



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MYLA LÔBO DE SOUZA

**CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA DE USO ORAL CONTRA
A LEISHMANIOSE**

Recife

2022

MYLA LÔBO DE SOUZA

**CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA DE USO ORAL CONTRA
A LEISHMANIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Souza, Myla Lôbo de

Carreador lipídico nanoestruturado contendo antimoniato de meglumina como alternativa terapêutica de uso oral contra a Leishmaniose / Myla Lôbo de Souza– 2022.

188 f. : il., fig., tab.

Orientador: Pedro José Rolim Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Leishmaniose 2. Nanopartículas 3. Testes de toxicidade I. Rolim Neto, Pedro José (orient.) II. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -240

MYLA LÔBO DE SOUZA

**CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA DE USO ORAL CONTRA
A LEISHMANIOSE**

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

Aprovado em 25/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dra. Monica Felts, De La Roca Soares (membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dra. Ivone Antônia de Souza (membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior (membro externo)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof.^a. Dra. Marcelo Montenegro Rabello (membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Sempre fui grata à Deus por todas as pessoas incríveis que entraram na minha vida e caminharam comigo em algumas (ou todas) jornadas. Durante o doutorado, recebi o apoio de várias pessoas, que tornaram essa caminhada árdua em momentos mais leves, e me incentivaram a seguir em frente.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família. São meu porto seguro e minha fortaleza, com quem sei que sempre poderei contar. À minha vó, nossa matriarca, motivo maior pelo qual nossa família se mantém unida, fonte das minhas melhores lembranças da infância e do coração apertado de saudade sempre me cobra para voltar pra casa. À minha mãe, que se virou sozinha para sustentar e educar dois filhos, que nunca mediu esforços para que nós pudéssemos realizar nossos objetivos, sempre apoiando. Ao meu irmão Alan, minha inspiração de professor, que ao saber do meu interesse pela vida acadêmica, está sempre me apoiando e aconselhando. Meus tios e tias, os quais deram suporte à minha mãe para que tivéssemos uma boa infância e incentivaram nossos estudos. Com destaque à Genilton, nos dá apoio em tudo; Ivon, que desde a graduação me auxilia e até faz experimentos comigo, me socorrendo em todos os perrengues de química; e Bill, o maior entusiasta da minha vida de farmacêutica. Também às minhas primas Luara, Jéssica e Paula, que me propiciam os momentos de descontração e alegria quando estou em casa. A todos vocês, o meu amor e gratidão!

À Alex, meu companheiro de vida e melhor amigo, sempre a primeira pessoa com quem compartilho tudo, agradeço o incentivo, apoio, paciência, compreensão, atenção, amor, carinho e tudo mais que tem compartilhado comigo nesses oito anos, principalmente a paciência enorme para aturar as ausências, surtos, choros e lamentações durante esses 6 anos de pós-graduação. Te amo!

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos de longas datas, que vem me acompanhando em várias etapas da vida. Aos amigos que fiz no mestrado: Douglas, minha primeira dupla de laboratório e incentivador da vida na pesquisa, agradeço por compartilhar experimentos, projetos, conquistas, e se fazer presente nesses anos mesmo com a distância; Thalisson, por essa amizade leve e divertida, pelos momentos de muita gargalhada e por se esforçar pra me acudir à distância; e Rousi, por disponibilizar ajuda sempre que preciso e por ser a pessoa que topa todas as saídas. Às minhas amigas da graduação Juli, Tai e Cíntia, que são meus encontros garantidos sempre que retorno para casa.

Agradeço também aos novos amigos que a vida me deu, companhias de muitas e longas horas e de altos e baixos. À Marcos, sou muito grata por ter sido a pessoa que me acolheu em Recife, por ter sido minha principal companhia e maior suporte nos momentos difíceis de adaptação e saudades nos primeiros meses e pelos momentos divertidos (quase todos) que passamos. À Widson, agradeço por ter compreendido a minha (nossa) dor da distância de casa e a dificuldade de adaptação, por ter sido a companhia de vinhos, pizzas e filmes nos fins de semana e por ser o amigo que sempre ouve meus desabafos e me bota pra cima. Minha nanodupla Victor, que surgiu no momento mais frustrante da minha pesquisa, me motivou, me ajudou, virou meu companheiro diário de laboratório e um amigo importante, agradeço por estar presente e me apoiar nos momentos mais difíceis e também compartilhar momentos adoráveis. Lucas, com quem tive o prazer de começar o projeto de pesquisa, agradeço todos os nossos rolês, as resenhas e fofocas e as gaitadas mais gostosas que alegram o meu dia. Obrigada à Demis, por me ajudar em várias dúvidas de experimentos, ouvir meus áudios longos para discutir resultados, e também por topa todas as saídas e contribuir nas resenhas. À Larissa, por se solidarizar com minhas dificuldades de projeto, oferecer ajuda, compartilhar ideias e a organização das festas do laboratório. À Emerson e Camila por, desde o início, me ajudarem nas rotinas do laboratório, compartilharem conhecimento e também momentos de diversão. Aline, por aguentar sempre eu pedindo pra comprar algo e por compartilhar comigo os perrengues desses últimos meses de experimentos que, junto com Lucas Q., me acompanharam, ajudaram e deram apoio.

Às meninas do grupo Nano Samilly, Clara e Lavinya por se disponibilizarem a ajudar sempre que possível. À Fernanda, Joanellys, Laysa, Stéfani, Natália, pelo convívio e boas conversas no laboratório. À Lourenço pela disponibilidade e todos os apoios técnicos. Aos demais integrantes do LTM que de alguma forma contribuíram com minha pesquisa nesses anos. E, principalmente, ao Prof. Pedro por ter confiado em mim sem me conhecer, me receber como orientanda, ensinar tudo que tivesse ao alcance e proporcionar momentos de grande crescimento profissional, além de boas conversas.

Aos pesquisadores parceiros: Prof. Elvis, sempre muito solícito, Alesx e demais colaboradores do CRCN; Prof. Lamartine e Prof.^a Monica que abriram as portas do NCQMC pra mim, além de Yuri, Thaisa, Danda por toda disponibilidade em ajudar; Aos colaboradores do LAFAC, principalmente Prof.^a Ivone, Marcilene que são sempre muito atenciosas. Por fim, às instituições que viabilizaram esse doutorado: CAPES, pelo auxílio financeiro, UFPE e ao PPGIT.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários *Leishmania* spp., prevalente em 98 países no mundo. Entre 2018 e 2020, o Brasil ficou entre os três países com maior número de casos, os quais representam cerca de 90%. No Brasil, os medicamentos disponíveis não são totalmente eficazes, possuem uso parenteral e exibem vários efeitos adversos graves e muito frequentes, resultando em má adesão ao tratamento. Entre as alternativas que podem contornar esses problemas estão os Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que podem conferir aumento da solubilidade de fármacos, liberação prolongada e/ou controlada, maior absorção intestinal e biodisponibilidade oral. Nesse contexto, esse trabalho visa desenvolver CLNs contendo antimoniato de meglumina (AM) como alternativa terapêutica de uso oral para a leishmaniose. Inicialmente, ensaios de compatibilidade entre os insumos e o fármaco foram realizados. Otimizações de formulação e de processo foram feitas através de planejamento experimental, que possibilitou a escolha da nanopartícula com melhor tamanho, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulamento (EE). Os CLNs escolhidos também foram caracterizados por valor de pH, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios-X (DRX), estabilidade simulando condições gastrointestinais, estabilidade de armazenamento, bem como foram liofilizados. Além disso, foram realizados testes *in vitro* de cinética de liberação, citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, e atividade em promastigotas e amastigotas das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que não houve incompatibilidade entre o fármaco e os excipientes. O planejamento experimental resultou em um CLN com tamanho de 41,13 nm, PdI de 0,227, PZ de -27,9 mV, EE de 62,43% e pH 5,23. O FTIR confirmou a incorporação do AM no CLN, o DSC mostrou redução de cristalinidade da matriz da nanopartícula, que foi ratificado no DRX. O CLN foi estável simulando pH do trato gastrointestinal e também durante armazenamento sob refrigeração. Os liófilos obtidos mostraram estabilidade de tamanho e EE no período estudado. A liberação do AM no CLN em dispersão e liofilizado foi adequada ao modelo Peppas-Sahlin, com cinética de liberação por transporte anômalo. Não houve citotoxicidade em macrófagos pelo AM, enquanto os CLNs foram citotóxicos nas concentrações acima de 50 µg/mL. O AM também não apresentou atividade em promastigotas da *L. infantum*, mas o CLNb e CLN4 apresentaram IC₅₀ 104,7 µg/mL e 96,9 µg/mL respectivamente, enquanto nas amastigotas nenhuma das amostras

foram citotóxicas. Já na *L. amazonensis*, os IC₅₀ foram 278,7 µg/mL para o AM, 150,6 µg/mL para CLN-B e 115 µg/mL para CLN-AM nas formas amastigotas. Portanto, foi possível obter CLNs com propriedades físico-químicas e estabilidade adequadas, com cinética de liberação prolongada e atividade contra a forma infectante de *L. amazonensis*, os quais são resultados encorajadores quanto ao potencial do sistema para uso oral. Estudos de farmacocinética estão sendo desenvolvidos para elucidação da biodisponibilidade oral.

Palavras-chave: leishmaniose; administração oral; sistema de entrega de fármacos; nanocarreador; liberação modificada.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the protozoan *Leishmania* spp., prevalent in 98 countries worldwide. Between 2018 and 2020, Brazil was among the three countries with the highest number of cases, which together represent about 90% of cases. In Brazil, the available drugs are not fully effective, require parenteral application and exhibit several serious and very frequent adverse effects, resulting in poor adherence to treatment. Among the alternatives that can overcome these problems are nanostructured lipid carriers (NLC), which can provide increased drug solubility, prolonged and/or controlled release, greater intestinal absorption and oral bioavailability. In this context, this work aims to develop NLCs containing meglumine antimoniate (MA) as a therapeutic alternative for oral use for leishmaniasis. Initially, compatibility tests between the excipients and the drug were performed. Formulation and process optimizations were made through experimental design, which made it possible to choose the nanoparticle with the best size, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (EE). The chosen NLCs were also characterized by pH value, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), stability simulating gastrointestinal conditions, storage stability, as well as were lyophilized. In addition, *in vitro* tests of release kinetics, cytotoxicity on RAW 264.7 macrophages, and activity on promastigotes and amastigotes of *L. infantum* and *L. amazonensis* species were performed. The results showed that there was no incompatibility between the drug and the excipients. The experimental design resulted in an NLC with a size of 41.13 nm, PDI of 0.227, PZ of -27.9 mV, EE of 62.43% and pH 5.23. The FTIR confirmed the incorporation of MA in the NLC, the DSC showed a reduction in the crystallinity of the nanoparticle matrix, which was ratified in the XRD. NLC was stable during pH simulation of the gastrointestinal tract and also during refrigerated storage. The obtained lyophiles showed stability in size and EE during the studied time. The release of MA from the NLC in dispersion and after lyophilization was adapted to the Peppas-Sahlin model, with release kinetics by anomalous transport. There was no cytotoxicity in macrophages by MA, while NLCs were cytotoxic at concentrations above 50 µg/mL. MA also showed no activity against *L. infantum* promastigotes, but CLNb and NLC4 presented IC₅₀ of 104.7 µg/mL and 96.9 µg/mL respectively, while in amastigotes none of the samples were cytotoxic. Against *L. amazonensis*, the IC₅₀s were 278.7 µg/mL for AM, 150.6 µg/mL for NLC-B and 115 µg/mL for NLC-AM facing the amastigote

forms. Therefore, it was possible to obtain NLCs with adequate physicochemical properties and stability, with prolonged release kinetics and activity against the infective form of *L. amazonensis*, which are encouraging results regarding the potential of the system for oral use. Pharmacokinetic studies are being developed to elucidate oral bioavailability.

Keywords: leishmaniasis; oral administration; drug delivery system; nanocarrier; modified release.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	27
Figura 2 - Ilustração sobre diferença entre a matriz de NLS e CLN e a incorporação de fármacos ao longo do armazenamento	38
Figura 3 - Tipos de CLN de acordo com a matriz lipídica formada.....	39
Figura 4 - Curvas de DSC (a) e TG/DTG (b) do antimoniato de meglumina.....	65
Figura 5 - Espectro no infravermelho do antimoniato de meglumina.....	66
Figura 6 - Gráfico de difração de raios X do antimoniato de meglumina.....	67
Figura 7 - Curva analítica utilizada para quantificação do teor de antimônio por FAAS.....	68
Figura 8 - Curvas DTA dos lipídeos sólidos e suas misturas com os lipídeos líquidos.....	71
Figura 9 - Curvas TG das substâncias isoladas (A) e misturas ternárias com o fármaco e misturas totais (B).....	75
Figura 10 - Curvas DTA dos compostos isolados e misturas ternárias com o fármaco e mistura total.....	79
Figura 11 - Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total.....	81
Figura 12 - Gráfico de Pareto para avaliação das variáveis no planejamento experimental feito com Dynasan114 + Miglyol.....	89
Figura 13 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan114.....	90
Figura 14 - Gráfico de superfície resposta para a variável PdI em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan114.....	91
Figura 15 - Gráfico de Pareto para avaliação das variáveis no planejamento experimental feito com Compritol + Miglyol	94
Figura 16 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro (A) e PdI (B) em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Compritol. Fonte: autoria própria.....	95
Figura 17 - Gráfico de Pareto para avaliação das variáveis no planejamento experimental feito com Dynasa114 + Miglyol contendo o fármaco.....	100

Figura 18 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro (A) e eficiência de encapsulamento (B) em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan114 contendo o fármaco.	102
Figura 19 - Gráficos de DSC do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn114) isolados, da mistura física total (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN4) e sem o fármaco (CLNb).....	105
Figura 20 - Difrátogramas do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn114) isolados, da mistura física de todos os componentes (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN4) e sem o fármaco (CLNb).....	107
Figura 21 - Espectro de infravermelho do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn114) isolados, da mistura física total (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN4) e sem o fármaco (CLNb).....	109
Figura 22 - Gráfico das variações de diâmetro médio, PdI e potencial zeta do CLNb armazenados em diferentes condições de temperatura.....	111
Figura 23 - Gráfico das variações de diâmetro médio, PdI e potencial zeta do CLN4 armazenados em diferentes condições de temperatura.....	112
Figura 24 - Gráfico das variações de eficiência de encapsulamento (EE) do CLN4 armazenados em diferentes condições de temperatura.....	116
Figura 25 – Liberação <i>in vitro</i> do AM em solução e no CLN4 no decorrer de 48h.....	126
Figura 26 – Liberação <i>in vitro</i> do AM em solução e no CLN4 liofilizado no decorrer de 48h....	127
Figura 27 – Gráfico de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 do AM e dos CLNs.....	133
Figura 28. Curvas DTG das substâncias isoladas (lado A), misturas ternárias e misturas totais (lado B) avaliadas no ensaio de compatibilidade.....	173
Figura 29 - Estrutura molecular do Miglyol (A) e do AM (B).....	180
Figura 30 - Estrutura molecular do Dynasan114 (C) e Dynasa118 (D).....	180
Figura 31 - Estrutura molecular do Compritol (E) e Imwitor (F).....	181
Figura 32 - Gráfico de distribuição de diâmetro obtido por DLS do CLN4 submetido ao ensaio de estabilidade gastrointestinal simulado em pH 1,2.....	184
Figura 33 - Gráfico de distribuição de diâmetro obtido por DLS do CLN4 submetido ao ensaio de estabilidade gastrointestinal simulado em pH 6,8.....	185
IMAGEM 1 – RESUMO PUBLICADO EM ANAIS DO CONGRESSO DE CIÊNCIAS APLICADAS A FARMÁCIA – 2020.....	186
IMAGEM 2 – ARTIGOS PUBLICADOS.....	187

IMAGEM 3 – ARTIGOS PUBLICADOS.....	188
------------------------------------	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis empregadas no planejamento central composto para os ensaios com CLNs sem o fármaco.....	56
Tabela 2 - Variáveis empregadas no planejamento central composto para otimização dos CLNs contendo fármaco.....	57
Tabela 3 - Lipídeos utilizados para obtenção das nanopartículas e suas propriedades físico-químicas.....	69
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental feito com Dynasan114 + Miglyol mostrando as variáveis dependentes e independentes	86
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental feito com Compritol + Miglyol mostrando as variáveis dependentes e independentes	92
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental contendo o fármaco, feito com Dynasan114 + Miglyol, mostrando as variáveis dependentes e independentes	99
Tabela 7 - Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta do CLN4 após teste de estabilidade em condições de pH do TGI simulado.....	119
Tabela 8 – Características dos CLNs liofilizados com trealose em diferentes proporções.....	123
Tabela 9 - Características físico-químicas dos liófilos ao longo do tempo de armazenamento.....	124
Tabela 10 - Avaliação dos modelos cinéticos aplicados à liberação de AM no em solução e no CLN4.....	130
Tabela 11 - Atividade leishmanicida das amostras frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de <i>L. infantum</i> expresso em IC ₅₀	135
Tabela 12 - Atividade leishmanicida das amostras frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de <i>L. amazonensis</i> expresso em IC ₅₀	137
Tabela 13- Propriedades térmicas dos lipídeos sólidos e das misturas físicas com lipídeos líquidos avaliadas por DTA.....	172
Tabela 14 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 114 avaliados por TG/DTG.....	174
Tabela 15 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 118 avaliados por TG/DTG.....	175

Tabela16 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Compritrol avaliados por TG/DTG.....	176
Tabela 17 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Imwitor avaliados por TG/DTG.....	177
Tabela 18 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 114 avaliados por DTA.....	178
Tabela 19 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 118 avaliados por DTA.....	178
Tabela 20 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Compritrol avaliados por DTA.....	179
Tabela 21 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Imwitor avaliados por DTA.....	179
Tabela 22 - Caracterizações físico-químicas durante ensaio de estabilidade do CLN4 armazenado em refrigerado e temperatura ambiente.....	182
Tabela 23 - Caracterizações físico-químicas durante ensaio de estabilidade do CLNb armazenado em refrigerado e temperatura ambiente.....	183

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM - Antimoniato de Meglumina

AmB – Anfotericina B

BCS - *Biopharmaceutics Classification System* (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)

CC – Concentração Citotóxica

CLN - Carreador Lipídico Nanoestruturado

DLS - *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento De Luz Dinâmico)

DMSO – Dimetil sulfóxido

DRX - Difractometria de Raios-X

DSC - *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Diferencial Exploratória)

DoE – *Design of Experiments* (Desenho experimental)

DTA - *Differential Thermal Analysis* (Análise Térmica Diferencial)

DTG - *Derivative Thermogravimetry* (Termogravimetria Derivada)

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

EE – Eficiência de encapsulamento

EHL - Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atômica)

FTIR - *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier)

GRAS - *Generally Recognized as Safe* – (Geralmente Reconhecido como Seguro)

IC – *Inhibitory Concentration* (Concentração inibitória)

IFA - Insumo Farmacêutico Ativo

ISO – *International Organization for Standardization* – (Organização Internacional para Padronização)

LC – Leishmaniose Cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LV – Leishmaniose Visceral

MWCO - *Molecular Weight Cut-Off* – (Corte de Peso Molecular)

Nano-DDS – *Nanoscale Drug Delivery System* – Sistema de Entrega de Fármacos em Nanoescala

NLS – Nanopartícula Lipídica Sólida

OMS – Organização Mundial da Saúde

PdI - *Polydispersity Index* (Índice de polidispersão)

PZ – Potencial Zeta

pH - Potencial hidrogeniônico

TG – Termogravimetria

TGI – Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REFERENCIAL TEÓRIO.....	25
2.1 AS LEISHMANIOSES: CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA.....	25
2.1.1 Tratamentos disponíveis no Brasil.....	28
2.1.1.1 Antimoniais pentavalentes.....	29
2.1.1.2 Anfotericina B (AmB).....	30
2.1.1.3 Pentamidina.....	31
2.1.2 Novas formulações nanotecnológicas.....	32
2.2 NANOPARTÍCULAS COMO <i>DRUG DELIVERY SYSTEMS</i>	35
2.2.1 Nanopartículas Lipídicas.....	36
2.2.1.1 Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN).....	38
2.2.1.2 Caracterização físico-química.....	40
2.2.1.3 Liofilização.....	43
2.3 ENSAIO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO.....	45
2.4 AVALIAÇÃO DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	47
2.5 CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR.....	49
2.6 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	50
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 OBJETIVO GERAL.....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1 MATERIAIS.....	52
4.2 MÉTODOS.....	52
4.2.1 Caracterização do IFA.....	52
4.2.1.1 Análises térmicas.....	52
4.2.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	53
4.2.1.3 Difração de Raios-X (DRX).....	53
4.2.1.4 Teor de Antimônio no IFA.....	54
4.2.1.5 Ensaio de solubilidade.....	54

4.2.2 Ensaio pré-formulação.....	55
4.2.2.1 Triagem de lipídeos.....	55
4.2.2.2 Ensaio de compatibilidade.....	55
4.2.2.3 Projeto experimental e otimização dos CLNs.....	55
4.2.3 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs).....	57
4.2.4 Caracterização dos CLNs.....	58
4.2.4.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.....	58
4.2.4.2 Valor de pH.....	58
4.2.4.3 Análises térmicas.....	58
4.2.4.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	59
4.2.4.5 Difração de Raios-X (DRX).....	59
4.2.4.6 Determinação da eficiência de encapsulamento.....	59
4.2.5 Estudo de estabilidade dos CLN sob condições do TGI.....	60
4.2.6 Determinação da estabilidade de armazenamento.....	60
4.2.7 Liofilização dos CLNs.....	60
4.2.8 Ensaio de liberação <i>in viro</i>.....	61
4.2.9 Ensaio de viabilidade celular.....	62
4.2.10 Ensaio de atividade leishmanicida em promastigotas.....	62
4.2.11 Ensaio de atividade leishmanicida em amastigotas.....	63
4.2.12 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO IFA.....	64
5.1.1 Análises térmicas.....	64
5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	65
5.1.3 Difração de Raios-X (DRX).....	66
5.1.4 Teor de Antimônio no IFA e solubilidade.....	67
5.2 ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	69
5.2.1 Triagem de lipídeos.....	69
5.2.2 Ensaio de compatibilidade.....	73
5.2.2.1 Análises térmicas.....	73
5.2.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR.....	81

5.2.3 Projeto experimental e otimização dos CLNs.....	85
5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLNs	103
5.3.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e Eficiência de encapsulamento.....	103
5.3.2 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) dos CLNs.....	104
5.3.3 Difratometria de Raios X (DRX).....	106
5.3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR).....	109
5.4 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO.....	110
5.5 ESTABILIDADE EM pH GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	118
5.6 LIOFILIZAÇÃO DOS CLN.....	121
5.6.1 Estabilidade dos CLNs liofilizados.....	124
5.7 ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	125
5.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	132
5.9 ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	134
5.9.1 <i>Leishmania infantum</i>	134
5.9.2 <i>Leishmania amazonensis</i>	137
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	139
7 PERSPECTIVAS.....	140
REFERÊNCIAS.....	141
APÊNDICE A – RESUMO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS POR DTA.....	172
APÊNDICE B – GRÁFICOS DTG.....	173
APÊNDICE C – RESUMO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS POR TG/DTG.....	174
APÊNDICE D – RESUMO ENSAIO DE COMPATIBILIDADE POR DTA.....	178
APÊNDICE E – DESENHO DAS ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS.....	180
APÊNDICE F – RESUMO DAS CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO.....	182

APÊNDICE G – GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS AMOSTRAS ANALISADAS NA ESTABILIDADE EM MEIOS GASTROINTESTINAIS SIMULADO.....	184
ANEXO A – PRODUÇÕES	186

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que possui mais de 20 espécies conhecidas por serem infecciosas para humanos, sendo transmitidos através das picadas de flebotomíneos fêmeas infectadas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; WHO|LEISHMANIASIS, 2022). Afeta populações pobres e, por isso, está associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imunológico fraco e falta de recursos financeiros. Também está ligada a mudanças ambientais, desmatamento, construção de barragens, esquemas de irrigação e urbanização (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Sua epidemiologia depende das características das espécies de parasitas, das características ecológicas dos locais de transmissão e da exposição atual e passada da população humana ao parasita.

Segundo a OMS, a leishmaniose é uma doença considerada prevalente em 98 países nos cinco continentes, principalmente nas regiões de baixa renda, onde estima-se quase um milhão de novos casos por ano no mundo, embora o número de casos tenha diminuído substancialmente na última década (DNDI, 2018; WHO|LEISHMANIASIS, 2022). Estatísticas fornecidas pelo observatório global em saúde da OMS apontaram que nos últimos anos (2018-2020) o Brasil configurou entre os três primeiros países com maior número de casos de leishmaniose. Em 2020, mais de 95% dos novos casos de leishmaniose visceral notificados à OMS ocorreram no Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Sudão do Sul, Sudão, cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorreram no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão, Síria e cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (LEISHMANIASIS, 2022). Ao longo dos anos, poucas alterações ocorreram nessas listas de principais países acometidos.

Existem três formas principais de leishmaniose: leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, que é a forma mais grave da doença, atinge gânglios linfáticos, baço, fígado, causando hepatoesplenomegalia, sendo fatal em 95% dos casos se não for tratada; leishmaniose cutânea (LC), que é a forma mais prevalente e manifesta-se com lesões cutâneas e úlceras em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes e graves incapacidades ao longo da vida; e leishmaniose mucocutânea (LMC), a qual invade as membranas mucosas do trato respiratório superior, leva à destruição parcial ou total de tecidos no nariz, boca e garganta, causando mutilação

grosseira (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Cada forma da doença exige um tipo de tratamento e cada país possui seu protocolo terapêutico baseado nas diretrizes da OMS e na realidade socioeconômica da sua região.

Para o Brasil, os medicamentos atualmente disponíveis são o antimoniato de meglumina, Anfotericina B (desoxicolato sódico, lipossomal) e Pentamidina, os quais não são utilizados para todos os casos, possuem uso exclusivamente parenteral, além de exibirem uma série de efeitos adversos graves e muito frequentes, tais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade (BRASIL, 2014, 2017; PAHO, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Ademais, são tratamentos longos, de alto custo e pouca inovação, visto que são medicamentos usados há pelo menos 40 anos. O único medicamento de uso oral atualmente disponível para tratamento da leishmaniose é a Miltefosina, aprovada para tal finalidade pela FDA em 2014, representando um grande avanço terapêutico. Entretanto, também possui limitações que compreendem necessidade de monitoramento de efeitos colaterais gastrointestinais, hepatotoxicidade e teratogenicidade, surgimento de resistência e alto custo, o que inviabiliza seu uso para a maioria dos países acometidos, além de não estar registrada em alguns países endêmicos (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018). No Brasil, a miltefosina começou a ser usada em 2021, mas em casos especiais avaliados por médicos dos centros de referência e apenas para LC. Assim, com a dificuldade de desenvolvimento de vacina e do controle do mosquito vetor, e com medicamentos cuja forma farmacêutica e toxicidade não facilitam adesão, a OMS lista a leishmaniose como uma das doenças tropicais negligenciadas para as quais o desenvolvimento de novos tratamentos é uma prioridade (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Entre os problemas relacionados às terapias da leishmaniose, a administração injetável dos medicamentos ganha destaque, visto que é dolorosa, requer internação do paciente, acompanhamento médico e de exames laboratoriais devido aos efeitos tóxicos severos, necessita de deslocamento dos pacientes aos centros de saúde e possui longa duração do tratamento. Condições estas que não são adaptadas à realidade das condições de pobreza dos pacientes acometidos pela doença (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Como resultado, observa-se uma má adesão ao tratamento, o que compromete ainda mais a eficácia da terapia e aumenta o risco de desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Considerando esses fatores, o desenvolvimento de um medicamento de uso oral tem sido foco de muitas pesquisas, pois resolveriam muitas dessas questões.

A via oral é, sem dúvida, a via de administração de medicamentos mais acessível durante a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. No entanto, algumas limitações como baixa solubilidade, baixa permeabilidade intrínseca através das membranas celulares, rápida degradação pelo trato gastrointestinal e incapacidade de atravessar a barreira da mucosa intestinal muitas vezes dificultam a adequação de um Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) para essa via, reduzindo drasticamente a biodisponibilidade oral (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019; XU *et al.*, 2020). Vários avanços foram feitos nas últimas décadas para melhorar a eficiência da administração oral de medicamentos, na tentativa de maximizar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade de vários IFAs (BERTONI; PASSERINI; ALBERTINI, 2020; REINHOLZ; LANDFESTER; MAILÄNDER, 2018). Dentre algumas alternativas possíveis, os sistemas de entrega de fármacos em nanoescala (Nano-DDS) ganhou destaque visto as vantagens que a nanotecnologia pode trazer para o desenvolvimento de medicamentos.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) são dispersões coloidais cujas partículas são compostas por lipídios na escala nanométrica (1-1000nm). Representam a segunda geração de nanopartículas lipídicas, os quais possuem em sua composição uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos, formando uma matriz imperfeita que promove maior encapsulamento que as nanopartículas lipídicas sólidas, bem como diminuição da expulsão do fármaco ao longo do tempo (JAVED *et al.*, 2022; MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011; MÜLLER *et al.*, 2016). Essas vantagens conferem melhor eficiência de encapsulamento e manutenção ao longo do tempo de armazenamento. CLNs são Nano-DDSs de fácil obtenção, cujas propriedades físico-químicas conferem aumento da solubilidade e permeabilidade de IFAs, liberação prolongada e/ou controlada, maior biodisponibilidade, melhor absorção e acúmulo no local de ação, capacidade de melhorar a estabilidade e aumento do índice terapêutico dos fármacos (AZEVEDO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018; SHAHBAZI; A. SANTOS, 2012). Além disso, são biocompatíveis e possuem mecanismos permeabilidade intestinal diferenciados das formulações convencionais, e também de outros nanocarreadores, que favorece absorção oral por via linfática e endocitose (DATE; HANES; ENSIGN, 2016; PINELLI *et al.*, 2020). Portanto, são promissores para melhorar a biodisponibilidade oral de IFAs hidrofílicos ou lipofílicos, aumentando a absorção intestinal por meio de diferentes mecanismos. Assim, seria possível promover a administração oral de alguns IFAs através da promoção/facilitação da absorção através do seu uso.

Nesse contexto, fica constatada a necessidade de inovação da terapia para leishmaniose e a importância de um tratamento mais seguro e que possa ser feito de forma domiciliar. Portanto, o objetivo desse trabalho é desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) contendo fármaco leishmanicida para obtenção de uma possível alternativa terapêutica de uso oral para as leishmanioses. Para isso, foi realizada uma série de otimizações, tanto de formulação como de processo, visando a obtenção dos carreadores com melhores propriedades físico-químicas, que apresentassem estabilidade, cinética de liberação prolongada, eficácia adequada e de baixa toxicidade. As principais caracterizações do CLN foram realizadas, bem como estudo cinético e avaliações preliminares de estabilidade e viabilidade celular.

2 REFERENCIAL TEÓRIO

2.1 AS LEISHMANIOSES: CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA

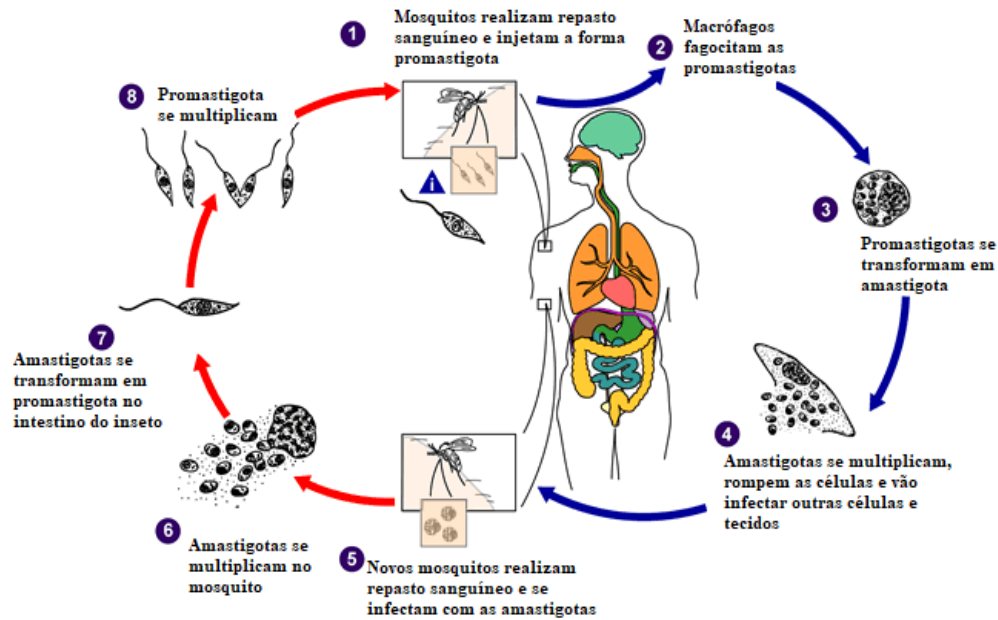
As doenças negligenciadas são condições que acometem, predominantemente, a população de maior índice de pobreza do mundo e, por isso, não representam um mercado lucrativo para as grandes indústrias farmacêuticas. Também conhecidas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs), por afetarem principalmente comunidades pobres que vivem em climas tropicais e subtropicais e não são cuidadas adequadamente, acometem mais de 1 bilhão de pessoas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019). Este quadro está diretamente relacionado a insuficiência de métodos de diagnósticos, ausência de vacinas e controle do vetor, fraca atenção básica da população, além do pequeno arsenal terapêutico disponível (SILVA-PIRES *et al.*, 2017). Visando contornar essa situação, em 2020 foi publicado um roteiro que estabelece metas e marcos globais para prevenir, controlar, eliminar ou erradicar as 21 doenças do grupo entre 2021–2030 (WHO, 2020).

Entre as principais DTNs está a leishmaniose, uma doença parasitária para a qual ainda não existe controle, nem pode ser eliminada por meio da administração em massa de medicamentos seguros e eficazes como algumas outras DTNs. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as leishmanioses prevalentes em 98 países ao redor do mundo, principalmente as regiões de baixa renda, onde estima-se quase um milhão de novos casos por ano (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; LEISHMANIASIS, 2022). Entre as regiões mais afetadas pode-se citar o sudoeste asiático, norte e leste da África, e as américas, onde existem populações predominantemente pobres, com alta incidência de desnutrição, moradia precária, sistema imunológico fraco e falta de recursos financeiros (DNDI, 2018; ORYAN; AKBARI, 2016). Estatísticas fornecidas pelo observatório global em saúde da OMS apontaram, em 2020, que mais de 95% dos novos casos de leishmaniose visceral notificados à OMS ocorreram no Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Sudão do Sul, Sudão, cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorreram no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão, Síria e cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. Entre 2018-2020 o Brasil configurou entre os três primeiros países com maior número de casos, tanto de leishmaniose cutânea quanto de visceral

(LEISHMANIASIS, 2022), refletindo a falta de intervenções e medidas efetivas de prevenção e combate à doença no país.

As leishmanioses são doenças parasitárias, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* spp., divididos em dois subgêneros, *Leishmania* e *Vivannia*, os quais possuem cerca de 20 espécies consideradas patogênicas para humanos. *Leishmania* spp. são organismos dimórficos, pois apresentam duas formas principais: promastigota, forma flagelada e móvel, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor; e amastigota, forma aflagelada, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DEPAQUIT; GAY; KALTENBACH, 2019). São parasitas que possuem ciclo de vida heteroxênico, ou seja, vivem alternadamente entre os hospedeiros intermediário (invertebrados) e definitivo (vertebrados) (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Como é possível visualizar na Figura 1, seu ciclo de vida é iniciado quando um hospedeiro vertebrado é infectado com promastigotas metacíclicas por um inseto vetor fêmea durante um repasto sanguíneo. As promastigotas são rapidamente capturadas por células do sistema fagócito mononuclear, tais como macrófagos, onde ocorre a diferenciação em amastigotas. Nos macrófagos, as amastigotas multiplicam-se até a ruptura da célula, sendo liberadas na corrente sanguínea e propagando a infecção ao infectar outro macrófago. Outros vetores se alimentam do sangue contaminado com as formas amastigotas durante um repasto sanguíneo. Dentro do inseto vetor, o sangue contendo as amastigotas é levado para o intestino, onde irão se diferenciar até promastigotas metacíclicas, e a partir de então, dar continuidade ao ciclo da *Leishmania* (BATES, 2018).

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevotion.
<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.

Baseado nessa relação parasito-hospedeiro se desenvolve a fisiopatologia da doença, cujas características são determinadas por fatores parasitários (tropismo, virulência, resistência, espécies) e fatores da resposta imune do hospedeiro. Assim, a leishmaniose se apresenta em três formas principais, a citar: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (DNDI, 2018; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). A LC é a forma mais comum, que se manifesta através de lesões na pele, principalmente úlceras ou nódulos nas áreas expostas como o rosto, os braços e as pernas. Normalmente não é fatal, mas deixa cicatrizes ao longo da vida, podendo ser desfigurante e socialmente estigmatizante. A úlcera pode curar espontaneamente, porém o tempo é variável e de acordo com a espécie envolvida, sendo necessária intervenção medicamento em muitos casos (MOKNI, 2019). A LMC apresenta-se como uma destruição lenta e progressiva dos tecidos mucoso e submucoso no nariz, na boca e ainda faringe, laringe, e mais raramente, na traqueia ou genitália. Pode ocorrer como uma complicação da leishmaniose cutânea, simultaneamente ou com meses/anos após a resolução das lesões primárias (CINCURÁ *et al.*, 2017; HANDLER *et al.*, 2015). Já a LV, também conhecida também por Calazar, a infecção espalha-se sistematicamente para se propagar nos reservatórios dos macrófagos

distribuídos nos tecidos dos órgãos internos, principalmente o fígado, o baço, a medula óssea e os gânglios linfáticos, caracterizando-se por hepatoesplenomegalia, anemia, perda de peso e febre, sendo fatal em 95% dos casos se não tratada (DEPAQUIT; GAY; KALTENBACH, 2019; MEDLEY *et al.*, 2015).

A gravidade da doença tem sido associada à resposta imune do hospedeiro (ROSSI; FASEL, 2018). Geralmente, a resposta mediada por células Th 1, caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α que induzem a ativação dos macrófagos, é crucial para a resistência do hospedeiro e eliminação do parasita, enquanto a resposta de Th 2, caracterizada por produção de IL-4 e IL-13, leva a um hospedeiro suscetível e incapaz de controlar a infecção. No entanto, essa correlação é muito mais complexa, pois também foi demonstrado que uma sobrecarga e a hipersensibilidade imune Th1 causa hiperinflamação, gerando destruição tecidual da pele e mucosas (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Além disso, imunossupressão durante a leishmaniose favorece a persistência do parasita e o desenvolvimento de infecção metastática em LC, além de propiciar uma infecção potencialmente letal. Nisso se inclui pacientes com comorbidades, principalmente portadores de HIV, que é o patógeno coinfeccioso mais estudado na leishmaniose, uma vez que induz o desenvolvimento de sintomas atípicos e aumenta a resistência ao tratamento e as recidivas da doença (AKUFFO *et al.*, 2018; ROSSI; FASEL, 2018). Baseado no tipo de doença, espécie de parasita e presença ou não de doenças concomitantes será estabelecido o tratamento.

2.1.1 Tratamentos disponíveis no Brasil

Devido à complexidade das respostas imunes necessárias para a proteção contra a *Leishmania*, o desenvolvimento de vacinas tem sido uma tarefa desafiadora, em que pesquisas buscando seu desenvolvimento vêm sendo realizadas há décadas sem muito sucesso (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Por isso, seu tratamento é exclusivamente medicamentoso, e deve seguir o protocolo terapêutico de cada país, elaborado com base nas diretrizes da OMS e na realidade socioeconômica da sua região (PAHO, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Os protocolos direcionam o esquema terapêutico a depender da forma clínica da doença, quantidade de lesões e gravidade, além de presença de comorbidades, estabelecendo os medicamentos de primeira e segunda escolha para cada caso (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Atualmente, os medicamentos disponíveis para o

tratamento da leishmaniose são o antimoniato de meglumina, Anfotericina B (desoxicolato sódico, lipossomal), Pentamidina, Paramomicina e Miltefosina, sendo disponíveis no Brasil apenas os três primeiros. Dentre esses, o único de uso oral é a Miltefosina, aprovada pela FDA em 2014 para esse uso, mas que também possui efeitos colaterais gastrointestinais, hepatotoxicidade e teratogenicidade, além de ser de alto custo e não estar registrada em alguns países endêmicos como o Brasil (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018). Sendo assim, o tratamento da leishmaniose no Brasil depende de medicamentos que estão em uso há, pelo menos, 40 anos.

2.1.1.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes são compostos que possuem antimônio Sb^{+5} complexados em uma molécula. Pouco se sabe sobre a estrutura e composição exata, visto que estudos para sua caracterização físico-química são escassos, mas sugere-se que seja uma mistura complexa da meglumina e antimônio na proporção 2:1 (DEMICHELI *et al.*, 1999; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998). Essa complexação favorece sua solubilidade aquosa, reportada como sendo 300 mg/mL, porém apresenta baixa permeabilidade (BCS classe III). Como impurezas do processo de complexação, podem existir resíduos de Sb^{+3} , que são tóxicos e contribuem para os efeitos colaterais. Por isso, existe um limite aceitável de Sb^{+3} nas formulações, e apenas o Sb^{+5} é considerado o IFA do medicamento (DE MORAES FLORES *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2014; KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Geralmente, o teor de Sb^{+5} presente na matéria-prima está entre 30-35% (BRASIL, 2019).

Os medicamentos antimoniais estão disponíveis comercialmente em duas formulações, o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil. Por conseguinte, a OMS padronizou o esquema terapêutico dos antimoniais baseado na quantidade de Sb^{+5} por peso (mg Sb^{+5} /kg/dia) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A formulação comercial disponível no Brasil é o antimoniato de meglumina (AM), um medicamento injetável com apresentação em frasco-ampola contendo uma solução de 5mL, na concentração de 1,5g de AM, o que corresponde à 405mg de Sb^{+5} (BRASIL, 2014, 2017; PAHO, 2019). O antimoniato de meglumina é o medicamento de primeira escolha nos casos de LC (todas as formas, exceto difusa), LMC e LV, cujo esquema terapêutico varia para cada forma clínica, geralmente de

10mg a 20mg Sb^{+5} /kg/dia, sendo no máximo de 3 ampolas por dia, durante 20-40 dias, administrado por via intramuscular ou endovenosa. Nos casos de LC localizada, também pode ser usado por via intralesional (BRASIL, 2014, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Apresenta efeitos adversos graves no sistema cardiovascular, renal e hepático de forma tempo-dependente, ou seja, ao longo do tempo de tratamento, aumenta a chance de desenvolver o efeito e sua gravidade. Já foi reportado também teratogenicidade e embriotoxicidade. Por isso, é contraindicado para pacientes acima de 50, com cardiopatias, nefropatias e hepatopatias e gestantes. Além desses, também existem efeitos adversos menos graves, porém frequentes, como artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor abdominal e pancreatite (DEPAQUIT; GAY; KALTENBACH, 2019).

Embora seja utilizado há mais de 70 anos, o mecanismo de ação do AM ainda é pouco elucidado. Acredita-se que envolve a inibição da atividade glicolítica e oxidativa dos ácidos graxos nas formas amastigota do parasita, resultando na diminuição do ATP intracelular e fragmentação do DNA (FABRINO, 2021; MOREIRA *et al.*, 2017). Outra hipótese é a inibição da enzima tripanotiona redutase ou glutathione redutase do parasita, interferindo na expressão gênica (FRÉZARD *et al.*, 2013). Além disso, é sugerido que o Sb^{+5} presente na molécula do AM atuaria como uma espécie de pró-fármaco, sendo convertido no organismo em Sb^{+3} , que em contato com os fluidos biológico forma $\text{Sb}(\text{OH})_3$ e atravessa mais facilmente as membranas celulares do que o Sb^{+5} , uma vez que este último adquire carga elétrica quando em fluidos fisiológicos e dificulta sua passagem (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Isso está relacionado com a melhor eficácia do Sb^{+3} , porém também contribui para sua toxicidade.

2.1.1.2 Anfotericina B (AmB)

A anfotericina B é um antibiótico poliênico já bastante conhecido por suas atividades antifúngicas, que possui também atividade contra leishmaniose, atuando nas formas amastigota e promastigota do parasita. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com o ergosterol presentes na membrana plasmática da *Leishmania*, levando ao aumento do influxo de íons, causando morte (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). É comercializada no Brasil sob a forma de desoxicolato de anfotericina B (suspensão coloidal) e anfotericina B lipossomal, ambas formulações injetáveis na forma

liofilizada, devido baixa solubilidade e permeabilidade (BCS classe IV). Apresenta instabilidade aquosa, por isso deve ser reconstituída no momento do uso, como também ser administrada por via endovenosa sob infusão lenta de (4 - 6 horas) devido a toxicidade para as células do endotélio vascular, causando flebite em muitos casos. Ainda existem outros efeitos colaterais frequentes e dose-dependente, desde os mais leves como cefaleia, febre, calafrios, anemia, dores musculares e articulares e hipotensão, até os mais graves como hepatotoxicidade e complicações renais que acometem praticamente todos os pacientes (BRASIL, 2014, 2017; PAHO, 2019).

A formulação lipossomal de AmB é a opção de primeira escolha em pacientes que não podem fazer uso do antimonial. Nisso se inclui casos de LC e LMC em pacientes com idade acima de 50anos, com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade, gestantes, além dos casos graves de LV e de LC com mais de 20 lesões (BRASIL, 2014, 2017; PAHO, 2019). Devido ao custo elevado, seu uso de rotina não é realizado, sendo restrito aos casos citados. O esquema terapêutico varia para cada caso, sendo geralmente aplicadas doses entre 2 mg a 5 mg/kg/dia sem limite de dose máxima diária, até atingir a dose total de 35 mg a 40 mg/kg. A forma desoxicolato é a segunda escolha nos casos em que a forma lipossomal não possa ser usada, sendo usado 0,7 mg a 1 mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados, com a mesma dose máxima (DEPAQUIT; GAY; KALTENBACH, 2019).

Embora a AmB na forma lipossomal tenha trazido mais eficácia e, principalmente, maior segurança por apresentar metade da nefrotoxicidade da formulação convencional (desoxicolato), ambas formulações ainda apresentam problemas biofarmacêuticos, e por isso são administradas apenas por via endovenosa (HNIK; WASAN; WASANA, 2020). Assim, seu uso é fundamentado na sua elevada potência e amplo espectro de atividade, apesar das desvantagens conhecidas.

2.1.1.3 Pentamidina

As pentamidinas são pertencentes à classe das diaminas aromáticas, comercializada nas formas de isetionato e mesilato, usada principalmente em LC em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. No Brasil, apresenta-se como isetionato de pentamidina 300 mg, liofilizada em frasco ampola, que deve ser reconstituída antes da administração. É administrada por via intramuscular ou endovenosa, na dose de 4mg/kg/dia em dias alternados, totalizando 15 doses, sem ultrapassar a 2g como dose total. Seus efeitos colaterais mais comuns são anorexia,

astenia, náusea, dor abdominal, mialgia, cefaleia, hipoglicemia prolongada, arritmias cardíacas, leucopenia, trombocitopenia, insuficiência renal aguda e pancreatite, que pode levar ao aparecimento de diabetes mellitus (BRASIL, 2017). Seu mecanismo de ação envolve preferencialmente as mitocôndrias do parasita, onde inibe seletivamente o processo de replicação de DNA do cinetoplasto, interferindo no mecanismo subjacente à inibição do crescimento do parasita (YANG; CHOI; NO, 2016).

Seu uso não é indicado no caso de gestação, aleitamento, crianças menores de 1 ano, diabetes mellitus, intolerância à glicose, insuficiência renal, insuficiência hepática e doenças cardíacas. Entretanto, é considerada o tratamento de primeira escolha nos casos de LC difusa, com tratamento realizado nos centros de referência uma vez que trata-se de uma forma clínica rara e grave, com difícil resposta terapêutica e cura clínica. É também usada no caso de falha terapêutica dos medicamentos de primeira linha (BRASIL, 2017; PICCICA *et al.*, 2021). Exceto esses casos, a eficácia da pentamidina não supera a dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B, não compensando seu uso (DEPAQUIT; GAY; KALTENBACH, 2019). Portanto, a escolha do medicamento para tratar a leishmaniose, atualmente, depende de uma avaliação risco-benefício de cada caso, visto não existir um tratamento realmente adequado para a doença. Nesse contexto, uma abordagem nanotecnológica poderia superar boa parte dessas limitações.

2.1.2 Novas formulações nanotecnológicas

Mesmo com mais de uma opção de medicamento, o tratamento da leishmaniose possui alguns problemas, pois são medicamentos não totalmente eficazes para todos os casos, requer internação para administração, acompanhamento médico e de exames laboratoriais para monitoração dos efeitos adversos graves e muito frequentes, além de possuir longa duração. Tudo isso encarece o tratamento, bem como diminui a adesão dos pacientes, visto que muitos moram em locais distantes, de difícil acesso e não possuem condições de se deslocar diariamente para fazer uso do medicamento. Portanto, urge o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, principalmente de uso oral, visto que essa forma é mais segura, permitiria tratamento domiciliar e, consequentemente, maior adesão dos pacientes.

No entanto, algumas limitações como baixa solubilidade, baixa permeabilidade intrínseca através das membranas celulares, rápida degradação pelo trato gastrointestinal e incapacidade de

atravessar a barreira da mucosa intestinal são características físico-químicas de muitos IFAs, antigos e novos, que dificulta o desenvolvimento de medicamentos para administração oral (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019; XU *et al.*, 2020). Sendo assim, alguns esforços têm sido realizados por pesquisadores para aprimorar a terapêutica da leishmaniose, visando o uso oral, sendo uma das estratégias mais utilizadas a obtenção de novas formulações para melhorar as características físico-químicas e biofarmacêuticas dos fármacos existentes, dado que envolve menos gastos, menos tempo e tem maior chances de sucesso do que o descobrimento de novas entidades químicas (BOCHICCHIO; LAMBERTI; BARBA, 2021; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013). Dentre algumas alternativas possíveis, os sistemas de entrega de fármacos em nanoescala (Nano-DDS, do inglês *Nanoscale Drug Delivery Systems*) ganhou destaque visto que abarca as vantagens que sistemas nanotecnológicos podem conferir para o desenvolvimento de medicamentos.

