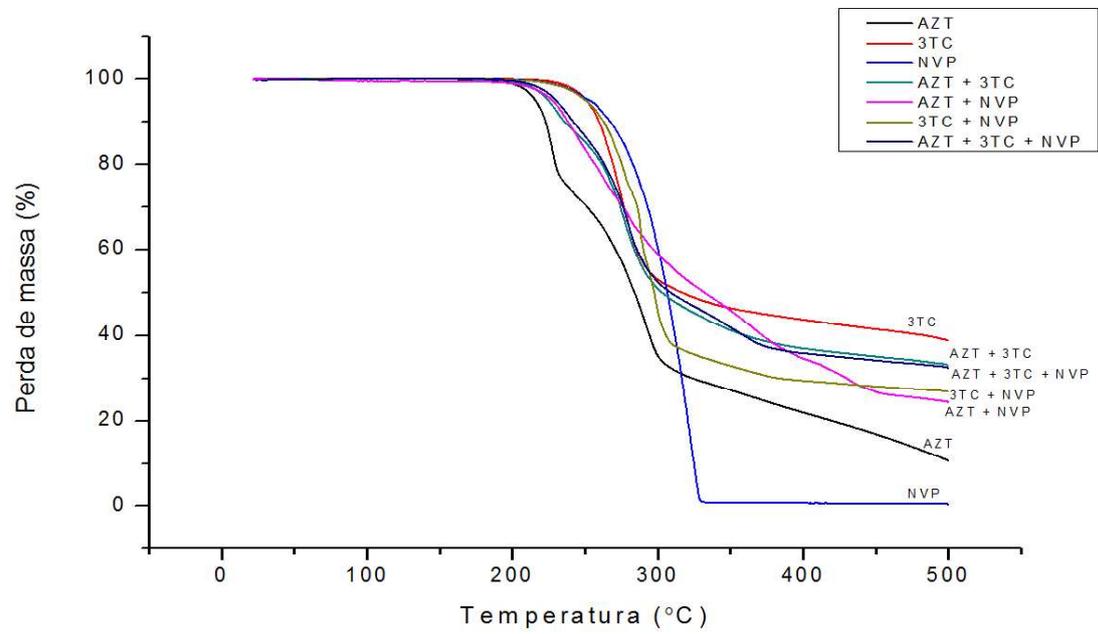


Figura 3. TG dos fármacos AZT, 3TC, NVP e suas possíveis combinações binária e ternária.

APÊNDICE E - Trabalhos publicados em revistas internacionais durante os anos de 2014 e 2015 referentes a química medicinal, ainda fruto do trabalho de mestrado.

MedChemComm



CONCISE ARTICLE

View Article Online
View Journal | View Issue

1 March 2014. Downloaded by University of Prince Edward Island on 25/10/2014 16:52:07.

Cite this: *Med. Chem. Commun.*, 2014, 5, 758

Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties

Lucas Cunha Duarte Coêlho,^a Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso,^a Diogo Rodrigo Magalhães Moreira,^a Paulo André Teixeira de Moraes Gomes,^a Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti,^a Arsenio Rodrigues Oliveira,^a Gevanio Bezerra de Oliveira Filho,^a Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira,^a Miria de Oliveira Barbosa,^a Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba,^b Teresinha Gonçalves da Silva,^b Belinda Kaskow,^c Mahdad Karimi,^c Lawrence J. Abraham^d and Ana Cristina Lima Leite^{*a}

Received 19th February 2014
Accepted 28th March 2014

DOI: 10.1039/c4md00070f

www.rsc.org/medchemcomm

Modulation of the immune system is an emerging concept in the control of tumor growth. Bearing in mind the pharmacological properties of thalidomide and its phthalimide derivatives, we describe here the structural design, synthesis and pharmacological evaluation of *N*-acylhydrazones derived from phthalimide. The ability of these *N*-acylhydrazones in inhibiting the secretion of TNF- α in stimulated cells as well as in inhibiting the transcription of the TNF- α gene was evaluated. We identified *N*-acylhydrazones **6b** and **9c**, which substantially impaired TNF- α secretion, expression and reduced IL-1 β production similar to thalidomide or Revlimid. *N*-Acyldhydrazone **9c** was also able to induce apoptosis in Jurkat cells, however it does not have either antiproliferative properties or cytotoxicity for mouse splenocytes. Beyond that, we have assayed the ability of these compounds to induce cell death and a number of them are able to induce apoptosis.