Com o advento da nanotecnologia e desde a incorporação de Anfotericina B em uma formulação lipossomal, outras formulações baseadas em nano-DDS contendo fármacos leishmanicidas começaram a ser desenvolvidas, proporcionando outra abordagem terapêutica para a leishmaniose. Tal interesse se deve às vantagens que estas formulações podem agregar aos agentes terapêuticos, antes com elevada toxicidade e que atingiam baixas concentrações nos locais alvos, acarretando melhoras na farmacocinética, aumento na eficácia, diminuição de toxicidade e acréscimo de permeabilidade intestinal (ALMEIDA *et al.*, 2017; FARJADIAN *et al.*, 2019). No caso da leishmaniose visceral, nanoformulações ganham ainda mais destaque, pois permite uma melhor biodistribuição do fármaco e seletividade aumentada para alcançar os tecidos onde o parasita se hospeda, como o baço, fígado, medula óssea e linfonodos (DE SOUZA *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2019).

Entre os tipos de nano-DDS mais empregados nos últimos anos estão as nanopartículas e complexos fármaco-conjugado. Com o antimoníato de meglumina, os estudos envolveram o uso de lipossomas (BORBOREMA, 2010; BORBOREMA *et al.*, 2016; FRÉZARD *et al.*, 2000; MOMENI *et al.*, 2013; MOOSAVIAN KALAT *et al.*, 2014; MOOSAVIAN; FALLAH; JAAFARI, 2019), nanopartícula poliméricas (ARAGÃO HOROIWA *et al.*, 2020; COSCO *et al.*, 2021; SARWAR *et al.*, 2017), nanopartícula de albumina (BARAZESH *et al.*, 2018), nanopartícula de cobre (ALBALAWI *et al.*, 2021) e compósito a base de nanopartícula de fosfato (ALVARENGA *et al.*, 2015). Porém os estudos visando uso por via oral realizados até então são

poucos, os quais testaram nanocarreadores sensíveis à polaridade (LANZA *et al.*, 2016), nanomontagens com ciclodextrinas (FRÉZARD *et al.*, 2008), complexos anfifílicos de Sb^{+5} (FERNANDES *et al.*, 2013) e antimoniato de meglumina em baixo estado de polimerização (KATO *et al.*, 2018).

Já a anfotericina B possui muitos estudos devido a diversidade de aplicações farmacológicas. Entre os mais recentes estudados para leishmaniose, pode-se citar o uso de nanopartículas poliméricas (ABU AMMAR *et al.*, 2019; RIEZK *et al.*, 2020; SAQIB *et al.*, 2020; SOHAIL *et al.*, 2021), carreador lipídico nanoestruturado (NIMTRAKUL; TIYABOONCHAI; LAMLERTTHON, 2019; REBOUÇAS-SILVA *et al.*, 2020), nanopartícula lipídica sólida (SOLTANI *et al.*, 2020), lipossoma (JAAFARI *et al.*, 2019) e nanopartícula de albumina (CASA *et al.*, 2018). Para uso oral foram testadas nanopartículas poliméricas (KAUR; KUMAR; KUSH, 2020; RADWAN *et al.*, 2017; SARWAR *et al.*, 2018) nanopartículas lipídicas sólidas (CHAUDHARI *et al.*, 2016; PARVEZ *et al.*, 2020) carreador lipídico nanoestruturado (LING TAN; ROBERTS; BILLA, 2019), conjugado fármaco-lipídio (THANKI; DATE; JAIN, 2019), micelas poliméricas (NIMTRAKUL *et al.*, 2020) e lipossomas (RAMOS *et al.*, 2022). Foi encontrado também nanocarreador com terapia combinada entre os fármacos, como niossomas contendo AmB e AM (MOSTAFAVI *et al.*, 2019). Quanto à pentamidina, a quantidade de estudos atuais foi bem inferior aos demais fármacos (ANDREANA *et al.*, 2022), sendo as nanoformulações usadas as nanopartículas poliméricas (VALLE *et al.*, 2019), testada para uso oral e o conjugado fármaco-polímero (SCALA *et al.*, 2018). De forma geral, os estudos com diferentes fármacos nos diversos nanocarreadores estão em estágio inicial, fase pré-clínica de pesquisa e com resultados em modelos animais, que embora sejam encorajadores, ainda precisam avançar para fase clínica para trazer maior confiança.

Diante dos estudos que têm sido reportados, observa-se que os nano-DDS são estratégias muito estudadas visando contornar problemas biofarmacêuticos. Ao longo dos anos de pesquisa com nanotecnologia, muitos medicamentos receberam aprovação regulatória e são comercializados, o que sugere mais crescimento futuro (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2021; FARJADIAN *et al.*, 2019). Alguns medicamentos baseados em nanoformulações estão em processo de aprovação nas agências reguladoras para leishmaniose (PANDIAN *et al.*, 2021). No que tange a via oral, as nanopartículas são destaque, onde as revisões mostram a quantidade de pesquisas avaliando a viabilidade desses sistemas para os diferentes fármacos, indicando como

estratégias promissoras anti-leishmaniose (JAMSHAD; DIN; KHAN, 2021; PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013).

2.2 NANOPARTÍCULAS COMO *DRUG DELIVERY SYSTEMS*

Os sistemas de entrega de fármacos em nanoescala (Nano-DDS, do inglês *Nanoscale Drug Delivery Systems*) são sistemas em escala nanométrica, variando entre 1 e 1000 nm, projetados para carrear um insumo farmacêutico por todo o corpo, de maneira controlada, para fins de prevenção, tratamento e diagnóstico (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2021; PATRA *et al.*, 2018). Existe uma infinidade de nano-DDS de acordo com os materiais utilizados para prepará-los, e cada vez mais estão surgindo novos. Entre os principais estudados atualmente pode-se citar lipossomas (e suas variações), nanopartículas lipídicas sólidas, nanocristais, carreadores lipídicos nanoestruturados, micelas poliméricas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas proteicas, nanoemulsões, microemulsões, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e pontos quânticos (MITCHELL *et al.*, 2020; PATRA *et al.*, 2018). Ainda existem variações quanto a morfologia, podendo se subdividir entre nanocápsulas e nanoesferas, o que os diferenciam em sistemas reservatórios e matriciais respectivamente. Portanto, a nanotecnologia nos fornece ampla variedade de nanocarreadores para múltiplas aplicações, o que permite projetar cautelosamente seu emprego no desenvolvimento de medicamentos inovadores.

A nanomedicina é um campo emergente no mercado farmacêutico que tem desenvolvido carreadores nanométricos para incorporação de IFAs, visando obtenção de medicamentos para diversas doenças. As pesquisas têm sido encorajadoras e cresceram muito rapidamente nos últimos anos diante da quantidade de novos medicamentos registrados e sob processo de registro para comercialização (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2021; BOBO *et al.*, 2016; FARJADIAN *et al.*, 2019). Em comparação aos medicamentos tradicionais, os nanomedicamentos possuem propriedades especiais estruturais, físico-químicas, magnéticas, elétricas e biológicas que conferem uma série de vantagens. Destaca-se o aumento da estabilidade, solubilidade e permeabilidade de IFAs, acréscimo do tempo de circulação, promoção da captação celular e tecidual, manutenção de janela terapêutica, e a melhor eficácia. Assim, os nano-DDS podem oferecer terapias alternativas aprimoradas tanto por obtenção de novos medicamentos, como por reformulação dos medicamentos tradicionais utilizados, superando os problemas relacionados aos tratamentos atuais (DATE; HANES; ENSIGN, 2016;

SCIOLI MONTOTO; MURACA; RUIZ, 2020). No caso de doenças parasitárias como a leishmaniose, isso permite melhorar a meia-vida e circulação do fármaco, permitir entrega direcionada ao local da infecção, melhorar a tolerabilidade, diminuir desenvolvimento de resistência e até melhorar o regime terapêutico (DE SOUZA *et al.*, 2018; JAMSHAD; DIN; KHAN, 2021).

A escolha do tipo do nanocarreador depende do objetivo e aplicação desejados. Assim, a seleção da nanopartícula pode ser baseada nas características físico-químicas dos fármacos (solubilidade, estabilidade, permeabilidade), na bioquímica dos alvos pretendidos, compatibilidade do material a ser usado e as características de liberação do produto final. Além disso, a transposição de escala deve ser pensada quando a intenção é lançar um produto no mercado, visto que serão necessários testes para solicitar aprovação de órgãos reguladores governamentais. Portanto, deve-se levantar as vantagens e desvantagens de diferentes tipos de nanopartículas e seus métodos de fabricação.

2.2.1 Nanopartículas lipídicas

Nanopartículas lipídicas são dispersões coloidais com tamanho nanométrico, geralmente 10-500nm, constituídos de lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal que são dispersos em uma fase aquosa e estabilizados por tensoativos. Sua estrutura é semelhante às emulsões do tipo óleo/água, se diferenciando na formação de uma matriz sólida como fase oleosa (MEHNERT; MÄDER, 2012; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015). São compostas por lipídios aprovados como compostos geralmente considerados como seguros (GRAS), biodegradáveis e biocompatíveis, o que representam uma vantagem por possuírem composição semelhantes aos constituintes das membranas celulares e não se acumularem no organismo (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Podem possuir aspecto leitoso, quando as partículas possuem tamanho >200nm e translúcido, se possuir partículas <200nm. Além disso, apresentam efeito Tyndal e reflexo azulado característicos de dispersões coloidais (CARVALHO *et al.*, 2018; HELGASON *et al.*, 2015).

O surgimento das nanopartículas lipídicas ocorreu no início da década de 90, com o intuito de minimizar/superar os problemas de armazenamento e estabilidade de outros sistemas nanoestruturados existentes, como os lipossomas e nanoemulsões (MISHRA; SHANDILYA; MISHRA, 2018; MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011). Isso porque, sua composição foi pensada para produzir uma matriz sólida que poderia conferir maior retenção do fármaco do que os lipídios

que formam vesículas como os lipossomas, assim como serem estruturalmente mais estáveis e oferecem melhor proteção aos IFAs contra fatores extrínsecos e intrínsecos (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015). Em comparação às nanopartículas poliméricas, as nanopartículas lipídicas possuem menor toxicidade e ativação do sistema imunes, bem como possibilitam maior biodisponibilidade oral dos fármacos, por promover absorção para circulação linfática e sanguínea no intestino, evitando o metabolismo de primeira passagem (LI *et al.*, 2017; SCIOLI MONTOTO; MURACA; RUIZ, 2020).

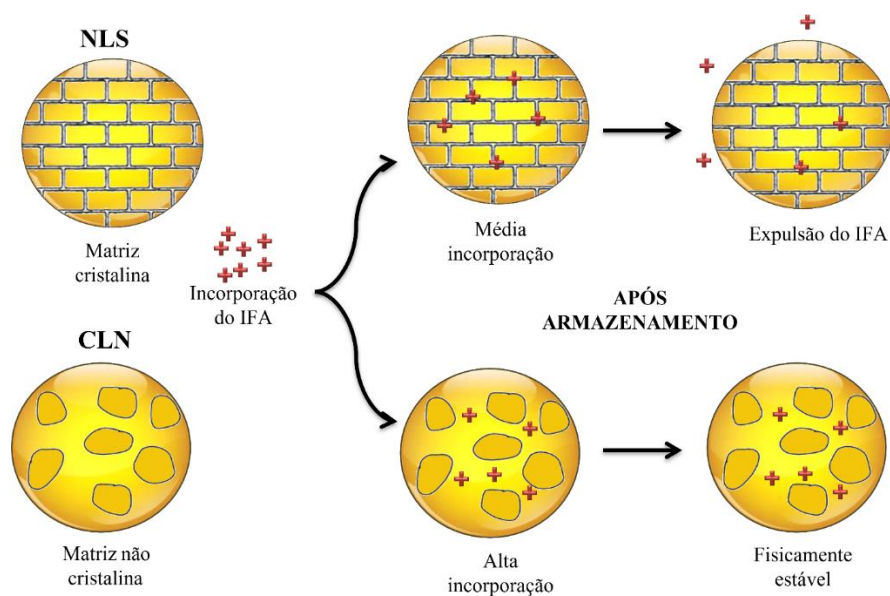
As primeiras nanopartículas lipídicas desenvolvidas, consideradas de primeira geração, foram as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), composta apenas de lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal, de diferentes tipos e comprimentos de cadeia, tais como ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídeos, ceras ou suas misturas. A seleção apropriada de lipídios e tensoativos propicia tamanhos de partícula e estabilidade adequados. São produzidas, tipicamente, com os lipídeos fundidos para que ocorra a emulsificação, juntamente com os tensoativos e fase aquosa, através do fornecimento de alta energia para formar as gotículas lipídicas, que após arrefecimento recristalizam e formam as partículas sólidas (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; MISHRA; SHANDILYA; MISHRA, 2018). Suas vantagens incluem encapsulamento de ativos hidrofílicos e lipofílicos, liberação modificada, obtenção fácil e possível sem uso de solvente e perspectiva de desenvolvimento industrial em larga escala (MIRCHANDANI; PATRAVALE; BRIJESH, 2021; SAKELLARI *et al.*, 2021).

No entanto, evidenciou-se problemas relacionados ao vazamento dos fármacos ao longo do tempo, os quais foram relacionados às transições polimórficas que ocorrem com os lipídeos. Durante o armazenamento, os lipídeos tendem a sair da forma polimórfica menos estável que se estabeleceu durante a recristalização (α e β') e retornar à forma mais estável (β), que é mais cristalina e promove um rearranjo da matriz lipídica para um estado altamente ordenado, acarretando a expulsão do fármaco (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; SEVERINO *et al.*, 2011). Esse efeito de expulsão é diretamente proporcional à pureza dos lipídeos e pode ocorrer durante resfriamento no processo de obtenção ou um tempo após, ao longo do armazenamento. Como consequência, além da diminuição da quantidade de fármaco encapsulado, pode levar ao aumento do tamanho das partículas e processos de instabilidade. Para contornar esses problemas, um novo tipo de nanopartículas lipídicas foi desenvolvido.

2.2.1.1 Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN)

Ao final da década de 90, surgiram os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), composto a partir da mistura binária de lipídeos sólidos e líquidos, com a promessa de propriedades melhoradas de encapsulamento e estabilidade física, sendo considerados a segunda geração de nanopartículas lipídicas (JAVED *et al.*, 2022). A inclusão dos lipídeos líquidos à composição evita a recristalização completa dos lipídios sólidos, inclusive durante o período de armazenamento, possibilitando a formação de uma nanopartícula com matriz imperfeita que favorece maior encapsulamento, diminuição da expulsão do fármaco ao longo do tempo e, conseqüentemente, melhor estabilidade que as nanopartículas lipídicas sólidas (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011; MÜLLER *et al.*, 2016). As diferenças entre as duas nanopartículas são ilustradas na Figura 2 abaixo.

Figura 2 - Ilustração sobre diferença entre a matriz de NLS e CLN e a incorporação de fármacos ao longo do armazenamento

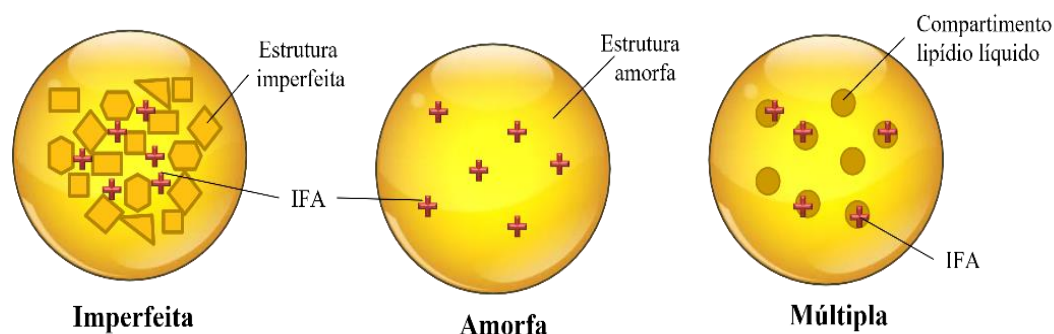


Fonte: adaptado de Souza (2020). Legenda: NLS= nanopartículas lipídicas sólidas; CLN = carreador lipídico nanoestruturado; IFA = insumo farmacêutico ativo.

Os CLNs podem ser compostos de lipídios naturais ou sintéticos, em concentrações até 30% do total da formulação, com proporções de sólido e líquido que geralmente variam de 99:1 a 50:50.

Entretanto, grande atenção deve ser dada à formulação a ser desenvolvida, visto que alta quantidade de lipídeo dificulta a obtenção de tamanhos homogêneos, favorece instabilidade e pode tornar a formulação semissólida. Além disso, altas proporções de lipídio líquido na mistura podem provocar saturação e impedir a solidificação da partícula (APOSTOLOU *et al.*, 2021; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). Sendo assim, existem proporções ideais para diferentes combinações de lipídeos, os quais podem alcançar as características desejáveis se estudadas previamente. A depender do tipo de lipídeo sólido e líquido, e das proporções entre cada um, podem ser formados CLNs com matrizes de três tipos diferentes durante o processamento, cuja quantidade e disposição do fármaco na nanopartícula são variáveis (MÜLLER *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2014). Como é possível visualizar na Figura 3, os tipos de matrizes são classificados como: matriz imperfeita, amorfa ou múltipla.

Figura 3 - Tipos de CLN de acordo com a matriz lipídica formada



Fonte: autoria própria.

Na matriz do tipo imperfeita, a mistura dos lipídios sólido e líquido forma várias estruturas lipídicas de formatos diferentes e menos cristalinas, configurando uma matriz desordenada com lacunas entre as estruturas que permitem acomodar melhor o fármaco. Esse tipo requer o uso de lipídios estruturalmente diferentes. A matriz amorfa (não cristalina) ocorre quando a mistura de lipídeos é homogênea, evitando a recristalização do lipídeo ao resfriar, formando uma partícula sem estrutura definida com fármaco disperso por toda a matriz. Já o tipo múltiplo ocorre com a formação de compartimentos de lipídeos líquidos distribuídos na matriz, semelhante à estrutura de emulsões múltiplas, em que o fármaco pode ficar incorporado nos compartimentos líquidos ou na matriz sólida (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; HOUACINE; ADAMS; SINGH, 2020).

Tais diferenças estruturais influenciam diretamente no perfil de liberação dos fármacos nos nanocarreadores. Geralmente, uma matriz do tipo múltiplo confere uma liberação mais controlada, visto que o fármaco incorporado no compartimento líquido está circundado por lipídio sólido, dificultando a difusão dele para o meio externo. Portanto, essas estruturas diferentes, específicas do CLN, conferem vantagens diferenciais dos SLN para melhor incorporação de fármacos e menor extravasamento ao longo do armazenamento (DAS; NG; TAN, 2012; HOUACINE; ADAMS; SINGH, 2020). Essas vantagens somadas às características das nanopartículas lipídicas oferecem de proteção aos IFAs, baixa toxicidade, menor ativação do sistema imune, fácil obtenção sem necessidade de solvente orgânico, baixo custo e versatilidade química, tornam os CLNs formulações muito atrativas para o desenvolvimento de medicamentos para as diferentes vias de administração. Além disso, possuem vantagens para administração oral, pois permitem maior permeabilidade intestinal, absorção por circulação sanguínea e linfática, possibilitando maior biodisponibilidade (ANSARI *et al.*, 2015; DAS; NG; TAN, 2012; DATE; HANES; ENSIGN, 2016). Por fim, o uso de CLNs como nano-DDS permite melhoria das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas dos IFAs, perfil de liberação controlada e/ou prolongada de fármacos, redução de doses terapêuticas e direcionamento ao local de ação, o que propicia redução de toxicidade. Tais propriedades são dependentes das características das nanopartículas, sendo necessária uma abordagem rigorosa quanto à caracterização para garantir a qualidade do produto e segurança do seu uso.

2.2.1.2 Caracterização físico-química

Entre os critérios mais importantes de qualidade das nanopartículas estão o tamanho, a distribuição e homogeneidade de tamanho, morfologia e estabilidade, pois influenciam diretamente na performance e eficácia. Por isso, as caracterizações das propriedades físico-químicas dos CLNs são realizadas rotineiramente. Os principais testes incluem avaliação do diâmetro médio, do índice de polidispersão (PdI) e medida do potencial zeta (PZ), os quais confirmam a qualidade do sistema obtido, bem como permitem avaliação de estabilidade física ao longo do tempo de armazenamento (DANAEI *et al.*, 2018; MANAIA *et al.*, 2017). Medidas de pH podem ser feitas para avaliação da estabilidade química da dispersão coloidal, principalmente quando se trata de formulações compostas de lipídeos que podem sofrer degradação, gerando ácidos graxos livres que provocam alterações no pH do sistema. Adicionalmente, técnicas mais avançadas como difração de raios X, espectroscopia

de infravermelho, análises térmicas e microscopias podem ser utilizadas para elucidar melhor as estruturas dos nanocarreadores e sua interação com os fármacos, ajudando a compreender e relacionar seu comportamento no organismo (MOURDIKLOUDIS; PALLARES; THANH, 2018).

O tamanho é um atributo muito crítico das nanopartículas que afeta a estabilidade, eficiência de encapsulamento, perfil de liberação do fármaco, permeabilidade e biodistribuição. A permeabilidade celular depende da endocitose e outros mecanismos, que ocorrem principalmente com partículas menores de 300nm, variando mais ou menos para cada via de administração, sendo para a via oral uma permeabilidade mais acentuada quando se trata de tamanhos de partículas <100nm (BANERJEE *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016). Além disso, uma formulação eficaz, com boa segurança e estabilidade requer distribuição de tamanho homogênea, ou seja, um sistema monodisperso. Nesse sentido, a avaliação do índice de polidispersão (PDI) é adequada pois mostra a distribuição dos tamanhos das partículas dentro de uma determinada amostra, cuja representação numérica varia de 0,0 a 1,0, sendo valores <0,1 considerados monodispersos e indica uma população mais homogênea de partículas, valores entre 0,2 e 0,3 indicam distribuição estreita de tamanhos e acima 0,4 reflete um sistema polidisperso, cuja distribuição de tamanhos é ampla (DANAEI *et al.*, 2018). Essas avaliações podem ser feitas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), que é amplamente empregada para tais análises. É uma técnica não invasiva, rápida e precisa que oferece boas estatísticas em relação ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas por meio da avaliação de dispersão da luz em função do tempo, proveniente do movimento Browniano (CARVALHO *et al.*, 2018; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2021). Uma técnica complementar para avaliação do tamanho de partículas são as microscopias eletrônicas, que também fornecem uma avaliação da morfologia das partículas.

O potencial zeta (PZ) reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica das partículas móveis e a camada de dispersante ao redor delas no plano de cisalhamento. Através do PZ, medido por mobilidade eletroforética, obtém-se a magnitude da carga de superfície das nanopartículas, que estará relacionada a uma maior ou menor repulsão eletrostática (CARVALHO *et al.*, 2018; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2021). Quando duas partículas se aproximam, eleva a interferência entre as camadas elétricas, aumentando também a atração de Van der Waals. Porém, quando existem cargas suficientes na superfície das nanopartículas, a repulsão eletrostática é maior do que as forças de atração, e as partículas permanecem dispersas e estáveis. Para isso, estudos demonstram ser necessário um PZ superior à 30mV (em módulo), considerando

partículas que não possui impedimento estérico como outra fonte de estabilização. Caso contrário, as forças de atração serão maiores e as partículas se agregarão (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; KOVACEVIC *et al.*, 2011). Quando os valores de PZ são baixos, a agregação só poderá ser impedida se houver impedimento eletrostático. Isso é possível para sistemas que contêm tensoativos não iônicos, porque sua presença na superfície das nanopartículas fornece barreira estérica que também atua como força de repulsão, evitando a agregação (CHOI; ADITYA; KO, 2014; KOVACEVIC *et al.*, 2011). Além disso, o PZ é influenciado pela concentração da suspensão, pelo solvente, pH e presença de eletrólitos, visto que todos esses podem promover mudanças nas cargas elétricas na superfície da nanopartícula, causando alterações na magnitude do potencial zeta e, em muitos casos, o sinal da carga exibida pelas partículas (BROWN; GOEL; ABBAS, 2016; MANAIA *et al.*, 2017).

Como o DLS pode fornecer informações sobre variação de tamanhos e PDI para indicação de tendência de agregação, e o potencial zeta sobre suficiência da repulsão eletrostática, estes parâmetros podem ser avaliados em conjunto para uma caracterização mais completa do sistema e acompanhamento de estabilidade (BHATTACHARJEE, 2016; FARKAS; KRAMAR, 2021). Portanto, a avaliação desses parâmetros ao longo do tempo de armazenamento fornece, informações sobre o surgimento de fenômenos de instabilidade no sistema, pois quanto mais rápido e mais pronunciados forem o aumento dos tamanhos e do PDI e a diminuição do potencial zeta, menos estável pode se encontrar o sistema.

Existem também diversas outras técnicas que auxiliam na determinação da estrutura, composição, morfologia e demais características das nanopartículas. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica baseada na medição da absorção de radiação eletromagnética com comprimentos de onda na região do infravermelho médio (4000–400 cm^{-1}). Moléculas que absorvem radiação no infravermelho fornece um espectro que mostram a posição de bandas e intensidade de picos relacionados às suas ligações e grupos funcionais específicos, gerando informações sobre sua estrutura (ROJEK; WESOŁOWSKI, 2019). Assim, é possível obter informações sobre a composição de materiais, estrutura da molécula e formação de ligações. Através da comparação do espectro do IFA e de cada componente das nanopartículas é possível obter informações sobre interações, compatibilidade, confirmação da incorporação do fármaco no sistema e até presença de ligantes específicos na superfície das nanopartículas (CHADHA; BHANDARI, 2014).

Para avaliação do comportamento térmico das matérias-primas e dos sistemas desenvolvidos a Termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são as técnicas mais utilizadas. Através das análises térmicas é possível obter informações relevantes como pureza, mudanças de fase polimórfica, alteração de estado físico e decomposição dos materiais, sendo importantes para controle de qualidade das matérias-primas e sistemas obtidos (MANSFIELD, 2015). A TG avalia a perda de massa em eventos térmicos dos materiais, sendo frequentemente utilizada para estudos de compatibilidade, comparando as curvas de misturas fármaco-excipiente com as dos ingredientes isolados das formulações (CHADHA; BHANDARI, 2014; MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018).

A DSC é uma técnica termoanalítica na qual são medidas a entalpia e temperatura dos eventos térmicos das amostras submetidas ao aquecimento controlado em atmosfera inerte ao longo do tempo (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018). Eventos térmicos tais como fusão, recristalização, decomposição e transição de vítrea podem ser analisados, permitindo elucidar o estado físico dos insumos antes e após obtenção das nanopartículas e identificar potenciais interações químicas. No caso de formulações lipídicas, o DSC também permite identificar o índice de cristalinidade de misturas de lipídeos e da nanopartícula, bem como avaliar transições polimórficas, podendo ser aprimorado com avaliações em DRX (ROCHA *et al.*, 2022; TENGKU-ROZAINA; BIRCH, 2019). A difração de raios X (DRX) é um dos métodos mais usados para avaliar os aspectos estruturais de amostras e nanocarreadores. A técnica mede a interação da difração de raios X com redes cristalinas ou estados amorfos de uma amostra, identificando a estrutura, o tamanho médio dos cristais e o grau de cristalinidade. Trata-se de um método valioso para entender a cristalinidade da matriz lipídica nas nanopartículas, e variações polimórficas dos lipídeos isolados e no sistema (RIBEIRO *et al.*, 2015; SEVERINO *et al.*, 2012; TETYCZKA *et al.*, 2019).

2.2.1.3 Liofilização

Através da caracterização físico-química das nanopartículas é possível saber se as mesmas possuem as propriedades condizentes com a qualidade do sistema, as quais contribuirão com sua estabilidade à longo prazo. A estabilidade é uma propriedade importante que traz evidências de como as características físico-químicas de um produto varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais e também fatores intrínsecos, definindo suas condições ideais de

armazenamento (PEREIRA, 2015; WHO TECHNICAL SERIES REPORT, 2018). Em outras palavras, sua avaliação contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e fornece subsídios para aperfeiçoamento destas, produzindo informações sobre a qualidade e segurança dos produtos.

As nanopartículas, assim como demais sistemas coloidais, podem sofrer instabilidade físico-química durante período de armazenamento, devido à possibilidade de ocorrência de agregação das partículas e sedimentação, degradação dos componentes e até mesmo liberação da substância ativa para a fase aquosa (MEHNERT; MÄDER, 2012; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021). Isso ocorre devido ao movimento das partículas em dispersão que, mesmo com um sistema tensoativo eficaz, pode levar à choques que à longo prazo favorece aglomeração e, conseqüentemente, início de instabilidade (CALGAROTO, 2018). Assim, uma forma de minimizar esses problemas de instabilidade é a remoção de água do sistema, já que as partículas em dispersão possuem facilidade de movimentação e de reação entre os componentes, além de proliferação de micro-organismos. Ademais, materiais secos facilitam obtenção de medicamentos durante a transposição de escala.

Entre os processos de secagem disponíveis, a liofilização destaca-se por não empregar altas temperaturas, o que é importante para a estabilidade das nanopartículas e dos IFAs termosensíveis ou de baixo ponto de fusão. Tal vantagem se deve ao fato de que a liofilização é baseada na remoção da água por sublimação sob condições de baixa pressão ou vácuo, a qual ocorre em três etapas: congelamento (solidificação), secagem primária (sublimação do gelo) e secagem secundária (dessorção da água) (HOWARD *et al.*, 2012). Na etapa de congelamento, os cristais de água se formam no líquido solidificado, onde uma pequena quantidade de água ainda permanece no estado líquido, a qual é conhecida como água ligante. A secagem primária está relacionada com a sublimação da água no estado sólido, que passa direto da porção que foi seca para a superfície da amostra, seguindo pela secagem da superfície onde o vapor passa da amostra para a câmara do condensador. Já a secagem secundária consiste na remoção da água adsorvida ao produto (CALGAROTO, 2018; PEREIRA, 2015).

Existem várias formas de congelamento de nanopartículas descritas na literatura, tais como nitrogênio líquido e ultrafreezers com diferentes temperaturas, sendo esta uma etapa de grande importância na liofilização, uma vez que tais condições de congelamento podem influenciar na eficiência de secagem e nas características finais do liófilo, podendo causar problemas às nanopartículas. Isso porque, durante a etapa de congelamento da amostra, ocorrem diferentes tensões ao produto e a formação de um concentrado de nanopartículas que podem se fundir e/ou agregar. Por

esta razão, agentes crioprotetores devem ser adicionados às dispersões de nanopartículas antes de iniciar o congelamento (LUO, W. C. *et al.*, 2021; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021). Tais excipientes atuam para conseguir uma proteção na fase de solidificação, devido à formação de uma matriz amorfa em torno das estruturas que promove espaçamento entre as partículas, evitando a agregação e facilitando a ressuspensão das mesmas. Entre os crioprotetores mais utilizados estão açúcares como a trealose, sacarose, glicose, lactose e manitol (DOKTOROVOVA *et al.*, 2013; HOWARD *et al.*, 2012).

As pesquisas demonstram diferentes resultados nos processos de liofilização devido à diversidade de crioprotetores e nanopartículas estudadas, onde a razão crioprotetor/nanopartícula é um critério importante a ser considerado. Geralmente, concentrações de crioprotetor podem variar de 5 à 30% para alcançar a estabilidade do sistema e manutenção das características originais após redispersão, podendo ocorrer variações nas concentrações para mais ou para menos (DOKTOROVOVA *et al.*, 2013). Alguns estudos relatam proporções de crioprotetor de 1/1 até 1/10 (m/m) em relação à quantidade de lipídeo na amostra. Entretanto, concentrações muito baixas podem prejudicar a secagem efetiva e inviabilizar a redispersão, bem como concentrações muito altas podem levar à formação de partículas aglomeradas e sedimentação. Tudo dependerá também da composição das nanopartículas e concentração das mesmas (PEREIRA, 2015; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021). Nesse contexto, é necessária uma investigação do tipo e concentração de crioprotetores a ser usados, de modo a conferir a integridade das nanopartículas durante o processo, mantendo suas características próximas às anteriores a secagem, uma vez que a conservação das características originais do produto é um fator importante para uma liofilização bem-sucedida.

2.3 ENSAIO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO

A produção de nanopartículas é complexa, porque pequenas modificações no processo de fabricação afetam as nanopartículas em termos de características físico-químicas (ou seja, tamanho de partícula, índice de polidispersão e forma de partícula), parâmetros biológicos (ou seja, liberação, permeação, absorção) e atividade farmacológica. Assim, é importante considerar diversos parâmetros da fabricação para se obter uma formulação com resultados consistentes. Para isso, é necessário projetar formulações de forma a garantir a qualidade do produto pretendido, o que requer o controle dos fatores críticos envolvidos na variabilidade do produto e dos métodos.

O planejamento experimental, também conhecido como *Design of experiments* (DoE), é uma abordagem sistemática de execução de experimentos com objetivos predefinidos para avaliar parâmetros que podem influenciar no resultado final. Essa abordagem atraiu muita atenção recentemente para a otimização de nanopartículas, com o intuito obter nanocarreadores com as características de qualidade necessárias, baseado na triagem dos atributos críticos do material e parâmetros críticos do processo (POLITIS *et al.*, 2017; TAVARES LUIZ *et al.*, 2021). Para isso, vários modelos matemáticos e testes estatísticos estão disponíveis para avaliação dos parâmetros que influenciam as características físico-químicas das formulações e o efeito desses parâmetros é avaliado perante as principais características das nanopartículas.

O DoE é aplicável quando um grande número de variáveis pode interferir nos produtos. Ele ajuda a entender como os fatores de entrada (variáveis independentes) afetam as respostas (variáveis dependentes), que são os parâmetros desejados do produto. Assim, é possível otimizar as respostas baseado nos parâmetros a ser analisado em diferentes níveis (JAVED *et al.*, 2022). No caso das nanopartículas lipídicas, as características desejadas mais avaliadas são o tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento do fármaco. Já os principais fatores que influenciam nessas características estão relacionados à sua composição, como o tipo e quantidade de lipídeos, tipos e proporções de tensoativos, quantidade de fármaco e proporção de cada componente da formulação, assim como aos parâmetros dos métodos de obtenção, que incluem o tempo e taxa de emulsificação, velocidade de homogeneização, tempo e amplitude de sonicação, pressão e número de ciclos de homogeneização, entre outros fatores a depender do método (MUSIELAK; FELICZAK-GUZIŁ; NOWAK, 2022; PINTO *et al.*, 2019; TAVARES LUIZ *et al.*, 2021). As etapas de execução de um planejamento experimental são apresentadas por uma matriz, que compreende o plano formal construído para conduzir o planejamento, incluindo os fatores, níveis e os experimentos resultantes da combinação deles. Os experimentos são executados em ordem aleatória para diminuir a interferência de variáveis incontrolláveis. A partir de então, são realizadas as avaliações para obtenção das respostas que em seguida são analisadas utilizando modelos estatísticos para tratamento e interpretação dos dados (BEHBAHANI *et al.*, 2017).

Os modelos matemáticos comumente usados para desenvolver nanocarreadores incluem o planejamento fatorial fracionado e o completo, e os métodos de superfície resposta como o planejamento composto central e Box-Behnken. Um experimento fatorial permite observar os efeitos que vários fatores podem ter sobre uma resposta, onde apenas os níveis estabelecidos para os fatores

são testados, completo ou fracionado, e utilizados no cálculo dos efeitos nas respostas. Já os métodos de superfície de resposta têm níveis adicionais ao estabelecido, onde é possível avaliar os fatores em uma região definida entre os níveis, e estimar quais os níveis ótimos dos fatores para uma determinada resposta (JAVED *et al.*, 2022; TAVARES LUIZ *et al.*, 2021). Independente do modelo utilizado, um ensaio de pré-formulação realizado através do DoE e sua avaliação estatística fornecem conclusões mais precisas do que a abordagem aleatória ou tentativa e erro. Isso porque os resultados do DoE reduzem o número de tentativas experimentais e fornecem conjuntos de dados mais informativos, além de permitir estudar a interação entre vários fatores e condições (BEG *et al.*, 2019; POLITIS *et al.*, 2017). Dessa forma, é possível obter as melhores formulações e designar a eleita para ser reproduzida e seguir demais ensaios ao longo da pesquisa.

2.4 AVALIAÇÃO DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Confirmada a qualidade das propriedades coloidais das nanopartículas, alguns ensaios de desempenho *in vitro* são necessários para avaliação prévia de cinética, atividade farmacologia e toxicidade, servindo também para correlações *in vitro/in vivo*. Assim como acontece com a maioria das formas de farmacêuticas, a qualidade e o desempenho do produto devem ser verificados através de vários experimentos. Dado que nanopartículas são sistemas de entregas de fármacos, é imprescindível que seja avaliada sua liberação *in vitro* para entender a maneira que os IFAs são liberados e poder elaborar seu perfil cinético. A utilidade e importância dos testes de liberação *in vitro* são tanto do ponto de vista do desenvolvimento de medicamentos quanto do ponto de vista de controle de qualidade.

Algumas técnicas são relatadas para determinar o padrão de liberação *in vitro* de fármacos encapsulados em nanopartículas, como liberação direta por agitação, agitação seguida por centrifugação/ultracentrifugação, células de difusão de compartimento com membranas, e difusão através de bolsa de diálise (JAIN; THAREJA, 2019). A escolha do método dependerá da disponibilidade de materiais, adequação aos nanocarreadores e fármacos estudados, via de administração simulada no ensaio, praticidade e reprodutibilidade das condições. Geralmente, os mais utilizados são as técnicas que usam membranas pois facilitam a remoção das nanopartículas do meio de liberação para análise sem necessidade de filtração (D'SOUZA, 2014; MIRCIOIU *et al.*, 2019). Entre estes, o método de diálise têm sido o mais versátil e popular para avaliar a liberação de

fármacos em nanopartículas para administração oral e parenteral, enquanto células de difusão por compartimento, como as células de Franz, mais empregadas para administração cutânea

No método de bolsa de diálise, as nanopartículas são introduzidas em um saco de diálise de tamanho de poro previamente definido, que posteriormente é selado e colocado em um recipiente maior contendo meio de liberação, e mantido sob agitação e temperaturas constantes. O fármaco liberado das nanopartículas é difundido através da membrana de diálise para o compartimento externo de onde são retiradas amostras para análise em intervalos de tempos determinados. Por isso, a seleção da membrana com tamanho de poro adequado (MWCO - *Molecular Weight Cut-Off*) não pode ser esquecida. Além disso, a seleção do meio de liberação de acordo com as condições do teste deve ser avaliada baseado na via de administração testada, bem como o volume do meio, visto que a solubilidade do fármaco no meio é essencial, considerando a manutenção das condições *sink* (D'SOUZA, 2014; HEREDIA *et al.*, 2022). Em geral, a quantidade de amostra contida na bolsa de diálise é significativamente menor do que o volume do meio externo.

A liberação do fármaco das nanopartículas pode ocorrer através de diferentes mecanismos e o uso de modelos matemáticos permite a elucidação desses mecanismos de liberação, descreve os perfis de liberação e serve para representar e comparar perfis (D'SOUZA, 2014). Entre os mecanismos possíveis estão o desprendimento do IFA aderido à camada externa, difusão através da matriz, relaxamento da matriz, erosão da matriz e/ou combinação de processo de difusão e erosão. Esse comportamento irá depender da solubilidade inerente do fármaco, composição da nanopartícula, tipo de nanocarreador, presença de cargas superficiais. Em matrizes insolúveis ou inertes é comum que ocorra a penetração de líquido na matriz, seguido de difusão do fármaco pelos poros deixados pelo solvente. Neste caso, a matriz permanece inalterada ao longo de toda a difusão, sendo eliminada quase que intacta. Entretanto, em algumas matrizes pode acontecer por erosão ou relaxamento da matriz, a depender da sua composição e as condições do meio e temperatura. Também existe a possibilidade de ocorrer mecanismos combinados (MIRCIOIU *et al.*, 2019; SIEPMANN; SIEPMANN, 2011). Desta forma, modelos matemáticos podem ser utilizados a fim de estabelecer um desses mecanismos, como também classificar o transporte ocorrido.

Entre os principais modelos matemáticos utilizados nas pesquisas para avaliação dos perfis de liberação estão o modelo de ordem zero, modelo de primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin, Hixson-Crowell e Weibull. Cada modelo sugere um mecanismo de liberação, bem como o tipo de transporte do fármaco para o meio, que pode ser classificado em difusão Fickiana

(caso I) e difusão não-Fickiana (caso II) (BRUSCHI, 2015). Na difusão Fickiana, o transporte do fármaco acontece segundo as leis de Fick, em que as moléculas do se difundem de uma região de maior concentração para menor, até que o equilíbrio seja atingido e que a taxa de difusão seja diretamente proporcional ao gradiente de concentração. É um transporte que depende da concentração do fármaco. Já na difusão não-Fickiana, o transporte do fármaco ocorre tanto por difusão quanto por relaxamento da matriz, variando a intensidade de atuação de cada fator na liberação. Assim, ele pode ser de três tipos: transporte anômalo, onde a difusão e o relaxamento ocorrem na mesma magnitude; transporte caso II, onde a velocidade de difusão do solvente é maior que a velocidade de relaxamento; e transporte super caso II, onde a velocidade de difusão do solvente é muito maior que o relaxamento e, portanto, é o fator determinante do mecanismo de liberação (BAISHYA, 2017; SINGHVI; SINGH, 2011). Todos esses fatores da cinética de liberação dependem, principalmente, do tipo de nanopartícula, sua composição, a estrutura da matriz, a quantidade de fármaco encapsulado e a forma como está disperso no sistema, as quais são características físico-químicas das nanopartículas que também determinam seu desempenho em vários outros ensaios.

2.5 CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

Avaliação de citotoxicidade *in vitro* em células servem como triagem para avaliar a toxicidade de novas moléculas e novos sistemas. No caso de fármacos incorporados em nanocarreadores, em que a atividade biológica pode ser intensificada, é necessário comprovar também a influência na toxicidade. Ensaios de citotoxicidade por meio de cultura celular são utilizados nessa finalidade com sucesso, devido a sua reprodutibilidade, rapidez, sensibilidade e custo acessível (KONG *et al.*, 2011). De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization - ISO), ensaios *in vitro* são os primeiros testes para se avaliar o quanto um material é ou não biocompatível (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION, 2009). Isso se deve ao fato de que os estudos com cultura de células serem capazes de determinar efeitos citotóxicos dos materiais que permanecerão em contato com tecidos humanos, podendo ser realizados através de técnicas rápidas, reprodutíveis e monitorados os efeitos ao longo do tempo experimental. As avaliações de citotoxicidade podem abranger ensaios efetuados em matérias-primas, formulações em desenvolvimento e produtos acabados.

Os ensaios de citotoxicidade são utilizados a fim de avaliar a viabilidade de materiais através do dano causado à diferentes linhagens de células. Os métodos mensuram os processos metabólicos e função mitocondrial das células expostas às diferentes substâncias testadas e avaliam a interferência no crescimento celular. Além de verificar efeitos citotóxicos de compostos, podem também medir os resultados da proliferação de células e determinar células viáveis (SAHU *et al.*, 2016). Desta forma, através dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* é possível selecionar materiais mais adequados para a aplicação *in vivo*, minimizando assim o número de testes em experimentais animais.

2.6 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Quando uma molécula ou sistema são sintetizados para atuar contra um determinado parasita, uma etapa importante do seu desenvolvimento é avaliar sua atividade *in vitro* contra o parasita. No caso da Leishmaniose, não há um modelo de ensaio padronizado para os testes de atividade *in vitro*. Além de diferentes métodos, os trabalhos utilizam diferentes cepas do parasito, diferentes formas evolutivas e diferentes meios de cultura (COHEN; AZAS, 2021). O método clássico para a triagem nas formas promastigotas é a contagem direta da cultura de parasitas, submetida ao tratamento com as amostras em câmara de Neubauer, o qual é simples, porém pouco reprodutível. Outros ensaios comuns se baseiam em metodologias convencionais, que incluem o ensaio de MTT para avaliação das formas promastigotas do parasita e a microscopia óptica, para as formas amastigotas. Os testes de MTT para as promastigotas possuem o mesmo mecanismo de funcionamento quando em células, através da redução do reagente pela atividade mitocondrial dos parasitas viáveis. Já os testes de microscopia óptica para as formas amastigotas são avaliados pela determinação da porcentagem de macrófagos infectados por contagem em microscópio (ALMEIDA, 2012; DE MUYLDER *et al.*, 2011).

Tais métodos têm sido relatados como mais laboriosos e que exigem mais tempo, o que promoveu o desenvolvimento de novas alternativas. Métodos mais recentes têm utilizados genes repórteres que são transfectados nos parasitas, os quais passam a expressar proteínas fluorescentes que podem ter sua atividade medida por detecção colorimétrica. Alguns dos genes repórteres mais utilizados são a β -galactosidase, lactamase e luciferase. É uma ferramenta que está sendo muito utilizada como alternativa nos testes de seleção de candidatos ao tratamento de diversas doenças, dentre elas as parasitárias (OLIVEIRA, 2014; SANTOS *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados otimizados contendo antimoniato de meglumina como alternativa terapêutica de uso oral contra leishmaniose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos insumos obtidos;
- Realizar ensaio de compatibilidade fármaco-excipientes e excipiente-excipiente;
- Realizar planejamento experimental para otimização do nanocarreador;
- Obter carreadores lipídicos nanoestruturados contendo antimoniato de meglumina;
- Proceder as caracterizações físico-químicas e confirmação da formação dos nanocarreadores;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas em condições gastrointestinais simulada;
- Avaliar a estabilidade de armazenamento das nanopartículas em diferentes condições de temperatura;
- Realizar a liofilização do nanocarreador obtido;
- Conduzir ensaios de liberação *in vitro* e perfil cinético das nanopartículas obtidas;
- Conduzir ensaios de citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas obtidas;
- Realizar ensaio de atividade leishmanicida dos nanocarreadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os lipídios sólidos Dynasan[®] 114 (trimiristrina), Dynasan[®] 118 (triestearina) e Inwitor[®] 900K (Monoestearato de glicerila) foram doados pela IOI Chemical (Hamburg, Alemanha), o Compritol[®] ATO 888 (behenato de glicerila) foi doado pela MCassab (São Paulo, Brasil). O lipídio líquido Miglyol[®] 812 (triglicerídeo ácido cáprico/ caprílico) foi doado pela IOI Chemical (Hamburg, Alemanha) e o ácido oleico foi doado pela Croda (São Paulo, Brasil). O agente tensoativo Alkest CSO 300 (óleo de rícino etoxilado OE30) foi doado pela Oxiten (São Paulo, Brasil) e o Span[™] 80 (monooleato de sorbitano) foi comprado da Sigma (St Louis, EUA). Por fim, o IFA antimoniato de meglumina adquirido da Acros Organics (Geel, Bélgica). Água ultrapura foi obtida pelo equipamento Milli Q water Ultrapure Simplicity[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha). Além disso, foram empregados também solventes adequados para a realização de testes de doseamento e outros ensaios dos laboratórios parceiros.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização do IFA

O antimoniato de meglumina (AM) foi caracterizado quanto suas propriedades físico-químicas através de análises térmicas (DSC, TG/DTG), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), teor de antimônio no IFA, e solubilidade.

4.2.1.1 Análises térmicas

As análises térmicas do IFA ocorreram pelas técnicas de Termogravimetria (TG/DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), baseado no método de Timóteo (2019).

A análise termogravimétrica (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) foram realizadas simultaneamente usando um DTG-60 (Shimadzu, Japão). Amostras com uma massa de

aproximadamente $5 \pm 0,5$ mg do IFA foram adicionadas ao cadinho de platina e submetido ao ensaio sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, m temperatura entre 20 a 600 °C no equipamento DTG-60H Shimadzu®. Os eventos térmicos e a derivada (DTG) foram determinados pelo software TA-60 Shimadzu®.

Para a avaliação por DSC, uma massa de $2,5 \pm 0,5$ mg foi adicionada à um cadinho de alumínio que foi hermeticamente selado e submetido à análise sob temperatura de 25 °C à 300 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, no equipamento DSC-60 Shimadzu®. Os eventos térmicos e a entalpia foram determinados pelo software TA-60 Shimadzu®.

4.2.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho da amostra analisada foi obtido utilizando pastilhas de KBr como suporte sólido, baseado no método de Aminu (2021). Para preparo da pastilha utilizou-se aproximadamente 1 mg da amostra para 100 mg de KBr, os quais foram macerados até a obtenção de um pó fino. A mistura foi então submetida a pressão de 78,5 KN, empregando prensa hidráulica Shimadzu® por um período de dez minutos. Após a obtenção da pastilha de KBr, esta foi analisada em espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu®), na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 45 scans e resolução de 8 cm^{-1} .

4.2.1.3 Difração de Raios-X (DRX)

O grau de cristalinidade do IFA foi determinado pela análise de difração de raios X (DRX), obtido usando um difratômetro Smartlab® (Rigaku, Japão), equipado com anodo de cobre, comprimento de onda 1,5443 Å. As amostras foram analisadas no ângulo de difração 2θ na faixa de 5 à 60°, com velocidade de varredura de 5 °/min e passo de 0,03 °/s (AMINU *et al.*, 2021). A análise foi realizada no Central multiusuário do Departamento de Física da UFPE.

4.2.1.4 Teor de Antimônio no IFA

O doseamento de antimônio (Sb) no IFA (antimoniato de meglumina, lote A0374354) ocorreu por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) conforme preconiza a monografia do Antimoniato de Meglumina na Farmacopeia (BRASIL, 2019). Em suma, a metodologia foi empregada em equipamento espectrômetro Varian AA, com software SpectraAA- 220 (Varian®, Austrália), utilizando chama com ar acetileno, lâmpada de cátodo oco para elemento Sb e leitura no comprimento de onda de 217,6nm e resolução do monocromador de $(0,20 \pm 0,10)$ nm. A amostra foi preparada como uma solução de antimoniato de meglumina a 30% (p/v) em água e diluída 2500 vezes com uma solução de ácido clorídrico 6 M. Foi construída uma curva de analítica com padrão de antimônio (Sb_2O_3 em HCl 2 mol/L, 1000 mg/L, lote BCCC3110, Merck) com cinco pontos, no intervalo de concentração de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ por diluição na solução de ácido clorídrico 6 M. A solução de HCl 6M também foi usada como zero para as análises. A partir da concentração de Sb determinada foi obtido o teor de Sb no antimoniato de meglumina. A análise foi realizada na Central multiusuário do Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN) em Recife.

4.2.1.5 Ensaio de solubilidade

O ensaio de solubilidade em água e tampões foi realizado pelo método da agitação orbital em frascos (*shake flask*), baseado na Farmacopeia 6ª edição (BRASIL, 2019). Resumidamente, 350mg de AM foram colocados em tubos de ensaio com 1mL de água, solução tampão de HCl pH 1,2, solução tampão fosfato de pH 6,8 ou solução tampão fosfato de pH 7,4 e submetidos à agitação de 100 rpm à $37,0 \pm 1,0$ °C por 72h. Os doseamentos das alíquotas foram realizados por FAAS conforme item 1.2.1.5. A solubilidade foi expressa em mg/mL de antimoniato de meglumina, levando-se em consideração o teor de antimônio doseado. O ensaio foi realizado em triplicata, para cada solvente.