Accepted Manuscript

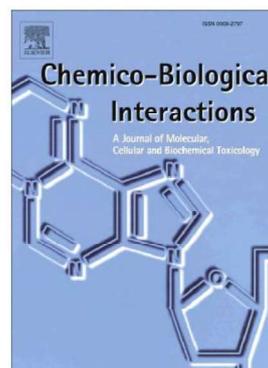
Improvement of *in vivo* anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives

Patrícia Marçal da Costa, Marcília Pinheiro da Costa, Adriana Andrade Carvalho, Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso, Gevânio Bezerra de Oliveira Filho, Daniel de Araújo Viana, Francisco Vagnaldo Fechine-Jamacaru, Ana Cristina Lima Leite, Manoel Odorico de Moraes, Claudia Pessoa, Paulo Michel Pinheiro Ferreira

PII: S0009-2797(15)30012-0
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.037>
Reference: CBI 7412

To appear in: *Chemico-Biological Interactions*

Received Date: 15 March 2015
Revised Date: 22 June 2015
Accepted Date: 26 June 2015



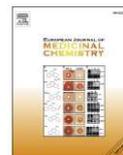
Please cite this article as: c.M.d. Costa, M.P.d. Costa, A.A. Carvalho, S.M.T. Cavalcanti, M.V.d. Cardoso, n.B.d. Filho, D.d.A. Viana, F.V. Fechine-Jamacaru, A.C.L. Leite, M.O.d. Moraes, C. Pessoa, P.M.P. Ferreira. Improvement of *in vivo* anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives, *Chemico-Biological Interactions* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.037>



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Original article

Design, synthesis and structure–activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities



Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso ^{a,*}, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira ^a,
Gevanio Bezerra Oliveira Filho ^a, Suellen Melo Tiburcio Cavalcanti ^a,
Lucas Cunha Duarte Coelho ^a, José Wanderlan Pontes Espíndola ^a, Laura Rubio Gonzalez ^a,
Marcelo Montenegro Rabello ^a, Marcelo Zaldini Hernandez ^a,
Paulo Michel Pinheiro Ferreira ^b, Cláudia Pessoa ^{c,d}, Carlos Alberto de Simone ^e,
Elisalva Teixeira Guimarães ^{f,g}, Milena Botelho Pereira Soares ^g, Ana Cristina Lima Leite ^a

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Biofísica e Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, PI, Brazil

^c Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil

^d Fundação Oswaldo Cruz, 60180-900, Fortaleza, CE, Brazil

^e Departamento de Física e Informática, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

^f Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, 41150-000, Salvador, BA, Brazil

^g Hospital São Rafael, 41253-190, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2014

Received in revised form

15 April 2015

Accepted 18 April 2015

Available online 20 April 2015

Keywords:

Phthalimide

Thiosemicarbazone

Thiazole

Thiazolidinone

Antiproliferative

Immunosuppressive

ABSTRACT

The present work reports the synthesis and evaluation of the antitumour and immunomodulatory properties of new phthalimides derivatives designed to explore molecular hybridization and bioisosterism approaches between thalidomide, thiosemicarbazone, thiazolidinone and thiazole series. Twenty-seven new molecules were assessed for their immunosuppressive effect toward TNF α , IFN γ , IL-2 and IL-6 production and antiproliferative activity. The best activity profile was observed for the (6a–f) series, which presents phthalyl and thiazolidinone groups.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

ANEXO

ANEXO A - Participação no 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica (EBIT).



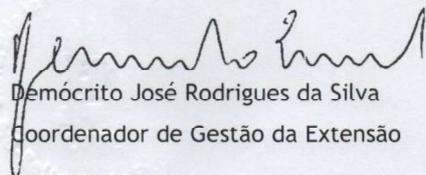
ANEXO B - Projeto de extensão “Palavra de Qualidade” do laboratório NCQMC – UFPE.



DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que **Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti**, participou como Apoio Técnico Operacional no projeto de extensão “Palavra de Qualidade”, registrado no Sistema de Informação e Gestão de Projetos, protocolo SIGProj n° 48902.158845.612.149961.23102014, coordenado por Monica Felts de La Roca Soares, SIAPE n° 1666877, no período de 01 de agosto de 2013 a 31 de julho de 2014, com carga horária total de 384 horas, conforme informações no relatório final.

Recife, 18 de novembro de 2014.


Demócrito José Rodrigues da Silva
Coordenador de Gestão da Extensão

ANEXO C - Monitora na disciplina “Gerenciamento da qualidade na fabricação de produtos (*in-process control*)” do curso de especialização *latu sensu* de Inovação Tecnológica e formação qualificada Farma-Biotec em 2014, parceria UFPE, Uninovartis e PPGIT.



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO



CERTIFICADO

Certificamos que

SUELLEN MELO TIBÚRCIO CAVALCANTI

exerceu monitoria na disciplina “Gerenciamento de Qualidade na Fabricação de Produtos” do **Curso de Especialização *latu sensu* Inovação Tecnológica e Formação Qualificada Farma-Biotec** durante o período de Outubro e Novembro de 2014, perfazendo a carga horária total de 30 horas.

Maira Galdino da Rocha Pitta

Coordenadora do Curso de Especialização *latu sensu*
Inovação Tecnológica e Formação Qualificada Farma-Biotec

ANEXO D - Estágio a docencia na disciplina “controle de qualidade físico-químico” do curso de graduação em ciências farmacêuticas da UFPE em 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Av. Prof. Moraes Rego 1235 | Cidade Universitária | CEP 50.670-901 | Recife - PE
Fone/Fax: (81) 2126.8947 | <http://www.ufpe.br/ppgit>

D E C L A R A Ç Ã O

Declaramos para os devidos fins que **Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti Duarte Coelho** cursou **PIT-912 Estágio de Docência**, na disciplina Controle de Qualidade Físico-Químico do Departamento de Ciências Farmacêuticas, no 2º semestre de 2014, com carga horária de 30 horas (02 créditos), tendo obtido o conceito final A.

Recife, 19 de junho de 2017

Maira G.R. Pitta

Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta
Centro de Ciências Biológicas/UFPE
Coordenadora do PPG em
Inovação Terapêutica
SIAPE: 1796964

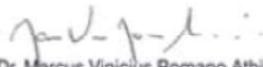
ANEXO E - Trabalho apresentado no XVIII Congresso da Federação Farmacéutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas em 2015.

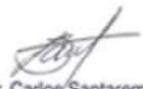


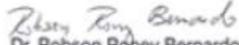
CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico **AUSÊNCIA DE PADRÃO DE REFERÊNCIA PARA OS 50 FÁRMACOS MAIS COMERCIALIZADOS NO BRASIL: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA**, autores **ERIKA SABRINA LIMA DE SOUZA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO); SUELLEN MELO TIBÚRCIO CAVALCANTI (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO); MARCIANA SOCORRO FERREIRA CORDEIRO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO); JOSÉ LAMARTINE SOARES SOBRINHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO); MÔNICA FELTS DE LA ROCA SOARES (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO)**, foi apresentado no XVIII Congresso da Federação Farmacéutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas, com carga horária de 28 horas, que abordou como tema "A prescrição farmacêutica e os novos paradigmas da profissão" e teve como eixo central "Atuação clínica do farmacêutico", de 15 a 17 de outubro de 2015, no Centro de Convenções SulAmérica, no Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2015.


Dr. Marcus Vinicius Romano Athila
Presidente do CRF-RJ


Dr. Carlos Santarem
Presidente do Congresso


Dr. Robson Rohey Bernardo
Presidente da Comissão Científica



ANEXO F - Apresentação oral de traballo no no XXI Encontro Galego-Portugues de Química em 2015.



Pazo da Cultura de Pontevedra
18 al 20 de novembro de 2015
Pontevedra - España

Dña. Suellen Cavalcanti, ha participado en el *XXI Encontro Galego-Portugués de Química*, celebrado en el Pazo da Cultura de Pontevedra (España), del 18 al 20 de noviembre de 2015, presentando la comunicación en formato Oral "*Desenvolvimient de Nanopartículas Lípidicas de NVP por Aplicação de QbD*"

Para que conste y a los efectos oportunos, se expide el presente documento.

En Vigo, a 18 de noviembre de 2015



A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by a smaller 'u' and a horizontal line.

Comisión Organizadora