4.2.2 Ensaio pré-formulação

4.2.2.1 Triagem de lipídeos

Uma série de lipídeos sólidos (Dynasan[®] 114, Dynasan[®] 118, Compritol[®] ATO, Imwitor[®] 900k) e dois lipídeos líquidos (Miglyol[®] 812 e Ácido oleico) foram combinados e analisados separadamente ao comportamento térmico da mistura lipídica. As misturas físicas na proporção 1:1 de cada lipídeo sólido com cada lipídeo líquido foram submetidas à análise por DTA conforme item 4.2.1.1 até 200 °C, para análise da entalpia e temperatura dos eventos de fusão, bem como a cristalinidade da mistura lipídica.

4.2.2.2 Ensaio de compatibilidade

Um ensaio de compatibilidade fármaco-excipientes foi realizado para triagem dos componentes que seriam usados no desenvolvimento dos CLNs. Uma análise com diversos lipídeos sólidos e líquidos, com os tensoativos e o IFA isolados, em forma de misturas binárias e misturas da formulação completa foi realizada por TG/DTG, DTA e FTIR, de modo a avaliar possíveis incompatibilidades entre os componentes. Alterações drásticas como deslocamento, surgimentos ou desaparecimento de eventos térmicos, bem como surgimento/desaparecimento de bandas no espectro do infravermelho comparados ao perfil original dos compostos isolados foram avaliados quanto à indicação de incompatibilidades. Os componentes que apresentarem compatibilidade foram utilizados para obter os CLNs.

4.2.2.3 Projeto experimental e otimização dos CLNs

Um design de experimentos (DoE) foi realizado para ajustar todos os parâmetros necessários para a síntese de nanopartículas lipídicas com os melhores parâmetros de tamanho, índice de polidispersão e eficiência de encapsulamento, ou seja, menor tamanho e PDI, e maiores potencial zeta e eficiência e encapsulamento. As formulações testadas foram compostas pelos pares de lipídeos escolhidos baseado na triagem de lipídeos por DTA, e por uma quantidade de 10% de tensoativos, sendo o tipo de tensoativo e a proporção entre tensoativos hidrofílico e lipofílico

baseados nos ensaios de EHL obtido em experimentos prévios. Assim, foi realizada uma triagem da composição lipídica da formulação e dos parâmetros do método de obtenção que influenciam nas características das nanopartículas, ainda sem o fármaco. Para isso, foi desenvolvido um DoE do tipo central composto, com 4 fatores, 2 níveis e replicação de ponto central, cujas variáveis independentes foram a quantidade total de lipídeos na formulação, a proporção entre lipídeos sólido e líquido, a potência e tempo de sonicação. As variáveis dependentes escolhidas foram o diâmetro médio, PDI e potencial zeta. Esta metodologia de superfície resposta exigiu 31 execuções experimentais, cujo desenho experimental está mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis empregadas no planejamento central composto para os ensaios com CLNs sem o fármaco

Fatores	Níveis	
	(-1)	(+1)
Quantidade de lipídeo (% p/p)	6	10
Proporção de lipídeo sólido/líquido (% p/p)	65/35	85/15
Potência (amplitude %)	40	70
Tempo (min)	4	10

Fonte: dados da pesquisa

Com base nos resultados da triagem desse planejamento experimental, foram padronizados o tempo e potência de sonicação e estabelecida a faixa de quantidade de lipídeos e proporção de lipídeo sólido/líquido que desenvolveram as nanopartículas com melhores características. Esses parâmetros foram utilizados para desenvolver um novo experimento central composto com dois fatores, dois níveis e repetição do ponto central, agora com CLNs contendo fármaco, para otimização da formulação e avaliação da eficiência de encapsulamento. O experimento resultou em 13 execuções, cujo diâmetro médio, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulamento foram usados como variáveis dependentes. O desenho experimental gerado está mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis empregadas no planejamento central composto para otimização dos CLNs contendo fármaco

Fatores	Níveis	
	(-1)	(+1)
Quantidade de lipídeo (% p/p)	6	8
Proporção de lipídeo sólido/líquido (% p/p)	65/35	85/15

Fonte: dados da pesquisa.

4.2.3 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs)

Os CLNs foram preparados pela técnica de emulsificação múltipla por ultrasonicação à quente. A fase oleosa (O) composta pelo lipídio sólido, lipídio líquido e tensoativo lipofílico (Span 80) e a fase aquosa interna contendo o fármaco à 300 mg/mL (A_1), que correspondeu à 29% da fase oleosa, foram aquecidos separadamente à uma temperatura ± 60 °C superior do ponto de fusão do lipídeo sólido. A fase aquosa foi vertida lentamente na fase oleosa, sob agitação magnética por 1 min para formação da emulsão primária A_1/O . Em seguida, a fase aquosa externa (A_2) contendo o tensoativo hidrofílico (Alkest CSO 300), também aquecida à mesma temperatura e adicionada à emulsão primária, sendo submetidos à ultrasonicação usando um sonicador de sonda (Ecosonics®^{QR} 800, São Paulo). A emulsão formada ($A_1/O/A_2$) foi arrefecida para atingir a temperatura ambiente e formar o CLN por recristalização da fase lipídica (BECKER PERES *et al.*, 2016). A quantidade de lipídeos e os parâmetros de sonicação foram definidos pelo DoE. Já a concentração de tensoativos total foi fixada em 10% da formulação, onde a proporção tensoativo hidrofílico/lipofílico foi de 75% e 25% respectivamente, baseado em estudo prévio de EHL. Um CLN branco foi obtido da mesma forma, sem a presença do fármaco na A_1 . A melhor formulação obtida nesse DoE será selecionada para dar continuidade ao estudo, onde foi repetido o CLN para caracterização e demais ensaios.

4.2.4 Caracterização dos CLNs

4.2.4.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas foram determinados a 25°C com um ângulo de incidência de luz fixa de 90° por dispersão dinâmico de luz (DLS) usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). O potencial Zeta (PZ) foi medido por mobilidade eletroforética no mesmo equipamento (CAVALCANTI *et al.*, 2018). Para as medições, todas as amostras foram diluídas em água ultrapurificada 1:10. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4.2 Valor de pH

A determinação do pH das formulações foi realizada através de pHmetro digital de bancada (Micronal -B474), seguindo metodologia adequada para formas farmacêutica líquidas e preconizada pela 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). As leituras foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicata.

4.2.4.3 Análises térmicas

Termogravimetria foi realizada para avaliar a estabilidade térmica dos CLNs em dispersão, conforme item 4.2.1.1. A avaliação da cristalinidade da matriz lipídica dos CLNs foi realizada através da técnica de DSC, conforme método descrito no item 4.2.1.1. O índice de recristalização, ou cristalinidade relativa dos CLN, foi determinado a partir da entalpia de fusão da dispersão de CLN e do lipídeo sólido, de acordo com a equação 1:

$$IR = \frac{\Delta H_{NP}}{\Delta H_{LS} \times fase\ lipídica} \quad Eq.1$$

Onde, ΔH_{NP} é a entalpia de fusão dos CLNs, ΔH_{LS} é a entalpia de fusão do lipídeo sólido e a fase lipídica é a quantidade de lipídeo sólido presente na nanopartícula (MADUREIRA *et al.*, 2015).

4.2.4.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de FTIR foi realizada para confirmar a incorporação do fármaco nas nanopartículas em dispersão e as possíveis interações entre os componentes. A análise foi realizada de acordo com o método descrito no item 4.2.1.2.

4.2.4.5 Difração de Raios-X (DRX)

O grau de cristalinidade e a presença de formas polimórficas da matriz lipídica das nanopartículas em dispersão foram determinados pela análise de difração de raios X (DRX), obtidos usando conforme método descrito no item 4.2.1.3.

4.2.4.6 Determinação da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento do fármaco foi determinada pelo método indireto (CAVALCANTI *et al.*, 2018). As dispersões dos CLNs diluídas em água ultrapura (1:5) foram separadas do fármaco não encapsulado (livre) por ultrafiltração, utilizando filtros de centrífuga Amicon Ultra-0,5 (Millipore, Darmstadt, Alemanha) com tamanho de poro de 30 kDa, e centrifugadas a 7500 rpm por 45 minutos (Daiki DTC-16000). A fase dispersante separada contendo o fármaco livre (não incorporado) foi coletada, diluída em solução de HCl 6M para quantificação do AM por FAAS conforme método descrito no item 1.2.1.5. CLNs sem o fármaco foram preparadas da mesma forma e utilizadas como branco (NPB). A eficiência de encapsulamento (EE) do fármaco nas nanopartículas foi calculada de acordo com a equação 2:

$$EE (\%) = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{livre}}}{C_{\text{total}}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde C_{total} é a quantidade de fármaco total na nanopartícula e C_{livre} é a quantidade de fármaco não incorporado doseado após filtração.

4.2.5 Estudo de estabilidade dos CLN sob condições do TGI

A estabilidade física das nanopartículas preparadas foi avaliada em condições gastrointestinais simuladas, baseado na metodologia de Dong e colaboradores (2018). O ensaio foi realizado em meio simulado gástrico com tampão HCl pH 1,2 e meio simulado intestinal com tampão fosfato pH 6,8. Resumidamente, 500 μ L dos CLNs foram colocados em 5mL dos meios e incubados à 37 °C sob agitação de 100rpm, durante 2h e 4h nos meios gástricos e intestinais respectivamente. As amostras foram avaliadas quanto ao diâmetro médio das nanopartículas, PDI e potencial zeta em alíquotas retiradas em intervalos de tempos pré-definidos.

4.2.6 Determinação da estabilidade de armazenamento

As dispersões dos CLN foram divididas e armazenadas em temperatura ambiente ($30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob refrigeração ($4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Ao longo do período de armazenamento, análises das propriedades físico-químicas foram realizadas em intervalos de tempo pré-determinados (7, 15, 30, 45 dias), monitorando o diâmetro médio, PDI, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulamento.

4.2.7 Liofilização dos CLNs

CLNs recém-formulados foram utilizados para os testes de liofilização. Nesse ensaio, diferentes crioprotetores em diferentes concentrações foram testados, bem como diferentes formas de congelamento. Foram escolhidos a maltodextrina, manitol, lactose e trealose como crioprotetores, os quais foram utilizados em forma de solução nas concentrações de 30%, 60%, 100%, 125%, 185% em relação à quantidade de lipídeo (m/m), sendo adicionados na proporção de 1:2 ou 1:5 (v/v) aos CLNs. As amostras foram armazenadas em frascos de penicilina e levadas para congelamento em ultrafreezer à -80°C durante a noite (12h), ou rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. A liofilização foi realizada por 4 dias usando no equipamento LIOTOP® (modelo L101), sob pressão de cerca de 30 mmHg e temperatura de -54°C . Os CLNs liofilizados foram armazenados em temperatura ambiente durante o tempo do ensaio de estabilidade e, em intervalos de tempos definidos, foram redispersas em água ultrapura na mesma quantidade presente antes da liofilização, seguidos de homogeneização em agitador magnético por 15 minutos. As

amostras redispersas foram levadas para avaliação de diâmetro médio, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulamento.

4.2.8 Ensaio de liberação *in vitro*

Ensaio de liberação do fármaco *in vitro* dos CLNs foram conduzidos de acordo com a técnica de bolsa de diálise (LUAN *et al.*, 2015). Membranas de diálise de acetato de celulose com tamanho de poro de 12-14 KDa (SERVAPOR®, Alemanha) foram embebidos em água ultrapura 12h antes do ensaio. Para o teste, 3 mL da solução do AM e dos CLN em dispersão foram colocados, separadamente, na bolsa de diálise selada em ambas as extremidades e então colocado em um béquer contendo 30 mL do meio de liberação, sob agitação de 100 rpm em banho-maria à 37 ± 1 °C. O ensaio foi conduzido consecutivamente em diferentes meios, simulando a administração oral, sendo 2h em tampão HCl pH 1,2 (meio gástrico), 4h em tampão fosfato pH 6,8 (meio intestinal) e tampão fosfato pH 7,4 (circulação sanguínea) até o fim do ensaio. Em todos os estágios, 2 mL de meio de liberação foi retirado nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 12h, 24h, 36h e 48h, e a mesma quantidade de meio fresco foi repostado para manter o volume constante e as condições *sink*. A concentração de AM nas alíquotas retiradas foi medida por FAAS, segundo método do tópico 4.2.1.4, utilizando curva analítica com padrão de antimônio no intervalo de concentração entre 1 e 50 µg/mL. A solução de HCl 6M foi usada como zero para as análises, bem como as soluções tampão de cada etapa foram utilizadas como branco. Os resultados foram expressos pela porcentagem cumulativa de droga liberada em função do tempo, que foi calculada baseada na quantidade total de fármaco adicionada ao ensaio. Um segundo ensaio de liberação foi realizado após o processo de liofilização das nanopartículas. Neste caso, o CLN4 liofilizado foi redisperso em água ultrapura, na mesma quantidade presente antes da liofilização, e 3 mL desta dispersão foi utilizada no ensaio de liberação, o qual seguiu o mesmo protocolo citado acima.

A cinética de liberação do fármaco foi estimada usando o DDSolver, a fim de encontrar o modelo cinético mais adequado. Foram testados os modelos ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin e Hixon-Crowell. O coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}) foram calculados para determinar o modelo de melhor ajuste.

4.2.9 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram soltos das garrafas de cultura, colocados em placas de 96 poços e incubados por 24 h à 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após esse tempo, os compostos (AM, CLNs e Glucantime) foram adicionados nas concentrações entre 6,25 e 800 µg/mL e incubados novamente por um período de 72 h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle positivo e a Miltefosina como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25 µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5 mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em duplicata.

4.2.10 Ensaio de atividade leishmanicida em promastigotas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) e *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,0025 mg/mL de hemina e 1% de penicilina-estreptomicina (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contados e diluídos em meio Schneider's (Sigma) completo a 1×10^6 células/mL. Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações das amostras (6,25 a 800µg/mL) por 72h. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 10 minutos, a 22°C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC 70 Multiskan FC. Os resultados foram expressos como porcentagem de redução da absorbância dos poços com as amostras em comparação com parasitas não tratados. A Miltefosina foi utilizada como controle positivo e o meio de cultura foi utilizado como controle negativo. Os valores de IC₅₀ foram

calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.2.11 Ensaio de atividade leishmanicida em amastigotas

Para esta avaliação, macrófagos RAW 264.7 ($0,2 \times 10^5$ células/poço) foram incubados para aderência por 1h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* na proporção de 15 parasitas/macrófago, por um período de 6 h, a 37 °C e 5% de CO₂. Os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (6,25 a 800 µg/mL) por 72h, a 37°C e 5% de CO₂. Amastigotas incubadas apenas com meio de cultura e com Miltefosina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a incubação, os poços foram lavados, o meio RPMI foi substituído e foi adicionada solução de CPRG (chlorophenol red beta-D-galactopyranoside), seguida de nova incubação por 2-6 h, a 37 °C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. Os resultados foram expressos como porcentagem de redução da absorbância dos poços com as amostras em comparação com parasitas não tratados. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.2.12 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, exceto quando mencionado contrário, e os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). As avaliações estatísticas foram realizadas por comparação entre vários grupos de estudo usando ANOVA one-way com pós teste t-stundet no software Graphpad Prism® 5 (EUA). Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. O DoE foi realizado no software Minitab® 18 (EUA). Os gráficos foram construídos e avaliados pelos softwares Origin® 8.5 ou Graphpad Prism® 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO IFA

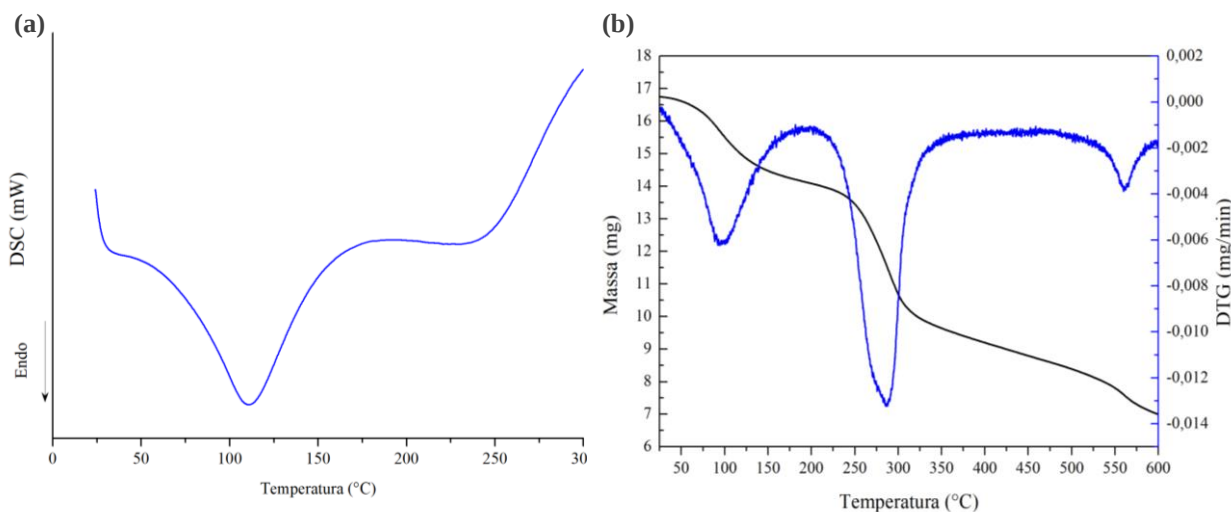
Durante desenvolvimento de medicamentos é imprescindível o controle de qualidade de matérias-primas, principalmente insumos farmacêuticos ativos. Para isso, são realizados ensaios de físico-químicos dos materiais para confirmação das propriedades conforme as especificações. No caso do antimoniato de meglumina, sua estrutura exata ainda permanece pouco compreendida, onde alguns estudos sugerem que o AM não possui uma estrutura única, e sim uma mistura de complexos de coordenação entre o antimônio e a meglumina (DE MORAES FLORES *et al.*, 2002; DEMICHELI *et al.*, 1999; FABRINO, 2021; ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998). Além disso, avaliações em espectroscopia de infravermelho, difração de raios X e análises térmicas também são escassas, sendo esse o motivo de poucos estudos para comparação dos resultados do presente trabalho.

5.1.1 Análises térmicas

Na curva de DSC mostrada na Figura 4a, pode ser observado o primeiro evento térmico, que possui natureza endotérmica (ΔH -212,51 J/g) e pico em torno de 110,80 °C, o qual está relacionado com evento de fusão do AM, bem como associado à perdas de água de solvatação. O início do evento exotérmico de termodecomposição pode ser observado no final da curva, a partir de 250°C. Observa-se também que não há picos bem definidos de eventos térmicos que indiquem cristalinidade no IFA, sugerindo que o mesmo se encontra no estado amorfo. A análise termogravimétrica do AM está representada na Figura 4b, que mostra a perda de massa em função da temperatura. Como pode ser observado na curva do TG, existem três eventos térmicos: o primeiro entre 65,9 °C e 130,8 °C, com perda de cerca de 15,3% de massa, atribuída à eliminação da água de solvatação; o segundo entre 254,9 °C e 305,6 °C, com perda de cerca 28% de massa, atribuída ao início de decomposição; e o terceiro evento entre 553 °C e 599 °C, com perda de cerca de 14% de massa atribuída ao evento final de decomposição, com perda de matéria orgânica. Não houve decomposição completa da amostra devido a faixa de temperatura avaliada, bem como ao resíduo se tratar de óxidos de antimônio (~35%), os quais se decompõem em temperaturas muito

elevadas não avaliadas em TG. Esses resultados estão em consonância com os encontrados por outros estudos (FERREIRA, 2010; SILVA, 2016). Martins (2007) ainda mostrou que o evento de decomposição que se inicia depois de 500 °C está relacionada à decomposição do ligante meglumina, que finaliza após 650 °C, resultando apenas resíduos do antimônio em 900 °C.

Figura 4 - Curvas de DSC (a) e TG/DTG (b) do antimoniato de meglumina.

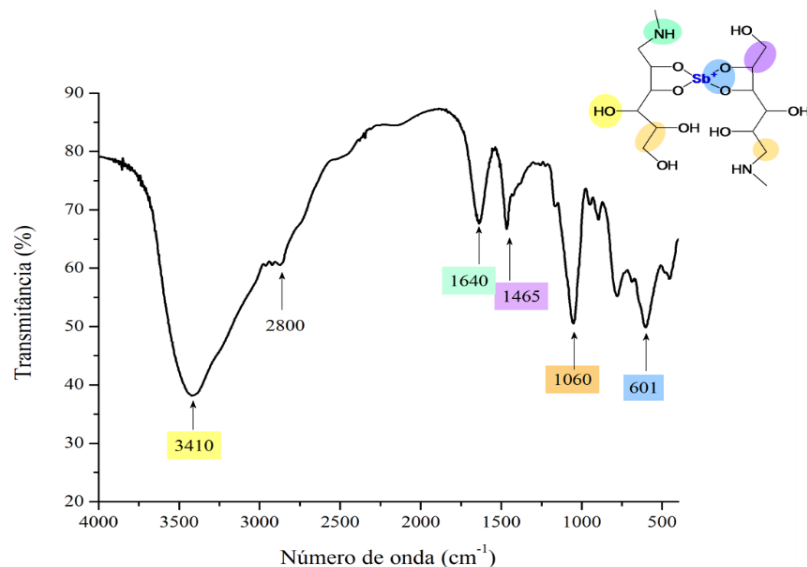


Fonte: autoria própria.

5.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro vibracional na região do infravermelho do AM obtido está mostrado da Figura 5, onde estão destacadas as principais bandas. Em 3410cm^{-1} pode ser vista uma larga banda correspondente às vibrações do estiramento dos grupamentos -OH e -NH de álcoois primários e aminas secundárias, os quais são bastante presentes na molécula de AM. Em seguida, existem as bandas em 2800cm^{-1} correspondente aos estiramentos -CH de alcanos, em 1641cm^{-1} referente ao dobramento no plano -NH de aminas secundárias, em 1465cm^{-1} da deformação angular no plano dos grupos C-O e em 1060cm^{-1} referente ao estiramento dos grupos C-N e C-O do álcool primário e secundário sobrepostos. Por fim, a ligação do átomo de antimônio pode ser visualizada na banda em 601cm^{-1} , que corresponde ao estiramento Sb-O. Outros estudo também mostraram resultados semelhantes das principais bandas do espectro do AM (DEMICHELI *et al.*, 1999; FABRINO, 2021; NAVAELI *et al.*, 2014; SILVA, 2016).

Figura 5 - Espectro no infravermelho do antimoniato de meglumina

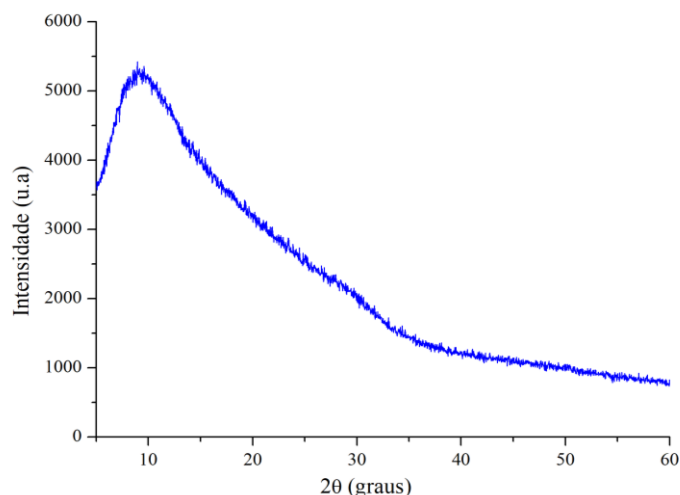


Fonte: autoria própria.

5.1.3 Difração de Raios-X (DRX)

O AM apresenta-se como um pó branco e finamente dividido. Seu difratograma (Figura 6) mostra um padrão típico de substâncias amorfas e de geometria estrutural indefinida, em conformidade com a literatura (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; SILVA, 2016). Isso pode ser favorável para que haja maior incorporação de fármaco dentro de matrizes lipídicas, uma vez que requer menor gasto energético para que seja incorporado, bem como se adapta melhor à diferentes graus de cristalinidade dos lipídeos na matriz (PRADO; ROCHA, 2015). Ademais, esse resultado corrobora os resultados propostos no DSC.

Figura 6 - Gráfico de difração de raios X do antimoniato de meglumina



Fonte: autoria própria.

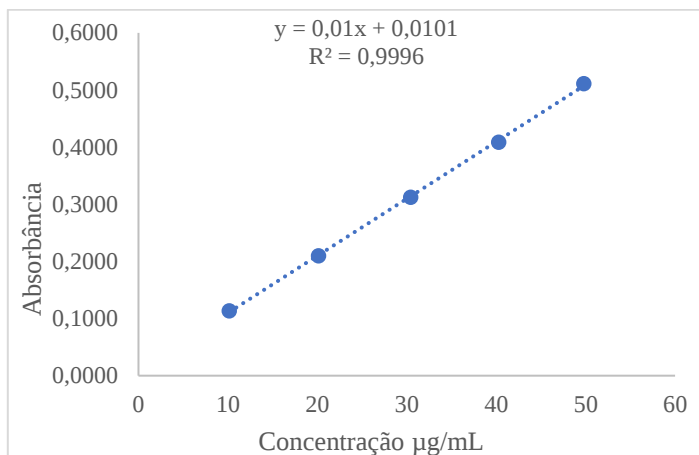
5.1.4 Teor de Antimônio no IFA e solubilidade

O antimoniato de meglumina (AM) é uma IFA composto de átomos de antimônio complexado a moléculas de meglumina, conforme mencionado anteriormente. Um dos ensaios de controle de qualidade do IFA é a quantificação do teor de antimônio na matéria-prima, visto que para o doseamento do AM nos diversos ensaios em que o mesmo é utilizado, ocorre a quantificação de antimônio presente na amostra através da espectroscopia de absorção atômica (FAAS). Dessa forma, sabendo-se o teor de antimônio no AM, é possível calcular a concentração de AM em quaisquer ensaios em que o mesmo for utilizado, como no teste de solubilidade, na eficiência de encapsulamento dos CLNs, nos ensaios de liberação, citotoxicidade, entre outros.

Segundo a monografia do AM na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), a porcentagem de antimônio presente no IFA deve estar entre 26 e 28% na forma de Sb^{5+} , sendo o Sb^{3+} doseado apenas para ensaios de pureza devido sua maior toxicidade. Entretanto, o método de doseamento de antimônio recomendado pelo compêndio, através de FAAS, não é capaz de distinguir entre as espécies Sb^{5+} e Sb^{3+} , visto que para essa especiação deve ser empregada a geração de hidretos acoplada à espectroscopia de absorção atômica (FERREIRA *et al.*, 2014; LIMA, 2019). Portanto, a quantificação do teor de antimônio realizada foi baseada na quantidade total do metal, sem diferenciação entre espécie oxidada ou reduzida, a qual poderá ser utilizada para doseamento de AM nos demais ensaios empregando-se os cálculos necessários.

Baseado nos resultados de dois ensaios independentes realizados em triplicata, foi revelado um teor médio de $31,10 \pm 0,91\%$ de Sb no AM, cuja curva analítica esta apresentada na Figura 7. Tal resultado está em acordo com a especificação do fabricante, que informa uma faixa entre 30 e 34% de Sb na matéria-prima. Assim, o teor encontrado de antimônio no AM será utilizado doravante para cálculo da concentração da solução de AM, nos demais ensaios necessários e na obtenção das nanopartículas.

Figura 7 - Curva analítica utilizada para quantificação do teor de antimônio por FAAS



Fonte: autoria própria

Quanto aos ensaios de solubilidade, estes foram realizados tanto em água como em diferentes tampões, visando conhecer a concentração máxima de AM nesses meios. Ficou demonstrado que o antimoniato de meglumina possui uma solubilidade aquosa de $305,75 \pm 4,21$ mg/mL, além de solubilidade em tampão HCl pH 1,2 de $309,05 \pm 3,12$ mg/mL, em tampão fosfato pH 6,8 de $302,81 \pm 0,98$ mg/mL e tampão fosfato pH 7,4 de $301,85 \pm 1,53$ mg/mL. Houve uma pequena diferença de solubilidade nos meios, sendo maior no pH mais baixo, o que é condizente com a maior facilidade de dispersão do AM em valores de pH ácidos devido a dissociação do complexo antimônio-meglumina. De acordo com as farmacopeias brasileira e americana, substâncias que solubilizam 1g de soluto em volumes de 1-10mL de solvente, ou seja, que possuem solubilidade de 100mg/mL até 1g/mL, são consideradas facilmente solúveis (BRASIL, 2019; USP, 2021). Sendo assim, o AM é considerado um IFA facilmente solúvel em água e nos tampões testados. Além disso, o resultado de solubilidade aquosa foi similar (300mg/mL) ao que é reportado na literatura (BRASIL, 2019; FRÉZARD *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2006). Portanto, através

desses resultados foi possível conhecer as concentrações máximas que podem ser utilizadas para a preparação da solução de AM utilizada para desenvolver os CLNs, bem como nos ensaios de liberação *in vitro* dos nanocarreadores sob condições *sink*.

5.2 ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

5.2.1 Triagem de lipídeos

Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) se diferenciam de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) pela presença de um lipídeo líquido na sua composição, que confere a vantagem de redução da rigidez que a cristalinidade que o lipídeo sólido possui, permitindo maior encapsulamento de fármacos e menor expulsão dos mesmos dentro da matriz devido às transições polimórficas ocorridas ao longo do tempo. Assim, diferentes lipídeos sólidos e líquidos podem ser usados para obtenção de CLNs com diferentes graus de cristalinidade, a depender da composição (diferentes ácidos graxos, mistura de mono-, di- e triglicerídeos) e proporção de lipídeos utilizada (PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). A seleção da mistura lipídica é etapa crucial para a produção de CLNs com características físico-químicas adequadas para sua aplicação. Nesse trabalho foram avaliados cinco lipídeos sólidos e dois líquidos à temperatura ambiente (Tabela 3), cujas composições diferem nos graus de rigidez que podem conferir à matriz lipídica da nanopartícula.

Tabela 3 - Lipídeos utilizados para obtenção das nanopartículas e suas propriedades físico-químicas

Lipídeo	Composição	Estado físico	Temperatura de fusão	Ordenação da matriz
Dynasan [®] 114	triglicerídeo do ácido mirístico (C:14)	sólido	± 57 °C	Altamente ordenado
Dynasan [®] 118	triglicerídeo do ácido esteárico (18:0)	sólido	± 73°C	Altamente ordenado
Compritol [®] ATO 888	mistura de mono- di- e triglicerídeos do ácido beênico (C:22)	sólido	± 70 °C	Ordenado
Imwitor [®] 900K	mistura de mono- e diglicerídeos dos ácidos palmítico (C:16) e esteárico (C:18)	sólido	± 61 °C	Ordenado

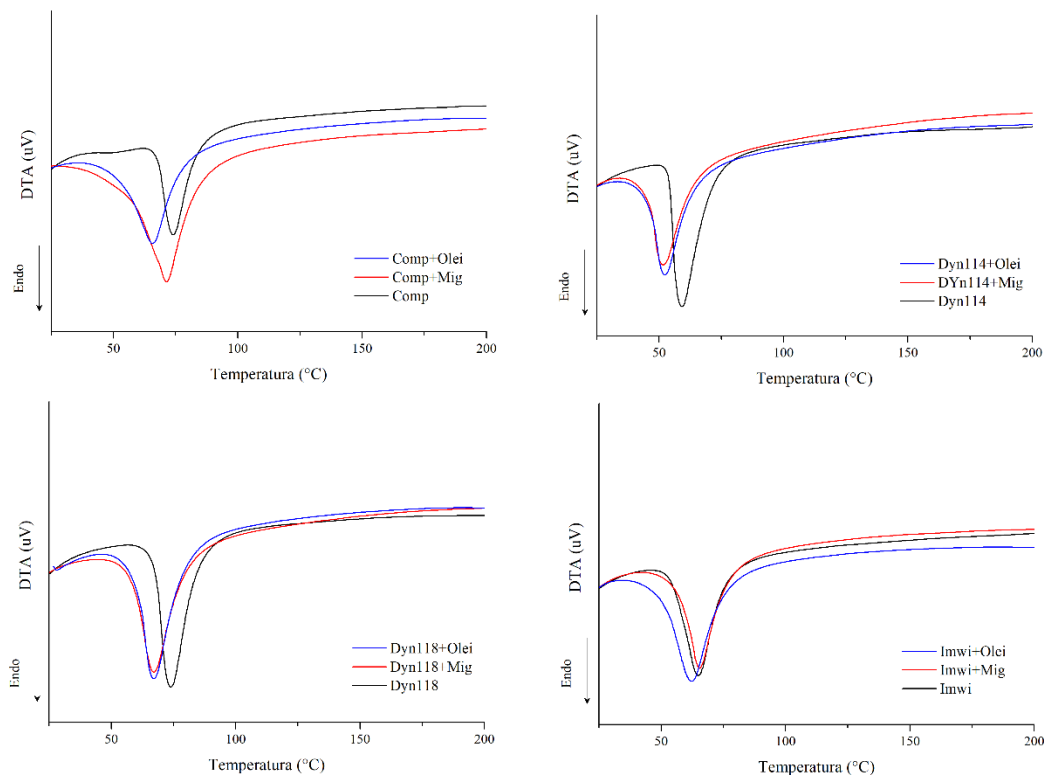
Miglyol® 812	triglicerídeo dos ácidos caprílico (C:8) e cáprico (C:10)	líquido	-5 °C	Desordenado
Ácido oleico	-	líquido	± 14 °C	Desordenado

Fonte: autoria própria.

Para obter informações relacionadas ao estado físico e cristalinidade dos lipídeos sólidos puros e confirmação de alterações da cristalinidade nas misturas físicas com lipídeos líquidos, pode-se fazer uso das análises térmicas, avaliando alterações nas temperaturas e entalpias de fusão. Nesse sentido, as misturas binárias entre os diferentes lipídeos sólidos e líquidos utilizados nessa pesquisa foram avaliados por DTA, cujos resultados estão apresentados na Figura 8.

Através das curvas de DTA, pode-se observar que todos os lipídeos sólidos apresentam um evento endotérmico nas faixas de temperaturas de fusão, com picos de fusão bem definidos. As temperaturas de fusão estão de acordo com as especificações dos fabricantes e similares a outros estudos (DE SOUSA MARCIAL; CARNEIRO; LEITE, 2017; SAKELLARI *et al.*, 2021; SEVERINO *et al.*, 2012). Sabe-se que dentro da faixa de temperatura na qual ocorre o evento de fusão do lipídeo, a diferença entre as temperaturas do pico de fusão e a temperatura de início estão relacionadas com a organização da estrutura cristalina, sendo que uma maior a diferença entre essas temperaturas revela uma maior a desordem da estrutura (ROCHA *et al.*, 2022; SEVERINO *et al.*, 2012). Sendo assim, pode-se inferir que o Imwitor apresenta a estrutura mais desordenada do que os demais lipídeos, visto que apresentou a maior diferença (aprox. 9°C). Isso corrobora o fato de que lipídeos que são compostos por misturas de ácidos graxos ou misturas de mono- e diglicerídeos possuem menor cristalinidade (KOVAČEVIĆ; MÜLLER; KECK, 2020; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011), como é o caso deste.

Figura 8 - Curvas DTA dos lipídeos sólidos e suas misturas com os lipídeos líquidos



Legenda: AM = antimoniato de meglumina; Dyn114 = Dynasan114; Dyn118 = Dynasan118; Comp = Compritol; Imwi = Imwitor; Alk30 = Alkest 30.

Quando foram avaliadas as misturas físicas com os lipídeos líquidos, não foram observadas mudanças bruscas na temperatura de fusão da mistura comparado ao lipídeo sólido puro, o que é possível notar através das proximidades dos picos das curvas DTA, sendo a mistura Comp+Olei a que apresentou maior redução (9,5°C). Além disso, foram notórios o alargamento e a redução dos picos de fusão, sendo o primeiro mais proeminente nas misturas com Compritol e Imwitor (misturas de glicerídeos), e o segundo nas misturas com Dynasan 114 e 118 (triglicerídeos). Tal ocorrido pode estar relacionado ao fato que com as misturas de glicerídeos houve uma maior extensão de solubilidade nos lipídeos líquidos, a qual proporcionou uma mistura de cristalinidade reduzida e variações polimórficas que causam fusão em faixa maior, enquanto nos triglicerídeos pode ter prevalecido uma mistura física em detrimento à solubilidade com o lipídeo líquido, que resulta em fusão à uma temperatura intermediária às substâncias (DA SILVA *et al.*, 2016; SEVERINO *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2013). Isso porque, misturas de glicerídeos possuem um ou mais grupos hidroxila livres na molécula que podem interagir melhor com lipídeos mais polares,

como ácidos graxos livres e triglicerídeos de cadeia média, possibilitando uma maior solubilização, tal como ocorreu com Imwitor e Compritol. Já triglicerídeos de cadeia longa como Dynasan114 e 118, são mais apolares e interagem menos com lipídeos mais polares (BORUGADDA; GOUD, 2014; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Ainda assim, em todas as misturas ocorreram diminuição das entalpias de fusão, cujos valores detalhados podem ser vistos no Apêndice A. O Miglyol conseguiu promover maiores reduções nas entalpias de fusão, alcançando uma redução de 134,71 J/g para a mistura com o Dynasan114 e 148,88 J/g no Dynasan118, enquanto o Ácido oleico atingiu o máximo de redução na mistura com Compritol e Imwitor, exibindo uma diminuição de energia de 35,40 J/g e 94,97 J/g respectivamente.

Pesquisas demonstram que o uso de misturas binárias em caracterizações térmicas fornece informações sobre a solubilidade e eventuais interações dos lipídeos (ANDRADE *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2022). A redução da entalpia e da temperatura de fusão dos lipídeos sólidos quando em mistura com os lipídeos líquidos pode ser atribuída à solubilidade parcial destes, facilitando o processo de fusão que irá requerer menos energia (CAVENDISH *et al.*, 2020; SEVERINO *et al.*, 2012). Sendo assim, quanto menor a entalpia envolvida na fusão da mistura de lipídeos, maior a redução de cristalinidade da matriz lipídica na mistura física, e menor cristalinidade será obtida na matriz lipídica após recristalização, visto que a grande quantidade de lipídio sólido que se dissolve no óleo durante a fusão, quando retornar à temperatura ambiente irá recristalizar em formas cristalinas menos estáveis devido a competitividade estrutural da presença do lipídeo líquido, ou em formas desordenadas pela formação de estruturas micelares entre o lipídeo sólido (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; ZHENG *et al.*, 2013). Devido a isso, CLNs podem possuir diferentes matrizes de acordo com os lipídeos sólidos e líquidos usados, que acarretam imperfeições em sua estrutura cristalina, sendo capazes de acomodar uma maior quantidade de fármaco, bem como minimizar sua expulsão durante o armazenamento (GALVÃO *et al.*, 2016; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). Portanto, a partir dos resultados revelados de maior redução da cristalinidade de matrizes lipídicas, o Miglyol foi escolhido como lipídeo líquido que será utilizado para obtenção das nanopartículas e continuação do estudo.

5.2.2 Ensaio de compatibilidade

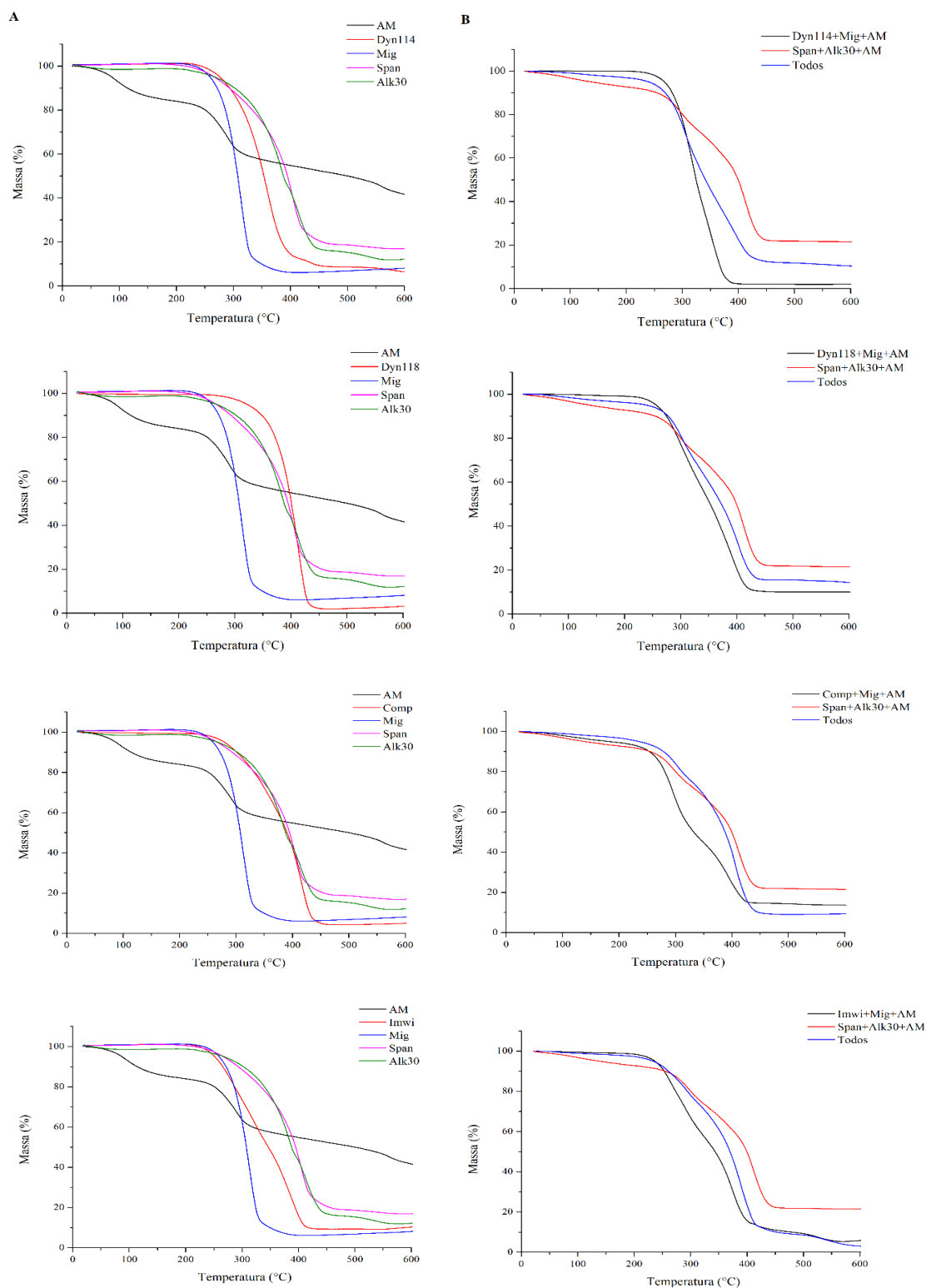
5.2.2.1 Análises térmicas

Em formulações multicomponentes, como é o caso dos CLNs, é necessário que se realize um estudo de compatibilidade entre o IFA e os excipientes, visto que possíveis interações e incompatibilidades podem levar a problemas na formulação e, à longo prazo, efeitos negativos no organismo. Nesse sentido, o uso de ferramentas que possam identificar interações entre compostos em misturas complexas são úteis para evitar problemas decorrentes de incompatibilidades. Entre elas, pode-se citar as análises térmicas (TG/DTG e DTA) e espectroscópicas (FTIR) como as alternativas mais utilizadas (PIRES *et al.*, 2017). Os protocolos usuais utilizam misturas binárias em proporção mássica igual entre fármaco e excipientes, visando maximizar as possíveis interações. O uso concomitante dessas técnicas termoanalíticas com as espectroscópicas permite uma compreensão aprofundada das interações físicas ou químicas e auxilia na seleção dos excipientes apropriados (CHADHA; BHANDARI, 2014). Nesse estudo, as análises TG/DTG foram usadas para avaliar alterações nas perdas de massas durante os eventos térmicos dos compostos isolados em comparação com as misturas físicas ternárias e misturas totais (com todos os componentes usados para obtenção das nanopartículas), bem como a DTA foi utilizada para monitorar alterações nas temperaturas e energias envolvidas em tais eventos. Essas análises trazem parâmetros importantes para acessar a estabilidade térmica das amostras e possíveis interações. A Figura 9, traz as curvas TG das amostras, onde o lado esquerdo (A) mostra as curvas das substâncias isoladas, tanto fármaco, como lipídeos e tensoativos, enquanto o lado direito (B) mostra as curvas TG das misturas ternárias do fármaco + lipídeos, fármaco + tensoativos, e mistura de totais (todos os componentes juntos).

Como é possível observar nas curvas TG dos compostos isolados (lado A), a maioria dos lipídeos apresentam um evento principal de decomposição, onde o Dynasan118, Compritol e Miglyol apresentaram um único evento, com perdas de 96,36% entre 383,52 e 428,71 °C, 94,84% entre 357,17 e 432,07 °C, e 94,57% entre 292,21 e 329,80 °C respectivamente. Já o Dynasan114 e Imwitor apresentaram dois eventos, sendo o Dynasan114 com perda principal de 88,62% entre 315,96 e 384,12 °C e secundário de 3,28% entre 429,51 e 445,39 °C, e o Imwitor com duas perdas

parciais, sendo 49,2% entre 253,33 e 326,45°C e 41,85% entre 366,65 e 407,19 °C. Em todos foi possível verificar a decomposição quase completa das amostras (>90%). Quanto aos tensoativos, o Span também apresentou evento único de decomposição, com perda de 85,66% de massa entre 366,83 e 422,27 °C, embora não tenha apresentado decomposição completa até a temperatura estudada. Já o Alkest apresentou três eventos térmicos, com 50,29% de perda de massa entre 344,02 e 388,74 °C, 26,96% entre 404,19 e 432,88 °C e 2,67% entre 513,40 – 547,96 °C, que também não mostrou decomposição completa. O fármaco apresenta o comportamento já discutido no tópico 2.1.1. As temperaturas de início de decomposição de cada lipídeo estudado estão relacionadas às suas composições, visto que diferentes ácidos graxos se decompõem em diferentes temperaturas. O mesmo se aplica aos tensoativos, uma vez que são compostos derivados de lipídeos, possuindo eventos de decomposição semelhantes aos lipídeos correspondente à sua composição principal, sendo os ácidos oleico/ linoleico/ linolênico para o Span e o óleo de rícino para o Alkest.

Figura 9 - Curvas TG das substâncias isoladas (A) e misturas ternárias com o fármaco e misturas totais (B)



Legenda: AM = antimoniato de meglumina; Dyn114 = Dynasan114; Dyn118 = Dynasan118; Comp = Compritol; Imwi = Imwitor; Alk30 = Alkest 30.

De acordo com as pesquisas, é relatado que decomposições de ácidos graxos poli-insaturados e saturados de cadeias curtas ocorrem à uma faixa de 200-380 °C, monoinsaturados entre 380-480 °C e saturados de cadeias longas entre 480-600 °C, onde variações nessas faixas podem existir a depender do tamanho das cadeias carbônicas, presenças de ramificações e/ou insaturações, ou quando estruturados na forma de mono- di- e triglicerídeos respectivamente (MATOS, 2012; SZABO; CHAMBRE; IDIŢOIU, 2012; TENGKU-ROZAINA; BIRCH, 2019). Tais comportamentos estão relacionados às interações intermoleculares entre as cadeias de ácidos graxos presentes nos lipídeos, de forma que a presença de insaturações acarreta forças de atração mais fracas e, portanto, se decompõem em temperaturas mais baixas. De forma similar, cadeias saturadas e sem ramificações são bem “empilhadas” e possuem maior força de atração intermolecular, sendo decompostas em temperaturas mais elevadas, principalmente quando em forma de triglicerídeos (BORUGADDA; GOUD, 2014). Isso corrobora os resultados encontrados nesse estudo, com temperaturas iniciais de decomposição menores para lipídeos compostos de ácidos graxos de cadeia menor e na forma de mono- e diglicerídeos, e temperaturas mais elevadas para lipídeos de ácidos graxos de cadeias longas e em forma de triglicerídeos.

Misturas binárias do fármaco com cada excipiente e dos excipientes entre si não foram realizadas, visando otimizar recursos e tempo, direcionando o estudo para realização das misturas ternárias e misturas totais, levando-se em consideração que, caso ocorresse alterações nos resultados das misturas ternárias que configurassem incompatibilidades, as misturas binárias seriam testadas para elucidação dos compostos incompatíveis.

Ao comparar os gráficos das substâncias isoladas com os das misturas ternárias fármaco + lipídeos, nota-se uma redução das temperaturas de início de decomposição, sendo próximas dos componentes de menor temperatura de decomposição (Miglyol e AM), e uma finalização de decomposição em faixas de temperatura dos compostos que se decompõem em temperaturas mais elevadas (lipídeos sólidos). A mistura Dyn114+Mig+AM apresentou dois eventos de decomposição, com perda de 63,42% de massa entre 291,98 e 328,37 °C no primeiro evento e 31,58% entre 345,87 e 374,66 °C no segundo, sendo a faixa de temperatura do primeiro evento próxima aos eventos de decomposição do Miglyol e do AM (sobrepostos), e a segunda dentro da faixa de decomposição principal do Dynasan114. Nessa mistura, houve a maior proporção de decomposição (95%) entre todas as misturas testadas, com baixo resíduo de decomposição do AM. Para a mistura Dyn118+Mig+AM, as perdas ocorreram em dois eventos: 40,87% de perda de massa

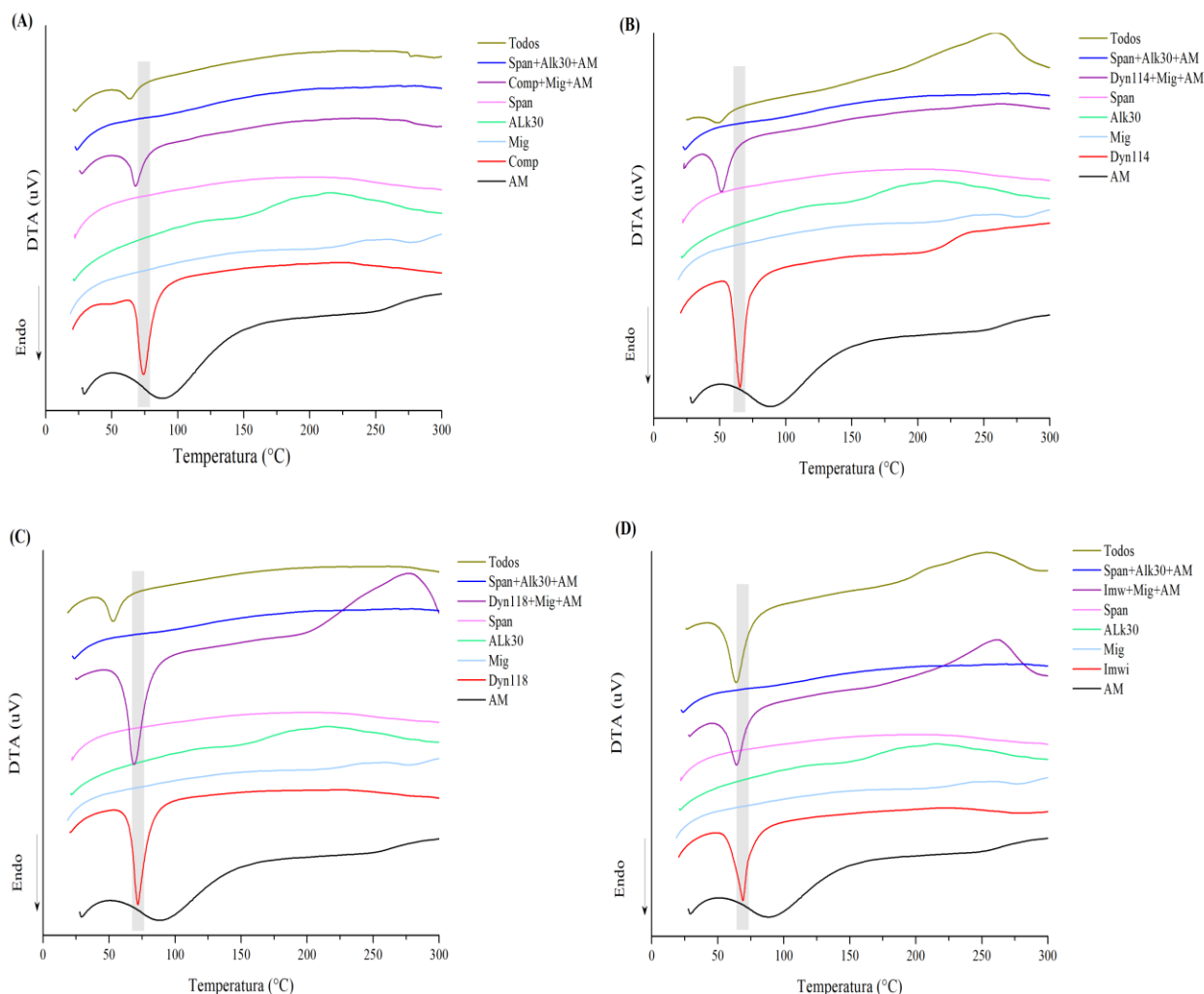
entre 272,21 e 321,66 °C, que é a região do início de decomposição do Miglyol e AM; e 44,98% entre 368,26 e 414,14°C, correspondendo à antecipação de aproximadamente 14°C do início de decomposição do Dynasan118. Já a mistura Comp+Mig+AM também teve o primeiro evento de decomposição na faixa entre a temperatura de decomposição do AM e do Miglyol, mas com o segundo finalizando com antecipação de 14°C da decomposição do Compritol. A única mistura que apresentou três eventos de decomposição foi o Imw+Mig+AM, sendo o primeiro evento ocorrendo em temperaturas próximas ao início de decomposição do Imwitor e do AM em sobreposição, o segundo na faixa de decomposição do segundo evento do Imwitor, e o terceiro na faixa do terceiro evento de decomposição do AM e do Alkest. Essas diferenças entre evento de decomposição único, em duas ou mais etapas podem ser melhor evidenciadas observando as curvas DTG das substâncias isoladas e das misturas no Apêndice B, bem como os valores detalhados dos eventos no Apêndice C.

Observando os gráficos da mistura ternária fármaco + tensoativos (lado B), é mostrado uma decomposição em duas etapas, onde o primeiro evento ocorre entre 269,36 e 313,13 °C com perda de 18,89% de massa, e o segundo entre 390,58 e 433,14 °C com perda de 48,86%. Observa-se também que não houve decomposição completa da mistura, assim como os componentes isolados. Quanto às misturas completas (lipídeo sólido+Miglyol+tensoativos+AM), as curvas TG mostraram um comportamento que se assemelha à soma das curvas das misturas ternárias fármaco+lipídeos com fármaco+tensoativos, onde os eventos de decomposição ocorrem em faixas de temperatura intermediárias aos eventos de decomposição de cada mistura ternária. Apenas na mistura com o Compritol a decomposição iniciou um pouco depois, aproximadamente 8 °C após das misturas ternárias. Além disso, todas as misturas apresentaram decomposição de mais de 80%, que é superior ao AM sozinho (66,4%) e à mistura AM + tensoativos (67,7%), com destaque para as misturas com Dynasan114. Isso pode estar relacionado com melhor interação do fármaco com todos os componentes juntos, que pode ter propiciado sua solubilidade no meio, promovendo decomposição da parte orgânica, restando apenas os resíduos de óxidos de antimônio. Ademais, mesmo com a antecipação da temperatura de decomposição de algumas misturas, estas ocorrem acima de 200°C, faixa em que as formulações não serão expostas nem no processo de obtenção, nem durante armazenamento. Portanto, sugere-se que os compostos possuem boa estabilidade térmica nas condições de produção das nanopartículas.

No que se refere à DTA, as curvas estão apresentadas na Figura 10, onde é possível visualizar os eventos térmicos entre as substâncias isoladas e suas respectivas misturas ternárias e misturas completas. O resumo dos dados da DTA está presente no Apêndice D. Na Figura 10A, observa-se as curvas dos compostos isolados e misturas com Compritol. Na curva do AM, existe um pico alargado endotérmico em 101,53 °C referente à sua fusão e perda de moléculas de água, com entalpia de 217,95 J/g, além de um início de evento exotérmico acima de 250 °C que corresponde ao início de sua decomposição, como mostrado no TG. A curva do Compritol apresenta um pico endotérmico em 76,64 °C e entalpia de 163,40 J/g, correspondente à sua fusão. Para o Miglyol, Alkest e Span não foram visualizados eventos na faixa estudada, visto que são substâncias líquidas com eventos de decomposição acima de 290 °C. Ao avaliar as curvas das misturas ternárias, a mistura Comp+Mig+AM apresentou o pico de fusão do Compritol com menor intensidade e mais alargado em 68,41 °C (antecipação de 4 °C), possivelmente da sua solubilização no lipídeo líquido e redução de cristalinidade, além de menor energia envolvida (56,57 J/g). Já a mistura ternária Span+Alk30+AM apresentou uma curva semelhante aos tensoativos, sem eventos perceptíveis, nem mesmo do fármaco, que pode sinalizar sua solubilização parcial na mistura líquida dos tensoativos. Por fim, a curva da mistura total apresenta um perfil semelhante à mistura ternária do fármaco + lipídeos, com um pico que corresponde à fusão do Compritol, ainda mais alargado e menos intenso, na faixa de 64,9 °C (antecipação de 9 °C) e com entalpia de 27,36 J/g.

Na Figura 10B estão apresentados os gráficos das misturas com o Dynasan114 juntos aos compostos isolados. Na curva do Dynasan nota-se um pico endotérmico em 59,14 °C e energia envolvida de 245,24 J/g, referente ao ponto de fusão do mesmo. As demais substâncias isoladas já foram mencionadas no parágrafo anterior e são repetidas em todos os gráficos para comparação com cada mistura. Ao analisar a curva da mistura ternária do fármaco + lipídeos é possível perceber o deslocamento do pico de fusão do Dynasan114 para 52,23 °C, além de redução da entalpia para 131,21 J/g. Já a mistura completa mostrou uma grande redução no pico e fusão do lipídeo sólido, que também resultou em grande redução de entalpia para 10,02 J/g, embora a faixa da temperatura de fusão tenha sido próxima da mistura ternária. Além disso, também houve um pico exotérmico em 258°C, relacionado à decomposição da amostra, como já mostrado na TG.

Figura 10 - Curvas DTA dos compostos isolados e misturas ternárias com o fármaco e mistura total



Legenda: AM = antimoniato de meglumina; Dyn114 = Dynasan114; Dyn118 = Dynasan118; Comp = Compritol; Imwi = Imwitor; Alk30 = Alkest 30. Fonte: autoria própria

As curvas dos eventos relacionados ao Dynasan118 e suas misturas estão presentes na Figura 10C, que mostra seu evento de fusão quando isolado em 73,86°C, com um pico endotérmico bem definido e energia de 273,45 J/g. A mistura ternária com o lipídeo líquido e AM, foi observada uma pequena redução da temperatura do pico de fusão para 68,83 °C, juntamente com a diminuição da entalpia para 135,96 J/g, além do evento exotérmico com pico em 276,90 °C e entalpia de 379,78 J/g, relacionado à decomposição da amostra. Já a mistura total também apresentou redução da entalpia e temperatura de fusão, evidenciados pela diminuição e deslocamento do pico, com valores de 56,78 J/g e 53,09 °C respectivamente.

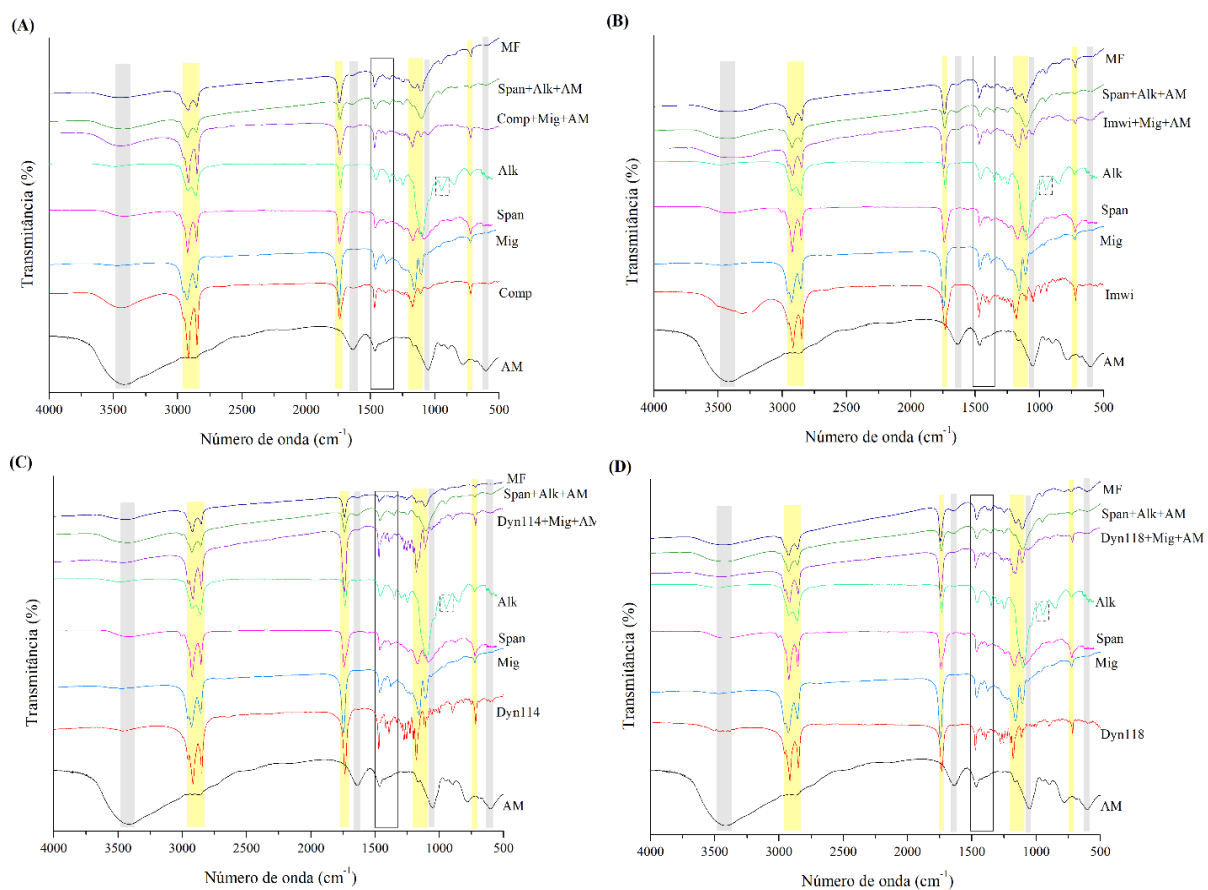
Por fim, a Figura 10D apresenta as curvas do Imwitor e suas misturas, onde é possível observar o pico endotérmico de fusão do lipídeo sólido em 64,76 °C e envolvimento de energia de 239,95 J/g. Tanto a mistura ternária com lipídeo líquido e AM como a mistura total mantiveram o pico de fusão muito próximas ao Imwitor, e tiveram redução de entalpia para 120,43 e 120,19 J/g respectivamente. Além disso, em ambas as misturas foi mostrado um evento exotérmico relacionado às respectivas decomposições, que ocorreram em 261,79 °C e 253,83 °C.

Através da DTA foi possível confirmar o ponto de fusão dos lipídeos sólidos, que confere com as especificações do fabricante, além de poder avaliar possíveis alterações desse evento quando os mesmos foram misturados com o fármaco e demais excipientes da formulação. Em misturas complexas multicomponentes, como as misturas aqui testadas, alargamentos e diminuição de picos de fusão já são esperados devido à menor proporção de cada componentes na mistura, bem como às possíveis interações físicas ou solubilização dos componentes sólidos nos líquidos, o que também promove redução na entalpia dos eventos (DANTAS *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, a redução da entalpia demonstra a redução da cristalinidade do lipídeo sólido na mistura física, com o surgimento de arranjos polimórficos com menor organização, os quais são menos estáveis e, por isso, apresentam ponto de fusão em temperaturas menores (RIBEIRO *et al.*, 2015; SEVERINO *et al.*, 2011). Isso confere uma vantagem, visto que uma menor cristalinidade que será obtida na matriz lipídica após a recristalização permite melhor incorporação de fármacos, como mencionado anteriormente (ROCHA *et al.*, 2022; YANPING *et al.*, 2011). Por fim, essa pequena antecipação na temperatura de fusão ocorrida em algumas misturas pode ser favorável para obtenção dos CLNs desse trabalho, visto que facilita a fusão e mistura da fase oleosa durante o processo de obtenção, como também evita alcançar temperaturas elevadas que podem levar à fusão do fármaco e evaporação da sua solução aquosa utilizada nas nanopartículas. Resultados que sugerem algum tipo de interação, não necessariamente indicam incompatibilidades, uma vez que tais sinais de interação entre os componentes lipídicos da formulação podem ser desejáveis, ao ponto de contribuir para a obtenção de CLNs com melhores características (MATOS, 2017; SHETE; PATRAVALE, 2013). Porém, como pode ser indicativo de incompatibilidade da amostra, uma investigação mais aprofundada foi realizada.

5.2.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

A utilização da técnica FTIR, no caso de misturas de componentes, permite avaliar possíveis interações químicas dos compostos que impliquem em mudanças na composição através de alterações significativas na forma e posição das bandas dos espectros (CHADHA; BHANDARI, 2014; PANI *et al.*, 2012). Nesse sentido, os espectros de infravermelho das amostras individuais e das misturas podem ser úteis para avaliação das interações observadas nas análises térmicas, bem como possíveis incompatibilidades. Os espectros das amostras isoladas e das misturas ternárias e totais são mostrados na Figura 11, na qual foram destacadas as principais bandas relacionadas aos grupos funcionais dos lipídeos em amarelo e do IFA em cinza. O apêndice E mostra as estruturas moleculares dos componentes.

Figura 11 - Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total



Legenda: AM = antimoniato de meglumina; Dyn114 = Dynasan114; Dyn118 = Dynasan118; Comp = Compritol; Imwi = Imwitor; Alk30 = Alkest 30; MF = mistura física total. Fonte: autoria própria

Na figura 11A observa-se o espectro do Compritol com uma banda larga por volta de 3400 cm^{-1} relacionada aos estiramentos dos grupos -OH presentes nos mono- e diglicerídeos, além de picos fortes em 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} das vibrações do estiramento dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, em 1740 cm^{-1} do estiramento de $\text{C}=\text{O}$ das carbonilas características de ésteres, picos menores em 1465 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} dos dobramentos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ de alcanos, em 1172 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} do estiramento assimétrico de $\text{C}-\text{O}$ de ésteres, um pico pequeno em 1060 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}-\text{O}$ de álcool secundário, e em 721 cm^{-1} de dobramento dos grupos CH_2 de cadeias longas. O Miglyol apresentou picos de absorção em regiões semelhantes que são característicos de lipídeos, com exceção da absorção em 3400 cm^{-1} , visto que é um triglicerídeo e todos os grupamentos -OH do glicerol estão esterificados com as cadeias de ácidos graxos. Os tensoativos Span e Alkest também apresentaram espectros com bandas semelhantes ao Compritol, já que são derivados de lipídeos. No caso do Span, existe também um pico em 1080 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}-\text{O}$ de álcool secundário, e a banda de absorção referente ao -OH em 3400 cm^{-1} é mais fraca devido menor presença desse grupamento. Também foram observados os picos em 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, em 1740 cm^{-1} de $\text{C}=\text{O}$ de ésteres, em 1465 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} dos dobramentos de CH_3 e CH_2 , 1175 cm^{-1} de $\text{C}-\text{O}$ de ésteres, e em 721 cm^{-1} de dobramento dos grupos CH_2 de cadeias longas. Para o Alkest, além desses picos mencionados nas faixas de 2920 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1739 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} e 721 cm^{-1} , vale destacar um pico de forte intensidade em 1090 cm^{-1} característico do estiramento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de éter alifático, que é um grupamento muito presente em sua molécula devido à etoxilação, sendo esse pico em sobreposição com $\text{C}-\text{O}$ de álcoois secundários e ésteres presentes na molécula. Outro destaque é o pico em 946 cm^{-1} dos dobramentos fora do plano de alcenos. Tais resultados do espectro do Compritol são semelhantes ao reportado por outras pesquisas (ARSHAD *et al.*, 2019; BORGES *et al.*, 2021; JANSOOK; FÜLÖP; RITTHIDEJ, 2019).

Nas misturas ternárias do AM com os lipídeos, a presença do IFA nas amostras foi confirmada com a detecção em bandas características do mesmo (já mencionadas no tópico 5.1.2) e ausentes nos demais componentes, sendo um pico em 1060 cm^{-1} referente aos grupos $\text{C}-\text{N}$ das aminas e outra em 601 cm^{-1} correspondente ao $\text{Sb}-\text{O}$, os quais estão em menor intensidade devido a proporção de fármaco na mistura. Para a mistura ternária com os tensoativos, o AM foi identificado pela presença dos picos em 1641 cm^{-1} referente ao dobramento $-\text{NH}$ de aminas secundárias e 601 cm^{-1} do $\text{Sb}-\text{O}$, além de uma banda mais pronunciada em 3400 cm^{-1} referente ao estiramento do -OH. Na mistura total, também é possível identificar os mesmos picos do IFA, ainda

que em baixa intensidade. Ademais, em todas as misturas foi possível notar os picos característicos dos lipídeos e tensoativos isolados.

O Imwitor apresentou um espectro com absorções em bandas muito semelhantes ao Compritol, uma vez que também é composto por mono- e diglicerídeos, mudando apenas os ácidos graxos. Na Figura 11B é possível visualizar os picos na região 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, em 1740 cm^{-1} de $\text{C}=\text{O}$, em 1465 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} dos dobramentos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, em 1172 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} do $\text{C}-\text{O}$ de éster, um pico em 1080 cm^{-1} do estiramento $\text{C}-\text{O}$ de álcool secundário e em 721 cm^{-1} de dobramento dos grupos CH_2 de cadeias longas. Uma pequena diferença em relação ao Compritol foi observada na banda referente aos estiramentos dos grupos $-\text{OH}$, que se apresentou mais deslocada para 3300 cm^{-1} . Quanto à mistura ternária com os lipídeos, foi possível identificar o fármaco pelos picos em 1060 cm^{-1} e 601 cm^{-1} , enquanto a mistura total apresentou os picos do mesmo em 1641 cm^{-1} e 601 cm^{-1} . O espectro do Imwitor é semelhante à outro estudo (IBRAHIM; ALOMRANI; YASSIN, 2014).

A Figura 11C mostra o espectro do Dynasan114, que apresenta as bandas de absorção características dos lipídeos, tais como os picos nas regiões de 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} do estiramento dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, em 1740 cm^{-1} do estiramento de $\text{C}=\text{O}$ das carbonilas características de ésteres, em 1465 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} dos dobramentos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, 1172 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} do estiramento $\text{C}-\text{O}$ de ésteres, e em 721 cm^{-1} de dobramento de grupos CH_2 de cadeias longas. A diferença aqui foram picos justapostos na faixa entre 1215 e 1288 cm^{-1} do estiramento assimétrico $\text{C}-\text{O}$ comum em triglicerídeos, além da ausência da banda de alta intensidade na região de 3400 cm^{-1} , uma vez que trata-se de um triglicerídeo. Nas misturas ternárias com os lipídeos, apenas picos de muito baixa intensidade relacionado ao fármaco foram identificados, sendo o 1641 cm^{-1} referente ao $-\text{NH}$ das aminas secundárias e 601 cm^{-1} do $\text{Sb}-\text{O}$. Na mistura total, apenas uma banda fraca em 3400 cm^{-1} e o sinal fraco em 1641 cm^{-1} foram identificados. Todas as misturas apresentaram os picos principais dos lipídeos e tensoativos isolados. Além da proporção diminuída do IFA nas misturas, os picos referentes à sua molécula podem ter sido diminuídos por uma dispersão mais facilitada do fármaco nessa mistura. Bertoni e colaboradores (2019) e Prajapati e colaboradores (2018) apresentaram espectro do Dynasan114 semelhante.

O espectro do Dynasan118 é mostrado na Figura 11D, onde é possível notar as principais bandas de absorção dos lipídeos muito semelhantes ao Dynasan114, com diferença nas intensidades, pois ambos são triglicerídeos que se diferenciam apenas no tamanho das cadeias

carbônicas dos ácidos graxos. Na mistura AM+lipídeos, o fármaco pôde ser identificado por dois sinais de baixa intensidade do C-N e do Sb-O em 1060 cm^{-1} e 601 cm^{-1} respectivamente. Já na mistura total, é possível visualizar os picos do fármaco em 1641 cm^{-1} e 601 cm^{-1} , e uma banda larga de baixa intensidade em 3400 cm^{-1} . Além disso, os picos dos demais componentes também foram identificados. Esses resultados são similares ao que foi encontrado na literatura (IBRAHIM; ALOMRANI; YASSIN, 2014; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2020).

Em todas as misturas dos diferentes lipídeos não foram observados deslocamentos bruscos de bandas de absorção, nem surgimento de picos em bandas novas. Baseados nesses resultados de compatibilidade, foi possível verificar que as interações observadas nas análises térmicas não foram oriundas de reações químicas perceptíveis em FTIR, ocorrendo apenas alteração nos parâmetros físico-químicos dos componentes, com indícios de solubilização entre os componentes (CHADHA; BHANDARI, 2014; PANI *et al.*, 2012; ROJEK; WESOŁOWSKI, 2019). Nesse caso, trata-se de uma interação que pode favorecer a formação de nanopartículas com maiores concentrações de fármaco. Isso aliado com os ensaios de cristalinidade dos lipídeos, direcionou para a escolha dos lipídeos sólidos Dynasan114 e Compritol para dar continuidade ao estudo. O Dynasan114 foi o lipídeo que apresentou uma interação que sugere melhor dispersão do fármaco nas misturas ternárias e misturas totais, bem como mostrou a melhor interação com o Miglyol, formando uma matriz lipídica de menor cristalinidade, que pode favorecer o encapsulamento do fármaco. O Compritol foi escolhido como a segunda opção de lipídeo sólido com o objetivo de comparação dos tipos de lipídeos sólidos nas nanopartículas, através da avaliação da influência do tamanho das cadeias carbônicas de ácidos graxos e da composição mista de mono-, di- e triglicerídeos nas propriedades físico-químicas e estabilidade dos CLN a serem desenvolvidos. Ademais, os resultados revelaram que os compostos possuem boa estabilidade térmica nas condições de produção das nanopartículas, bem como ausência de incompatibilidades químicas suportadas pelo FTIR.

5.2.3 Projeto experimental e otimização dos CLNs

Um ensaio de pré-formulação pode ser otimizado empregando planejamento estatístico de experimentos, também conhecido como *Design of Experiments* (DoE). O objetivo de utilizar um DoE nesse estudo foi investigar a influência de alguns parâmetros do método de obtenção e da formulação nas características físico-químicas dos CLNs, para obter as condições ideais de obtenção das nanopartículas com as melhores características. Assim, baseado em relatos da literatura e estudos preliminares, foram definidos como atributos críticos de qualidade das nanopartículas o diâmetro médio, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulamento, enquanto o tempo e potência de sonicação foram definidos como parâmetros críticos de processo e a quantidade de lipídeos e proporção lipídeo sólido/líquido como parâmetros críticos da formulação, visto que são fatores importantes que afetam a qualidade da formulação. Vale ressaltar que o tipo de tensoativo e a proporção hidrofílico/lipofílico foi avaliado em estudos prévios de ensaios de EHL, como mencionado anteriormente. Dessa forma, foram realizados experimentos do tipo central composto com dois níveis, em duas séries: a primeira série teve dois experimentos, com um lipídeo sólido diferente cada (escolhidos no ensaio de compatibilidade), e sem o fármaco, para avaliação dos parâmetros do método e triagem dos parâmetros da formulação das nanopartículas; a segunda série teve um experimento, com o fármaco, o lipídeo sólido de melhor resultado da primeira série, e as variáveis apenas da formulação em níveis otimizados da série anterior, para avaliação também da incorporação do fármaco.

Para a primeira série, os parâmetros selecionados como variáveis independentes (variáveis de entrada) para os dois ensaios, um com cada lipídeo sólido, foram a quantidade total de lipídeos na formulação (%Lip), a proporção de lipídeos sólido e líquido (Sol/Liq), o tempo de sonicação e a potência de sonicação (A%), medida em amplitude. Já as variáveis dependentes (variáveis de saída) avaliadas foram o diâmetro médio (Diam.), o índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) dos CLNs obtidos. Esse desenho experimental com quatro fatores em dois níveis gerou 31 ensaios. Tais fatores foram escolhidos baseados em estudos que mostraram suas influências nos parâmetros críticos da qualidade das formulações, tais como a composição lipídica (tipos de lipídeos e concentração) interferindo nos tamanhos, índice de polidispersão, eficiência de encapsulamento e estabilidade de nanopartículas (APOSTOLOU *et al.*, 2021; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011; ZHENG *et al.*, 2013),

bem como a contribuição do tempo e potência de ultrassom (KUMAR; SINGH; GARG, 2019; LUO *et al.*, 2022; PUCEK-KACZMAREK, 2021; SIDDIQUI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2011). Da mesma forma, os níveis máximos e mínimos de cada fator foram estabelecidos baseados em uma triagem da literatura. O desenho experimental referente ao ensaio realizado com o lipídeo sólido Dynasan114 estão dispostos na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental feito com Dynasan114 + Miglyol mostrando as variáveis dependentes e independentes

Amostra	%Lip	Sol/Liq	Tempo (min)	Potência (A%)	Diam. (nm)	PdI	PZ (mV)
1	12	75/25	7	55	48,18 ± 1,02	0,602 ± 0,036	-12,30 ± 0,603
2	6	65/35	10	70	28,22 ± 0,072	0,240 ± 0,004	-16,50 ± 0,755
3	8	55/45	7	55	36,24 ± 0,43	0,233 ± 0,012	-12,10 ± 0,141
4	10	65/35	4	40	108,00 ± 0,65	0,467 ± 0,009	-18,90 ± 0,458
5	10	85/15	10	40	123,00 ± 1,26	0,582 ± 0,005	-14,90 ± 0,115
6	6	85/15	10	40	30,43 ± 0,28	0,154 ± 0,002	-20,90 ± 1,540
7	10	85/15	4	70	14,97 ± 0,22	0,422 ± 0,014	-25,90 ± 0,265
8	8	75/25	7	55	83,88 ± 0,13	0,487 ± 0,012	-25,70 ± 0,651
9	8	75/25	7	55	43,03 ± 0,19	0,263 ± 0,005	-8,15 ± 0,550
10	8	75/25	7	85	40,18 ± 0,26	0,236 ± 0,007	-14,50 ± 2,600
11	8	75/25	7	25	122,10 ± 0,85	0,425 ± 0,004	-18,10 ± 0,351
12	6	65/35	4	40	33,04 ± 0,66	0,322 ± 0,005	-18,30 ± 0,503
13	6	85/15	4	70	26,15 ± 0,25	0,269 ± 0,002	-18,20 ± 0,306

14	10	65/35	10	70	53,46 ± 0,51	0,256 ± 0,011	-10,40 ± 0,808
15	8	95/5	7	55	74,01 ± 0,36	0,304 ± 0,008	-11,80 ± 0,465
16	6	65/35	4	70	36,67 ± 0,54	0,338 ± 0,012	-17,20 ± 0,351
17	6	85/15	4	40	60,07 ± 0,83	0,900 ± 0,016	-11,00 ± 0,153
18	10	85/15	4	40	110,50 ± 1,09	0,482 ± 0,007	-14,40 ± 0,354
19	8	75/25	7	55	53,02 ± 0,27	0,289 ± 0,006	-21,10 ± 0,709
20	10	85/15	10	70	60,20 ± 0,33	0,375 ± 0,022	-13,90 ± 0,057
21	8	75/25	1	55	57,65 ± 0,62	0,520 ± 0,031	-10,00 ± 0,173
22	8	75/25	7	55	46,32 ± 0,40	0,227 ± 0,006	-20,40 ± 1,230
23	8	75/25	7	55	38,16 ± 0,03	0,238 ± 0,01	-12,40 ± 2,830
24	8	75/25	7	55	37,42 ± 0,13	0,234 ± 0,003	-14,60 ± 2,570
25	6	85/15	10	70	28,23 ± 0,18	0,223 ± 0,005	-16,10 ± 1,610
26	4	75/25	7	55	22,01 ± 0,18	0,275 ± 0,023	-15,90 ± 1,140
27	8	75/25	13	55	37,23 ± 0,15	0,220 ± 0,002	-7,77 ± 1,050
28	8	75/25	7	55	80,74 ± 1,24	0,495 ± 0,06	-23,90 ± 2,140
29	6	65/35	10	40	38,98 ± 0,39	0,218 ± 0,011	-14,20 ± 2,960
30	10	65/35	10	40	53,65 ± 1,35	0,609 ± 0,039	-20,00 ± 0,541
31	10	65/35	4	70	57,59 ± 0,22	0,277 ± 0,006	-9,00 ± 0,376

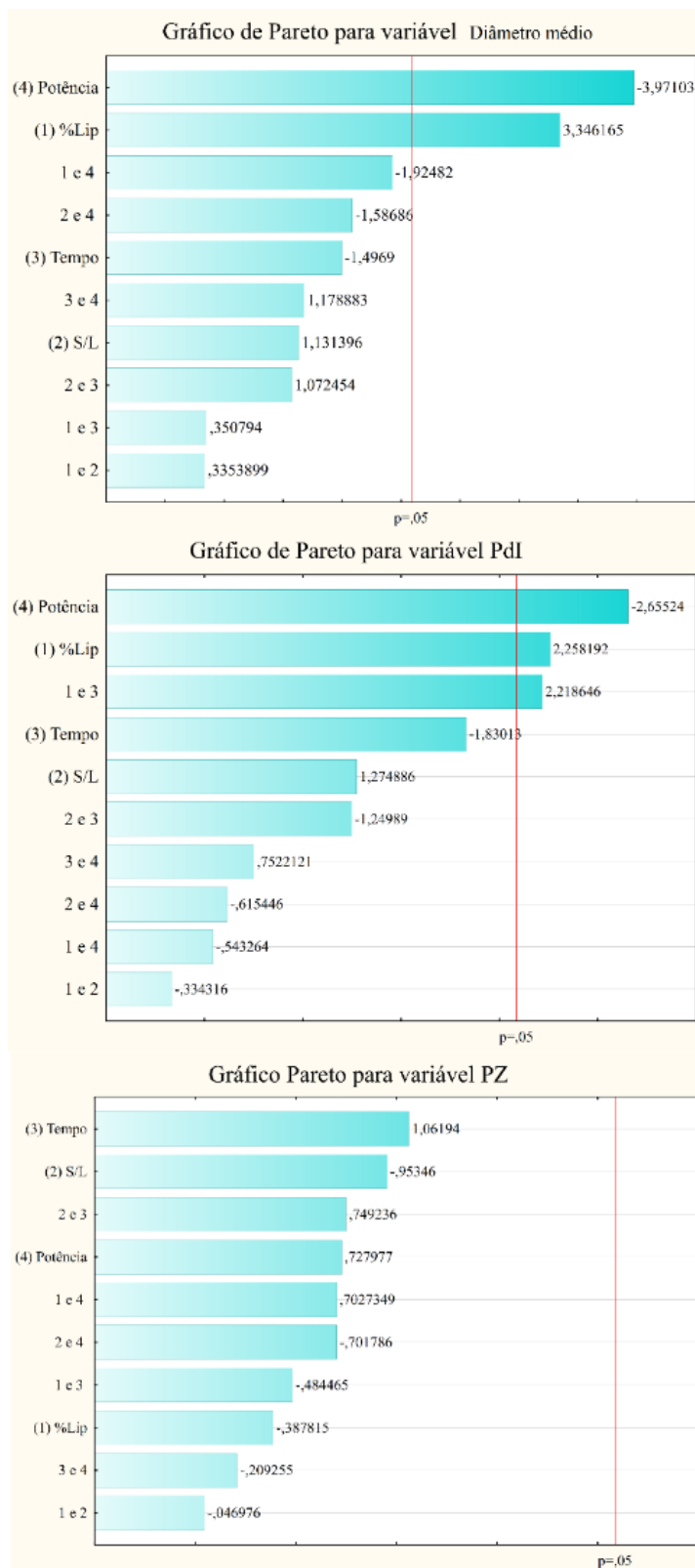
Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; Sol/Liq= proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; Diam. = diâmetro; PZ = potencial zeta.

Avaliando os resultados mostrados pelas variáveis dependentes, foi possível obter CLNs com diâmetro médio variando de 14,97 nm à 123 nm, PDI entre 0,154 e 0,900 e potencial zeta entre -7,77 e -25,9. As formulações apresentaram-se líquidas, com aspecto de translúcido à leitoso, condizente com os tamanhos encontrados, além de reflexo azulado característico de nanopartículas. De acordo com a literatura, nanopartículas ideais para uso oral devem possuir tamanhos inferiores à 300 nm, visto que isso permite permeabilidade intestinal aprimorada e absorção para circulação sistêmica, onde tamanhos menores que 100nm conferem também melhor farmacocinética, com maior eficiência de permeação e absorção oral (BANERJEE *et al.*, 2016; DANAIE *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2016). Quanto ao PDI, é sugerido que seja inferior à 0,300 para garantir uma distribuição de tamanhos mais estreita, característica de uma amostra menos dispersa, a qual possuirá comportamento físico-químico, farmacocinético e farmacológico mais homogêneo (DANAIE *et al.*, 2018; MUSIELAK; FELICZAK-GUZIŁ; NOWAK, 2022). Já o potencial zeta, valores $\geq |30|$ mV (em módulo) são considerados ótimos para garantia de alta estabilidade eletrostática das nanopartículas. No entanto, na existência também de estabilidade estérica, como no caso de tensoativos não iônicos semelhantes aos utilizados aqui, esse valor pode ser menor (aproximadamente 20 mV) sem prejuízo da estabilidade (CARVALHO *et al.*, 2018; HONARY; ZAHIR, 2013; SHAH *et al.*, 2022; VARENNE *et al.*, 2019).

Baseado nesse contexto, para essa pesquisa foram estabelecidos como critérios de exigência o tamanho menor que 100 nm, $PDI \leq 0,300$ e o PZ mais elevado possível, como propriedades ideais dos CLNs. Sendo assim, todas as amostras desse primeiro experimento apresentaram tamanhos dentro do ideal, porém o PDI e o PZ variaram bastante. De acordo com os resultados obtidos, as formulações que apresentaram tais características foram as amostras 2, 6, 10, 13, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 29, as quais foram produzidas com %Lip entre 4 e 8%, proporção Sol/Liq entre 65/35 e 85/15, tempo de sonicação entre 4 e 10 minutos e potência entre 40 e 85%.

Através do processamento estatístico do planejamento experimental através de ANOVA, foi revelado um valor de $p > 0,05$ para falta de ajuste, o que significa a adequação do modelo para as variáveis estudadas. Os gráficos de Pareto (Figura 12) foram elaborados para ilustração dos efeitos importantes e comparar a magnitude destes, determinando os parâmetros que mais contribuem nas variáveis tamanho, PDI e PZ, correlacionando com os CLNs de melhores resultados.

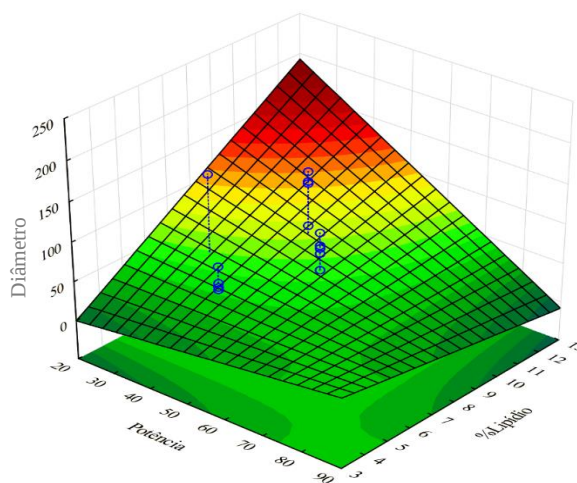
Figura 12 - Gráfico de Pareto para avaliação das variáveis no planejamento experimental feito com Dynasan114 + Miglyol



Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L= proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; PZ = potencial zeta. Fonte: autoria própria

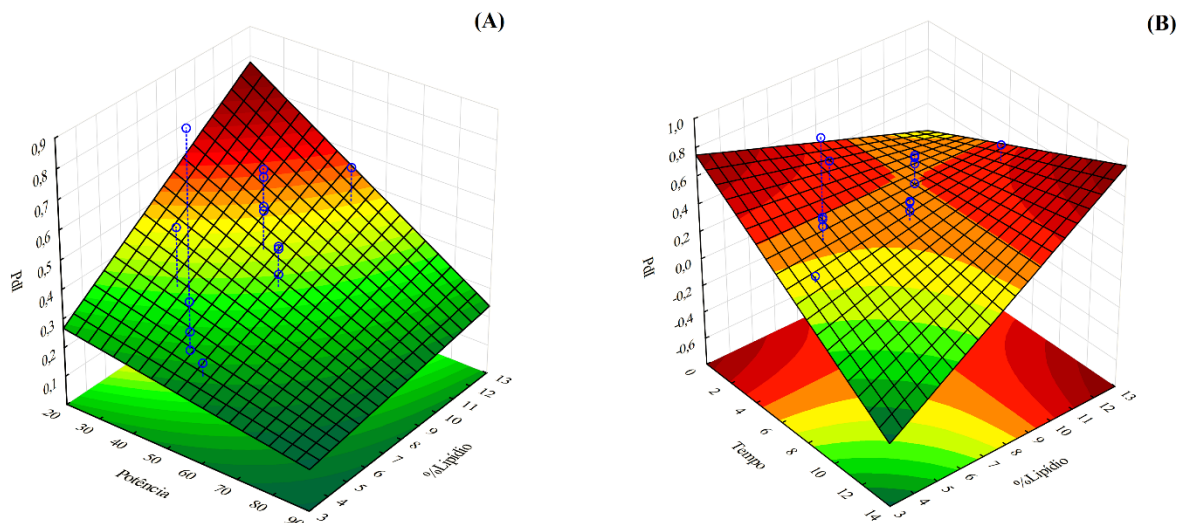
O gráfico de Pareto mostra que, para o diâmetro, as variáveis que tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) nos níveis analisados foram a potência de sonicação e a quantidade de lipídeo total da formulação (%Lip). O sinal negativo de um efeito para uma variável indica que em níveis mais baixos, a resposta da variável aumenta. Ou seja, para a variável diâmetro, baixos níveis de potência aumentam o diâmetro das nanopartículas. Assim como o valor positivo do efeito para a proporção de lipídeo mostra que altos níveis desse fator aumentam o diâmetro das nanopartículas. Para o PdI, além da potência de sonicação e quantidade de lipídeo que também tiveram uma contribuição similar do diâmetro, a interação entre a quantidade de lipídeo e o tempo de sonicação também é significativa, o que quer dizer que o tempo de sonicação passa a ter contribuição significativa quando avaliado com a quantidade de lipídeo, de forma que altos níveis desses fatores juntos aumentam o PdI. Quanto ao potencial zeta, nenhuma variável testada teve efeito significativo. Portanto, para obtenção de CLNs com melhores tamanhos e PdI, devem ser utilizados como parâmetros maiores potências, menores quantidades de lipídeos e tempos mais elevados, quando a quantidade de lipídeos for menor. Para uma melhor visualização desses efeitos significativos, foram gerados gráficos de superfície resposta, mostrados na Figura 13 e 14.

Figura 13 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan114



Fonte: autoria própria

Figura 14 - Gráfico de superfície resposta para a variável PdI em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan114



Fonte: autoria própria.

É possível observar no gráfico da Figura 13 que as regiões em vermelho, que correspondem aos maiores diâmetros, são regiões onde a potência está abaixo de 40% e a proporção de lipídio está acima de 8%. Pela inclinação, percebe-se o grau de significância do efeito, confirmando os resultados do Pareto que baixos níveis de potência e altos de quantidade de lipídeo aumentam o diâmetro médio das nanopartículas. O mesmo é observado no gráfico A da Figura 14 sobre a influência dos mesmos fatores para o PdI. Já no gráfico B é mostrado o efeito da interação tempo de sonicação e quantidade de lipídeo para o PdI, onde verifica-se que as interações em altos níveis de ambas as variáveis causam aumento da resposta (região vermelha), sendo os melhores valores de PdI (região verde) correspondentes à altos níveis de tempo de sonicação (acima de seis minutos) e baixos de quantidade de lipídeos (até 8%). Todos esses resultados estão de acordo com as amostras que apresentaram os melhores resultados de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta já mostradas na tabela 4. Assim, nesse planejamento realizado com Dynasan114 foi possível obter CLNs com características adequadas ao objetivo do trabalho, os quais representam mais de 10 entre 31 amostras feitas no experimento.

O segundo planejamento experimental da primeira série, agora com o lipídeo sólido Compritol, teve resultados que revelaram que todos os CLNs obtidos possuíam diâmetros adequados para uso oral, ($< 300\text{nm}$), porém o PdI e PZ variaram bastante, com poucas amostras dentro dos parâmetros ideais ($\text{PdI} < 0,300$ e $\text{PZ} \geq |30| \text{mV}$), conforme é possível observar na Tabela 5. Os resultados mostrados pelas variáveis dependentes mostram que foram obtidos CLNs com diâmetro médio variando de 35,06 nm à 286,5 nm, PdI entre 0,252 e 0,653, e potencial zeta entre -5,79 e -16,3. As formulações apresentaram-se líquidas, a maioria com aspecto leitoso condizente com os tamanhos encontrados, além de reflexo azulado. Baseado nos parâmetros ideais já mencionados de tamanho, PdI e PZ para as nanopartículas, apenas as amostras 16 e 21 desse experimento apresentaram resultados próximos ao adequado, embora o PZ estivesse muito abaixo do ideal. Essas amostras foram produzidas com %Lip entre 6 e 8%, proporção Sol/Liq entre 65/35 e 75/25, tempo de sonicação entre 1 e 4 minutos e potência entre 55 e 70% de amplitude.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental feito com Compritol + Miglyol mostrando as variáveis dependentes e independentes

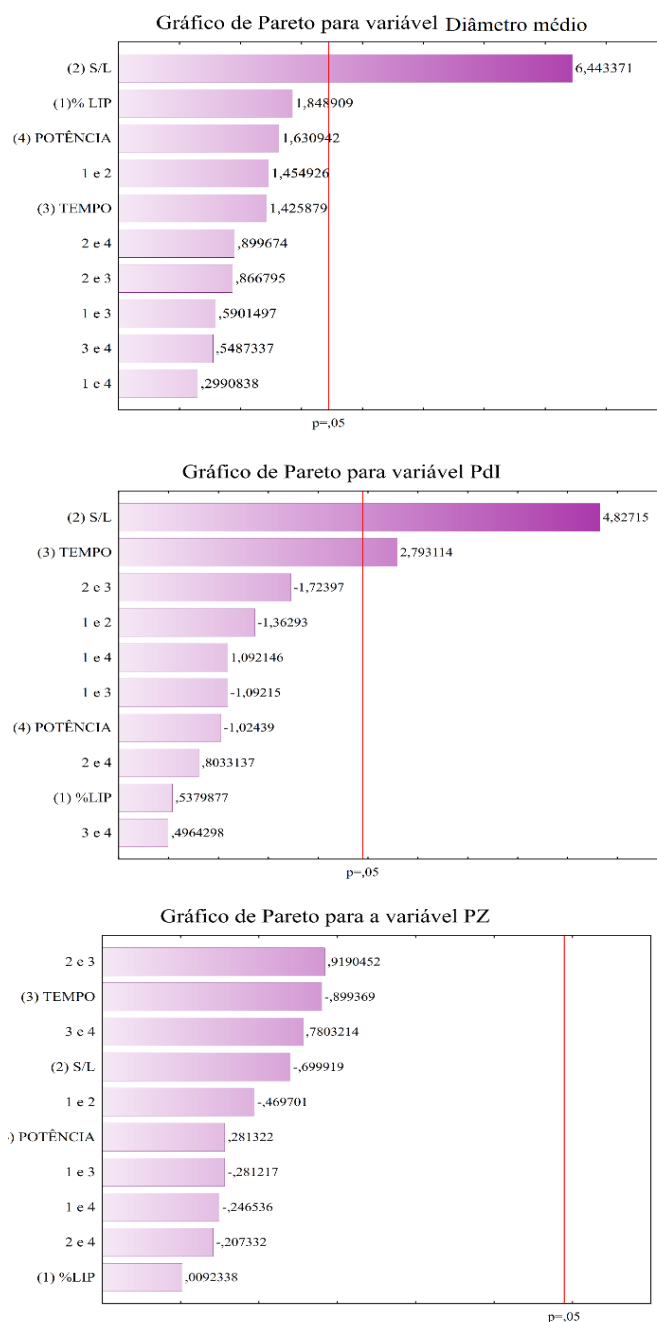
Amostra	%Lip	Sol/Liq	Tempo (min)	Potência (A%)	Diam. (nm)	PdI	PZ (mV)
1	12	75/25	7	55	185,0 $\pm$ 5,615	0,648 $\pm$ 0,042	- 8,68 $\pm$ 0,349
2	6	65/35	10	70	60,14 $\pm$ 0,202	0,536 $\pm$ 0,005	-8,65 $\pm$ 1,75
3	8	55/45	7	55	35,06 $\pm$ 0,262	0,346 $\pm$ 0,004	-5,79 $\pm$ 0,445
4	10	65/35	4	40	63,35 $\pm$ 0,516	0,454 $\pm$ 0,003	-3,00 $\pm$ 0,265
5	10	85/15	10	40	222,4 $\pm$ 11,51	0,558 $\pm$ 0,040	-7,74 $\pm$ 1,14
6	6	85/15	10	40	140,5 $\pm$ 3,315	0,592 $\pm$ 0,028	-8,18 $\pm$ 0,554
7	10	85/15	4	70	198,5 $\pm$ 0,585	0,511 $\pm$ 0,007	-7,79 $\pm$ 0,330
8	8	75/25	7	55	123,8 $\pm$ 1,537	0,632 $\pm$ 0,009	-8,00 $\pm$ 0,439
9	8	75/25	7	55	118,6 $\pm$ 1,922	0,653 $\pm$ 0,010	-6,58 $\pm$ 0,640
10	8	75/25	7	85	196,2 $\pm$ 4,157	0,636 $\pm$ 0,004	-7,43 $\pm$ 0,234

11	8	75/25	7	25	80,77 ± 1,667	0,604 ± 0,045	-11,8 ± 4,01
12	6	65/35	4	40	60,64 ± 1,299	0,514 ± 0,019	-7,24 ± 0,475
13	6	85/15	4	70	149,2 ± 0,850	0,616 ± 0,049	-10,2 ± 0,433
14	10	65/35	10	70	61,63 ± 0,552	0,467 ± 0,025	-7,70 ± 0,0874
15	8	95/5	7	55	206,7 ± 2,250	0,648 ± 0,010	-9,33 ± 0,163
16	6	65/35	4	70	36,71 ± 0,521	0,252 ± 0,001	-7,93 ± 0,051
17	6	85/15	4	40	133,6 ± 0,635	0,594 ± 0,010	-7,69 ± 0,403
18	10	85/15	4	40	171,9 ± 0,503	0,593 ± 0,012	-10,7 ± 0,755
19	8	75/25	7	55	111,2 ± 11,03	0,669 ± 1,00	-10,1 ± 2,30
20	10	85/15	10	70	286,5 ± 9,350	0,564 ± 0,037	-11,5 ± 0,379
21	8	75/25	1	55	50,79 ± 0,397	0,309 ± 0,73	-8,31 ± 0,372
22	8	75/25	7	55	130,9 ± 2,386	0,623 ± 0,006	-11,0 ± 0,351
23	8	75/25	7	55	189,3 ± 3,899	0,562 ± 0,019	-10,4 ± 1,51
24	8	75/25	7	55	221,3 ± 4,332	0,543 ± 0,038	-6,92 ± 0,225
25	6	85/15	10	70	169,9 ± 2,250	0,556 ± 0,054	-8,28 ± 0,235
26	4	75/25	7	55	148,7 ± 0,321	0,586 ± 0,007	-9,02 ± 1,29
27	8	75/25	13	55	111,2 ± 3,014	0,549 ± 0,036	-10,2 ± 0,323
28	8	75/25	7	55	113,3 ± 3,483	0,532 ± 0,037	-16,3 ± 0,136
29	6	65/35	10	40	49,42 ± 1,356	0,552 ± 0,034	-11,5 ± 1,16
30	10	65/35	10	40	60,57 ± 2,120	0,545 ± 0,023	-11,8 ± 0,656
31	10	65/35	4	70	55,23 ± 1,22	0,550 ± 0,024	-9,97 ± 0,471

Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; Sol/Liq= proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; Diam. = diâmetro; PZ = potencial zeta.

O teste ANOVA realizado mostrou valor de $p > 0,05$ para falta de ajuste, demonstrando a adequação do modelo para as variáveis estudadas. Os gráficos de Pareto obtidos podem ser visualizados na Figura 15, que mostram os parâmetros de maior influência nas variáveis independentes testadas.

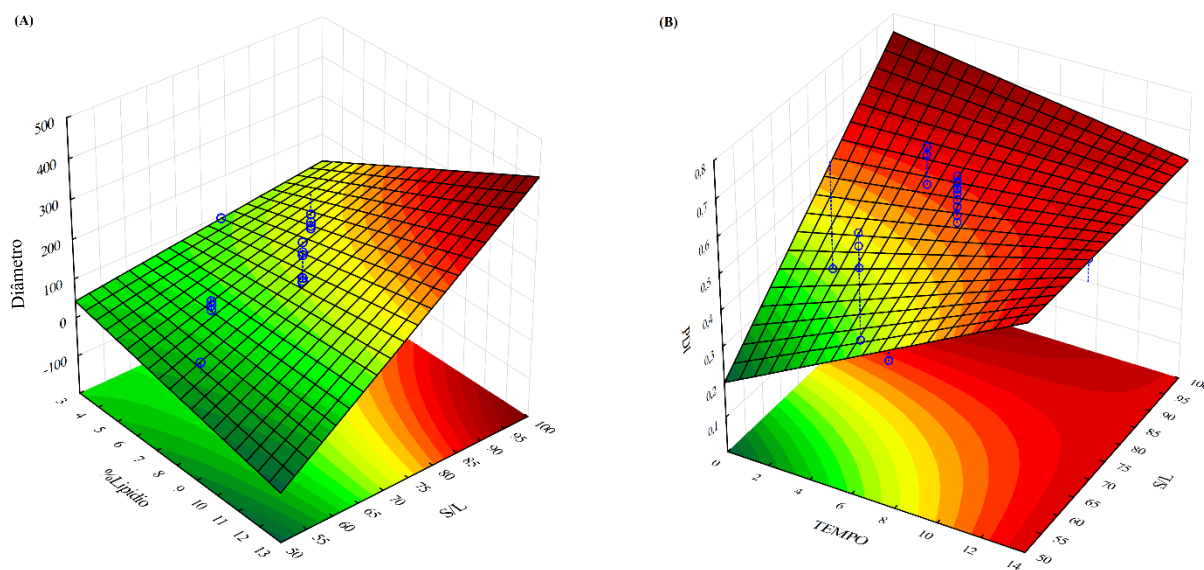
Figura 15 - Gráfico de Pareto para avaliação das variáveis no planejamento experimental feito com Compritol + Miglyol



Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L= proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; PZ = potencial zeta. Fonte: autoria própria

Conforme mostra o gráfico de Pareto, a variável que teve efeito significativo ($p < 0,05$) para o tamanho nos níveis analisados foi a proporção de lipídeos sólido e líquido (S/L). O sinal positivo do efeito significa que níveis elevados causam aumento da resposta da variável, ou seja, alta quantidade de lipídeo sólido na proporção S/L aumenta o tamanho das nanopartículas. Em outras palavras, aumentar a quantidade de Compritol na mistura com Miglyol geram CLNs com maiores tamanhos. Esse mesmo efeito foi observado para o PdI, que também sofre influência significativa do tempo de sonicação, de forma que um maior tempo de sonicação provocou aumento da polidispersão. Quanto ao potencial zeta, novamente, nenhuma variável testada teve efeito significativo. Sendo assim, CLNs compostos por Compritol possuem características de tamanho e PdI ideais quando utilizados alto tempo de sonicação e baixa proporção sólido/líquido dos lipídeos. Através dos gráficos de superfície resposta (Figura 16) pode-se visualizar melhor a interação dos efeitos nas variáveis testadas.

Figura 16 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro (A) e PdI (B) em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Compritol.



Fonte: autoria própria.

No gráfico A é possível visualizar região em vermelho, que corresponde aos maiores diâmetros, a qual está relacionada com proporção S/L acima de 75% de lipídeo sólido e quantidade de lipídeo total acima de 7%. Já o gráfico B mostra os efeitos para o PdI, onde é possível observar uma grande região vermelha relacionada à valores elevados de PdI, correspondente a proporções acima de 75% de lipídeo sólido na variável S/L e tempo de sonicação maior que 8 minutos. Esses resultados estão em concordância com as amostras que apresentaram os melhores resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta apresentadas na Tabela 5. Entretanto, apenas duas amostras desse planejamento feito com o Compritol apresentaram as características ideais para o objetivo do estudo, o que é uma quantidade muito pequena em relação aos 31 experimentos realizados.

Os resultados do planejamento com o lipídeo sólido Dynasan114 e com o Compritol revelaram que os fatores que mais influenciam nas características de diâmetro médio e no índice de polidispersão das nanopartículas dependem do tipo de lipídeo utilizado. No caso das formulações com Dynasan114, a quantidade total de lipídeo na formulação e a potência foram os fatores significativos e de maior magnitude, de forma que uma maior quantidade de lipídeo necessita de maior potência de sonicação para obter tamanhos e PdI adequados. Além disso, ficou demonstrado que a proporção Dynasan/Miglyol na formulação, avaliada pela variável S/L, não tem influência significativa no tamanho e PdI, o que pode ser explicado pelo fato de o Dynasan114 ser um lipídeo sólido composto por triglicerídeos do ácido mirístico (C:14), que é um ácido graxo de baixo peso molecular (MISCHEL; HOFFMANN, 2014), possuindo baixa interferência na viscosidade da matriz lipídica, sem causar grandes dificuldades na redução das partículas em tamanhos nanométricos. Baseado nesse mesmo raciocínio, devido Compritol ser composto por misturas de mono-, di- e triglicerídeos do ácido beênico (C:22), o qual possui alto peso molecular, ocorre um aumento na viscosidade da matriz lipídica que dificulta o rompimento das partículas para atingir tamanhos nanométricos e com baixa dispersão de tamanhos, o que pode justificar a interferência significativa da variável S/L nas formulações com o Compritol. Por fim, em ambas formulações não foram apresentadas variáveis com interferências significativas no potencial zeta, o que é justificado pelo fato de não terem sido testados parâmetros que causem grandes alterações nas cargas superficiais das nanopartículas, como diferenças de pH, moléculas com carga, eletrólitos, tensoativos e suas proporções (HONARY; ZAHIR, 2013; KAMBLE *et al.*, 2022; SHAH, 2014).

A literatura corrobora esses resultados, visto que já são relatados que formulações com grandes quantidades de lipídeo na dispersão necessitam de maior energia (potência) para serem “quebrados” em tamanhos nanométricos, assim como elevadas concentrações de lipídeos podem levar à um aumento de tamanho devido a quantidade insuficiente de tensoativos para cobrir toda a superfície das partículas (APOSTOLOU *et al.*, 2021; AZHAR SHEKOUFEH BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). O tipo de lipídeo também já é um fator consolidado nos estudos como interferente na obtenção de nanopartículas, onde sistemas com matrizes compostas por lipídeos de alto peso molecular possuem maior viscosidade, que é um parâmetro que dificulta a redução de tamanhos em relação à lipídeos de menor peso, quando utilizando a mesma energia (BEHBAHANI *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2011; RIGON *et al.*, 2018; SHETE; PATRAVALE, 2013; ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, a quantidade de energia fornecida ao sistema, através do controle da potência do sonificador e o tempo de exposição, interferem na distribuição de tamanhos, de forma que melhores resultados de tamanho e PDI são obtidos empregando-se potência e tempos maiores. Entretanto, para o tempo existe um limite de exposição em que valores superiores não conferem benefício adicional, ou causam aumento de PDI por favorecer aglomeração das partículas pelo elevado tempo de choque entre elas (BEHBAHANI *et al.*, 2017; KUMAR; SINGH; GARG, 2019; PUCEK-KACZMAREK, 2021; SIDDIQUI *et al.*, 2014). Sendo assim, ficam confirmados os efeitos do tipo e quantidade de lipídeo, a proporção de lipídeos sólido/líquido na matriz lipídica, e os parâmetros de sonicação no tamanho e a homogeneidade da dispersão dos CLNs. Diante do exposto, os resultados dessa primeira série de ensaios de planejamento experimental direcionaram a escolha do Dynasan114 como lipídeo sólido para continuar o estudo, permitiu uma triagem da faixa de composição lipídica, bem como determinou os parâmetros do método de obtenção.

Alguns estudos que também avaliaram a influência de diferentes fatores nas propriedades das nanopartículas através de diversos planejamentos de experimentos, chegaram a resultados semelhantes. Quanto aos parâmetros de sonicação, estudos mostraram que a redução do tamanho de partículas é proporcional à potência de sonicação empregada e a uniformidade de dispersão dependendo do tempo (BECKER PERES *et al.*, 2016; BEHBAHANI *et al.*, 2017; CORTIAL *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2020). Já em relação aos parâmetros da formulação, as pesquisas têm relatado que as principais influências no tamanho e PDI das nanopartículas é a quantidade de lipídeo total e concentração de lipídeos sólidos na formulação, cuja diminuição desses fatores facilitam a

obtenção de tamanhos menores e distribuição mais homogênea (DAS; NG; TAN, 2012; GHANEM *et al.*, 2021; KELIDARI *et al.*, 2017; SALEM *et al.*, 2020; SOLEIMANIFARD *et al.*, 2020). Além desses fatores, outros fatores que as pesquisas têm mostrado que contribuem para o aumento do tamanho das nanopartículas é o tipo de lipídeo (BEHBAHANI *et al.*, 2017; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2019; VARSHOSAZ *et al.*, 2010), inclusive quando testados para nanopartículas encapsulando IFAs hidrofílicos (BECKER PERES *et al.*, 2016; CAVALCANTI *et al.*, 2018; DĄBROWSKA; SOUTO; NOWAK, 2021; GHADIRI *et al.*, 2012; KHEZRI *et al.*, 2020; SHARIF MAKHMAL ZADEH *et al.*, 2018; VARSHOSAZ; TABBAKHIAN; MOHAMMADI, 2010). Na eficiência de encapsulamento, o que mais influenciou melhores incorporações de fármaco foi a quantidade e tipo de lipídeo e de tensoativo, sendo uma relação direta na quantidade desses componentes e um maior encapsulamento (BAIG *et al.*, 2016; DARA *et al.*, 2019; SALEM *et al.*, 2020; SHAH *et al.*, 2012). Já a proporção lipídio sólido/líquido tem mostrados resultados distintos, predominando a relação de maior concentração de lipídios sólidos ocasionando menor EE, visto que a adição de lipídio líquido à matriz proporciona menor cristalinidade, permitindo que mais fármaco seja incorporado (KELIDARI *et al.*, 2017; SALEM *et al.*, 2020). Entretanto, se tratando de CLN contendo fármacos hidrofílicos que foram produzidos pelo método de emulsificação múltipla ou microemulsão, em que o fármaco é adicionado em forma de solução aquosa, essa fase interna presente na fase oleosa já provoca uma desorganização que ajuda a reduzir a cristalinidade da matriz lipídica, sem a necessidade de quantidades maiores de lipídeo líquido. Inclusive, uma maior proporção de lipídeo líquido nesses casos pode amorfizar em excesso a matriz e dificultar a solidificação, facilitando que o fármaco escape da nanopartícula. Por isso, alguns estudos mostram uma maior quantidade de lipídeo sólido favorecendo maior encapsulamento de fármacos (AWADEEN; BOUGHADADY; MESHALI, 2020; BECKER PERES *et al.*, 2016; FANGUEIRO *et al.*, 2012; GHASEMIAN *et al.*, 2017), assim como visualizado nesse estudo.

Portanto, para o planejamento da segunda série foram estabelecidos os seguintes critérios: quantidade de lipídeo (%Lip) e a proporção de lipídeos sólido e líquido (Sol/Liq) como variáveis independentes; parâmetro de sonicação fixados em 7 minutos e potência de 55% de amplitude; diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento como variáveis dependentes. Esses critérios foram utilizados em planejamento experimental do tipo central composto, com dois fatores, em dois níveis e três repetições do ponto central, o que gerou

um total de 13 experimentos, cujo desenho experimental e os resultados estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental contendo o fármaco, feito com Dynasan114 + Miglyol, mostrando as variáveis dependentes e independentes

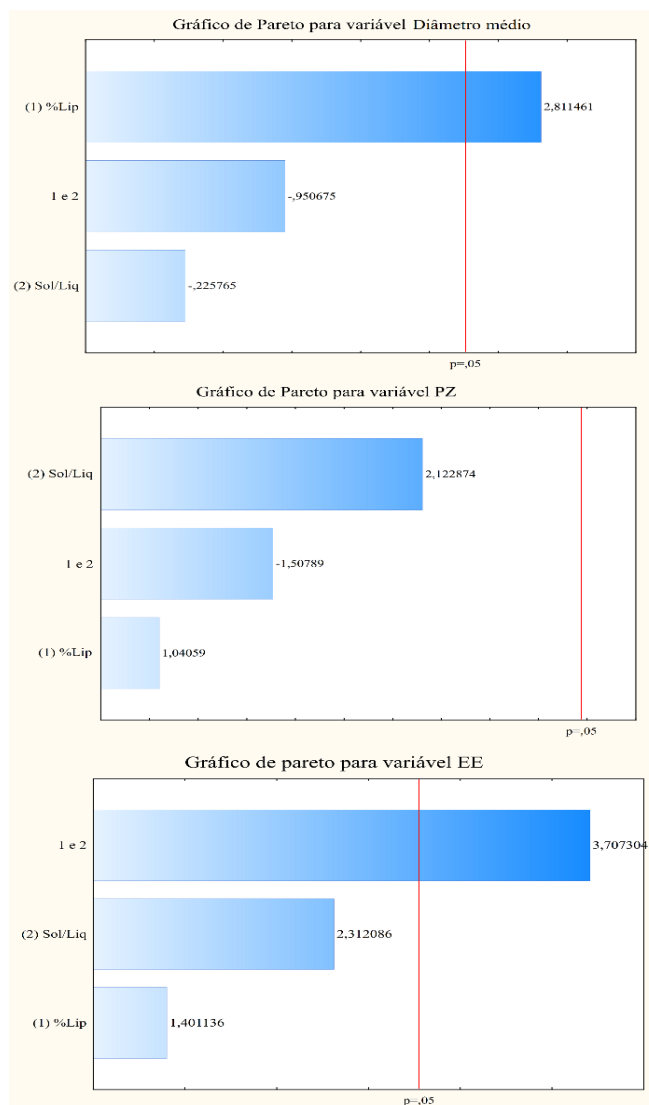
Amostra	%Lip	Sol/Liq	Diam. (nm)	PdI	PZ (mV)	EE (%)
1	6,00	65/35	31,77	0,280	-39,0	53,61
2	8,00	65/35	41,13	0,227	-27,9	49,93
3	6,00	85/15	37,45	0,344	-19,6	41,31
4	8,00	85/15	38,01	0,296	-23,6	59,94
5	5,59	75/25	26,51	0,244	-19,1	46,29
6	8,41	75/25	45,52	0,263	-13,7	44,14
7	7,00	61/39	39,35	0,279	-21,3	40,78
8	7,00	89/11	35,45	0,269	-16,8	56,32
9	7,00	75/25	48,09	0,248	-17,7	57,20
10	7,00	75/25	34,54	0,230	-24,9	50,54
11	7,00	75/25	34,73	0,251	-11,0	51,54
12	7,00	75/25	38,45	0,273	-18,8	55,70
13	7,00	75/25	41,50	0,249	-20,1	56,32

Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; Sol/Liq= proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; Diam. = diâmetro; PZ = potencial zeta.

É possível observar na tabela que os resultados mostram a obtenção de CLNs com diâmetro médio variando de 26,51 nm à 48,09 nm, PdI entre 0,227 e 0,344, potencial zeta entre -11,0 e -39,0 e eficiência de encapsulamento entre 40,78% e 59,94%. As formulações apresentaram-se líquidas, com aspecto translúcido condizente com os tamanhos encontrados, além de reflexo azulado. Considerando os parâmetros ideais para esse estudo já mencionados, todas as amostras desse experimento apresentaram resultados adequado em relação ao diâmetro, apenas a amostra 3 apresentou PdI um pouco acima do recomendado. O potencial zeta sofreu muita variação, com algumas formulações tendo valores próximos ao ideal. Quanto à eficiência de encapsulamento, valores próximos à 50% são os mais encontrados em estudos com CLNs contendo fármacos

hidrofílicos (CAVALCANTI *et al.*, 2018; DARA *et al.*, 2019; GHADIRI *et al.*, 2012; GHASEMIAN *et al.*, 2017; KHEZRI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2014; ROSTAMKALAEI *et al.*, 2019; SHAH *et al.*, 2012; SHTAY *et al.*, 2019; VARSHOSAZ; TABBAKHIAN; MOHAMMADI, 2010; ZHAO *et al.*, 2014). O modelo mostrou-se ajustado para as variáveis avaliadas, com exceção do PDI ($p < 0,05$), o que pode estar relacionado à pouca contribuição dos níveis dos efeitos testados nessa variável, resultando em pouca variação na resposta. Os gráficos de Pareto obtidos para esse planejamento estão dispostos na Figura 17, onde é possível visualizar os parâmetros de maior magnitude e significativos nas variáveis independentes testadas.

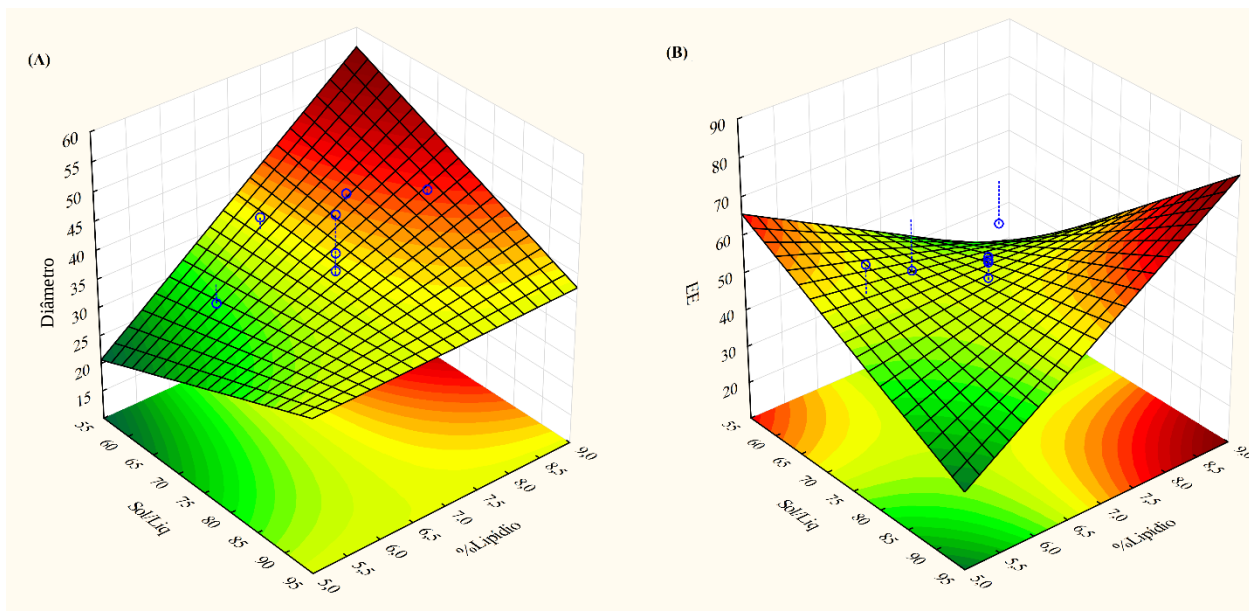
Figura 17 - Gráfico de Pareto para avaliação das variáveis no planejamento experimental feito com Dynasa114 + Miglyol contendo o fármaco



Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; Sol/Liq= proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; PZ = potencial zeta; EE = eficiência de encapsulamento. Fonte: autoria própria

Como mostram os gráficos acima, a variável que teve efeito significativo ($p < 0,05$) para o diâmetro nos níveis analisados foi a quantidade de lipídeos total (%Lip), cujo sinal positivo do efeito demonstra que níveis elevados causam aumento do diâmetro das nanopartículas. Para o potencial zeta, novamente, nenhuma variável testada teve efeito significativo. Já na eficiência de encapsulamento, foi significativa a interações entre os efeitos %Lip e Sol/Liq com sinal positivo, indicando que altos níveis das variáveis juntas aumentam a resposta. Ou seja, uma maior quantidade de lipídeo total e uma maior proporção de lipídeo sólido na razão Dynasan114/Miglyol pode aumentar a EE. Já o PDI não teve os efeitos avaliados, visto que o modelo não foi ajustado para essa variável, podendo-se aproveitar apenas a avaliação de tendências dos fatores testados nessa variável, o que nesse caso demonstrou uma propensão de aumentos nos valores de PDI com o aumento da proporção Sol/Liq, conforme pode ser observado na Tabela 6 mostrada acima. Por conseguinte, evitar as proporções de lipídeo sólido mais altas pode favorecer PDI mais baixos. Sendo assim, é possível inferir que os CLNs compostos por Dynasan114 contendo o fármaco possuem as melhores características quando utilizados menores quantidades de lipídeo total e menor proporção sólido/líquido, enquanto maior EE é obtida com quantidades maiores. Portanto, foi necessário encontrar uma região intermediária desses fatores que resultasse em valores ótimos tanto para o tamanho da nanopartícula, quanto para a eficiência de encapsulamento do fármaco, o que pôde ser melhor visualizado através dos gráficos de superfície resposta (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro (A) e eficiência de encapsulamento (B) em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan114 contendo o fármaco.



Fonte: autoria própria

No gráfico A é possível visualizar que os melhores diâmetros estão presentes na região verde/amarela, que corresponde à proporção Sol/Liq abaixo de 90% de lipídeo sólido e quantidade de lipídeo total abaixo de 8%. Já no gráfico B, observa-se que as melhores EE estão nas regiões laranja/vermelha, relacionadas às proporções Sol/Liq acima de 80% de lipídeo sólido e quantidade total de lipídeo acima de 7%. Esses resultados apontam para as amostras 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 como as melhores do ensaio e, como as amostras de 9 a 13 são repetições do experimento, apenas 4 amostras (4, 6, 8 e 9) foram consideradas como as formulações ideais para a obtenção dos CLNs. Considerando, entre estas, que todas possuem tamanhos ótimos para a finalidade do estudo, PDI dentro da faixa de baixa dispersão ($\leq 0,300$) e que o potencial zeta variou sem influência das variáveis testadas, a escolha da melhor formulação foi feita baseada na eficiência de encapsulamento, uma vez que seus valores determinam a forma de liberação do IFA da matriz lipídica, além da quantidade total de fármaco na formulação. Nesse contexto, a amostra 4 foi selecionada como a melhor formulação para obtenção das nanopartículas que continuam no estudo.

5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLNs

A partir dos parâmetros das amostras eleitas no planejamento experimental foram desenvolvidos os CLNs com e sem o fármaco, doravante denominados CLN4 e CLNb respectivamente. Os carreadores foram obtidos por ultrasonicação à quente pelo método de emulsão múltipla explicado no tópico 4.2.3, além dos parâmetros definidos no DoE de 7 minutos de sonicação à uma potência de 55% de amplitude, utilizando 8% de lipídeo na proporção 85% Dynasan e 15% Miglyol para o CLN4.

5.3.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e Eficiência de encapsulamento

Os nanocarreadores obtidos passaram por caracterização pós-preparo para avaliação de diâmetro médio, PDI, potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulamento (EE) e pH, os quais foram também monitorados continuamente ao longo da pesquisa para avaliação de estabilidade. O CLN4 apresentou diâmetro médio de partícula de $41,13 \pm 0,210$ nm, PDI $0,227 \pm 0,017$, potencial zeta de $-27,9 \pm 1,30$ mV, pH de $5,73 \pm 0,11$, além de eficiência de encapsulamento de $62,46 \pm 1,48$ %, enquanto o CLNb teve diâmetro médio de $36,91 \pm 0,341$ nm, PDI $0,184 \pm 0,009$, potencial zeta de $-22,0 \pm 1,18$ mV e pH $5,93 \pm 0,32$. Ambos os carreadores possuíram valores de diâmetro, PDI e PZ semelhantes à mesma formulação testada no planejamento experimental, demonstrando sua reprodutibilidade, bem como a EE também foi semelhante. Pequenas alterações no CLN4 podem estar relacionadas à incorporação do fármaco, que pode influenciar em alguns parâmetros, como aumento de tamanho e variação de PZ e pH das nanopartículas, que nesse estudo mostrou um pH levemente mais baixo comparada ao CLN4b devido ao pH ácido do fármaco em solução.

Em aplicações farmacêuticas, o tamanho e a homogeneidade da dispersão das nanopartículas são parâmetros cruciais para garantir um comportamento ideal da formulação em termos de estabilidade, absorção, entrega alvo e segurança (CHEN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2016). Por isso, é importante obter carreadores com características físico-químicas ótimas, que confirmem estabilidade, bem como adequadas ao seu uso, e que essas características se mantenham com o encapsulamento do fármaco. Os valores de diâmetro, PDI, PZ, EE apresentados pelo CLN4 estão dentro dos padrões de qualidade recomendados na literatura para conferir melhor estabilidade para

as nanopartículas e dentro dos critérios estabelecidos dessa pesquisa (diâmetro $\leq 100\text{nm}$, $\text{PdI} \leq 0,300$ e $\text{PZ} \geq |20| \text{ mV}$, $\text{EE} \geq 50\%$). Além disso, o carreador possuiu um pH característico da solução do AM, que não impede administração oral, como também demonstrou uma eficiência de encapsulamento condizente, e até superior, a outros estudos que incorporaram IFAs hidrofílicos em CLNs (CAVALCANTI *et al.*, 2018; DARA *et al.*, 2019; GHADIRI *et al.*, 2012; GHASEMIAN *et al.*, 2017; KHEZRI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2014; ROSTAMKALAEI *et al.*, 2019; SHAH *et al.*, 2012; SHARIF MAKHMAL ZADEH *et al.*, 2018; SHTAY *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2018; VARSHOSAZ; TABBAKHIAN; MOHAMMADI, 2010). Devido à alta solubilidade em água, fármacos muito hidrofílicos e o baixo peso molecular, como o AM, são de difícil incorporação em muitos sistemas de liberação de fármacos, possuindo média de encapsulamento nas pesquisas por volta de 60% (LI; LI; ZHAO, 2020; MIRCHANDANI; PATRAVALE; BRIJESH, 2021).

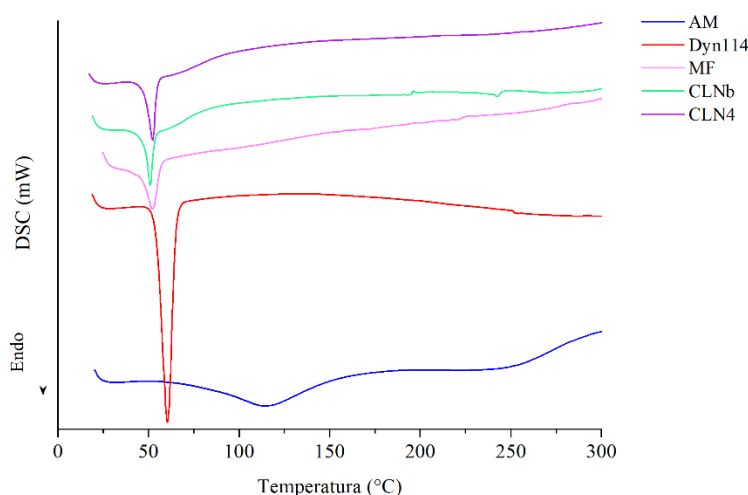
Em relação à encapsulação de antimoniato de meglumina em outros estudos, são poucas as pesquisas que utilizaram nanocarreadores como sistemas de entrega do fármaco, os quais obtiveram EE em faixas próximas nos diferentes sistemas obtidos, tais como lipossomas com 58% (FRÉZARD *et al.*, 2000), 38% (BORBOREMA, 2010) 55,3-55,8% (MOOSAVIAN KALAT *et al.*, 2014) e 51,1% (MOOSAVIAN; FALLAH; JAAFARI, 2019), nanopartícula de quitosana tiolada revestida com manose com 63,4% (SARWAR *et al.*, 2017), sendo um estudo com EE mais elevada com nanopartículas de PLA com 70,5% (COSCO *et al.*, 2021), embora a concentração de antimônio tenha sido 10x menor que as utilizadas aqui. Outros três estudos não informaram a EE das nanopartículas obtidas (ALVARENGA *et al.*, 2015; BARAZESH *et al.*, 2018; SOUSA-BATISTA *et al.*, 2019). Sendo assim, fica demonstrado o potencial inovador dessa pesquisa. Ademais, as avaliações iniciais realizadas confirmaram a qualidade dos nanocarreadores obtidos, sendo direcionados para demais ensaios de caracterizações físico-químicas.

5.3.2 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) dos CLNs

As avaliações de DSC do fármaco, lipídeo sólido, mistura física total e carreadores desenvolvidos foram realizadas visando avaliação do comportamento térmico das amostras e da cristalinidade da matriz lipídica no CLN, visto que são fatores importantes para prever a estabilidade física a longo prazo das nanopartículas, no que concerne sua capacidade de manter o encapsulamento do fármaco. Os gráficos estão apresentados na Figura 19. Comparando a curva do

AM isolado com a mistura física e CLN4, nota-se que não aparece o evento de fusão do fármaco. No caso do Dynasan puro em relação às demais amostras, é possível notar um leve deslocamento do pico de fusão do lipídeo de 60,4 °C para 52,28 °C na MF, 50,9 °C no CLNb e 52,30 °C no CLN4, além de redução das entalpias de -199,39 J/g para 33,06 J/g, 21,30 J/g e 25,70 J/g respectivamente.

Figura 19 - Gráficos de DSC do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn114) isolados, da mistura física total (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN4) e sem o fármaco (CLNb)



Fonte: autoria própria

O desaparecimento do pico de fusão do fármaco sugere sua solubilidade nos excipientes da formulação, tanto na MF quanto no CLN4, sendo nesse último também indicativo de incorporação da solução do fármaco na matriz da nanopartícula, como relatado em alguns estudos (BENIVAL; DEVARAJAN, 2012; LIU *et al.*, 2014; MIRCHANDANI; PATRAVALE; BRIJESH, 2021; SAEEDI *et al.*, 2021). Também pode estar relacionado à diminuição da sua proporção. Além disso, a inclusão do AM nas misturas favoreceu a redução da cristalinidade, já que o mesmo é uma substância amorfa, culminando na redução das entalpias. Quanto ao lipídeo (ΔH -199,39 J/g), a mudança na endoterma de fusão foi gradativa, com redução das temperaturas e entalpias de fusão na MF (ΔH -33,06 J/g), no CLNb (ΔH -21,30 J/g) e CLN4 (ΔH -25,70 J/g), visíveis através do deslocamento e redução do pico. A diminuição na MF é condizente com a solubilização do Dynasan na mistura líquida dos excipientes, formando uma mistura com fusão facilitada, enquanto no CLNb e CLN4 é também relacionada a formação de matrizes lipídicas com imperfeições, menos

cristalinas, que foram ocasionadas pela formação da nanopartícula (LIU *et al.*, 2017; SCHOENITZ *et al.*, 2014). Ambos os carreadores apresentaram evento de fusão com menor entalpia que a MF, o que pode ser explicado pelo tamanho nanométrico da partícula, cuja alta área superficial facilita a fusão com menor gasto energético (PIRES *et al.*, 2017; ROSTAMKALAEI *et al.*, 2019). Porém, no caso da temperatura, o CLNb possuiu o menor valor, sendo relacionado com a ausência do fármaco, que é uma substância sólida e eleva o ponto de fusão quando presente nas misturas. Essa mesma interferência contribuiu para a diferença entre as nanopartículas, embora mínima, confirmado pela temperatura e entalpia um pouco maior do CLN4 em relação ao CLNb.

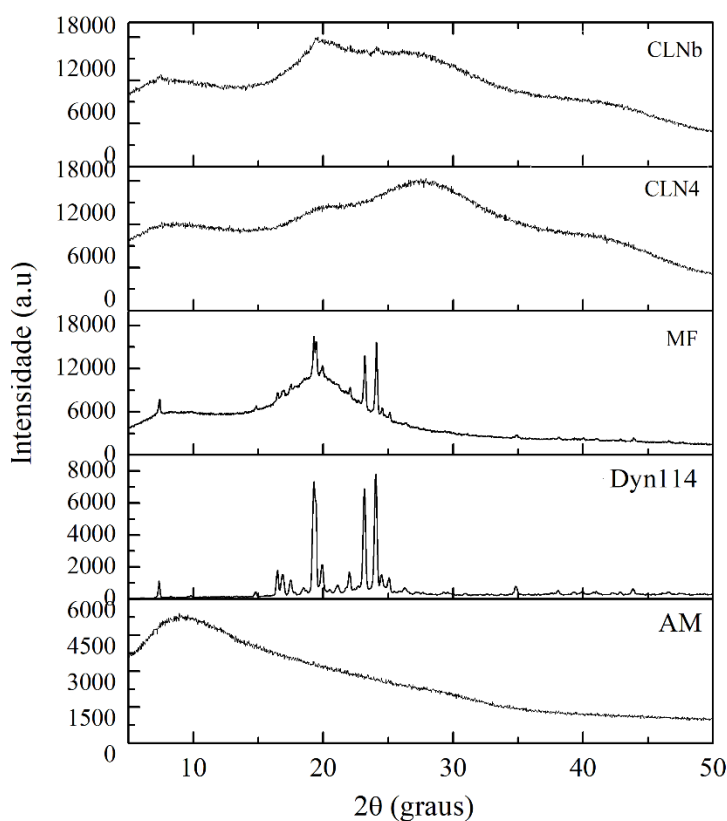
Para inferir de forma mais assertiva sobre a redução de cristalinidade do lipídeo durante a obtenção das nanopartículas baseado no resultado do DSC, foi realizado o cálculo do índice de recristalização (IR), conforme equação 1 mencionada nos métodos. O resultado mostrou um IR de 18,95% para o CLN4, confirmando a redução da cristalinidade do lipídio sólido após solidificação e a formação de uma matriz imperfeita do nanocarreador. O IR vai depender da composição da nanopartícula e da proporção de lipídeo líquido usada, os quais vão influenciar na redução da cristalinidade do lipídeo sólido (BAN *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2019; MADUREIRA *et al.*, 2015). No caso do carreador obtido nesse estudo, ainda deve-se levar em consideração a solução do fármaco usada como fase aquosa interna durante o método de obtenção do CLN4, que também influencia nesse cálculo, tornando a cristalização menor (NELIS *et al.*, 2019). Como já mencionado, a redução da cristalinidade é um fenômeno desejado para incorporação do fármaco com maior estabilidade, sendo retido dentro encapsulado ao longo do tempo de prateleira (DAS; CHAUDHURY, 2011; GALVÃO *et al.*, 2016; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). Por conseguinte, o resultado encontrado foi favorável à encapsulação do AM no CLN desenvolvido.

5.3.3 Difratometria de Raios X (DRX)

A avaliação por DRX foi realizada para avaliação da estrutura das substâncias isoladas, da alteração estrutural quando em mistura e no nanocarreador, e para confirmação dos resultados obtidos no DSC. Conforme mostrado na Figura 20, é possível ver o padrão de DRX do AM (discutido no item 5.1.3), onde está mostrado seu comportamento amorfo. O Dynasan exibiu picos intensos em ângulos 2θ entorno de 19,29, 23,15, 24,05, indicando natureza cristalina. Esses picos já foram relacionados anteriormente às formas polimórficas α , β e β/β' respectivamente (LIU *et*

al., 2017; SEVERINO *et al.*, 2012). Na mistura física, já foi apresentado um grau de amorfização, evidenciado pelo desaparecimento de picos menores e redução dos picos mais intensos característicos do lipídeo, como os citados acima, que aparecem em bem menor intensidade devido a sobreposição com um halo amorfo oriundo dos outros componentes da mistura (AM, tensoativos e lipídeo líquido). Por fim, os nanocarreadores apresentaram difratogramas semelhantes, com um grande halo amorfo sem presença de nenhum pico cristalino do lipídeo sólido, denotando um maior grau de amorfização em relação à MF.

Figura 20 - Difrátogramas do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn114) isolados, da mistura física de todos os componentes (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN4) e sem o fármaco (CLNb)



Fonte: autoria própria

O difratograma do Dynasan está de acordo com a literatura (KIPRIYE; ŞENEL; YENILMEZ, 2017; KRISHNAM RAJU; SUDHAKAR; MURTHY, 2014; KUPETZ; BUNJES, 2014). O alargamento dos picos do Dynasan visualizados no gráfico da MF foram provocados pela adição dos demais componentes presentes na MF, com consequente solubilização do lipídeo,

acarretando a diminuição da organização da estrutura cristalina, com predominância polimorfos menos estáveis. Assim como, o desaparecimento dos picos com o surgimento de um halo amorfo largo mostrados nos gráficos do CLN4 e CLNb é resultado da obtenção de nanocarreadores com variação polimórfica na matriz, alcançando um grau desorganização, característico de CLNs que possuem lipídeo líquido em sua formulação (SAKELLARI *et al.*, 2021; SATO; UENO, 2011; SCHOENITZ *et al.*, 2014; SEVERINO *et al.*, 2017).

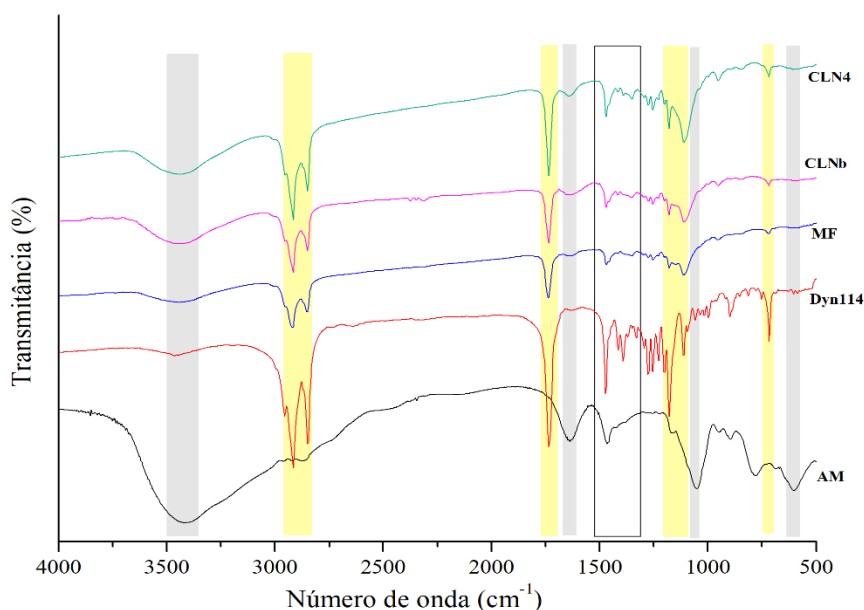
Triglicerídeos podem se solidificar em diferentes formas cristalinas, dependendo da forma de processamento, da presença de misturas de lipídeos ou de uma interface óleo/água, visto que isso influencia o empacotamento ordenado das suas cadeias de ácidos graxos (ALFUTIMIE *et al.*, 2016; DOUAIRE *et al.*, 2014; SATO; UENO, 2011). Em geral, lipídeos de cadeia longa, como o Dynasan, se cristalizam em duas ou três fases diferentes, α e β' ou α , β e β/β' respectivamente (RIBEIRO *et al.*, 2015; SEVERINO *et al.*, 2012). Essas estruturas polimórficas variam em níveis de maior ou menor energia e possuem diferentes graus de cristalinidade. A conformação β é a mais estável e de maior ponto de fusão, sendo a mais cristalina, enquanto as conformações α e β' são mais instáveis e de menor ponto de fusão, responsáveis por arranjos de menor cristalinidade (DA SILVA *et al.*, 2016; GOMES DA SILVA *et al.*, 2022; NELIS *et al.*, 2019). Por isso, esses últimos polimorfos são os mais prevalentes em CLN que demonstram redução de cristalinidade da matriz no DRX (LIU *et al.*, 2017).

Nos resultados de DRX mostrados nesse trabalho, os picos mais intensos presentes no difratograma do Dynasan referentes à forma β e β/β' indica sua conformação na forma polimórfica mais cristalina e estável. Houve uma redução de cristalização na MF, demonstrado pela sobreposição desses picos com o aparecimento de um halo amorfo dos demais componentes, enquanto nos CLNs houve desaparecimento dos picos característicos de formas cristalinas do lipídio, o que é condizente com amorfização da matriz do carreador. Ademais, esses resultados corroboram os apresentados no DSC, que sugeriram redução de cristalinidade da MF e dos CLNs devido à diminuição do pico de fusão, das temperaturas e das entalpias. Isso, acompanhado pelo desaparecimento dos picos no DRX, confirmam maior amorfização do nanocarreadores. Assim, foi obtida uma matriz mais desorganizada, que favorece a incorporação de quantidade maior de AM, podendo minimizar sua expulsão durante o armazenamento, e também modular sua liberação.

5.3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR)

Para confirmação da incorporação do fármaco na matriz dos CLN, bem como avaliação de interações e estabilidade físico-química, foi realizado ensaio de espectroscopia no infravermelho, cujos gráficos estão apresentados na Figura 21. Em amarelo estão destacados os picos característicos dos lipídeos, o quadrado branco ressalta picos em de grupamentos em comum do lipídeo e do AM, e em cinza os picos mais característicos do fármaco, que foram usados para destacar sua presença nas misturas e nanopartículas. Os espectros do AM, Dynasan e MF já foram discutidos no tópico 5.1.2 e 5.2.2.2 respectivamente.

Figura 21 - Espectro de infravermelho do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn114) isolados, da mistura física total (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN4) e sem o fármaco (CLNb)



Fonte: autoria própria

Os espectros dos nanocarreadores possuem muita semelhança, sendo possível observar discretas diferenças relacionadas a presença do fármaco. O CLNb apresentou um espectro similar ao da MF, com diferença na banda em torno de 3400 cm^{-1} referente aos estiramentos dos grupos -OH, que está mais proeminente devido a água das dispersões, a qual também contribuiu para uma pequena banda em 1641 cm^{-1} referente ao dobramento também do -OH. Já o CLN4 apresentou diferenças sutis em relação ao carreador branco, com uma banda um pouco maior dos estiramentos

dos grupos -OH em 3400 cm^{-1} , por causa da presença desses grupamentos na molécula do fármaco, além do pico em 1641 cm^{-1} mais definido devido à contribuição também dos dobramentos -NH presentes no AM, além de um sinal fraco 601 cm^{-1} referente ao Sb-O. Além disso, em todos foram mantidos os picos característicos do lipídeo.

Similar aos resultados de DSC e DRX, as análises de FTIR dos CLNs obtidos revelam uma interação positiva destes com o fármaco. A diminuição e/ou desaparecimento dos picos característicos do AM no espectro do CLN4 sugere que o fármaco tem uma boa dispersão nos componentes da nanopartícula, e que encontra-se incorporado em sua matriz. Esses resultados são consistentes com avaliações semelhantes feitas em outras pesquisas (BENIVAL; DEVARAJAN, 2012; KHEZRI *et al.*, 2020; SAEEDI *et al.*, 2021). Ademais, a manutenção do perfil do espectro dos compostos, sem deslocamentos nem surgimento de novos picos, também confirmam a estabilidade físico-químicas dos sistemas obtidos.

Portanto, baseado nos resultados das caracterizações físico-químicas do CLN4 e CLNb, pode-se inferir que foram obtidos nanocarreadores com ótimas característica nanométricas, condizentes com os parâmetros reportados na literatura e apropriado ao objetivo do trabalho, os quais possuíram matrizes lipídicas de baixa cristalinidade, que permitiu um bom aprisionamento do antimoníato de meglumina, sem sinais de interação química danosa ao sistema. Sendo assim, os carreadores obtidos foram direcionados para demais ensaios e avaliações de estabilidade.

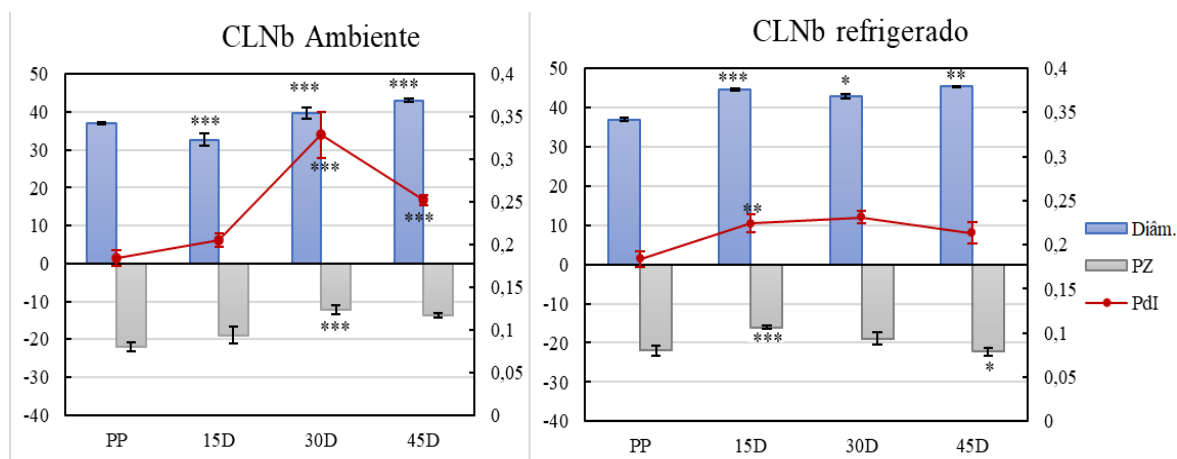
5.4 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

Para avaliar variações nas propriedades físico-químicas dos CLNs ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento, foi realizado um ensaio de estabilidade com determinação do diâmetro médio, PdI, PZ, pH, além de EE para o CLN4, com resultados preliminares de 45 dias em armazenamento sob refrigeração ou temperatura ambiente. Sendo assim, através desse estudo será possível avaliar a qualidade dos CLNs desenvolvidos, bem como estimar uma tendência geral de estabilidade em determinada temperatura, direcionando o local ideal de armazenamento. Todos os valores aferidos dos parâmetros ao longo dos 45 dias de ensaio estão descritos no Apêndice F (Tabelas 18 e 19).

As variações ocorridas durante o período de armazenamento nas diferentes condições de temperatura estão dispostas graficamente na Figura 22 para o CLNb e Figura 23 para o CLN4. Para

o nanocarreador sem o fármaco (CLNb), as variações de diâmetro médio foram significativas ao longo do período de estudo, que saiu de $36,91 \pm 0,341$ nm no pós-preparo para $45,39 \pm 0,140$ nm no 45º dia sob refrigeração e $43,03 \pm 0,447$ nm sob temperatura ambiente. O PDI foi de $0,184 \pm 0,009$ no primeiro dia para $0,213 \pm 0,012$ no último dia da amostra refrigerada, sendo a variação significativa apenas nos 15 primeiros dias, e alcançou $0,252 \pm 0,006$ no último dia da amostra em temperatura ambiente, com significância a partir do 30º dia. Quanto ao potencial zeta, a variação ocorreu de $-22,0 \pm 1,18$ mV no pós-preparo para $-22,3 \pm 1,10$ mV e $13,6 \pm 0,57$ mV no último dia das amostras sob refrigeração e temperatura ambiente respectivamente, sendo na primeira significativa as variações no dia 30 e segunda nos dias 15 e 45. Para o CLNb armazenado sob refrigeração, embora algumas variações tenham sido significativas, estas não foram relevantes, e todos os parâmetros se mantiveram dentro dos critérios de qualidade já mencionados. No entanto, o CLNb armazenado em temperatura ambiente apresentou uma variação maior do PDI no 30º dia, que alcançou valores acima ao limite máximo desejado, e o potencial zeta abaixo, que juntos ao aumento de tamanho podem ser consideradas alterações que merecem maior atenção. Como o ensaio ainda não foi finalizado, os próximos resultados trarão uma melhor avaliação de um possível início de instabilidade. No 45º dia, todos os parâmetros avaliados foram significativamente diferentes entre o CLNb refrigerado e o armazenado em temperatura ambiente ($p < 0,01$).

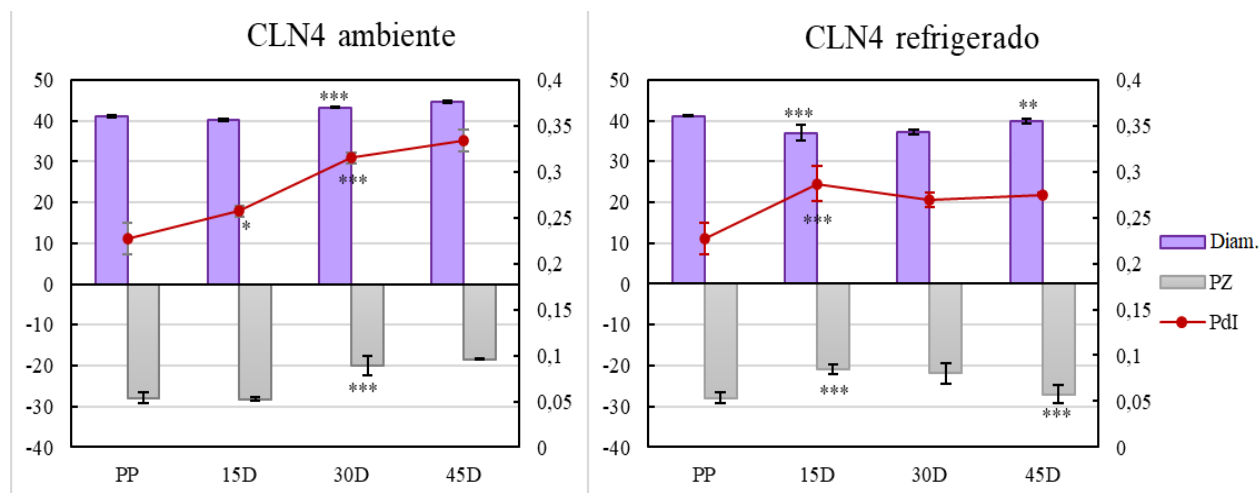
Figura 22 - Gráfico das variações de diâmetro médio, PDI e potencial zeta do CLNb armazenados em diferentes condições de temperatura.



Legenda: Diâm. = diâmetro; PZ = potencial zeta. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Em relação ao CLN4, avaliando os gráficos de estabilidade abaixo é possível notar que na amostra armazenada em refrigeração houve variações em todos os parâmetros no 15º dia, porém houve uma manutenção em valores próximos no diâmetro e no PDI e aumento do PZ (retorno ao valor inicial) até o 45º dia, enquanto a amostra em temperatura ambiente iniciou um aumento significativo de PDI no 15º dia, que seguiu variando até o 45º, junto com os demais parâmetros. Os resultados da avaliação do pós-preparo e do 45º dia de ensaio mostrou uma variação de diâmetro de $41,13 \pm 0,210$ nm para $39,88 \pm 0,631$ nm no CLN4 refrigerado e para $44,62 \pm 0,196$ nm do CLN em temperatura ambiente. Já o PDI variou de $0,227 \pm 0,017$ para $0,275 \pm 0,001$ na amostra refrigerada e $0,334 \pm 0,012$ na amostra ambiente, e PZ de $-27,9 \pm 1,30$ mV para $-27,00 \pm 2,10$ mV e $18,40 \pm 0,17$ mV respectivamente. Novamente, observa-se uma variação mais relevante do carreador armazenado à temperatura ambiente, que poderá ter uma melhor avaliação da mudança na estabilidade depois do estudo de estabilidade completo. Ao final do estudo (45º dia), todos os parâmetros avaliados mostraram diferença significativa quando comparado o CLN4 armazenado em temperatura ambiente e o armazenado sob refrigeração ($p < 0,01$).

Figura 23 - Gráfico das variações de diâmetro médio, PDI e potencial zeta do CLN4 armazenados em diferentes condições de temperatura



Legenda: Diâm. = diâmetro; PZ = potencial zeta. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

São diversos os fatores que influenciam o tamanho, a homogeneidade e a estabilidade das dispersões de nanocarreadores, principalmente sua composição e forma de armazenamento, os quais impactam na obtenção de formulações estáveis desde o pós-preparo e na manutenção das

características de estabilidade ao longo do tempo. Nesse sentido, nanocarreadores são considerados estáveis quando apresentam homogeneidade das características físico-químicas da dispersão, como o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2021; SHAH, 2014; ZHAO *et al.*, 2020). Por isso, a avaliação dessas características frente às diferentes condições ambientais durante o tempo de armazenamento é importante para avaliar o surgimento de instabilidades no sistema.

Mais do que apenas saber o tamanho das nanopartículas, obter tamanhos ideais para a finalidade almejada, com distribuição homogênea, e garantir a manutenção dessas características ao longo do tempo deve ser considerado prioridade. A medida do índice de polidispersão indica a qualidade da dispersão do sistema através da distribuição dos tamanhos das partículas, podendo variar de 0,1 à 1,0, de forma que quanto menor e mais próximo de 0,2, mais homogêneo está a distribuição do sistema, ou seja, menos polidisperso ele se encontra (BHATTACHARJEE, 2016; ZHAO *et al.*, 2014). Por isso, mudanças nos valores de PdI ao longo do tempo indicam variação na distribuição de tamanhos das partículas no sistema, em que um aumento pronunciado pode indicar agregação ou floculação, os quais são fenômenos de instabilidade. Pesquisas sugerem valores de $PdI \leq 0,300$ para considerar baixa polidispersão, sendo o aumento gradativos desse índice um indicativo de instabilidade da dispersão (SHAH, 2014; YANG *et al.*, 2014).

Em geral, as pesquisas referem-se ao início dos processos de instabilidade devido a modificações do potencial zeta, que podem levar a agregação das partículas e, conseqüentemente, aumento do tamanho e PdI . Isso porque, o potencial zeta reflete a estabilidade do sistema em termos de barreira eletrostática, que causa repulsão e evita a aglomeração das partículas em eventuais choques durante o movimento Browniano. Por isso, considera-se que um $PZ \geq 30mV$ (em módulo) é um valor ideal para garantir uma repulsão eletrostática maior que as forças atrativas, garantindo maior estabilidade (Heurtault, 2003; Kovacevik, 2014; Gordillo-Galeano, 2012). No entanto, a repulsão eletrostática não é o único parâmetro que influencia a estabilidade das dispersões de nanopartículas. O impedimento estérico também é um fator que contribui para a repulsão das partículas, o qual está relacionado ao uso de tensoativos não-iônicos polietoxilados, que possuem cadeias longas capazes de formar uma camada interfacial com propriedades estéricas suficientes para evitar aglomeração. Além disso, a adsorção de tensoativos estéricos diminui o potencial zeta devido ao deslocamento no plano de cisalhamento da partícula (BHATTACHARJEE, 2016; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2021; KOVACEVIC *et al.*, 2011), sendo então,

outro motivo para não considerar valores $\leq |30| \text{ mV}$ como insatisfatório para estabilidade. Ademais, também é possível ocorrer a estabilização por ambos os mecanismos (estérico e eletrostático) em paralelo. Nesses casos, mesmo com PZ abaixo de 30 mV (em módulo), as formulações podem ser estáveis por um longo tempo (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; KOVACEVIC *et al.*, 2011; SHAH *et al.*, 2022).

Durante o estudo de estabilidade preliminar de 45 dias desse trabalho, as variações mais pronunciadas foram observadas nos CLNs armazenados em temperatura ambiente, as quais podem estar relacionadas à temperatura de armazenamento ($\sim 30^\circ\text{C}$), que aumenta a energia cinética do sistema e a agitação das partículas, eleva o número de choques, superando a energia de repulsão e favorecendo agregação. Além disso, a alta rigidez do filme do tensoativo (microviscosidade) que evita a fusão das camadas dos filmes após o contato das partículas, também é impactada com o aumento da temperatura, levando à desestabilização (MASIIWA; GADAGA, 2018; SANDHU *et al.*, 2021; ZHANG; KIRSCH, 2004). Nessas condições, com a barreira estérica prejudicada, a diminuição do PZ pode favorecer mais a aglomeração das nanopartículas, levando à detecção de um aumento maior do diâmetro médio e do PDI desses carreadores em comparação aos carreadores em temperaturas de refrigeração, onde as partículas se movimentam menos e a barreira do tensoativo está preservada. Por isso, evidenciou-se que tanto o CLNb quanto o CLN4 armazenados sob refrigeração apresentaram menores variações nos parâmetros avaliados, sendo considerados mais estáveis até o tempo do estudo. Outras pesquisas mostraram resultados semelhantes da influência da temperatura das condições de armazenamento na estabilidade das nanopartículas (AKHOOND ZARDINI *et al.*, 2018; BANERJEE *et al.*, 2018; GAO; MCCLEMENTS, 2016; KOROLEVA *et al.*, 2022; LBALL; BAJAJ; WHITEHEAD, 2017; MANCINI *et al.*, 2015). Freitas & Muller (1998) ainda demonstraram que em condições de maior temperatura, nanopartículas apresentaram mais instabilidade e aumento de tamanho com um $\text{PZ} \leq 15 \text{ mV}$.

Ainda assim, embora tenha apresentado variações mais significativas, os CLNs armazenados em temperatura ambiente também permanecem estáveis perante os valores apresentados, os quais continuam dentro dos limites de aceitação. Importante mencionar que, mesmo com o PZ abaixo de $|30| \text{ mV}$, todas as formulações têm mantido boas características de estabilidade, o que pode ser explicado devido ao uso do tensoativo Alkest, um tensoativo não iônico de cadeia longa e polietoxilado, que assim como outros da mesma classe, possuem ótimas propriedades de formação de barreira estérica na superfície de nanopartículas (KOVACEVIC *et*

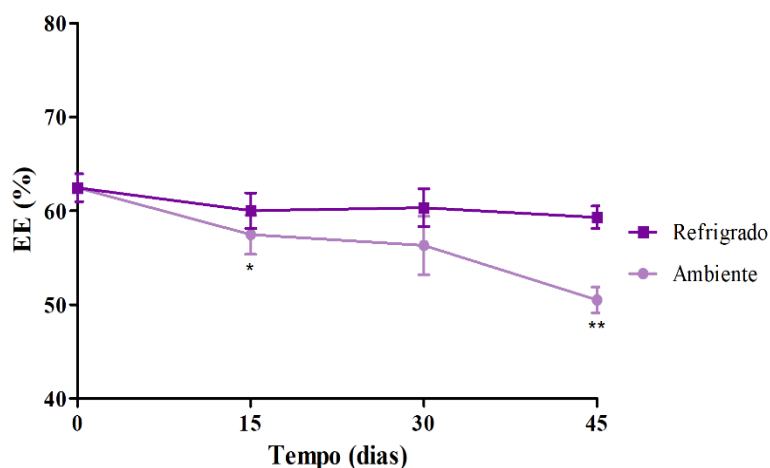
al., 2011; LUAN *et al.*, 2015; SHAH, 2014). Dessa forma, os carreadores puderam ser estabilizados pelo efeito eletrostático e o impedimento estérico juntos. Ademais, uma avaliação completa ao final do ensaio de estabilidade no 90° será essencial para avaliar melhor o comportamento dessas mudanças nas dispersões dos carreadores, confirmando ou refutando o processo de instabilidade.

As caracterizações das propriedades nanotecnológicas não podem ser os únicos parâmetros determinante para avaliação da estabilidade de nanocarreadores, uma vez que relacionam-se, predominantemente, com instabilidade física. Também são necessários outros parâmetros complementares para avaliação da estabilidade química, para em conjunto fornecem uma avaliação mais conclusiva sobre a estabilidade do sistema (MURAMATSU *et al.*, 2022). Um exemplo é o pH, cuja avaliação nas dispersões pode trazer boa contribuição quanto a estabilidade química dos carreadores, principalmente quando se trata de formulações lipídicas, onde as alterações no valor do pH podem significar oxidação ou hidrólise dos lipídeos, gerando ácido graxos livres que diminuem o pH das dispersões (KHANUM; THEVANAYAGAM, 2017; LBALL; BAJAJ; WHITEHEAD, 2017; LI *et al.*, 2013). Tais variações de pH, além de impactar na estabilidade físico-química do sistema, também podem impactar os IFAs, causando problemas de solubilidade e degradação.

Durante os 45 dias de avaliação de estabilidade, as medidas de pH dos CLNs variaram pouco, sendo significativas apenas para as formulações armazenadas em temperatura ambiente. Para o nanocarreador sem o fármaco (CLNb), o pH iniciou o estudo com $5,93 \pm 0,32$ e finalizou com $5,61 \pm 0,12$ quando armazenado em temperatura ambiente, com variações significativas no dia 15 e 30, enquanto a amostra mantida refrigerada manteve o pH sem variações significativas. Já as nanopartículas contendo o fármaco (CLN4), o pH no primeiro e no último dia mudou de $5,23 \pm 0,11$ para $5,22 \pm 0,02$ na amostra refrigerada e para $4,92 \pm 0,04$ na amostra em temperatura ambiente, sendo nessa última significativa a mudança no 15° dia. Os valores completos podem ser observados no Apêndice F. As variações de pH observadas nos CLNs desse estudo foram consideradas irrelevantes, visto que houve manutenção de valores próximos, sem indicação de degradação dos lipídeos até o dia avaliado. Ainda, a faixa de pH das amostras não causa nenhum prejuízo às propriedades físico-químicas do fármaco, visto que o AM possui pH dentro dessa faixa avaliada nos nanocarreadores. Inclusive, tais valores de pH apresentados pelas formulações também são compatíveis com sua administração por via oral.

Por fim, outro parâmetro importante para ser avaliado durante o armazenamento é a eficiência de encapsulamento, visto que está diretamente ligada com a farmacocinética dos sistemas. Como já mencionado, fenômenos de expulsão de IFAs da matriz das nanopartículas podem ocorrer devido ao rearranjo dos lipídeos para conformações mais estáveis, que são mais cristalinas, e acabam “empurrando” o fármaco, diminuindo o encapsulamento (GALVÃO *et al.*, 2016; MEHNERT; MÄDER, 2012; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). Por isso, a eficiência de encapsulamento deve ser avaliada também como um parâmetro de estabilidade dos nanocarreadores, visto que diferentes condições de armazenamento podem influenciar nessa propriedade. A Figura 24 mostra a variação da EE dos CLNs armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração ao longo dos 45 dias de estabilidade, cujos valores detalhados podem ser consultados no Apêndice F.

Figura 24 - Gráfico das variações de eficiência de encapsulamento (EE) do CLN4 armazenados em diferentes condições de temperatura



Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

As variações observadas no CLN4 mantido refrigerado apresentou uma variação não significativa da EE de $62,46 \pm 1,48\%$ para $59,32 \pm 1,19\%$ ao final do estudo, enquanto o CLN4 armazenado em temperatura ambiente apresentou uma diminuição para $50,51 \pm 1,38\%$, com variações significativas ao longo do estudo. A diferença da EE entre as amostras foi significativa no 45º dia ($p < 0,01$). Sendo assim, mais uma vez foi demonstrado a interferência da temperatura durante o tempo de armazenamento nas características do nanocarreador. No caso da eficiência de

encapsulamento, alguns pesquisadores mostraram essa influência de forma mais evidente quando a nanopartícula é submetida à temperaturas mais altas, como em um ensaio de estabilidade acelerada, em que fica mais claro a diminuição da EE em função da temperatura (HOSSEINI *et al.*, 2019; MURTHY *et al.*, 2020; RAVI *et al.*, 2014; SOLEIMANIFARD *et al.*, 2020). É sugerido que a diminuição do encapsulamento está relacionada com alterações na organização da matriz lipídica, cujas mudanças são favorecidas com aumento de temperatura, facilitando a conversão para formas polimórficas mais cristalinas do lipídio que contribuem para a expulsão dos IFAs da matriz (GALVÃO *et al.*, 2016; PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011; ZHENG *et al.*, 2013). Isso acontece não só em temperaturas de estresse térmico, mas também em diferentes temperaturas de armazenamento (2° - 30°C) testadas nas pesquisas, onde temperaturas mais baixas favorecem a manutenção da EE (BANERJEE *et al.*, 2018; CHOKSHI; KHATRI; PATEL, 2018; KALAM *et al.*, 2013; MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019; MURTHY *et al.*, 2020; OSANLOU *et al.*, 2022; RAVI *et al.*, 2014). Inclusive, uma pesquisa comprovou, através de espalhamento de raios X de alto ângulo (WASX) e por DSC, o aumento da cristalinidade de CLNs armazenados a 25°C (temperatura ambiente) por dois meses e a diminuição da EE devido rearranjo polimórfico do lipídeo (KASONGO; MLLER; WALKER, 2012).

Outro fator que pode influenciar a EE ao longo do tempo de armazenamento em temperaturas maiores é a mudança no filme de tensoativos na superfície das nanopartículas. Como já mencionado, mudanças na temperatura também alteram as propriedades dos tensoativos, os quais diminuem a rigidez da sua camada de proteção, o que pode favorecer a difusão do fármaco para fora da nanopartícula (FREITAS; MÜLLER, 1998; KOVACEVIC *et al.*, 2011). No caso de CLN contendo fármacos hidrossolúveis, esse processo de difusão é facilitado devido à maior afinidade pela fase aquosa da dispersão. Nesse contexto, estudos com CLNs contendo IFAs hidrofílicos têm mostrado melhor manutenção do encapsulamento do fármaco em temperaturas de refrigeração (BANERJEE *et al.*, 2018; KAMBOJ; VERMA, 2018; KASONGO; MLLER; WALKER, 2012; KHEZRI *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2018), assim como nesse estudo. Portanto, foi mostrado que as variações da EE do AM no CLN4 armazenado em refrigeração não foram significativas até o momento avaliado, indicando que as alterações estruturais que a temperatura pode causar nos carreadores não foram pronunciadas nessa temperatura de armazenamento.

Em suma, considerando todos os parâmetros avaliados nesse ensaio de estabilidade de armazenamento, foi possível demonstrar que a melhor condição de armazenamento do CLN4 é sob

refrigeração, cujas temperaturas são mantidas em aproximadamente 4°C. Nesta condição, foi possível manter a formulação com diâmetro, PdI, PZ, pH e EE estáveis até o momento de ensaio, garantindo a qualidade da formulação. Considerando que a estabilidade de armazenamento a longo prazo de nanocarreadores é uma propriedade crítica para aplicações médicas, cuja homogeneidade das propriedades físico-químicas está diretamente relacionada com eficácia e segurança, os resultados obtidos aqui sugerem o CLN4 como uma formulação promissora até o momento. Além disso, vale a pena destacar que a manutenção do tamanho do nanocarreador foi importante, dado que já foi demonstrado que esse parâmetro interfere na permeabilidade intestinal, que é fator importante da absorção oral do fármaco. Ademais, a liofilização dos CLNs é outra alternativa a ser estudada futuramente.

5.5 ESTABILIDADE EM pH GASTROINTESTINAL SIMULADO

Para nanocarreadores serem absorvidos e alcançar a corrente sanguínea, é necessário que os mesmos permaneçam íntegros após ser administrado por via oral, para garantir que o IFA seja protegido até o momento da permeação intestinal. Nesse caminho, ocorrem variações de pH no trato gastrointestinal (TGI), que vão de muito ácido no estômago (~1,2) à menos ácido no intestino delgado (~6,8). Como essas variações de pH podem afetar a estrutura e estabilidade dos nanocarreadores, é importante uma avaliação de estabilidade nesses diferentes pH (SHI *et al.*, 2020). Nessa pesquisa, os CLNs foram testados quanto à sua estabilidade físico-química em meios simulando pH do trato gastrointestinal (TGI) para entender o comportamento coloidal dos carreadores nos fluídos por administração oral. Nas faixas de pH avaliadas, os resultados mostraram que todos os parâmetros sofreram variações, conforme dados relacionados na Tabela 7. O diâmetro médio sofreu mudanças significativas, mas sem impactos importantes, cujas variações foram de $41,13 \pm 0,21$ nm para $40,35 \pm 0,18$ nm ao final de 2h no tampão simulando pH estomacal, e para $55,71 \pm 0,48$ nm ao final de 4h em tampão simulando pH intestinal. Para o PdI, as diminuições dos valores são boas para os CLNs, embora não significativas, passando de $0,227 \pm 0,017$ para $0,093 \pm 0,007$ e $0,186 \pm 0,005$ no tampão pH 1,2 e 6,8 respectivamente. Já o potencial zeta apresentou diminuição importante, quase alcançando o ponto isoelétrico das cargas superficiais. A variação foi de $-27,90 \pm 1,30$ mV para $-0,156 \pm 2,741$ mV e $-1,08 \pm 0,354$ mV em tampão pH 1,2 e 6,8 respectivamente.

Tabela 7 - Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta do CLN4 após teste de estabilidade em condições de pH do TGI simulado

Meio	Tempo	Diâmetro (nm)	PdI	PZ (mV)
-	0	41,13 ± 0,21	0,227 ± 0,017	-27,90 ± 1,30
Tampão pH 1,2	15min	51,73 ± 0,45 ^a	0,051 ± 0,013	-3,80 ± 2,45 ^b
	30min	51,76 ± 0,44 ^a	0,044 ± 0,015	-1,15 ± 1,13 ^b
	1h	49,97 ± 0,25 ^a	0,074 ± 0,018	-0,403 ± 0,41 ^b
	2h	40,35 ± 0,18	0,093 ± 0,007	-0,156 ± 2,74 ^b
Tampão pH 6,8	15min	55,91 ± 0,27 ^c	0,116 ± 0,014	-6,59 ± 1,04 ^d
	30min	51,89 ± 0,29 ^c	0,061 ± 0,008	-4,54 ± 0,39 ^d
	1h	41,37 ± 0,57	0,095 ± 0,028	-4,57 ± 0,72 ^d
	2h	52,40 ± 0,54 ^c	0,067 ± 0,019	-1,16 ± 0,89 ^d
	4h	55,71 ± 0,48 ^c	0,186 ± 0,005	-1,08 ± 0,35 ^d

Legenda: letras sobrescritas iguais na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao tempo zero.

As variações observadas podem estar relacionadas aos íons presentes nos tampões nos diferentes valores de pH estudados. O tamanho, PdI e PZ das nanopartículas podem ser afetados por diferentes valores pH ou na presença de eletrólitos, visto que tais condições alteram as cargas na superfície das partículas (CHOI; ADITYA; KO, 2014; HONARY; ZAHIR, 2013; SHI *et al.*, 2020). Nesse sentido, as medições de potencial zeta nessas condições de flutuação de pH e eletrólitos no meio são interessantes pois fornecem uma análise do estado da carga superficial das nanopartículas, e os dados obtidos podem ser usados para prever a estabilidade das dispersões perante o impedimento eletrostático (MANAIA *et al.*, 2017; RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020). É de conhecimento que PZ acima de $|30|$ mV é indicado como valor ótimo para produzir estabilidade eletrostática das nanopartículas, enquanto valores menores que $|20|$ mV indicam condições menos estáveis, que podem favorecer agregação, caso não exista impedimento estérico (BHATTACHARJEE, 2016; HONARY; ZAHIR, 2013; KAMBLE *et al.*, 2022). Portanto, de acordo com as características do meio em que foi realizado o ensaio, podem ocorrer alterações

na magnitude e na carga do potencial zeta do nanocarreador, o que pode ocasionar aglomeração das partículas, aumento de tamanho e polidispersão, a depender do tipo de tensoativo utilizado.

Nesse ensaio, o potencial zeta foi reduzido para próximo ao ponto isoelétrico ao final do ensaio, que é bem abaixo do necessário para uma estabilização eletrostática mínima (KAMBLE *et al.*, 2022; SHAH *et al.*, 2022). Entretanto, como os tamanhos foram mantidos muito próximos e o PDI teve uma variação positiva, é possível inferir que houve uma estabilização estérica fornecida pelo surfactante utilizado. O Alk30 é um tensoativo não iônico, e como tal, possui grupamentos que podem adquirir carga negativa na interface quando em solução, devido à predominância do íon OH^- em relação ao H^+ (CHOI; ADITYA; KO, 2014; ORTIZ *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2014). Nos tampões utilizados, existe uma grande quantidade de íons K^+ , os quais neutralizam essas cargas do tensoativo, comprimindo a bicamada elétrica e levando o potencial zeta à próximo de zero, o que poderia permitir a agregação das nanopartículas e aumento de PDI. Entretanto, o Alk30 tem uma molécula grande e polietoxilada, que confere bom impedimento estérico na superfície da nanopartícula, sendo o suficiente para evitar a agregação na ausência do impedimento eletrostático. Tal fenômeno já foi relatado em pesquisas com outros tensoativos da classe, que obtiveram resultados semelhantes (MATHUR *et al.*, 2019; SHAH *et al.*, 2022; SHI *et al.*, 2016; SOLEIMANIAN *et al.*, 2019).

As pequenas alterações no tamanho do CLN4 observadas podem ser atribuídas às variações na dupla camada elétrica da superfície das nanopartículas devido à presença dos eletrólitos nos diferentes tampões utilizados, os quais interferem na medida do diâmetro hidrodinâmico que é feito na avaliação de tamanho no DLS, causando pequenas variações. Ainda assim, foram consideradas variações irrelevantes para a estabilidade do sistema. O PDI também foi impactado pela presença dos eletrólitos, porém positivamente, cuja redução dos valores para $< 0,100$ em pH 1,2 indicam monodispersão e para $< 0,200$ em pH 6,8 indicam mínima polidispersão de tamanhos (DANAEI *et al.*, 2018; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2021), como pode ser verificado nos gráficos das Figuras 30 e 31 no Apêndice G. Como discutido acima, a redução das cargas superficiais da nanopartícula, evidenciada pela redução do PZ, diminuiu a repulsão eletrostática, sobrando apenas o impedimento estérico proporcionado pela molécula do tensoativo. Como o PDI diminuiu, sugere-se que a repulsão estérica foi suficiente para evitar a agregação das partículas, isso refletiu em uma distribuição de tamanhos mais homogênea e, conseqüentemente, um PDI melhor. Antes, quando a repulsão era influenciada por forças eletrostáticas, variações podiam

ocorrer de acordo com as flutuações das cargas superficiais, fornecendo maior ou menor repulsão eletrostática, que influencia na agregação das partículas, conferindo um PdI menos homogêneo.

Além disso, as variações da carga de superfície dos CLNs também podem contribuir para as interações do nanocarreador ao longo do trato gastrointestinal, uma vez que é o principal fator que influencia na adsorção inicial das nanopartículas na membrana celular (carregada negativamente) e, após adsorção, o tamanho da nanopartícula passa a regular a taxa de captação endocítica (CARVALHO *et al.*, 2018; RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020). Portanto, o tamanho e o potencial zeta são fatores importantes para a absorção oral das nanopartículas e liberação de fármacos. Sendo assim, os resultados obtidos neste ensaio demonstram a estabilidade do nanocarreador nas condições avaliadas, bem como mostraram que em condições de pH mais ácido e na presença de íons positivos, como os simulados aqui, o CLN4 adquire uma carga levemente neutra, sugerindo a possibilidade de ter um contato mais próximo com a mucosa do TGI e, talvez, favorecer a permeabilidade. Além disso, a manutenção dos tamanhos abaixo de 60nm, também propicia a absorção. Estudos de permeabilidade *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar essa hipótese.

5.6 LIOFILIZAÇÃO DOS CLNs

Almejando aumentar estabilidade e viabilizar a obtenção de formas farmacêuticas sólidas orais, os CLNs passaram pelo processo de secagem por liofilização. Como o efeito de estabilização promovido pelos crioprotetores é influenciado pelo tipo e concentração, foi comparado o efeito protetor de quatro açúcares em diferentes concentrações na formulação final (Ball, 2017). Em avaliação prévia realizada, foi detectado que a liofilização sem crioprotetor não confere secagem eficiente das amostras, permanecendo um aspecto pegajoso, similar à um creme. Sendo assim, uma série de crioprotetores foram testados em diferentes concentrações objetivando a obtenção de uma líofilos em pó e que as características originais dos CLNs fossem mantidas. Inicialmente, foi realizada uma triagem onde foram testados como crioprotetores o manitol, lactose, maltodextrina e trealose, todos em solução, em concentrações que alcançassem as proporções finais de 30%, 60%, 100%, 125%, 185% em relação à quantidade de lipídeo (m/m), sendo adicionados na proporção de 1:2 ou 1:5 (v/v) aos CLNs. Além disso, as amostras foram congeladas à -80 °C em ultrafreezer por 12h.

Os resultados mostraram que as nanopartículas aumentaram significativamente de tamanho após a liofilização, com diferentes resultados de acordo com a quantidade de crioprotetor usada. Nenhum dos liófilos preparados com crioprotetores em concentrações inferiores à 60% secaram adequadamente, apresentando o mesmo aspecto pegajoso dos liófilos sem crioprotetor. Todos os liófilos que foram preparados com crioprotetores acima de 60% e na proporção 1:2, após a redispersão, não mantiveram o tamanho e PDI originais dos CLNs, apresentando tamanhos acima de 250 nm (5x maior) e/ou PDI > 0,300. Já os liófilos preparados com crioprotetores acima de 60% e adicionados na proporção 1:5 (v/v) nos CLNs apresentaram resultados divergentes: as amostras contendo $\geq 60\%$ e $<100\%$ de crioprotetor também apresentaram tamanhos e PDI elevados, enquanto as amostras com crioprotetor $\geq 100\%$ apresentaram precipitados de partículas, inviabilizando a avaliação das nanopartículas. Dentre todas as amostras, as que usaram trealose mostraram os resultados mais próximos as características das nanopartículas em dispersão antes da liofilização.

Com o resultado da triagem, foi selecionado o melhor crioprotetor para seguir na avaliação da influência do processo de congelamento nas propriedades das nanopartículas liofilizadas após redispersão. Assim, foi testado o congelamento rápido por nitrogênio líquido nas amostras usando trealose. Nesse novo teste de liofilização, os CLNs foram adicionados de solução trealose em concentrações que alcançassem as proporções finais entre 50% e 70% da proporção de lipídio (m/m), cujos resultados estão dispostos na Tabela 8 abaixo. Como é possível observar, apenas as nanopartículas preparadas com crioprotetor nas concentrações de 50 e 60% apresentaram manutenção das características iniciais das nanopartículas após a redispersão dos liófilos. Como a amostra contendo 60% apresentou aspecto mais pulverulento, este foi selecionado com o liófilos de escolha para dar seguimento ao estudo de estabilidade. Portanto, o liófilo escolhido apresentou diâmetro médio de 53,99 nm, PDI 0,266 e PZ -25,0.

Tabela 8 - Características dos CLNs liofilizados com trealose em diferentes proporções

Características	CLN em dispersão	CLNs liofilizados		
		T50%	T60%	T70%
Diâmetro médio (nm)	50,96 ± 0,555	52,55 ± 0,226	53,99 ± 0,530	241,60 ± 13,43
PdI	0,277 ± 0,008	0,333 ± 0,012	0,266 ± 0,047	0,249 ± 0,095
PZ	-25,0 ± 0,231	-25,5 ± 0,252	-25,7 ± 0,666	-27,8 ± 0,924

Legenda: T50%: 50% de trealose; T60%: 60% de trealose; T70%: 70% de trealose.

Esses resultados dos testes de liofilização são similares com algumas pesquisas reportados na literatura e opostos ao de outras, visto que não existe uma convergência dos processos de liofilização, dado que existe uma diversidade de parâmetros que podem ser variados, desde aqueles relacionados à formulação como aqueles relacionados ao método (LUO, W.-C. *et al.*, 2021). Sabe-se que uma concentração insuficiente de crioprotetor pode ocasionar um revestimento incompleto da matriz vítrea ao redor das nanopartículas, favorecendo agregação e promovendo uma secagem inadequada (DOKTOROVOVA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2021). Sendo assim, é necessário sempre realizar avaliação do tipo e quantidade de crioprotetor para diferentes tipos de nanopartículas. Nesse estudo, diante dos vários parâmetros testados, a trealose foi o crioprotetor mais eficaz em manter o tamanho e PdI originais dos CLNs, o que pode estar relacionado ao fato do mesmo apresentar uma baixa mobilidade molecular após a secagem e formar uma matriz amorfa e vítrea (GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Em relação às nanopartículas lipídicas, no que tange o método de congelamento, alguns estudos encontraram melhores resultados de liofilização com congelamento rápido por nitrogênio (HORN; SCHANDA; FRIESS, 2018; ZHAO *et al.*, 2020), justificado pela formação de cristais de gelo menores que causam menos danos às nanopartículas e melhorar o efeito crioprotetor, enquanto outros o congelamento mais lento foi melhor (HOWARD *et al.*, 2012). Existe ainda a possibilidade de cada tipo de crioprotetor atuar melhor em diferentes condições de temperatura (ROUCO *et al.*, 2021).

Quanto aos crioprotetores, em alguns estudos as nanopartículas lipídicas tiveram melhor resultados com menores concentrações de crioprotetor (ALIHOSSEINI *et al.*, 2015; OHSHIMA *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2022), sendo mais eficaz em manter as características de tamanho e PdI após a redispersão do líofilo, visto que quantidades muito elevadas de crioprotetor podem causar

precipitação dos mesmos e comprometer a distribuição de tamanhos das nanopartículas. Em outros, a eficácia do crioprotetor foi proporcional à sua concentração, usando pelo menos 20% (AMIS *et al.*, 2020; LBALL; BAJAJ; WHITEHEAD, 2016). Além disso, o manitol e a trealose são os crioprotetores mais amplamente empregados nos estudos (LBALL; BAJAJ; WHITEHEAD, 2016; ROUCO *et al.*, 2021; TRENKENSCHUH; FRIESS, 2021).

5.6.1 Estabilidade dos CLNs liofilizados

Um ensaio de estabilidade das nanopartículas liofilizadas está em realização, sendo mostrados aqui os resultados preliminares. A liofilização ocorreu baseado no melhor resultado dos ensaios, cujas condições empregaram o uso de trealose como crioprotetor, usando uma solução na concentração final de 60% em relação à quantidade de lipídio e adicionado na proporção 1:5 (v/v) nos CLNs. Dessa forma, o CLN4 e o CLNb foram submetidos a liofilização e armazenados em temperatura ambiente durante o ensaio, onde em determinado intervalo de tempos as amostras foram redispersas e avaliadas quanto ao tamanho das nanopartículas, PdI, potencial zeta. Os resultados são mostrados na Tabela 9. É possível observar que houve baixa variação nos parâmetros até o dia avaliado.

Tabela 9 - Características físico-químicas dos liófilos ao longo do tempo de armazenamento

Amostras	Parâmetros	PP	15D	30D
CLNb	Diâmetro médio (nm)	49,21 ± 0,175	49,20 ± 0,461	54,64 ± 0,770 ^b
	PdI	0,287 ± 0,039	0,285 ± 0,019	0,312 ± 0,020
	PZ	-25,6 ± 0,231	-20,8 ± 0,755 ^a	-12,9 ± 0,451 ^a
CLN4	Diâmetro médio (nm)	53,99 ± 0,530	57,70 ± 2,224 ^c	56,30 ± 0,425
	PdI	0,266 ± 0,047	0,269 ± 0,009	0,264 ± 0,004
	PZ	-25,7 ± 0,666	-28,1 ± 1,01	-14,7 ± 0,681 ^d

Legenda: PP = pós-preparo; PZ = potencial zeta. Letras sobrescritas iguais na mesma linha representam diferença significativa quando comparado ao PP (p<0,001).

Como já foi mencionado, as nanopartículas quando em dispersão possuem facilidade de movimentação e pode favorecer o choque entre elas, aumentando a chance de agregação e

instabilidade. Logo, a secagem favorece a estabilidade físico-química e também microbiológica, visto que diminui a viabilidade de proliferação de micro-organismos (LUO, W. C. *et al.*, 2021). Quando se trata de CLNs, devido sua composição lipídica, a secagem por liofilização é uma vantagem visto que não emprega temperatura elevadas que poderiam levar à fusão dos lipídios e consequente destruição das partículas (AMEKYEYEH; BILLA, 2021). No caso específico desse estudo, há também a vantagem adicional da preservação do fármaco, pois o AM apresenta faixa de fusão em aproximadamente 100°C. Portanto, o processo de secagem dos CLNs por liofilização foi o mais adequado para preservação do sistema, assim como os parâmetros empregados proporcionou um liófilo que mantém as propriedades físico-químicas das nanopartículas. Assim, foi possível obter um produto com melhor estabilidade e que permite a obtenção de formas sólidas de uso oral.

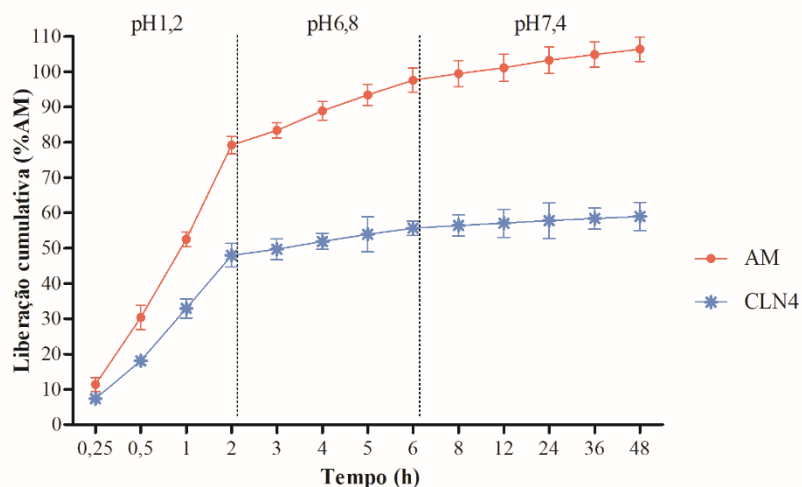
5.7 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Carreadores lipídicos nanoestruturados são reconhecidos por apresentarem uma cinética de liberação mais lenta e sustentada ao longo do tempo, em comparação com formas farmacêuticas convencionais. Entre os principais fatores que podem influenciar o perfil de liberação de fármacos incorporados nesses sistemas são composição e estrutura da matriz do nanocarreador, tamanho da partícula, a quantidade e distribuição do fármaco, a temperatura do ensaio e meio receptor, sendo as características do sistema as mais importantes (DELMAS *et al.*, 2012; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Nessa pesquisa, um ensaio de liberação *in vitro* foi realizado visando avaliar o comportamento de liberação do fármaco pelo nanocarreador em função do tempo. Como é uma técnica que ajuda a prever o comportamento do sistema *in vivo*, é importante que avaliações de liberação *in vitro* do fármaco a partir de um sistema de entrega sejam realizadas em condições que mimetizem situações *in vivo*.

Ao ser administrado por via oral, o nanocarreador passa por variações de pH no TGI, que vão de muito ácido no estômago (~1,2) à fracamente ácido no intestino delgado, até ser absorvido e atingir o pH levemente básico na corrente sanguínea (7,4). Por isso, nesse estudo, o ensaio de liberação do AM em solução comparado ao AM no CLN4 foi realizado em meios com diferentes meios para mimetizar as condições de variação de pH ocorridas no TGI, simulando uma

administração oral. O gráfico de liberação cumulativa do AM obtido no ensaio de liberação a partir da solução e do CLN4 em dispersão está exibido na Figura 25.

Figura 25 – Liberação *in vitro* do AM em solução e no CLN4 em dispersão no decorrer de 48h



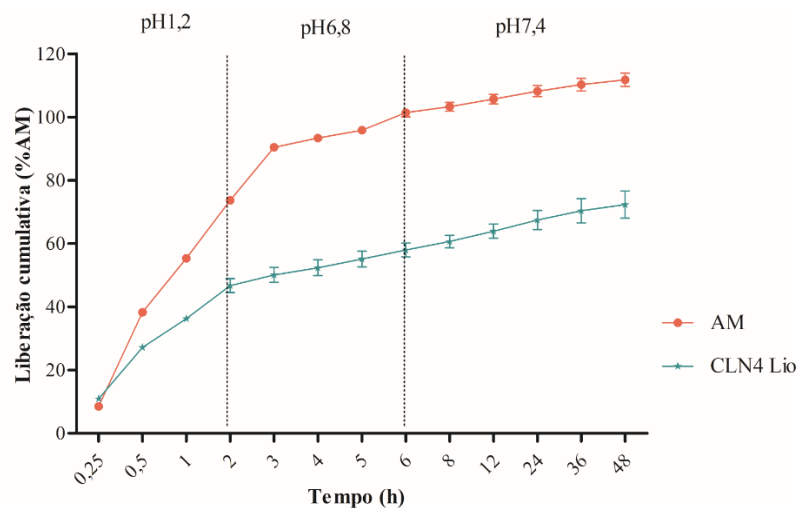
Legenda: AM = antimoniato de meglumina. $p < 0,001$ na comparação das amostras em cada ponto, exceto 0,25h ($p > 0,05$).

Conforme os resultados apresentados no gráfico, existe uma grande diferença entre a liberação do fármaco do CLN4 e da solução ($p < 0,001$), exceto no primeiro ponto de coleta, aos 15 minutos (0,25h). Durante o estágio simulando a passagem pelo estômago (pH 1,2), ocorreu uma liberação rápida (efeito *burst*), onde ao final de 2h nesse meio, a quantidade de AM liberada pela solução foi de 79,18%, enquanto a quantidade liberada pelo CLN4 foi de 47,98%. Essa fase inicial de liberação em grande quantidade já era esperada para a solução do AM, visto que o fármaco se encontra livre para atravessar a bolsa de diálise por difusão em direção à solução tampão que constitui o meio de liberação, no qual o AM possui alta solubilidade. No caso do CLN4, essa liberação inicial pode ser atribuída ao AM não encapsulado no nanocarreador, que está livre em solução, ou ao que está adsorvido na superfície, interagindo fracamente com o tensoativo, os quais são facilmente difundidos para o meio. Essa afirmação pode ser melhor fundamentada ao comparar a EE do fármaco no CLN4 (62,46%) com a quantidade liberada no efeito *burst*, onde os 47,98% liberado podem corresponder aos 37,54% do fármaco não encapsulado, mais 10,44% de fármaco adsorvido superficialmente.

Posteriormente, na etapa simulando a passagem intestinal, houve uma liberação mais lenta e sustentada de AM do nanocarreador, evidenciada através da formação de um platô, onde apenas 7,65% de fármaco foi doseado durante as 4h de duração no meio pH 6,8, alcançando um total de liberação de 55,63%. em contraste, a solução liberou 18,41% de AM nesse intervalo, alcançando um total de 97,59%. Por fim, na última etapa do ensaio, a qual simulava o pH sanguíneo (7,4), o CLN4 manteve a liberação sustentada, finalizando o ensaio com 58,99% de fármaco liberado em 48h, enquanto a solução atingiu 100% em 12h. Esse resultado demonstra que a incorporação do AM no CLN4 possibilita um perfil de liberação prolongado, de pelo menos 48h. Além disso, ao considerar que 62,46% do fármaco está encapsulado, e que ao longo de todo o ensaio foi liberado 58,99% de AM do nanocarreador, percebe-se que apenas 21,45% do fármaco liberado até o final do ensaio foi oriundo do encapsulamento, demonstrando que a matriz lipídica do CLN foi capaz de reter o fármaco de forma eficaz durante um longo tempo nas condições estudadas. Isso é importante pois sugere que grande quantidade de fármaco poderia entrar no processo de permeação intestinal e absorção sistêmica ainda veiculado no nanocarreador, conferindo melhor desempenho e manutenção de concentrações plasmáticas de forma prolongada.

Um segundo ensaio, após o processo de liofilização dos sistemas, foi realizado o ensaio de liberação do CLN a partir do liófilo, o qual seguiu as mesmas condições e parâmetros da liberação anterior. A Figura 26 mostra o gráfico de liberação cumulativa do AM a partir da solução e do CLN4 liofilizado.

Figura 26 - Liberação *in vitro* do AM em solução e no CLN4 liofilizado no decorrer de 48h



Legenda: AM = antimoniato de meglumina. $p < 0,001$ na comparação das amostras em cada ponto, exceto 0,25h ($p > 0,05$).

Através do gráfico pode-se perceber que o CLN4 liofilizado mostrou um comportamento semelhante ao CLN4 em dispersão, embora o carreador liofilizado tem alcançado uma liberação de quantidade maiores do AM ao longo do estudo. Também existiu uma diferença significativa entre a liberação do fármaco do liófilo e da solução ($p < 0,001$), exceto no primeiro tempo de coleta, aos 15 minutos (0,25h). Durante o estágio em meio gástrico simulado (pH 1,2), houve efeito *burst*, onde ao final de 2h a quantidade de AM liberada pela solução foi de 73,74%, enquanto a quantidade liberada pelo CLN4 foi de 46,72%. Resultado já era esperado e converge com a liberação do ensaio anterior. A liberação inicial do AM a partir do CLN4 liofilizado está relacionado ao fármaco não encapsulado no nanocarreador e adsorvido na superfície. Como ainda não foi possível realizar o doseamento do liófilo pra saber a EE após o processo de liofilização, e tomando como partida a EE 59,32% da dispersão antes de liofilizar e que o processo não leva à perdas significativas, pode-se sugerir que os 46,72% do AM liberado nas primeiras 2h esteja relacionado, possivelmente, com os 40,68% do fármaco não encapsulado e 6,04% de fármaco adsorvido na superfície.

Na etapa em meio intestinal simulado, houve uma liberação mais lenta e sustentada de AM do liófilo, onde é possível visualizar um platô, sendo liberado apenas 11,29% de fármaco durante as 4h de duração no meio pH 6,8, alcançando um total de 58,01% de AM liberado, em contraste com a solução que liberou 27,26% de AM nesse intervalo, alcançando 100% de liberação do fármaco ao final de 6h. Já na última etapa do ensaio, em pH sanguíneo simulado (7,4), o CLN4 liofilizado não manteve a liberação sustentada apresentada pelo CLN em dispersão, finalizando o ensaio com 72,4% de fármaco liberado em 48h. Esse resultado pode se relacionar à presença do crioprotetor presente no liófilo que, ao se localizar na superfície e interface das nanopartículas, facilita a difusão do fármaco da matriz da nanopartícula para o meio, visto que o crioprotetor possui característica hidrofílica (Amekyeh, 2021). Ainda assim, a liofilização anda manteve um perfil de liberação prolongado, de pelo menos 48h.

Nanopartículas quando entram na circulação sanguínea são rapidamente fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, tais como o macrófago, e levadas para o fígado e baço para serem metabolizadas (SCIOLI MONTOTO; MURACA; RUIZ, 2020). Isso ainda é mais acentuado quando se trata de tamanhos de partículas $< 100\text{nm}$. Além disso, quando se refere à

nanopartículas lipídicas, existe grande possibilidade de absorção linfática, onde também ocorre direcionamento para o baço (BANERJEE *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016). Considerando a fisiopatologia da leishmaniose, cuja forma infectante do parasita está presente nos macrófagos do hospedeiro, e que a disseminação da doença nas formas mais graves ocorre principalmente para o fígado e baço (BATES, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018), é possível supor que a absorção de fármacos contidos em nanocarreadores para o combate à leishmaniose é uma boa alternativa terapêutica. Nesse contexto, nanopartículas que possuem maior quantidade de fármaco encapsulado, quando alcançarem o intestino para permeação e absorção sistêmica, poderão ter melhor eficácia, pois estariam no local de ação com concentrações elevadas de fármaco. Portanto, o resultado do ensaio de liberação gastrointestinal simulado sugere que cerca de 52% do AM estaria encapsulado nos CLN4, tanto em dispersão quanto no líofilo, quando alcançasse o meio intestinal para ser absorvido, o que o torna um potencial sistema de entrega de fármaco oral com finalidade leishmanicida. Claro, essa é apenas uma extrapolação de raciocínio para os resultados encontrados *in vitro*, baseado em conhecimentos reportados na literatura, sendo necessários testes adicionais para validá-la.

A liberação de fármacos a partir de nanocarreadores tem diferentes mecanismos a depender do tipo de sistema (matricial ou reservatório), bem como da composição. Entre os principais, pode-se citar difusão, erosão, relaxamento ou dissolução. É relatado que no caso de sistemas lipídicos do tipo matricial, tais como os CLNs, o processo de liberação do fármaco é governado principalmente por um processo de difusão, lixiviação/erosão da matriz, sendo esse último dependente da molhabilidade (DELMAS *et al.*, 2012; MIRCIOIU *et al.*, 2019; SIEPMANN; SIEPMANN, 2011). Inclusive, para CLN com fármacos hidrofílicos a molhabilidade é ainda mais importante, visto que esta facilita a entrada do meio de liberação na nanopartícula para favorecer a difusão do fármaco, sendo a mesma incrementada com tensoativos hidrofílicos. Porém, o fato é que não pode-se prever um determinado comportamento de liberação devido à complexidade do sistema, que é susceptível à transformações polimórficas e mudanças na microestrutura da matriz (SIEPMANN; SIEPMANN, 2011).

Então, para avaliar o perfil de liberação do AM a partir dos nanocarreadores, se houve modulação da liberação e se a liofilização alterou o perfil de liberação, foram testados vários modelos cinéticos para determinar qual corresponde ao perfil apresentado pelos CLNs e pela solução, explicando o mecanismo de transporte do AM em ambos. Entre todos os modelos testados

pelo software (ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Peppas-Sahlim, Hixson-Crowell), o que apresentou melhor ajuste para ambos os CLN4 foi o Peppas-Sahlim, enquanto o melhor ajuste para a solução foi primeira ordem, visto que apresentaram o maior valor de R^2_{ajustado} para cada amostra. A escolha do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}) para determinar o modelo de melhor ajuste se deve ao fato que o coeficiente de determinação (R^2) é usado para comparar modelos com números iguais de parâmetros, enquanto o R^2_{ajustado} usado para comparar modelos com diferentes números de parâmetros, como é o caso desse estudo (BRUSCHI, 2015; HEREDIA *et al.*, 2022). O fato de os nanocarreadores e a solução se ajustarem à diferentes modelos cinéticos (destacados de cinza) indica que o sistema foi capaz de modificar a cinética de liberação do fármaco. Além disso, como ambos os CLN4 apresentaram ajuste ao mesmo modelo cinético, significa que a liofilização não foi capaz de afetar o mecanismo de liberação, embora a quantidade de fármaco liberado tenha sido maior ao final do ensaio (Amekyeh, 2021).

Tabela 10 - Avaliação dos modelos cinéticos aplicados à liberação de AM no em solução e no CLN4

Modelo	AM solução		CLN4 dispersão		CLN4 liofilizado	
	R^2	R^2_{ajustado}	R^2	R^2_{ajustado}	R^2	R^2_{ajustado}
Ordem zero	-2,6497	-2,6497	-3,8247	-3,8247	-2,4750	-2,4750
Primeira ordem	0,9837	0,9837	-2,1713	-2,1713	-0,6600	-0,6600
Higuchi	-0,3112	-0,3112	-0,8900	-0,8900	-0,0326	-0,0326
Korsmeyer–Peppas	0,6878	0,6595	0,6009	0,5647	0,9669	0,7801
Peppas-Sahlin	0,9033	0,8839	0,8483	0,8180	0,9492	0,9391
Hixson-Crowell	-1,3398	-1,3398	-2,5973	-2,5973	-1,0302	-1,0304

A solução de AM apresentou melhor ajuste ao modelo de primeira ordem, denotando a ocorrência do mecanismo de transporte por difusão Fickiana, a qual ocorre por um gradiente concentração entre o meio doador e receptor, tendendo a atingir um equilíbrio, característica de uma difusão normal (BAISHYA, 2017; SILVA *et al.*, 2012). Isso revela a significância da concentração do fármaco no controle da taxa de liberação do AM, visto que, na cinética de liberação de primeira ordem, a velocidade da liberação no meio depende da relação de quantidade liberada de fármaco e quantidade remanescente, de modo que a liberação vai diminuindo com o tempo. Esse é o modelo mais relacionado à liberações convencionais (AHMED *et al.*, 2019;

HEREDIA *et al.*, 2022). Nesse sentido, o modelo foi bastante adequado para descrever o mecanismo de transporte ocorrido na liberação do AM em solução, visto que não existe uma matriz que poderia influenciar no transporte do soluto para o meio, sendo dependente apenas da difusão do fármaco.

Já os CLN4 apresentaram melhor ajuste ao modelo Peppas-Sahlin, que explica que a liberação é governada, ao mesmo tempo, tanto por fenômenos de difusão do fármaco quanto por relaxamento da matriz do carreador. Nesse modelo, estes fenômenos são representados pelos valores de K_1 (difusão) e K_2 (relaxamento), os quais são usados para definir qual mecanismo de transporte prevalece na cinética de liberação. Além disso, o valor do expoente de difusão (m) pode direcionar o tipo de difusão (BRUSCHI, 2015; DASH *et al.*, 2010). Para o CLN4 em dispersão e para o líofilo, respectivamente, os valores de K_1 (34,81 e 33,41) foram maiores que K_2 (-4,48 e -3,68) no ensaio, denotando que o mecanismo de liberação do AM da matriz lipídica do nanocarreador é mais influenciado pelo processo de difusão do que relaxamento. Já os valores de $m > 0,43$ para ambos permitiu classificar como difusão do tipo anômala (não Fickiana), onde ambos processos ocorrem simultaneamente.

O relaxamento da matriz lipídica pode estar relacionado ao estresse da temperatura do ensaio, que gera alterações polimórficas, tornando-a mais flexível e permitindo a difusão do fármaco. Quanto à difusão, já foi mencionado que fármacos hidrossolúveis tem tendência em se difundir para fase aquosa externa por afinidade (KOVACEVIC *et al.*, 2011). Portanto, o ajuste ao modelo Peppas-Sahlin com predominância de transporte por difusão ($K_1 > K_2$) mostrou-se bastante adequado para descrever o mecanismo da cinética de liberação do AM no CLN4. Alguns estudos também apresentaram o modelo Peppas-Sahlin como o mais adequado para os carreadores lipídicos desenvolvidos (IGNJATOVIĆ *et al.*, 2021; MARKOVA *et al.*, 2022). Em outros, o modelo Korsmeyer-Peppas (também explica o transporte por difusão e relaxamento) foi o mais adequado (KOTESHWARA *et al.*, 2017; ORTIZ *et al.*, 2021; PATEL; MUNDADA; SAWANT, 2019).

Como mencionado anteriormente, vários fatores podem influenciar no mecanismo de liberação do fármaco nos nanocarreadores. Logo, é importante salientar que não haverá um predomínio de comportamentos, devido variações de tantos parâmetros, nem também um modelo matemático válido para todos os sistemas. Ainda assim, os resultados dessa pesquisa são consoantes aos encontrados na literatura acerca do perfil de liberação de CLNs, que demonstram que esses carreadores possuem uma matriz capaz de impor resistência à erosão/relaxamento da

matriz, prevalecendo transporte por difusão (CHOKSHI; KHATRI; PATEL, 2018; KALAM *et al.*, 2013; LUAN *et al.*, 2015; MATHUR *et al.*, 2019). Inclusive, na pesquisa de Delmas e pesquisadores (2012) foi mostrado que uma maior proporção de lipídeo sólido confere perfis de liberação mais prolongado. O mesmo foi observado por Osanlou *et al.* (2022) ao comparar diferentes nanopartículas sólidas.

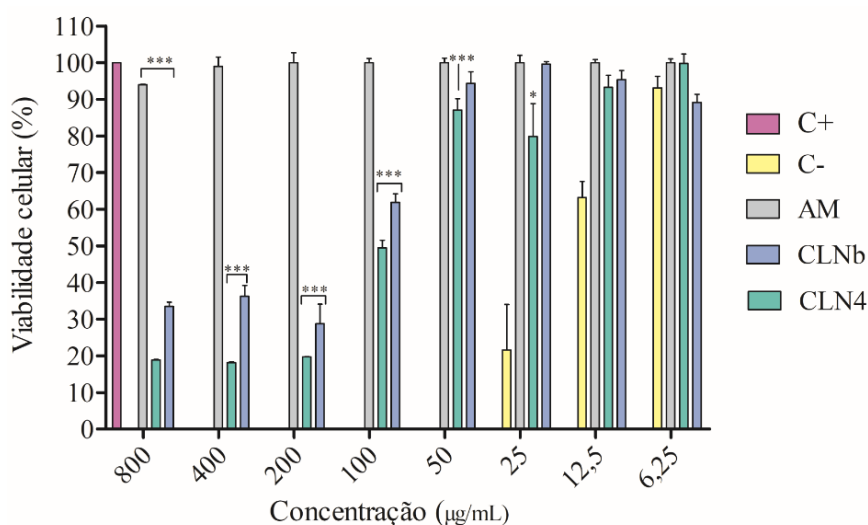
Por fim, comparada à cinética de liberação de primeira ordem apresentada pela solução, a qual dependente da concentração do fármaco, os nanocarreadores mostraram uma cinética de liberação combinada do relaxamento da matriz e difusão, evidenciando que os CLN4 obtidos foram capazes de modular a liberação do AM. Isso demonstra a importância da matriz no controle cinético da liberação, corroborando a baixa quantidade de AM liberada, do quantitativo encapsulado, ao longo de 48h de ensaio. Sendo assim, além das qualidades físico-químicas já comprovadas nos ensaios anteriores, foi possível mostrar que o CLN4 é um sistema de entrega de antimonio de meglumina com comportamento bifásico e liberação prolongada, que pode conferir concentrações plasmáticas dentro da janela terapêutica, melhor regime posológico e até melhor eficácia, cujo potencial deve ser aproveitado para avaliações adicionais de atividade leishmanicida e segurança toxicológica.

5.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO*

No desenvolvimento de novas formulações são necessários testes para avaliar sua biocompatibilidade e segurança. Somado a isso, o antimonio de meglumina é um fármaco que possui efeitos tóxicos, como já mencionado. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization - ISO), ensaios *in vitro* são os primeiros testes para se avaliar o quanto um material é ou não biocompatível (ISO, 2009). Por isso, um ensaio de citotoxicidade por meio de cultura celular foi realizado, visto que conseguem avaliar a viabilidade celular de diversos compostos com sucesso, devido a sua reprodutibilidade, rapidez, sensibilidade e custo acessível (KONG *et al.*, 2011; LABOUTA *et al.*, 2018). O teste foi realizado para avaliar a concentração citotóxica do AM frente aos macrófagos RAW 264.7, bem como comparar com as avaliações feitas com o carreador contendo o fármaco (CLN4) e o branco (CLNb), cujas concentrações avaliadas foram entre 6,125 µg/mL e 800 µg/mL.

Os resultados mostraram que a viabilidade dos macrófagos não foi alterada de maneira significativa quando estes foram expostos ao AM até 400 $\mu\text{g/mL}$, mantendo-se percentuais de viabilidade acima de 90% mesmo na maior concentração. Os carreadores apresentaram toxicidade acima da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, com CC_{50} de 99,3 $\mu\text{g/mL}$ para o CLNb e 94,2 $\mu\text{g/mL}$ para o CLN4. Embora apresentem alguma citotoxicidade, estas ainda foram bem inferior ao controle positivo realizado com a miltefosina, que foi citotóxica a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e apresentou CC_{50} de 19,2 $\mu\text{g/mL}$. A figura 27 mostra as variações de citotoxicidade dos compostos nas diferentes concentrações testadas.

Figura 27 - Gráfico de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 do AM e dos CLNs



Legenda: C+ = controle positivo; C- = controle negativo; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ quando comparados ao controle positivo. Fonte: Autoria própria.

De acordo com a ISO 10993-5, é determinado como citotóxico um produto que iniba o crescimento celular em mais de 30% (ISO, 2009). Sendo assim, os resultados mostraram que tanto o AM em solução não é citotóxico para os macrófagos até 800 $\mu\text{g/mL}$. Já as nanopartículas são consideradas citotóxicas em concentrações superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo o CLNb menos citotóxico. Tal toxicidade dos nanocarreadores pode estar relacionadas à concentração de tensoativo das amostras, visto que já é de conhecimento que alguns tensoativos não iônicos polietoxilados podem apresentar citotoxicidade em concentrações a partir de 0,02% (GRANT *et al.*, 1992). Já a citotoxicidade significativa mais elevada do CLN4 em relação ao CLNb

a partir de 50 µg/mL se correlaciona com a conhecida toxicidade do AM, que mesmo não tendo sido citotóxico quando testado em solução, ao sua veiculação em um nanocarreador pode ter facilitado sua interação e internalização com as células devido seu tamanho reduzido e alta área superficial, característica essa já conhecidas das nanopartículas (VILLANUEVA-FLORES *et al.*, 2020).

Comparados com outras pesquisas que estudaram os perfis de viabilidade celular de nanocarreadores contendo AM, que são poucas, os valores apresentados têm sido variados, cujos resultados foram relatados como concentrações que são citotóxicas para 50% das células (CC₅₀). Em macrófagos J774, a CC₅₀ variou entre 112,1 e 1125 µg/mL para o AM (ALBALAWI *et al.*, 2021; BARAZESH *et al.*, 2018; BORBOREMA *et al.*, 2016; TREIGER BORBOREMA *et al.*, 2011), e quando encapsulado em diferentes nanocarreadores surgem valores CC₅₀ de 148,1 µg/mL para nanopartículas de albumina (BARAZESH *et al.*, 2018), 396,3 µg/mL com nanopartículas de cobre associadas ao AM (ALBALAWI *et al.*, 2021) e >1000 µg/mL em lipossoma (BORBOREMA *et al.*, 2016).

5.9 ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO*

5.9.1 *Leishmania infantum*

A triagem exploratória de atividade leishmanicida *in vitro* de compostos em parasita dimórfico (promastigota e amastigota), o que significa que há uma infinidade de alvos moleculares potenciais que envolvem muitas variações em diversas vias metabólicas, bioquímicas e biológicas. Várias espécies de *Leishmania* são usadas experimentalmente *in vitro* para avaliação de atividade. Nesse estudo, os compostos foram testados frente às formas evolutivas amastigota (intracelular) e promastigota (extracelular) das espécies de *L. infantum*, visando avaliar a atividade leishmanicida frente à uma espécie de parasita causadora de leishmaniose visceral, sendo esta a de maior infecção na América Latina.

A Tabela 10 mostra os valores de IC₅₀ para cada amostra testada. Como é possível observar, o AM e o Glucantime não apresentaram atividade para nenhuma das formas da *L. infantum*, enquanto os CLNs apresentaram atividade apenas contra a forma promastigota. A Miltefosina, que foi utilizada como controle positivo, apresentou atividade para ambas as formas. O Glucantime,

medicamento usado no SUS que possui o AM como IFA, também foi testado para comparação dos resultados.

Buscando avaliar se as amostras são ativas contra o parasita causando poucos danos às células do hospedeiro, é utilizado o índice de seletividade, que é calculado pela razão entre CC_{50} nos macrófagos e IC_{50} nos parasitas. Quanto maior é o índice, mais seletivo é o composto para o parasita e, conseqüentemente, menor seu efeito tóxico sobre as células do hospedeiro. Não foi possível fazer o cálculo desse índice para o AM, visto que o mesmo não apresentou atividade. Mas no caso dos CLNs o índice de seletividade de ambos foi baixo ($<1,0$), o mostra que os mesmos não possuem seletividade para aquela forma do parasita. Tal resultado já era esperado, visto que houve citotoxicidade em concentrações próximas às que possuem atividade leishmanicida. Além disso, o AM já é conhecido por apresentar toxicidade.

Tabela 11 - Atividade leishmanicida das amostras frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de *L. infantum* expresso em IC_{50}

Amostras	Amastigotas (IC_{50} µg/mL)	Promastigotas (IC_{50} µg/mL)
AM	ND	>800
CLNb	ND	104,7 ± 3,3
CLN4	ND	96,9 ± 1,5
Glucantime	>800	>800
Miltefosina	1,5 ± 0,2	3,9 ± 1,8

Legenda: ND= não detectado. Fonte: Autoria própria.

Como é possível observar, os valores de IC_{50} dos CLNs são próximos entre si, o que pode estar relacionado à citotoxicidade do nanocarreador, sendo o CLN4 mais tóxico devido a presença do fármaco na nanopartículas, que teve sua atividade leishmanicida intensificada em relação ao AM livre, sendo este comportamento semelhante ao que ocorreu no ensaio de citotoxicidade em macrófagos. Entretanto, o antimonio de meglumina é o tratamento de primeira escolha para as leishmanioses e, portanto, a ausência de atividade no ensaio levantou a possibilidade de problemas com a matéria-prima do AM utilizada no estudo. Nesse ponto, foi utilizado o Glucantime, onde uma amostra diretamente retirada da ampola do medicamento foi testada no ensaio. Ainda assim, não houve atividade leishmanicida até a concentração mais alta estudada (800 µg/mL).

Ao tentar buscar explicação para a ausência de atividade do AM e do Glucantime, percebeu-se que pode estar relacionado com o método do ensaio, o qual usa cepas transgênicas dos parasitas, os quais foram transfectados para passarem a expressar beta-galactosidase. Trata-se de uma enzima que é utilizada no ensaio colorimétrico, a qual cliva o substrato produzindo uma coloração avermelhada, detectável por espectrofotometria, sendo sua presença condicionada à parasitas vivos no ensaio (SANTOS *et al.*, 2019). O teste foi validado pelo laboratório utilizando a Anfotericina B como fármaco modelo que possui atividade leishmanicida através do mecanismo de ação que envolve a interferência da precursor do ergosterol presente na membrana citoplasmática do parasita, levando sua ruptura. Já a miltefosina, usada no teste como controle positivo aqui nessa pesquisa, atua por inibição da síntese da membrana celular do parasito, por interrupção das vias de sinalização celulares na membrana, indução de apoptose ou por disfunção mitocondrial (LIMA, 2017; SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). Ambos os fármacos não dependem exclusivamente da interferência do metabolismo energético do parasita para ter ação. No caso do AM, alguns mecanismos são sugeridos, sendo eles envolvidos com a redução do Sb^{+5} em Sb^{+3} após a administração, onde o Sb^{+3} atuaria em enzimas do metabolismo celular, interferindo na bioenergética do parasita. Baseado nisso, foi levantada a hipótese de que os parasitas transgênicos podem ter sofrido alguma modificação que impossibilita a redução do antimônio pentavalente em trivalente, ou que não possua mais os substratos das enzimas onde o fármaco atuaria, ou até mesmo que tenha suprimido a sensibilidade dos parasitas ao fármaco.

Tais hipóteses foram sustentadas por alguns estudos que testaram a atividade leishmanicida do AM por método clássico com espécies não transgênicas comparado ao método que utiliza os parasitas transfectados para expressar constitutivamente a beta-galactosidase. Seus resultados mostraram que a Anfotericina B e a miltefosina apresentaram atividade em ambos os métodos, enquanto o glucantime só apresentou atividade no método que usou parasitas não transgênicos (CARVALHO *et al.*, 2015). Os pesquisadores mostraram que a transfecção provocou a resistência dos parasitos ao glucantime, 3 a 10 vezes acima da IC_{50} da cepa não transfectada. Somado a isso, outras pesquisas que usaram métodos tradicionais para testar atividade do AM contra cepas de *L. infantum* não transgênicas, mostraram atividade leishmanicida: IC_{50} de 60,28 $\mu\text{g/mL}$ para a solução de AM e 0,95 $\mu\text{g/mL}$ quando incorporado no lipossoma em amastigotas (BORBOREMA *et al.*, 2016); IC_{50} de 11,26 $\mu\text{g/mL}$ para a solução de AM e 8,30 $\mu\text{g/mL}$ incorporado em microesfera

contra promastigotas e 176 $\mu\text{g/mL}$ para a solução de AM e 31,95 $\mu\text{g/mL}$ na microesfera contra amastigota (PUJALS *et al.*, 2008).

5.9.2 *Leishmania amazonensis*

No Brasil, há sete espécies de leishmanias envolvidas na ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar, sendo a *L. amazonensis* uma das mais importantes e frequentes nas infecções (BRASIL, 2014). Nessa pesquisa, essa espécie foi escolhida para avaliar a atividade dos compostos contra uma espécie causadora de LC. Conforme é visto na tabela 11, nenhuma das amostras apresentaram atividade contra a forma promastigota, apenas o controle positivo feito com miltefosina. Já em relação à forma amastigota, o AM e o glucantime continuaram sem apresentar atividade, enquanto as nanopartículas foram ativas. Novamente, observou-se comportamento semelhante ao ensaio anterior, em que houve ausência de atividade leishmanicida pelo AM livre e os valores de IC_{50} dos CLNs são próximos entre si e o CLN4 foi mais tóxico devido a presença do fármaco nas nanopartículas.

Tabela 12 - Atividade leishmanicida das amostras frente as formas evolutivas amastigota e promastigota de *L. amazonensis* expresso em IC_{50}

Amostras	Amastigotas (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)	Promastigotas (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)
AM	>800	ND
CLNb	150,6 $\pm$ 38,4	>800
CLN4	115 $\pm$ 12,4	>800
Glucantime	>800	>800
Miltefosina	1,4 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 2,2

Legenda: ND= não detectado. Fonte: Autoria própria.

Alguns estudos demonstram a atividade do antimoniato de meglumina contra a espécie *L. amazonensis* feitos por métodos clássicos, sustentando a hipótese de o método que utiliza espécies transgênicas poder interferir na sensibilidade já conhecida ao fármaco. Zauli-Nascimento (2010) mostrou atividade do AM contra amastigotas, com IC_{50} que variou entre 112,2 $\mu\text{g/mL}$ e 146,0

µg/mL, enquanto Oliveira (2018) mostrou um IC₅₀ entre 4,43 e 7,41 µg/mL. Já na pesquisa de Carvalho e colaboradores (2015), o glucantime mostrou um IC₅₀ de 22,9 µg/mL em amastigotas. Considerando outras espécies além das estudadas aqui, pesquisas também relatam atividade do AM livre e nanoencapsulado. Nas formas amastigota foram relatados IC₅₀ de 26,6 µg/mL para o AM livre e 13,18 µg/mL quando encapsulado em nanopartícula de albumina (BARAZESH et al., 2018), 52,6 µg/mL para AM livre e 21,3 µg/mL na nanopartícula de cobre (ALBALAWI et al., 2021), 93 µg/mL do AM livre e <25 µg/mL do AM em lipossoma (BORBOREMA et al., 2011), e 9,68 µg/mL do AM em lipossoma (MOOSAVIAN; FALLAH; JAAFARI, 2019), todos avaliados na espécie *L. major*.

Baseado nos ensaios realizados em ambas as espécies de *Leishmania*, é possível ponderar a necessidade de realizar ensaios de atividade leishmanicida por outro método para confirmar ou refutar a hipótese de inadequabilidade desse ensaio para testar o antimoniato de meglumina e, consequentemente, a eficiência dos nanocarreadores produzidos. Ademais, ensaios *in vivo* podem ser necessários para comprovar a eficiência dos CLNs na entrega do fármaco de forma mais eficaz ao alvo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados é possível concluir que o planejamento experimental foi realizado com sucesso, visto que através dessa triagem foi possível desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados com características físico-químicas adequadas. O tamanho e sua distribuição homogênea, o potencial zeta e o pH mostraram-se adequados para nanocarreadores que visam administração oral. As demais técnicas de caracterização comprovaram a incorporação do fármaco na nanopartícula e confirmaram a obtenção de um CLN com matriz amorfizada que possibilitou bom encapsulamento do antimoníato de meglumina e permitirá menor extravasamento do fármaco ao longo do período de armazenamento. Inclusive, essa matriz foi capaz de manter bons níveis de fármaco encapsulado ao longo do tempo, assim como manteve os demais parâmetros avaliados também estáveis em armazenamento sob refrigeração por pelos 45 dias de ensaio. Além disso, a liofilização também mostrou estabilidade preliminar dos CLNs, sem grande alteração das características físico-químicas.

Em condições de pH simulando o trato gastrointestinal foi possível observar a manutenção das características e estabilidade do carreador, o que pode permitir chegar ao local de absorção com integridade preservada. Além disso, tanto o CLN em dispersão quanto o liofilizado proporcionou uma liberação prolongada do antimoníato de meglumina em ensaio simulando administração oral, com duração de pelo menos 48h, em contraste à solução que apresentou liberação entre 4 e 6h. O ensaio de viabilidade celular permitiu conhecer concentrações citotóxicas do fármaco e das nanopartículas em macrófagos, assim como a avaliação da atividade anti-leishmania forneceu um perfil de atividade que foi diferente para as espécies estudadas, e não correspondeu ao perfil de atividade leishmanicida do AM, alertando quanto ao método de avaliação utilizado. Portanto, pode-se inferir que os CLNs produzidos possuem potencial como um sistema de entrega oral de liberação prolongada de fármaco leishmanicida, os quais precisam passar por ensaios de farmacocinética *in vivo* para comprovar a possibilidade de melhoria de permeabilidade intestinal e absorção oral. Ademais, cuja obtenção do CLN liofilizado viabiliza a obtenção de formas farmacêuticas orais sólidas.

7 **PERSPECTIVAS**

- Finalização do ensaio de estabilidade de armazenamento dos CLNs até 90 dias de acompanhamento;
- Finalizar as caracterizações do CLN liofilizado;
- Realização de microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) dos CLNs obtidos;
- Realização de ensaios de toxicidade aguda *in vivo* em camundongos;
- Realização de ensaio de farmacocinética *in vivo* em ratos para avaliação de biodisponibilidade relativa;
- Obter formas farmacêuticas sólidas orais;

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGEED, Heidi Mohamed *et al.* Nanoparticles in nanomedicine: a comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1942275>, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 414–436, 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652048.2021.1942275>. Acesso em: 26 maio 2022.
- ABU AMMAR, Aiman *et al.* Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 76–84, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-018-00603-0>. Acesso em: 26 maio 2022.
- AHMED, Lina *et al.* Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release. **International Journal of Latest Technology in Engineering**, [s. l.], v. VIII, 2019. Disponível em: www.ijltemas.in. Acesso em: 22 maio 2022.
- AKHOOND ZARDINI, Ali *et al.* Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 287, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5756214/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/). Acesso em: 17 maio 2022.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004349>. Acesso em: 31 jan. 2019.
- AKUFFO, Hannah *et al.* New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. e0006375, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29746470>. Acesso em: 31 jan. 2019.
- ALBALAWI, Aishah E. *et al.* Therapeutic Potential of Green Synthesized Copper Nanoparticles Alone or Combined with Meglumine Antimoniate (Glucantime®) in Cutaneous Leishmaniasis. **Nanomaterials** 2021, Vol. 11, Page 891, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 891, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/891/htm>. Acesso em: 25 maio 2022.
- ALFUTIMIE, Abdullatif *et al.* The Effect of monoglycerides on the crystallisation of triglyceride. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 494, p. 170–179, 2016.
- ALIHOSSEINI, Faezeh *et al.* Freeze-drying of ampicillin solid lipid nanoparticles using mannitol as cryoprotectant. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 797–802, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjps/a/cMJmhrhzHShGy5XvRgDhwMK/?lang=en>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- ALMEIDA, Gregório. **Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida in vitro e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea**. 2012. 81 f. -

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-8XKLUQ/1/disserta__ogreg.pdf. Acesso em: 21 nov. 2022.

ALMEIDA, De *et al.* Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis-a review. **Journal of biomedical nanotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 117–133, 2017. Disponível em: www.aspbs.com/jbn. Acesso em: 24 maio 2022.

ALVARENGA, Betânia Mara *et al.* Nanoparticle phosphate-based composites as vehicles for antimony delivery to macrophages: possible use in leishmaniasis. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 3, n. 48, p. 9250–9259, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/tb/c5tb00376h>. Acesso em: 14 maio 2022.

AMEKYEYEH, Hilda; BILLA, Nashiru. Lyophilized Drug-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Formulated with Beeswax and Theobroma Oil. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **908**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 908, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/908/htm>. Acesso em: 20 nov. 2022.

AMINU, Nafiu *et al.* Physicochemical compatibility studies of triclosan and flurbiprofen with excipients of pharmaceutical formulation using binary, ternary, and multi-combination approach. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences** **2021** **7:1**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-021-00302-7>. Acesso em: 13 maio 2022.

AMIS, Timothy M. *et al.* Selection of Cryoprotectant in Lyophilization of Progesterone-Loaded Stearic Acid Solid Lipid Nanoparticles. **Pharmaceutics** **2020**, Vol. **12**, Page **892**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 892, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/9/892/htm>. Acesso em: 21 nov. 2022.

ANDRADE, Luciana Nalone *et al.* Praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles: Production, physicochemical characterization, release profile, cytotoxicity and in vitro activity against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 58, p. 101784, 2020.

ANDREANA, Ilaria *et al.* Nanotechnological approaches for pentamidine delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], p. 1–17, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-022-01127-4>. Acesso em: 26 maio 2022.

ANSARI, Mohammad Javed *et al.* Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1039666>, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1972–1979, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10717544.2015.1039666>. Acesso em: 29 abr. 2022.

APOSTOLOU, Maria *et al.* The Effects of Solid and Liquid Lipids on the Physicochemical Properties of Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 8, p. 2859–2872, 2021. Disponível em: <http://jpharmsci.org/article/S0022354921002343/fulltext>. Acesso em: 10 maio 2022.

ARAGÃO HOROIWA, Thais *et al.* Sugar-based colloidal nanocarriers for topical meglumine antimoniate application to cutaneous leishmaniasis treatment: Ex vivo cutaneous retention and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 147, p. 105295, 2020.

ARSHAD, Shumaila *et al.* Compatibility analysis of bergapten with different pharmaceutical excipients used in nanostructured lipid carriers. **Pak. J. Pharm. Sci**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 2879–2885, 2019.

AWADEEN, Randa Hanie; BOUGHDADY, Mariza Fouad; MESHALI, Mahasen Mohamed. <p>Quality by Design Approach for Preparation of Zolmitriptan/Chitosan Nanostructured Lipid Carrier Particles – Formulation and Pharmacodynamic Assessment</p>. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 15, p. 8553–8568, 2020. Disponível em: <https://www.dovepress.com/quality-by-design-approach-for-preparation-of-zolmitriptanchitosan-nan-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 13 maio 2022.

AZEVEDO, Cláudia *et al.* Engineered albumin-functionalized nanoparticles for improved FcRn binding enhance oral delivery of insulin. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 327, p. 161–173, 2020.

AZHAR SHEKOUFEH BAHARI, Leila; HAMISHEHKAR, Hamed. The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. **Advanced pharmaceutical bulletin**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 143–151, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27478775>. Acesso em: 1 maio 2022.

BAIG, Mirza Salman *et al.* Application of Box–Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 85, p. 258–270, 2016.

BAISHYA, Himankar. Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. **Journal of Developing Drugs**, [s. l.], v. 06, n. 02, 2017.

BAN, Choongjin *et al.* Enhancing the stability of lipid nanoparticle systems by sonication during the cooling step and controlling the liquid oil content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 47, p. 11557–11567, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf503489v>. Acesso em: 18 maio 2022.

BANERJEE, Subham *et al.* Comparative study of oral lipid nanoparticle formulations (LNFs) for chemical stabilization of antitubercular drugs: physicochemical and cellular evaluation. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], p. 1–19, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2018.1431648>. Acesso em: 19 ago. 2018.

BANERJEE, Amrita *et al.* Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, [s. l.], v. 238, p. 176–185, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27480450/>. Acesso em: 1 maio 2022.

BARAZESH, Afshin *et al.* Preparation of meglumine antimonate loaded albumin nanoparticles and evaluation of its anti-leishmanial activity: an in vitro assay. **Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 416–422, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30166789/>. Acesso em: 14 maio 2022.

BATES, Paul A. **Revising Leishmania's life cycle**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.

BECKER PERES, Luana *et al.* Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 140, p. 317–323, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez10.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0927776515303829>. Acesso em: 30 set. 2018.

BEG, Sarwar *et al.* Application of Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Product and Process Optimization. In: BEG, Sarwar; HASNAIN, Saquib (org.). **Pharmaceutical Quality by Design: Principles and Applications**. [S. l.]: Academic Press, 2019. p. 43–64.

BEHBAHANI, Elham Sadati *et al.* Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 38, p. 271–280, 2017.

BENIVAL, Derajram M.; DEVARAJAN, Padma V. Lipomer of doxorubicin hydrochloride for enhanced oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 423, n. 2, p. 554–561, 2012.

BERTONI, Serena *et al.* Glutathione-Loaded Solid Lipid Microparticles as Innovative Delivery System for Oral Antioxidant Therapy. **Pharmaceutics** 2019, Vol. 11, Page 364, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 364, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/8/364/htm>. Acesso em: 29 abr. 2022.

BERTONI, Serena; PASSERINI, Nadia; ALBERTINI, Beatrice. Nanomaterials for oral drug administration. In: NANOTECHNOLOGY FOR ORAL DRUG DELIVERY. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 27–76.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 235, p. 337–351, 2016.

BOBO, Daniel *et al.* Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. **Pharmaceutical research**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 2373–2387, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27299311/>. Acesso em: 26 maio 2022.

BOCHICCHIO, Sabrina; LAMBERTI, Gaetano; BARBA, Anna Angela. Polymer–Lipid Pharmaceutical Nanocarriers: Innovations by New Formulations and Production Technologies. **Pharmaceutics** 2021, Vol. 13, Page 198, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 198, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/2/198/htm>. Acesso em: 25 maio 2022.

BORBOREMA, Samanta Etel Treiger *et al.* Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine

liposomes: physicochemical evaluation and antileishmanial activity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 196–203, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/VBxZwZhhfLvNSQZHFjFmSYt/?lang=en>. Acesso em: 24 maio 2022.

BORBOREMA, Samanta. **Desenvolvimento e farmacocinética de antimônio encapsulado em lipossomas de fosfatidilserina utilizando radioisótopos em leishmaniose visceral**. 2010. 168 f. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BORGES, Gabriel Silva Marques *et al.* Nanostructured lipid carriers as a novel tool to deliver sclareol: physicochemical characterisation and evaluation in human cancer cell lines. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 57, 2021. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjps/a/hrgfv38NNnJqvwqXtQVG9Dv/>. Acesso em: 25 abr. 2022.

BORUGADDA, Venu Babu; GOUD, Vaibhav V. Thermal, oxidative and low temperature properties of methyl esters prepared from oils of different fatty acids composition: A comparative study. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 577, p. 33–40, 2014.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6ed. ed. Brasília: [s. n.], 2019. v. 1 *E-book*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 3 fev. 2020.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014.

BROWN, Matthew A.; GOEL, Alok; ABBAS, Zareen. Effect of Electrolyte Concentration on the Stern Layer Thickness at a Charged Interface. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 55, n. 11, p. 3790–3794, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201512025>. Acesso em: 18 maio 2022.

BRUSCHI, Marcos Luciano (org.). Mathematical models of drug release. *In: Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. p. 63–86.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618312042>. Acesso em: 21 abr. 2020.

CALGAROTO, Selma. **AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA E DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO E DO PERFIL DE BIODEGRADAÇÃO E ECOTOXICIDADE NO MEIO AMBIENTE**. 2018. 64 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2018.

CAMPOS, Joana R. *et al.* Optimization of nimesulide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) by factorial design, release profile and cytotoxicity in human Colon adenocarcinoma cell line. **Pharmaceutical development and technology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 616–622, 2019. Disponível

em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30477410/>. Acesso em: 14 maio 2022.

CARVALHO, Patrícia M *et al.* Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. **Frontiers in chemistry**, [s. l.], v. 6, p. 237, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29988578>. Acesso em: 28 set. 2018.

CARVALHO, A S ; *et al.* Um Novo Processo para a Obtenção do Antimoniato de Meglumina, Visando a Produção do Medicamento Genérico A New Process for Obtaining Meglumine Antimoniate Aiming at the Production of Generic Drug. **Rev. Virtual Quim**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 684–696, 2015. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>. Acesso em: 21 nov. 2022.

CASA, D. M. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 192, p. 12–18, 2018.

CAVALCANTI, S.M.T. *et al.* Optimization of nanostructured lipid carriers for Zidovudine delivery using a microwave-assisted production method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 122, p. 22–30, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez10.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0928098718302732?via%3Dihub>. Acesso em: 30 set. 2018.

CAVENDISH, Mariana *et al.* Study of pre-formulation and development of solid lipid nanoparticles containing perillyl alcohol. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 767–774, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-019-09080-0>. Acesso em: 14 abr. 2022.

CHADHA, Renu; BHANDARI, Swati. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 87, p. 82–97, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez10.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0731708513002665?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2018.

CHAUDHARI, Manisha B. *et al.* Solid lipid nanoparticles of amphotericin B (AmbiOnp): in vitro and in vivo assessment towards safe and effective oral treatment module. **Drug delivery and translational research**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 354–364, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26712123/>. Acesso em: 26 maio 2022.

CHEN, Yougan *et al.* Anti prostate cancer therapy: Aptamer-functionalized, curcumin and cabazitaxel co-delivered, tumor targeted lipid-polymer hybrid nanoparticles. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 127, n. 200, p. 110181, 2020.

CHOI, Kyeong Ok; ADITYA, N. P.; KO, Sanghoon. Effect of aqueous pH and electrolyte concentration on structure, stability and flow behavior of non-ionic surfactant based solid lipid nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 147, p. 239–244, 2014.

CHOKSHI, Nimitt V.; KHATRI, Hiren N.; PATEL, Mayur M. Formulation, optimization, and characterization of rifampicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of tuberculosis. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1506472>, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1975–1989, 2018.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2018.1506472>. Acesso em: 22 maio 2022.

CINCURÁ, Carolina *et al.* Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 761–766, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28722607/>. Acesso em: 3 nov. 2020.

COHEN, Anita; AZAS, Nadine. Challenges and Tools for In Vitro *Leishmania* Exploratory Screening in the Drug Development Process: An Updated Review. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34959563/>. Acesso em: 21 nov. 2022.

CORTIAL, Angèle *et al.* Hot homogenization process optimization for fragrance encapsulation in solid lipid nanoparticles. **Flavour and Fragrance Journal**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 467–477, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/ffj.3259>. Acesso em: 11 maio 2022.

COSCO, Donato *et al.* Meglumine Antimoniate-Loaded Aqueous-Core PLA Nanocapsules: Old Drug, New Formulation against *Leishmania*-Related Diseases. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 2100046, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez18.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/mabi.202100046>. Acesso em: 15 maio 2022.

CUNHA, Sara *et al.* Double Optimization of Rivastigmine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Nose-to-Brain Delivery Using the Quality by Design (QbD) Approach: Formulation Variables and Instrumental Parameters. **Pharmaceutics** 2020, Vol. 12, Page 599, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 599, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/7/599/htm>. Acesso em: 10 maio 2022.

D'SOUZA, Susan. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, [s. l.], v. 2014, p. 1–12, 2014.

DA SILVA, Roberta Claro *et al.* Microscopic approach of the crystallization of tripalmitin and tristearin by microscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 198, p. 1–9, 2016.

DĄBROWSKA, Marta; SOUTO, Eliana B.; NOWAK, Izabela. Lipid Nanoparticles Loaded with Iridoid Glycosides: Development and Optimization Using Experimental Factorial Design. **Molecules** 2021, Vol. 26, Page 3161, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 3161, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/11/3161/htm>. Acesso em: 11 maio 2022.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. [s. l.], v. 10, n. 2, p. 57, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/57/htm>. Acesso em: 1 maio 2022.

DANTAS, Isabella Lima *et al.* Influence of stearic acid and beeswax as solid lipid matrix of lipid nanoparticles containing tacrolimus. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 132, n. 3, p. 1557–1566, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-018-7072-7>. Acesso em: 16 abr. 2022.

DARA, Tahereh *et al.* Erythropoietin-loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, optimization, and in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 178, p. 307–316, 2019.

DAS, Surajit; CHAUDHURY, Anumita. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 62, 2011. Disponível em: /pmc/articles/PMC3066374/. Acesso em: 14 maio 2022.

DAS, Surajit; NG, Wai Kiong; TAN, Reginald B.H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22664358/>. Acesso em: 10 maio 2022.

DASH, Suvakanta *et al.* KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. **Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DATE, Abhijit A.; HANES, Justin; ENSIGN, Laura M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 240, p. 504–526, 2016.

DE MORAES FLORES, Érico Marlon *et al.* Determination of antimony(III) and total antimony by hydride generation atomic absorption spectrometry in samples of injectable drugs used for leishmaniasis treatment. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 819–823, 2002. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2002/ja/b203166c>. Acesso em: 11 abr. 2022.

DE MUYLDER, Geraldine *et al.* A Screen against Leishmania Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. e1253, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001253>. Acesso em: 21 nov. 2022.

DE SOUSA MARCIAL, Sara Pacelli; CARNEIRO, Guilherme; LEITE, Elaine A. Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-017-4042-0>. Acesso em: 14 abr. 2022.

DE SOUZA, Aline *et al.* Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez10.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0378517318304162?via%3Dihub>. Acesso em: 1 fev. 2019.

DELMAS, Thomas *et al.* Encapsulation and Release Behavior from Lipid Nanoparticles: Model Study with Nile Red Fluorophore. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 1, p. 16–25, 2012.

DEMICHELI, Cynthia *et al.* Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate.

Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 63–66, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10420575/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

DEPAQUIT, Jérôme; GAY, Frédérick; KALTENBACH, Matthieu L. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 393, n. 10174, p. 871–872, 2019. Disponível em: <http://ees.elsevier.com/thelancet/www.thelancet.com>. Acesso em: 3 nov. 2020.

DNDI. **Disease factsheet: Leishmaniasis**. Geneva: [s. n.], 2018. Disponível em: https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/12/Factsheet2018_Leishmaniasis.pdf. Acesso em: 2 fev. 2019.

DOKTOROVOVA, Slavomira *et al.* Trehalose is not a universal solution for solid lipid nanoparticles freeze-drying. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2013.840846>, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 922–929, 2013. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10837450.2013.840846>. Acesso em: 19 nov. 2022.

DONG, Wei *et al.* Chitosan based polymer-lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of enoxaparin. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 547, n. 1–2, p. 499–505, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez10.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0378517318303909?via%3Dihub>. Acesso em: 30 set. 2018.

DOUAIRE, M. *et al.* Fat crystallisation at oil–water interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 203, p. 1–10, 2014.

FABRINO, Henrique José Ferraz. **CARACTERIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA VISANDO UM TRATAMENTO EFICAZ E SEGURO DA LEISHMANIOSE**. 2021. 127 f. - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

FANGUEIRO, Joana F. *et al.* Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 100, p. 84–89, 2012.

FARJADIAN, Fatemeh *et al.* Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 93–126, 2019. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm-2018-0120>. Acesso em: 13 maio 2022.

FARKAS, Natalia; KRAMAR, John A. Dynamic light scattering distributions by any means. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-021-05220-6>. Acesso em: 14 maio 2022.

FERNANDES, Flaviana R *et al.* Amphiphilic Antimony(V) Complexes for Oral Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 9, p. 4229–4236, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796930>. Acesso em: 27 fev. 2019.

FERREIRA, Weverson Alves. **Complexos anfífilos de antimônio(V) e composições de fármacos à base antimônio com ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e potencial terapêutico**. 2010. 125 f. - Universidade Federal de Minas Gerais, [s. l.], 2010.

FERREIRA, Sergio L.C. *et al.* Strategies of sample preparation for speciation analysis of inorganic antimony using hydride generation atomic spectrometry. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 114, p. 22–31, 2014.

FONSECA-SANTOS, Bruno *et al.* Formulating SLN and NLC as innovative drug delivery systems for non-invasive routes of drug administration. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], 2019.

FREITAS-JUNIOR, Lucio H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 2, p. 11–19, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez16.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2211320712000048?via%3Dihub>. Acesso em: 31 jan. 2019.

FREITAS, Chrysantha; MÜLLER, Rainer H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.

FRÉZARD, Frédéric *et al.* Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revic-2012-0006/html>. Acesso em: 25 maio 2022.

FRÉZARD, Frédéric *et al.* Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ β -cyclodextrin nanoassemblies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 347, n. 1–2, p. 102–108, 2008.

FRÉZARD, F. *et al.* Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 841–846, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjmbra/a/zvZLRxLxBgqRHB4NMLL3qtN/?lang=en>. Acesso em: 14 maio 2022.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19633606/>. Acesso em: 30 maio 2022.

GALVÃO, Juliana G. *et al.* Effect of Ouratea sp. butter in the crystallinity of solid lipids used in nanostructured lipid carriers (NLCs). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 941–948, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-015-4890-8>. Acesso em: 14 abr. 2022.

GAO, Songran; MCCLEMENTS, David Julian. Formation and stability of solid lipid nanoparticles fabricated using phase inversion temperature method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 499, p. 79–87, 2016.

GHADIRI, Maryam *et al.* Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. **International journal of pharmaceutics**, [s. l.], v. 424, n. 1–2, p. 128–137, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22227603/>. Acesso em: 10 maio 2022.

GHANEM, Heba A. *et al.* Comprehensive Study of Atorvastatin Nanostructured Lipid Carriers through Multivariate Conceptualization and Optimization. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–24, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7911144/>. Acesso em: 10 maio 2022.

GHASEMIAN, Elham *et al.* Brain delivery of baclofen as a hydrophilic drug by nanolipid carriers: Characteristics and pharmacokinetics evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 37, p. 67–73, 2017.

GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug design, development and therapy**, [s. l.], v. 12, p. 25–40, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29317800>. Acesso em: 31 jan. 2019.

GOMES DA SILVA, Mayanny *et al.* Effect of stabilization and fatty acids chain length on the crystallization behavior of interesterified blends during storage. **Food Research International**, [s. l.], v. 157, p. 111208, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996922002654>. Acesso em: 14 maio 2022.

GON ALVES OLIVEIRA, Luiz Filipe *et al.* Antileishmanial Activity of 2-Methoxy-4H-spiro-[naphthalene-1,2'-oxiran]-4-one (Epoxy-methoxy-lawsonone): A Promising New Drug Candidate for Leishmaniasis Treatment. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 4, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6017818/>. Acesso em: 21 nov. 2022.

GORDILLO-GALEANO, Aldemar; MORA-HUERTAS, Claudia Elizabeth. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: Emphasizing some parameters for correct measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 620, p. 126610, 2021.

GORDILLO-GALEANO, Aldemar; MORA-HUERTAS, Claudia Elizabeth. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 133, p. 285–308, 2018.

GRANT, Roberta L. *et al.* Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. **Toxicology**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 153–176, 1992.

GUIMARÃES, Diana *et al.* Protective Effect of Saccharides on Freeze-Dried Liposomes Encapsulating Drugs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, p. 424, 2019.

HANDLER, Marc Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26568336/>. Acesso em: 3 nov. 2020.

HELGASON, Thrandur *et al.* Formation of transparent solid lipid nanoparticles by microfluidization: Influence of lipid physical state on appearance. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 448, p. 114–122, 2015.

HEREDIA, Nathaly S. *et al.* Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. e0264825, 2022. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0264825>. Acesso em: 22 maio 2022.

HNIK, Peter; WASAN, Ellen K.; WASANA, Kishor M. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of a Novel Oral Amphotericin B Formulation (iCo-019) following Single-Dose Administration to Healthy Human Subjects: an Alternative Approach to Parenteral Amphotericin B Administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 10, 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7508586/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3458586/). Acesso em: 30 maio 2022.

HOMAYUN, Bahman; LIN, Xueting; CHOI, Hyo Jick. Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2019. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6471246/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3458586/). Acesso em: 22 mar. 2021.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems-A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013. Disponível em: <http://www.tjpr.org>. Acesso em: 2 maio 2022.

HORN, Jacqueline; SCHANDA, Julia; FRIESS, Wolfgang. Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, [s. l.], v. 127, p. 342–354, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29522899/>. Acesso em: 21 nov. 2022.

HOSSEINI, Seyed Mostafa *et al.* Doxycycline-encapsulated solid lipid nanoparticles as promising tool against *Brucella melitensis* enclosed in macrophage: A pharmacodynamics study on J774A.1 cell line. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-019-0504-8>. Acesso em: 15 maio 2022.

HOUACINE, Chahinez; ADAMS, David; SINGH, Kamalinder K. Impact of liquid lipid on development and stability of trimyristin nanostructured lipid carriers for oral delivery of resveratrol. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 316, p. 113734, 2020.

HOWARD, Melissa D. *et al.* Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid-lipid nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1270–1279, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235767>. Acesso em: 30 set. 2018.

IBRAHIM, Waheed M.; ALOMRANI, Abdullah H.; YASSIN, Alaa Eldeen B. Novel sulpiride-

loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 129--144, 2014. Disponível em: <https://www.dovepress.com/novel-sulpiride-loaded-solid-lipid-nanoparticles-with-enhanced-intesti-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 18 maio 2022.

IGNJATOVIĆ, Jelisaveta *et al.* Development of solid lipid microparticles by melt-emulsification/spray-drying processes as carriers for pulmonary drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 156, p. 105588, 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. In: ISO 10993-5. BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES. 3th. ed. Geneva: [s. n.], 2009. p. 42. *E-book*. Disponível em: <http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2019.

JAAFARI, Mahmoud Reza *et al.* Development of a topical liposomal formulation of Amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 11, p. 156–165, 2019.

JAIN, Akhlesh K.; THAREJA, Suresh. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 524–539, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21691401.2018.1561457>. Acesso em: 28 maio 2022.

JAMSHAD, Humzah; DIN, Fakhar ud; KHAN, Gul Majid. Nanotechnology based solutions for anti-leishmanial impediments: a detailed insight. **Journal of Nanobiotechnology** 2021 19:1, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–51, 2021. Disponível em: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-021-00853-0>. Acesso em: 26 maio 2022.

JANSOOK, Phatsawee; FÜLÖP, Zoltán; RITTHIDEJ, Garmpimol C. Amphotericin B loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carrier (NLCs): physicochemical and solid-solution state characterizations. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569023>, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 560–567, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2019.1569023>. Acesso em: 28 abr. 2022.

JAVED, Shamama *et al.* Nanostructured lipid carrier system: A compendium of their formulation development approaches, optimization strategies by quality by design, and recent applications in drug delivery. **Nanotechnology Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1744–1777, 2022. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ntrev-2022-0109/html>. Acesso em: 14 maio 2022.

KALAM, Mohd Abul *et al.* Part I: Development and optimization of solid-lipid nanoparticles using Box–Behnken statistical design for ocular delivery of gatifloxacin. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [s. l.], v. 101A, n. 6, p. 1813–1827, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/jbm.a.34453>. Acesso em: 23 maio 2022.

KAMBLE, Shashikant *et al.* Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2022.

KAMBOJ, Vipin Kumar; VERMA, Prabhakar Kumar. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF METFORMIN LOADED STEARIC ACID COUPLED F127 NANOPARTICLES. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 212–217, 2018. Disponível em: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/26444>. Acesso em: 20 maio 2022.

KASONGO, Kasongo Wa; MLLER, Rainer H.; WALKER, Roderick B. The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 353–362, 2012.

KATO, Kelly C *et al.* Efficacy of Meglumine Antimoniate in a Low Polymerization State Orally Administered in a Murine Model of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. e00539-18, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29866873>. Acesso em: 8 jan. 2019.

KAUR, Kirandeep; KUMAR, Parveen; KUSH, Preeti. Amphotericin B loaded ethyl cellulose nanoparticles with magnified oral bioavailability for safe and effective treatment of fungal infection. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, [s. l.], v. 128, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32480227/>. Acesso em: 26 maio 2022.

KEDZIERSKI, LUKASZ; EVANS, KRYSTAL J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, [s. l.], v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075460>. Acesso em: 22 jun. 2019.

KELIDARI, H. R. *et al.* Development and Optimisation of Spironolactone Nanoparticles for Enhanced Dissolution Rates and Stability. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 1469–1474, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27834054/>. Acesso em: 10 maio 2022.

KHANUM, Ramona; THEVANAYAGAM, Haema. Lipid peroxidation: Its effects on the formulation and use of pharmaceutical emulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 401, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC7032086/>. Acesso em: 19 maio 2022.

KHEZRI, Khadijeh *et al.* An emerging technology in lipid research for targeting hydrophilic drugs to the skin in the treatment of hyperpigmentation disorders: kojic acid-solid lipid nanoparticles. **<https://doi-org.ez16.periodicos.capes.gov.br/10.1080/21691401.2020.1770271>**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 841–853, 2020. Disponível em: <https://www-tandfonline.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/21691401.2020.1770271>. Acesso em: 12 maio 2022.

KIPRIYE, Zeynep; ŞENEL, Behiye; YENILMEZ, Evrim. Preparation and evaluation of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for targeted drug delivery. **Tropical Journal of**

Pharmaceutical Research, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 2057–2068, 2017. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/161826>. Acesso em: 14 maio 2022.

KONG, Bokyung *et al.* Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine (London, England)**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 929, 2011. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3196306/](https://pubs.rsc.org/doi/10.1039/C1NM00006A). Acesso em: 24 maio 2022.

KOROLEVA, M. *et al.* Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 610, p. 61–69, 2022.

KOTESHWARA, KB *et al.* Solid lipid nanoparticles of irbesartan: preparation, characterization, optimization and pharmacokinetic studies. **J. Pharm. Sci**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 15012, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902017000115012>. Acesso em: 23 maio 2022.

KOVACEVIC, A. *et al.* Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 406, n. 1–2, p. 163–172, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311000081?via%3Dihub>. Acesso em: 18 ago. 2018.

KOVAČEVIĆ, Anđelka B.; MÜLLER, Rainer H.; KECK, Cornelia M. Formulation development of lipid nanoparticles: Improved lipid screening and development of tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 576, p. 118918, 2020.

KRISHNAM RAJU, Kovoru; SUDHAKAR, Beeravelli; MURTHY, Kolapalli Venkata Ramana. Factorial Design Studies and Biopharmaceutical Evaluation of Simvastatin Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improving the Oral Bioavailability. **ISRN Nanotechnology**, [s. l.], v. 2014, p. 1–8, 2014.

KUMAR, Raj; SINGH, Ashutosh; GARG, Neha. Acoustic Cavitation-Assisted Formulation of Solid Lipid Nanoparticles using Different Stabilizers. **ACS Omega**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 13360–13370, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.9b01532>. Acesso em: 1 maio 2022.

KUPETZ, Eva; BUNJES, Heike. Lipid nanoparticles: Drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 189, p. 54–64, 2014.

LABOUTA, Hagar I. *et al.* Understanding and improving assays for cytotoxicity of nanoparticles: what really matters?. **RSC Advances**, [s. l.], v. 8, n. 41, p. 23027–23039, 2018. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c8ra03849j>. Acesso em: 24 maio 2022.

LANZA, Juliane *et al.* Polarity-sensitive nanocarrier for oral delivery of Sb(V) and treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 11, p. 2305, 2016. Disponível em: <https://www.dovepress.com/polarity-sensitive-nanocarrier-for-oral-delivery-of-sbv-and-treatment-peer-reviewed-article-IJN>. Acesso em: 8 jan. 2019.

LBALL, Rebecca; BAJAJ, Palak; WHITEHEAD, Kathryn A. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. **International journal of nanomedicine**, [s. l.], v. 12, p. 305–315, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28115848/>. Acesso em: 21 nov. 2022.

LBALL, Rebecca; BAJAJ, Palak; WHITEHEAD, Kathryn A. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 12, p. 305, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5221800/>. Acesso em: 17 maio 2022.

LEISHMANIASIS. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 6 mar. 2022.

LI, Qianwen *et al.* A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials** 2017, Vol. 7, Page 122, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 122, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/7/6/122/htm>. Acesso em: 27 maio 2022.

LI, Hongyan *et al.* Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. **Journal of food science**, [s. l.], v. 78, n. 4, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527564/>. Acesso em: 17 maio 2022.

LI, Yang *et al.* Nano-based approaches in the development of antiviral agents and vaccines. **Life Sciences**, [s. l.], v. 265, p. 118761, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7658595/>. Acesso em: 17 jun. 2021.

LI, Huipeng *et al.* Size-exclusive effect of nanostructured lipid carriers on oral drug delivery. **International journal of pharmaceuticals**, [s. l.], v. 511, n. 1, p. 524–537, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27452421/>. Acesso em: 1 maio 2022.

LI, Qi; LI, Xiaosi; ZHAO, Chao. Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 437, 2020.

LIMA, Marta Lopes. **ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE FÁRMACOS EM LEISHMANIA: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA NÃO DIRIGIDA**. 2017. 196 f. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/99/99131/tde-13112017-090743/publico/MartaLLcorrigida.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2022.

LIMA, Eduardo Antonio de. **Métodos automáticos para a especiação de antimônio inorgânico em águas e determinação de antimônio total em sucos de uva por espectrometria de fluorescência atômica**. 2019. 104 f. - Universidade Federal da Paraíba, [s. l.], 2019.

LING TAN, Janet Sui; ROBERTS, Clive J.; BILLA, Nashiru. Mucoadhesive chitosan-coated nanostructured lipid carriers for oral delivery of amphotericin B. **Pharmaceutical development and technology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 504–512, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30132723/>. Acesso em: 25 maio 2022.

LIU, Dongfei *et al.* Formulation and characterization of hydrophilic drug diclofenac sodium-loaded solid lipid nanoparticles based on phospholipid complexes technology. **Journal of Liposome Research**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 17–26, 2014. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08982104.2013.826241>. Acesso em: 19 ago. 2018.

LIU, Chang *et al.* Strategies and industrial perspectives to improve oral absorption of biological macromolecules. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 223–233, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29111841/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

LIU, Jingying *et al.* The impact of particle preparation methods and polymorphic stability of lipid excipients on protein distribution in microparticles. <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1361967>, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 2032–2042, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2017.1361967>. Acesso em: 14 maio 2022.

LUAN, Jingjing *et al.* Nanostructured lipid carriers for oral delivery of baicalin: In vitro and in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 466, p. 154–159, 2015.

LUO, Xieqi *et al.* Effect of ultrasonic treatment on the stability and release of selenium-containing peptide TSeMMM-encapsulated nanoparticles in vitro and in vivo. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 83, p. 105923, 2022.

LUO, Wei Chung *et al.* Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, [s. l.], v. 169, p. 256–267, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34732383/>. Acesso em: 19 nov. 2022.

LUO, Wei-Chung *et al.* Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 169, p. 256–267, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641121002691>. Acesso em: 21 nov. 2022.

MADUREIRA, Ana Raquel *et al.* Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 29, p. 22665–22673, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c4ra15802d>. Acesso em: 30 maio 2022.

MAKONI, Pedzisai A.; KASONGO, Kasongo Wa; WALKER, Roderick B. Short Term Stability Testing of Efavirenz-Loaded Solid Lipid Nanoparticle (SLN) and Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Dispersions. **Pharmaceutics** 2019, Vol. 11, Page 397, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 397, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/8/397/htm>. Acesso em: 17 maio 2022.

MANAIA, Eloísa Berbel *et al.* Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 12, p. 4991–5011, 2017. Disponível em: <https://www.dovepress.com/physicochemical-characterization-of-drug-nanocarriers-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 13 maio 2022.

MANCINI, Guiliana *et al.* Lecithin and parabens play a crucial role in tripalmitin-based lipid nanoparticle stabilization throughout moist heat sterilization and freeze-drying. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 117, n. 12, p. 1947–1959, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez18.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/ejlt.201400431>. Acesso em: 17 maio 2022.

MANSFIELD, E. Recent advances in thermal analysis of nanoparticles: methods, models and kinetics. **Modeling, Characterization and Production of Nanomaterials: Electronics, Photonics and Energy Applications**, [s. l.], p. 167–178, 2015.

MARKOVA, Elena *et al.* Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer's disease treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1368–1390, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/jbm.b.35006>. Acesso em: 23 maio 2022.

MARQUES, Carine Santana Ferreira *et al.* Use of pharmaceutical nanotechnology for the treatment of leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 52, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/9nnCTfyfQ5pTjmQQLZRpXqc/?lang=pt>. Acesso em: 24 maio 2022.

MARTINS, Patricia Silveira. **Mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb a partir das composições de antimoniato de meglumina com ciclodextrina, visando o tratamento oral das leishmanioses**. 2007. 144 f. - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MARTINS, Patrícia S. *et al.* Mode of action of β -cyclodextrin as an absorption enhancer of the water-soluble drug meglumine antimoniate. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 325, n. 1–2, p. 39–47, 2006.

MARTINS, S. *et al.* Physicochemical properties of lipid nanoparticles: Effect of lipid and surfactant composition. <http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2010.545414>, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 815–824, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/03639045.2010.545414>. Acesso em: 1 maio 2022.

MASIIWA, Wadzanayi L.; GADAGA, Louis L. Intestinal Permeability of Artesunate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Using the Everted Gut Method. **Journal of Drug Delivery**, [s. l.], v. 2018, p. 1–9, 2018.

MATHUR, Prateek *et al.* Fabrication, optimization, and in vitro evaluation of docetaxel-loaded nanostructured lipid carriers for improved anticancer activity. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1614055>, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 182–196, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08982104.2019.1614055>. Acesso em: 22 maio 2022.

MATOS, FLÁVIO CARDOSO DE. **ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS GRAXOS ATRAVÉS DO USO DA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL**. 2017. 233 f. - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE

CAMPINAS, [s. l.], 2017.

MATOS, Flavio Cardoso. **Estudo da decomposição térmica de ácidos graxos através da calorimetria exploratória diferencial**. 2012. - UNICAMP, Campinas, 2012.

MEDLEY, Graham F. *et al.* Health-seeking behaviour, diagnostics and transmission dynamics in the control of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **Nature**, [s. l.], v. 528, n. 7580, p. S102–S108, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26633763/>. Acesso em: 3 nov. 2020.

MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, n. SUPPL., p. 83–101, 2012.

MIRCHANDANI, Yashika; PATRAVALE, Vandana B.; BRIJESH, S. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 335, p. 457–464, 2021.

MIRCIOIU, Constantin *et al.* Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6471682/>. Acesso em: 23 maio 2022.

MISCHEL, Simon André; HOFFMANN, Thorsten. Quantification of low molecular weight fatty acids in cave drip water and speleothems using HPLC-ESI-IT/MS-development and validation of a selective method. **Article in Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/260842323>. Acesso em: 8 maio 2022.

MISHRA, Dinesh K.; SHANDILYA, Ruchita; MISHRA, Pradyumna K. Lipid based nanocarriers: a translational perspective. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2023–2050, 2018.

MITCHELL, Michael J. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery** 20:2, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 101–124, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-020-0090-8>. Acesso em: 30 maio 2022.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, [s. l.], v. 146, n. 3, p. 232–246, 2019.

MOMENI, Arash *et al.* Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **http://dx-doi.ez16.periodicos.capes.gov.br/10.3109/08982104.2012.762519**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 134–144, 2013. Disponível em: <https://www-tandfonline.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.3109/08982104.2012.762519>. Acesso em: 26 maio 2022.

MOOSAVIAN, Seyedeh Alia; FALLAH, Maryam; JAAFARI, Mahmoud Reza. The activity of encapsulated meglumine antimoniate in stearylamine-bearing liposomes against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 200, p. 30–35, 2019.

MOOSAVIAN KALAT, S. A. *et al.* Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate

(Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 143, n. 1, p. 5–10, 2014.

MOREIRA, Vanessa Ribeiro *et al.* Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 6, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5444157/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27444157/). Acesso em: 30 maio 2022.

MOSTAFAVI, Mahshid *et al.* Niosomal formulation of amphotericin B alone and in combination with glucantime: In vitro and in vivo leishmanicidal effects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 116, p. 108942, 2019.

MOURDIKOUDIS, Stefanos; PALLARES, Roger M.; THANH, Nguyen T.K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, [s. l.], v. 10, n. 27, p. 12871–12934, 2018. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/nr/c8nr02278j>. Acesso em: 30 maio 2022.

MÜLLER, Rainer H. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC): The second generation of solid lipid nanoparticles. In: PERCUTANEOUS PENETRATION ENHANCERS CHEMICAL METHODS IN PENETRATION ENHANCEMENT: NANOCARRIERS. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 161–185.

MULLER, R. H.; SHEGOKAR, Ranjita; KECK, C. M. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 207–227, 2011.

MURAMATSU, Hiromi *et al.* Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1941–1951, 2022.

MURTHY, Aditya *et al.* Oral Bioavailability Enhancement of Raloxifene with Nanostructured Lipid Carriers. **Nanomaterials** 2020, Vol. 10, Page 1085, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1085, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/6/1085/htm>. Acesso em: 20 maio 2022.

MUSIELAK, Ewelina; FELICZAK-GUZIŁ, Agnieszka; NOWAK, Izabela. Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 2202, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/7/2202/htm>. Acesso em: 2 maio 2022.

NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin. **Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application**. [S. l.]: Tabriz University of Medical Sciences, 2015.

NAVAEI, Ali *et al.* Double-walled microspheres loaded with meglumine antimoniate: preparation, characterization and in vitro release study. **Drug development and industrial pharmacy**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 701–710, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23594302/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

NELIS, Veronique *et al.* Fat crystallization and melting in W/O/W double emulsions: Comparison

between bulk and emulsified state. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 566, p. 196–206, 2019.

NIMTRAKUL, Pataranapa *et al.* Copolymeric Micelles Overcome the Oral Delivery Challenges of Amphotericin B. **Pharmaceuticals** 2020, Vol. 13, Page 121, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 121, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/6/121/htm>. Acesso em: 26 maio 2022.

NIMTRAKUL, Pataranapa; TIYABOONCHAI, Waree; LAMLERTTHON, Supaporn. Amphotericin B Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Parenteral Delivery: Characterization, Antifungal and In vitro Toxicity Assessment. **Current drug delivery**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 645–653, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31362675/>. Acesso em: 26 maio 2022.

OHSHIMA, Hiroyuki *et al.* Freeze-dried nifedipine-lipid nanoparticles with long-term nano-dispersion stability after reconstitution. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 377, n. 1–2, p. 180–184, 2009.

OLIVEIRA, Jordana. **Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de Leishmania expressando luciferase**. 2014. 98 f. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-15122014-154829/publico/JordanaCristinaOliveira_mestrado.pdf. Acesso em: 21 nov. 2022.

ORTIZ, Andrea C. *et al.* Development of a nanostructured lipid carrier (NLC) by a low-energy method, comparison of release kinetics and molecular dynamics simulation. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 531, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/4/531/htm>. Acesso em: 14 maio 2022.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.

OSANLOU, Roya *et al.* Preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing zeaxanthin and evaluation of physicochemical properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 641, p. 128588, 2022.

PAHO. **Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas**. Washington: [s. n.], 2019.

PANDIAN, Sureshbabu Ram Kumar *et al.* Nano Based Approach for the Treatment of Neglected Tropical Diseases. **Frontiers in Nanotechnology**, [s. l.], v. 3, p. 49, 2021.

PANI, Nihar Ranjan *et al.* Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 219–226, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-011-1299-x>. Acesso em: 29 abr. 2022.

PARVEZ, Shabi *et al.* Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with Amphotericin B and Paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 12243, 2020. Disponível em:

www.nature.com/scientificreports. Acesso em: 14 jan. 2021.

PATEL, Mitali; MUNDADA, Veenu; SAWANT, Krutika. Enhanced intestinal absorption of asenapine maleate by fabricating solid lipid nanoparticles using TPGS: elucidation of transport mechanism, permeability across Caco-2 cell line and in vivo pharmacokinetic studies. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 144–153, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30669881/>. Acesso em: 23 maio 2022.

PATHAK, Kamla; KESHRI, Lav; SHAH, Mayank. Lipid nanocarriers: influence of lipids on product development and pharmacokinetics. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 357–393, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21967401/>. Acesso em: 1 maio 2022.

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology** **2018 16:1**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018. Disponível em: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0392-8>. Acesso em: 26 maio 2022.

PEREIRA, Eva Fabiana Silva. **LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA APLICAÇÃO DE PRODUTOS INOVADORES EM ONCOLOGIA**. 2015. 145 f. - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

PHAM, T. T.H.; LOISEAU, P. M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 454, n. 1, p. 539–552, 2013.

PICCICA, Matteo *et al.* Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 6, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/jtm/article/28/6/taab065/6246322>. Acesso em: 25 maio 2022.

PINELLI, Filippo *et al.* Is nanoparticle functionalization a versatile approach to meet the challenges of drug and gene delivery?. **Therapeutic Delivery**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 401–404, 2020. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/tde-2020-0030>. Acesso em: 22 mar. 2021.

PINTO, Fátima *et al.* Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with retinoids by central composite design. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 293, p. 111468, 2019.

PIRES, Felipe Q. *et al.* Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 137, p. 196–203, 2017.

POLITIS, Stavros N. *et al.* Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 889–901, 2017.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006052>. Acesso em: 2 fev. 2019.

PRADO, Livia D.; ROCHA, Helvécio Vinícius A. Solid state in the pharmaceutical industry: A brief review. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2080–2112, 2015.

PRAJAPATI, Jagruti B.; KATARIYA, Hitesh; PATEL, Ravish. Peyer's patch targeting of Isradipine loaded Solid Lipid Nanoparticles: It's cellular uptake study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 43, p. 318–326, 2018.

PUCEK-KACZMAREK, Agata. Influence of Process Design on the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles by an Ultrasonic-Nanoemulsification Method. **Processes** **2021**, Vol. 9, Page 1265, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1265, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/8/1265/htm>. Acesso em: 8 maio 2022.

PUJALS, G. *et al.* In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against Leishmania infantum. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 1243–1247, 2008.

RADWAN, Mahasen A. *et al.* Oral administration of amphotericin B nanoparticles: antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats. **Drug delivery**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 40–50, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28155565/>. Acesso em: 26 maio 2022.

RAMOS, Guilherme S. *et al.* Formulation of Amphotericin B in PEGylated Liposomes for Improved Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by Parenteral and Oral Routes. **Pharmaceutics** **2022**, Vol. 14, Page 989, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 989, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/5/989/htm>. Acesso em: 26 maio 2022.

RASMUSSEN, Martin K.; PEDERSEN, Jonas N.; MARIE, Rodolphe. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. **Nature Communications** **2020** **11:1**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15889-3>. Acesso em: 20 maio 2022.

RAVI, Punna Rao *et al.* Lipid nanoparticles for oral delivery of raloxifene: Optimization, stability, in vivo evaluation and uptake mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 114–124, 2014.

REBOUÇAS-SILVA, Jéssica *et al.* Evaluation of in vitro and in vivo Efficacy of a Novel Amphotericin B-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in the Treatment of Leishmania braziliensis Infection. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 15, p. 8659–8672, 2020. Disponível em: <https://www.dovepress.com/evaluation-of-in-vitro-and-in-vivo-efficacy-of-a-novel-amphotericin-b-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 26 maio 2022.

REINHOLZ, Jonas; LANDFESTER, Katharina; MAILÄNDER, Volker. The challenges of oral drug delivery via nanocarriers. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1694–1705, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306225504/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

RIBEIRO, Ana Paula Badan *et al.* Crystallization modifiers in lipid systems. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 7, p. 3925–3946, 2015. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-014-1587-0>. Acesso em: 7 maio 2022.

RIEZK, Alaa *et al.* Activity of Amphotericin B-Loaded Chitosan Nanoparticles against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page **4002**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 4002, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/17/4002/htm>. Acesso em: 26 maio 2022.

RIGON, Roberta Balansin *et al.* Solid lipid nanoparticles optimized by 22 factorial design for skin administration: Cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 171, p. 501–505, 2018.

ROBERTS, William L.; MCMURRAY, Walter J.; RAINEY, Petrie M. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 1076, 1998. Disponível em: [/pmc/articles/PMC105748/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9744448/). Acesso em: 30 abr. 2022.

ROCHA, Jessika L. *et al.* Thermal analysis applied to the development of nanostructured lipid carriers loading propranolol using quality-by-design strategies. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 708, p. 179143, 2022.

ROJEK, Barbara; WESOLOWSKI, Marek. FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, [s. l.], v. 208, p. 285–293, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30340208/>. Acesso em: 29 abr. 2022.

ROSSI, Matteo; FASEL, Nicolas. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!. **International Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/intimm/article/30/3/103/4774287>. Acesso em: 30 jan. 2019.

ROSTAMKALAEI, Seyyed Sohrab *et al.* Topical gel of Metformin solid lipid nanoparticles: A hopeful promise as a dermal delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 175, p. 150–157, 2019.

ROUCO, Helena *et al.* A Traffic Light System to Maximize Carbohydrate Cryoprotectants' Effectivity in Nanostructured Lipid Carriers' Lyophilization. **Pharmaceutics** **2021**, Vol. **13**, Page **1330**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1330, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/9/1330/htm>. Acesso em: 21 nov. 2022.

SAEEDI, Majid *et al.* Brain targeting of venlafaxine HCl as a hydrophilic agent prepared through green lipid nanotechnology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 102813, 2021.

SAHU, Devashri *et al.* In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles: A Comparison between Particle Size and Cell Type . **Journal of Nanoscience**, [s. l.], v. 2016, p. 1–9, 2016.

SAKELLARI, Georgia I. *et al.* Formulation design, production and characterisation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for the encapsulation of a model hydrophobic active. **Food Hydrocolloids for Health**, [s. l.], v. 1, p. 100024, 2021.

SALEM, Lamis H. *et al.* Coated Lipidic Nanoparticles as a New Strategy for Enhancing Nose-to-Brain Delivery of a Hydrophilic Drug Molecule. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 7, p. 2237–2251, 2020. Disponível em: <http://jpharmsci.org/article/S0022354920302008/fulltext>. Acesso em: 11 maio 2022.

SANDHU, Simarjot Kaur *et al.* Systematic development and characterization of novel, high drug-loaded, photostable, curcumin solid lipid nanoparticle hydrogel for wound healing. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8148018/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34148018/). Acesso em: 17 maio 2022.

SANTIAGO, Alexandre Silva; PITA, Samuel Silva da Rocha; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. e29510716543–e29510716543, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16543>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SANTOS, Aline C. S. *et al.* Assessment of Leishmania cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 166, p. 105732, 2019.

SAQIB, Mudassara *et al.* Amphotericin B Loaded Polymeric Nanoparticles for Treatment of Leishmania Infections. **Nanomaterials** 2020, Vol. 10, Page 1152, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1152, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/6/1152/htm>. Acesso em: 26 maio 2022.

SARWAR, Hafiz Shoaib *et al.* Design of mannosylated oral amphotericin B nanoformulation: efficacy and safety in visceral leishmaniasis. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2018.1430699>. Acesso em: 8 jan. 2019.

SARWAR, Hafiz S. *et al.* Mannosylated thiolated polyethylenimine nanoparticles for the enhanced efficacy of antimonial drug against Leishmaniasis. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0255>, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 25–41, 2017. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm-2017-0255>. Acesso em: 14 maio 2022.

SATO, Kiyotaka; UENO, Satoru. Crystallization, transformation and microstructures of polymorphic fats in colloidal dispersion states. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 384–390, 2011.

SCALA, Angela *et al.* “Click” on PLGA-PEG and hyaluronic acid: Gaining access to anti-leishmanial pentamidine bioconjugates. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 106, n. 8, p. 2778–2785, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.b.34058>. Acesso em: 26 maio 2022.

SCHOENITZ, M. *et al.* Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: a feasibility study. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 324–331, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23969160/>. Acesso em: 15 maio 2022.

SCIOLI MONTOTO, Sebastián; MURACA, Giuliana; RUIZ, María Esperanza. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 7, p. 319, 2020.

SEVERINO, Patrícia *et al.* Antimicrobial activity of polymyxin-loaded solid lipid nanoparticles (PLX-SLN): Characterization of physicochemical properties and in vitro efficacy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 106, p. 177–184, 2017.

SEVERINO, Patrícia *et al.* Crystallinity of Dynasan ®114 and Dynasan ®118 matrices for the production of stable Miglyol ®-loaded nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 101–108, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-011-1613-7>. Acesso em: 14 abr. 2022.

SEVERINO, Patrícia *et al.* Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 125–130, 2011.

SHAH, Rohan. Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. **Journal of physical science**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 59–59, 2014.

SHAH, M. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles of a Water Soluble Drug, Ciprofloxacin Hydrochloride. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 434, 2012. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC3660870/>. Acesso em: 11 maio 2022.

SHAH, Rohan M. *et al.* Stability mechanisms for microwave-produced solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 643, p. 128774, 2022.

SHAHBAZI, Mohammad-Ali; A. SANTOS, Helder. Improving Oral Absorption Via Drug-Loaded Nanocarriers: Absorption Mechanisms, Intestinal Models and Rational Fabrication. **Current Drug Metabolism**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 28–56, 2012.

SHARIF MAKHMAL ZADEH, Behzad *et al.* Ocular Delivery System for Propranolol Hydrochloride Based on Nanostructured Lipid Carrier. **Scientia Pharmaceutica** 2018, Vol. 86, Page 16, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 16, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-0532/86/2/16/htm>. Acesso em: 10 maio 2022.

SHETE, Harshad; PATRAVALE, Vandana. Long chain lipid based tamoxifen NLC. Part I: Preformulation studies, formulation development and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 454, n. 1, p. 573–583, 2013.

SHI, Li Li *et al.* Gastrointestinal stability, physicochemical characterization and oral bioavailability of chitosan or its derivative-modified solid lipid nanoparticles loading docetaxel. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1220571>, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 839–846, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2016.1220571>. Acesso em: 20 maio 2022.

SHI, Jia H. *et al.* Nanoparticle Digestion Simulator Reveals pH-Dependent Aggregation in the

Gastrointestinal Tract. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 92, n. 18, p. 12257–12264, 2020. Disponível em: <https://pubs-acsc-org.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acs.analchem.0c01844>. Acesso em: 20 maio 2022.

SHTAY, Rasha *et al.* Encapsulation of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in solid lipid nanoparticles for food applications. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 244, p. 91–100, 2019.

SIDDIQUI, Akhtar *et al.* Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM). **Pharmaceutical development and technology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 342–346, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23590412/>. Acesso em: 1 maio 2022.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug release from lipid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 418, n. 1, p. 42–53, 2011.

SILVA-PIRES, Felipe Do Espirito Santo *et al.* As doenças negligenciadas e os determinantes sociais da saúde no contexto da investigação em ensino. **Educação, Ciência e Cultura**, [s. l.], 2017.

SILVA, Tamires Andrade. **Avaliação de Mg, AL HDL como carreador de Sb(V), a partir de antimoniato de meglumina, visando uma alternativa para a quimioterapia da leishmaniose**. 2016. 67 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Maceió, 2016.

SILVA, A. C. *et al.* Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 158–165, 2011.

SILVA, A.C. *et al.* Risperidone Release from Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Validated HPLC Method and Modelling Kinetic Profile. **Current Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 307–316, 2012.

SINGHVI, Gautam; SINGH, Mahaveer. REVIEW: IN-VITRO DRUG RELEASE CHARACTERIZATION MODELS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, [s. l.], v. 2, p. 77–84, 2011.

SOHAIL, Aamir *et al.* Comparative efficacy of amphotericin B-loaded chitosan nanoparticles and free amphotericin B drug against *Leishmania tropica*. **Bulletin of the National Research Centre** **2021** **45:1**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-021-00644-5>. Acesso em: 26 maio 2022.

SOLEIMANIAN, Yasamin *et al.* β -sitosterol Lipid Nano Carrier Based on Propolis Wax and Pomegranate Seed Oil: Effect of Thermal Processing, pH, and Ionic Strength on Stability and Structure. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 1800347, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/ejlt.201800347>. Acesso em: 20 maio 2022.

SOLEIMANIFARD, Mansooreh *et al.* The formulation optimization and properties of novel

oleuropein-loaded nanocarriers. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 327, 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6952516/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31613731/). Acesso em: 10 maio 2022.

SOLTANI, Shahrzad *et al.* Evaluation of Antileishmanial Activity Employing Conventional and Solid Lipid Nanoparticles of Amphotericin B on *Leishmania major* In Vitro and In Vivo. **Infectious disorders drug targets**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 822–827, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31613731/>. Acesso em: 26 maio 2022.

SOUSA-BATISTA, Ariane De Jesus *et al.* Polycaprolactone Antimony Nanoparticles as Drug Delivery System for Leishmaniasis. **American Journal of Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. e12–e17, 2019.

SUNYOTO, Temmy; POTET, Julien; BOELAERT, Marleen. Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. e000709, 2018. Disponível em: <http://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2018-000709>. Acesso em: 31 jan. 2019.

SUZUKI, Yuta *et al.* Design and lyophilization of lipid nanoparticles for mRNA vaccine and its robust immune response in mice and nonhuman primates. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**, [s. l.], v. 30, p. 226, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9508692/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31613731/). Acesso em: 21 nov. 2022.

SZABO, Maria Raluca; CHAMBRE, Dorina; IDIȚOIU, Cornelia. TG/DTG/DTA for the oxidation behavior characterization of vegetable and animal fats. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 281–285, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-012-2253-2>. Acesso em: 15 abr. 2022.

TAVARES LUIZ, Marcela *et al.* Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 165, p. 127–148, 2021.

TEERANACHAIDEEKUL, Veerawat *et al.* Effect of Lipid and Oil Compositions on Physicochemical Properties and Photoprotection of Octyl Methoxycinnamate-loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC). **J. Oleo Sci**, [s. l.], v. 69, n. 12, p. 1627–1639, 2020. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jos/http://mc.manuscriptcentral.com/jjocs>. Acesso em: 28 abr. 2022.

TENGKU-ROZAINA, Tengku Mohamad; BIRCH, Edward John. Thermal Analysis for Lipid Decomposition by DSC and TGA. In: LAURENCE MELTON; FEREIDOUN SHAHIDI; PETER VARELIS (org.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. [S. l.]: Academic Press, 2019. v. 2, p. 345–352.

TETYCZKA, Carolin *et al.* Comprehensive characterization of nanostructured lipid carriers using laboratory and synchrotron X-ray scattering and diffraction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 139, p. 153–160, 2019.

THANKI, Kaushik; DATE, Tushar; JAIN, Sanyog. Improved Oral Bioavailability and Gastrointestinal Stability of Amphotericin B through Fatty Acid Conjugation Approach. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 4519–4529, 2019. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00662>. Acesso em: 26 maio 2022.

TIAN, Houkuan *et al.* Uniform Core–Shell Nanoparticles with Thiolated Hyaluronic Acid Coating to Enhance Oral Delivery of Insulin. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 7, n. 17, p. 1–12, 2018.

TIMÓTEO, Taysa Renata Ribeiro *et al.* Layered double hydroxides of CaAl: A promising drug delivery system for increased dissolution rate and thermal stability of praziquantel. **Applied Clay Science**, [s. l.], v. 180, p. 105197, 2019.

TREIGER BORBOREMA, Samanta Etel *et al.* Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in Leishmania (Leishmania) major-infected macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 341–347, 2011.

TRENKENSCHUH, Eduard; FRIESS, Wolfgang. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 165, p. 345–360, 2021.

ULIANA, SILVIA R. B.; TRINCONI, CRISTIANA T.; COELHO, ADRIANO C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 04, p. 464–480, 2018. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182016002523/type/journal_article. Acesso em: 2 fev. 2019.

USP. **The United States Pharmacopeia and The national formulary (USP 44- NF 39)**. 1. ed. Rockville: [s. n.], 2021.

VALLE, Isabela Viol *et al.* Oral pentamidine-loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles: an alternative approach for leishmaniasis treatment. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 45, p. 455102, 2019. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6528/ab373e>. Acesso em: 26 maio 2022.

VARENNE, F. *et al.* Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes. **Talanta**, [s. l.], v. 205, p. 120062, 2019.

VARSHOSAZ, Jaleh *et al.* Development and optimization of solid lipid nanoparticles of amikacin by central composite design. **Journal of liposome research**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 97–104, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19621981/>. Acesso em: 10 maio 2022.

VARSHOSAZ, Jaleh; TABBAKHIAN, Majid; MOHAMMADI, Mahboobeh Y. Formulation and optimization of solid lipid nanoparticles of buspirone HCl for enhancement of its oral bioavailability. **Journal of Liposome Research**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 286–296, 2010. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08982100903443065>. Acesso em: 19 ago. 2018.

VILLANUEVA-FLORES, Francisca *et al.* Understanding cellular interactions with nanomaterials: towards a rational design of medical nanodevices. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 13, p. 132002, 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7105107/](https://pubs.rsc.org/article/PM7105107). Acesso em: 21 nov. 2022.

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva: [s. n.], 2020.

WHO. **WHO | Neglected tropical diseases**. [S. l.], 2019. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/en/. Acesso em: 29 set. 2019.

WHO|LEISHMANIASIS. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 30 set. 2022.

WHO TECHNICAL SERIES REPORT. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. *In: GUIDELINES FOR STABILITY TESTING OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS*. 52. ed. Geneva: [s. n.], 2018. p. 309–351. *E-book*. Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/. Acesso em: 19 nov. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva: WHO Press, 2010. *E-book*. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 30 jan. 2019.

XU, Yining *et al.* Overcoming the intestinal barrier: A look into targeting approaches for improved oral drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 322, n. February, p. 486–508, 2020.

YANG, Yihui *et al.* The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 418, p. 261–272, 2014.

YANG, Gyongseon; CHOI, Gahee; NO, Joo Hwan. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 6828, 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5075092/](https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemther.5b00921). Acesso em: 25 maio 2022.

YANPING, Yuan *et al.* Theoretic Prediction of Melting Temperature and Latent Heat for a Fatty Acid Eutectic Mixture. **Journal of Chemical and Engineering Data**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 2889–2891, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/je200057j>. Acesso em: 16 abr. 2022.

ZAULI-NASCIMENTO, Rogéria C. *et al.* In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine & International Health**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3156.2009.02414.x>. Acesso em: 21 nov. 2022.

ZHANG, Xiaoguang; KIRSCH, Lee E. Correlation of the thermal stability of phospholipid-based emulsions and the microviscosity measurements using fluorescence polarization. **Pharmaceutical development and technology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 219–227, 2004.

ZHAO, Pengxuan *et al.* Long-term storage of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery.

Bioactive Materials, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 358–363, 2020.

ZHAO, Shuangni *et al.* Mixture of nonionic/ionic surfactants for the formulation of nanostructured lipid carriers: Effects on physical properties. **Langmuir**, [s. l.], v. 30, n. 23, p. 6920–6928, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la501141m>. Acesso em: 18 maio 2022.

ZHENG, Minying *et al.* Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 430, p. 76–84, 2013.

ZULFIQAR, Bilal; SHELPER, Todd B.; AVERY, Vicky M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617300053?via%3Dihub#bib0025>. Acesso em: 1 fev. 2019.

APÊNDICE A – RESUMO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS POR DTA

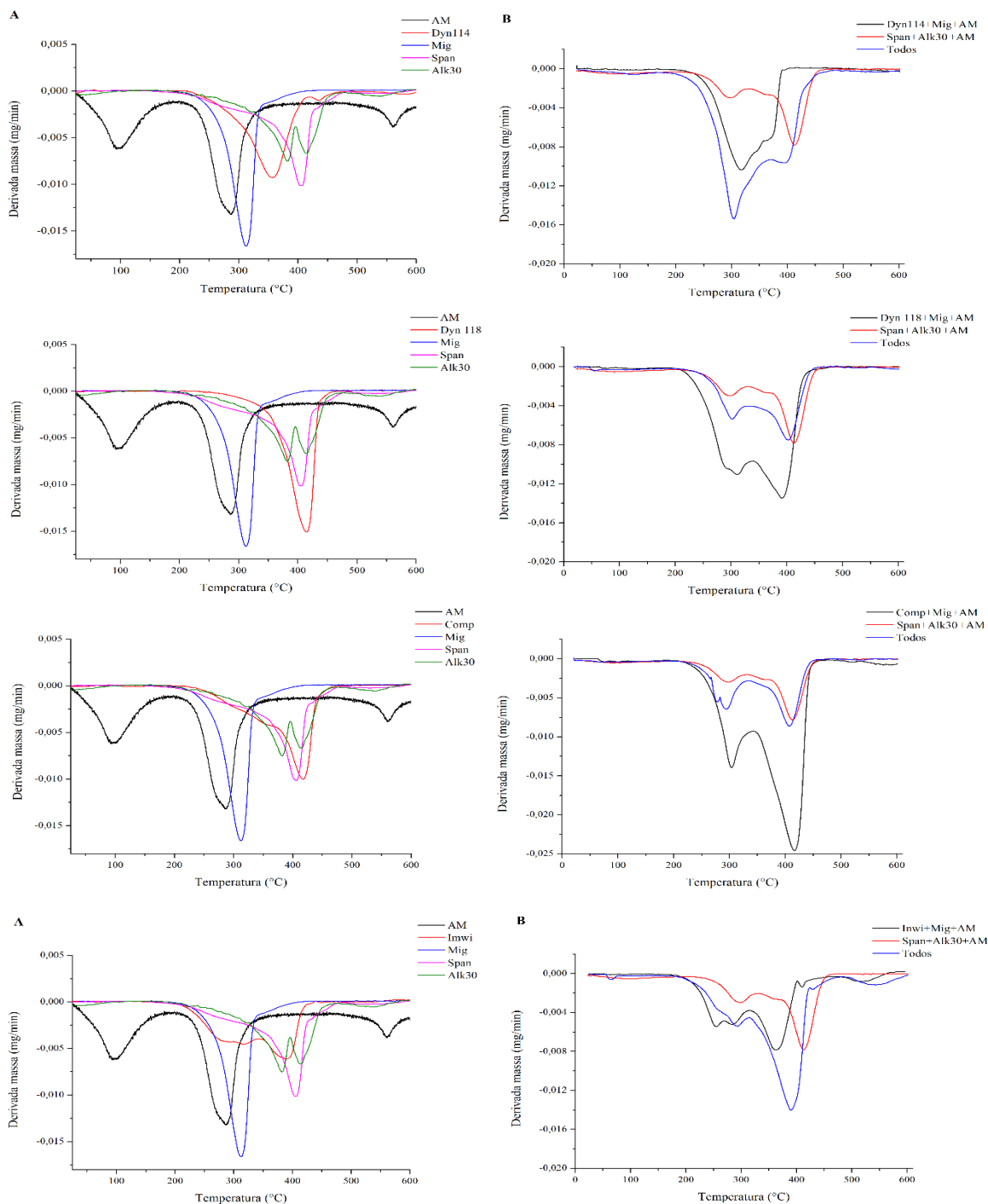
Tabela 13 - Propriedades térmicas dos lipídeos sólidos e das misturas físicas com lipídeos líquidos avaliadas por DTA

Amostra	TF (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Entalpia (J/g)
Dyn114	59,14	54,30	69,66	-245,24
Dyn114+Mig	51,54	46,27	63,39	-110,53
Dyn114+Olei	52,20	46,63	63,14	-128,02
Dyn118	73,86	68,42	84,67	-273,45
Dyn118+Mig	67,13	59,10	78,86	-124,57
Dyn118+Olei	66,98	62,55	78,81	-143,83
Comp	76,64	71,37	86,32	-163,40
Comp+Mig	73,45	67,79	83,81	-147,64
Comp+Olei	65,76	53,14	76,06	-128,00
Inwi	64,76	55,59	74,99	-239,95
Inw+Mig	65,52	59,20	75,63	-161,55
Inw+Olei	62,20	52,70	73,99	-144,98

Legenda: TF= temperatura de fusão; Dyn114 = Dynasa114; Dyn118 = Dynasan118; Comp = Compritol ATO; Imwi = Imwitor 900K; Mig = Miglyol 812; Olei = Ácido oleico. Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE B – GRÁFICOS DTG

Figura 28 - Curvas DTG das substâncias isoladas (lado A), misturas ternárias e misturas totais (lado B) avaliadas no ensaio de compatibilidade



Legenda: Dyn114 = Dynasa114; Dyn118 = Dynasan118; Comp = Compritol ATO; Imwi = Imwitor 900K; Mig = Miglyol 812; Olei = Ácido oleico; Span = Span80; Alk30 = Alkest. Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C – RESUMO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS POR TG/DTG

Tabela 14 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 114 avaliados por TG/DTG

	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Total de perda (%)
Amostra	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	
AM	15,29	65,90 - 130,80	28,44	254,96 - 305,65	14,01	547,73 - 575,38	57,74
DYN114	88,62	315,96 - 384,12	3,28	429,51 - 445,39	-	-	91,9
MIG	94,57	292,21 - 329,80	-	-	-	-	93,03
SPAN	85,66	366,83 - 422,27	-	-	-	-	85,66
ALK30	50,29	344,02 - 388,74	26,96	404,19 - 432,88	2,67	513,40 - 547,96	79,92
DYN114+MYG+AM	63,42	291,98 - 328,37	31,58	345,87 - 374,66	-	-	95,00
SPAN+ALK30+AM	18,89	269,36 - 313,13	48,86	390,58 - 433,14	-	-	67,75
MF	51,99	276,81 - 323,69	29,21	410,72 - 419,27	-	-	81,2

Legenda: Dyn114 = Dynasa114; Mig = Miglyol 812; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; Temp = temperatura. Fonte: Autoria própria.

Tabela 15 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 118 avaliados por TG/DTG

	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Total de perda (%)
Amostra	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	
AM	15,29	65,90 - 130,80	28,44	254,96 - 305,65	13,54	547,73 - 575,38	57,27
DYN118	96,36	383,52 - 428,71	-	-	-	-	96,36
MIG	94,57	292,21 - 329,80	-	-	-	-	93,03
SPAN	85,66	366,83 - 422,27	-	-	-	-	85,66
ALK30	50,29	344,02 - 388,74	26,96	404,19 - 432,88	2,67	513,40 - 547,96	79,92
DYN118+MYG+AM	40,87	272,21 - 321,66	44,98	368,26 - 414,14	-	-	85,85
SPAN+ALK30+AM	18,89	269,36 - 313,13	48,86	390,58 - 433,14	-	-	67,75
MF	30,29	282,87 - 311,70	49,74	380,91 - 423,83	-	-	80,03

Legenda: Dyn118 = Dynasa118; Mig = Miglyol 812; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; Temp = temperatura. Fonte: Autoria própria.

Tabela 16 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Compritol avaliados por TG/DTG

	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Total de perda (%)
Amostra	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	
AM	15,29	65,90 - 130,80	28,44	254,96 - 305,65	13,54	547,73 - 575,38	57,27
COMP	94,84	357,17 - 432,07	-	-	-	-	94,84
MIG	94,57	292,21 - 329,80	-	-	-	-	93,03
SPAN	85,66	366,83 - 422,27	-	-	-	-	85,66
ALK30	50,29	344,02 - 388,74	26,96	404,19 - 432,88	2,67	513,40 - 547,96	79,92
COMP+MYG+AM	47,33	269,29 - 314,74	30,56	375,42 - 418,32	-	-	77,89
SPAN+ALK30+AM	18,89	269,36 - 313,13	48,86	390,58 - 433,14	-	-	67,75
MF	18,97	277,04 - 311,94	65,5	381,82 - 425,78	-	-	84,47

Legenda: Comp = Compritol; Mig = Miglyol 812; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; Temp = temperatura. Fonte: Autoria própria.

Tabela 17 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Imwitor avaliados por TG/DTG

	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Total de perda (%)
Amostra	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	
AM	15,29	65,90 - 130,80	28,44	254,96 - 305,65	13,54	547,73 - 575,38	57,27
IMWI	49,20	253,33 - 326,45	41,85	366,65 - 407,19	-	-	91,05
MIG	94,57	292,21 - 329,80	-	-	-	-	93,03
SPAN	85,66	366,83 - 422,27	-	-	-	-	85,66
ALK30	50,29	344,02 - 388,74	26,96	404,19 - 432,88	2,67	513,40 - 547,96	79,92
IMWI+MYG+AM	40,51	241,18 - 295,16	41,79	351,60 - 393,22	4,16	505,82 - 553,93	86,46
SPAN+ALK30+AM	18,89	269,36 - 313,13	48,86	390,58 - 433,14	-	-	67,75
MF	23,58	252,50 - 301,82	60,88	354,62 - 406,71	5,59	511,99 - 573,71	90,05

Legenda: Imwi= Imwitor; Mig = Miglyol 812; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; Temp = temperatura. Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE D – RESUMO ENSAIO DE COMPATIBILIDADE POR DTA

Tabela 18 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 114 avaliados por DTA

Amostra	Evento	TF (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Entalpia (J/g)
AM	único	88,28	61,58	128,54	-212,71
DYN114	único	59,14	54,3	69,66	-245,24
DYN114+MYG+AM	único	52,23	44,27	66,04	-131,21
SPAN+ALK30+AM	-	-	-	-	-
MF	1º evento	48,44	40,7	57,33	-10,02
	2º evento	258,58	192,29	284,31	159,27

Legenda: Dyn114 = Dynasa114; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; TF = temperatura de fusão. Fonte: Autoria própria.

Tabela 19 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Dynasan 118 avaliados por DTA

Amostra	Evento	TF (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Entalpia (J/g)
AM	único	88,28	61,58	128,54	-212,71
DYN118	único	73,86	68,42	84,67	-273,45
DYN118+MYG+AM	1º evento	68,83	63,86	80,95	-135,96
	2º evento	276,90	211,17	303,90	379,78
SPAN+ALK30+AM	-	-	-	-	-
MF	único	53,09	48,09	61,59	-56,78

Legenda: Dyn118 = Dynasa118; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; TF = temperatura de fusão. Fonte: Autoria própria.

Tabela 20 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Compritol avaliados por DTA

Amostra	Evento	TF (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Entalpia (J/g)
AM	único	88,28	61,58	128,54	-212,71
COMP	único	76,64	71,37	86,32	-163,40
COMP+MYG+AM	único	68,23	62,96	76,36	-56,57
SPAN+ALK30+AM	-	-	-	-	-
MF	único	64,97	59,01	73,51	-27,36

Legenda: Comp = Compritol; Mig = Miglyol 812; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; TF = temperatura de fusão. Fonte: Autoria própria.

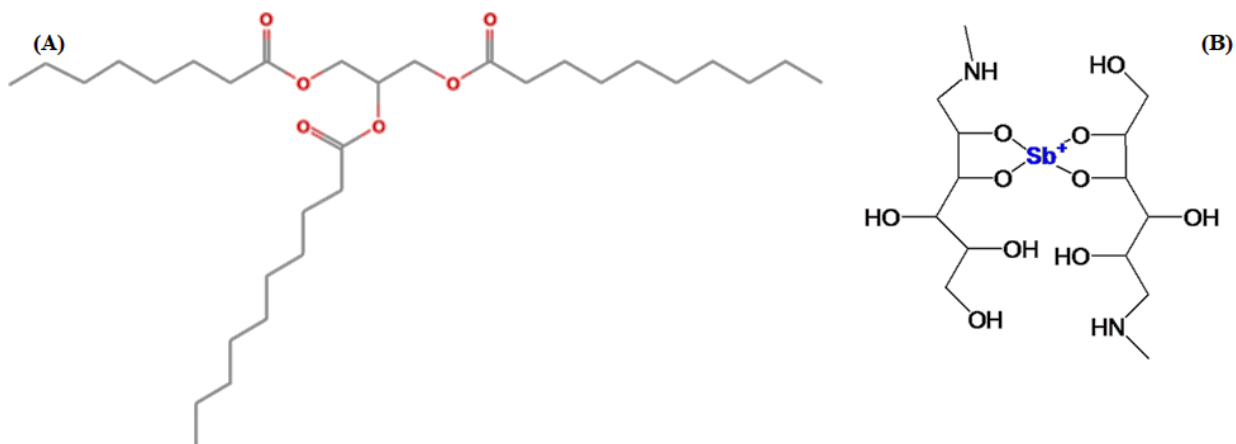
Tabela 21 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e totais feitas com Imwitor avaliados por DTA

Amostra	Evento	TF (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Entalpia (J/g)
AM	único	88,28	61,58	128,54	-212,71
INWI	único	64,76	55,59	74,99	-239,95
IMWI+MYG+AM	1º evento	64,13	56,51	73,11	-120,43
	2º evento	261,79	211,78	287,68	28,49
SPAN+ALK30+AM	-	-	-	-	-
MF	1º evento	63,75	58,57	74,47	-68,47
	2º evento	253,83	198,03	287,86	178,37

Legenda: Imwi= Imwitor; Mig = Miglyol 812; Span = Span80; Alk30 = Alkest; MF= mistura física total; TF = temperatura de fusão. Fonte: Autoria própria.

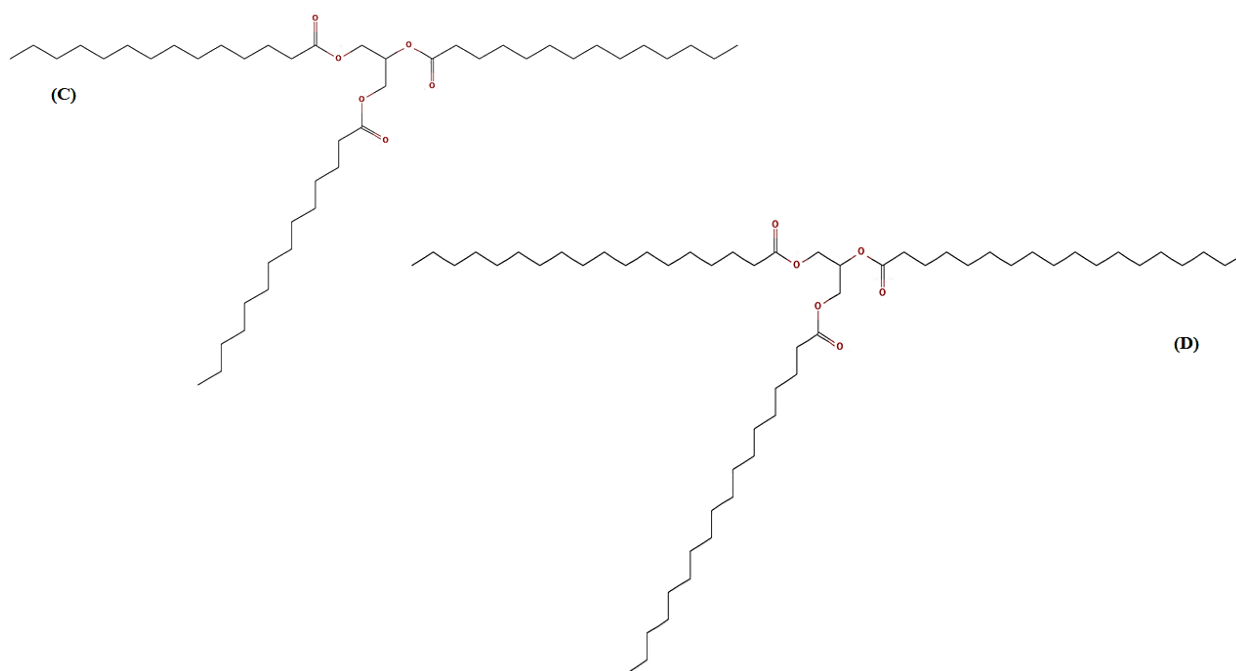
APÊNDICE E - DESENHO DAS ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS

Figura 29 - Estrutura molecular do Miglyol (A) e do AM (B)



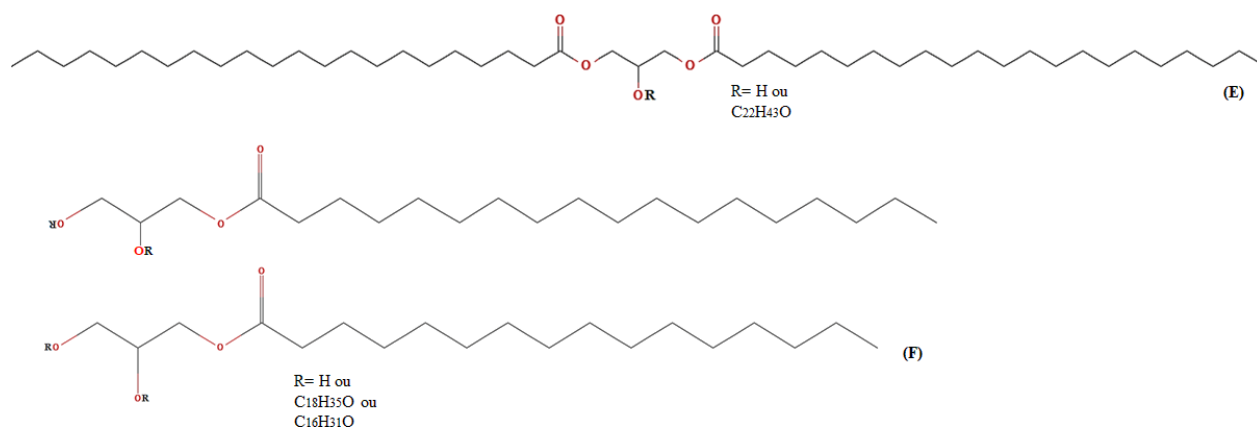
Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Estrutura molecular do Dynasan114 (C) e Dynasa118 (D).



Fonte: Autoria própria.

Figura 31 - Estrutura molecular do Compritol (E) e Imwitor (F).



Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE F – RESUMO DAS CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

Tabela 22 - Caracterizações físico-químicas durante ensaio de estabilidade do CLN4 armazenado em refrigerado e temperatura ambiente

	Armazenamento	PP	15D	30D	45D
Diam. (nm)	Ref	41,13 ± 0,21	36,96 ± 1,92	37,21 ± 0,70	39,88 ± 0,63
	Amb	41,13 ± 0,21	40,11 ± 0,33	43,30 ± 0,25	44,62 ± 0,19
PdI	Ref	0,227 ± 0,017	0,287 ± 0,049	0,269 ± 0,008	0,275 ± 0,001
	Amb	0,227 ± 0,017	0,257 ± 0,006	0,315 ± 0,006	0,334 ± 0,012
PZ (mV)	Ref	-27,9 ± 1,30	-21,0 ± 1,21	-21,9 ± 3,55	-27,00 ± 2,10
	Amb	-27,9 ± 1,30	-28,2 ± 0,51	-20,1 ± 2,40	-18,40 ± 0,17
EE (%)	Ref	62,46 ± 1,48	60,03 ± 1,89	60,35 ± 2,02	59,32 ± 1,19
	Amb	62,46 ± 1,48	57,47 ± 2,09	56,32 ± 3,12	50,51 ± 1,38
pH	Ref	5,23 ± 0,11	5,09 ± 0,05	5,02 ± 0,06	5,22 ± 0,02
	Amb	5,23 ± 0,11	4,91 ± 0,09	4,95 ± 0,06	4,92 ± 0,04

Legenda: Diâm. = diâmetro; PZ = potencial zeta; EE = eficiência de encapsulamento; PP = pós-preparo; Ref = refrigerado/ Amb= ambiente. Fonte: Autoria própria.

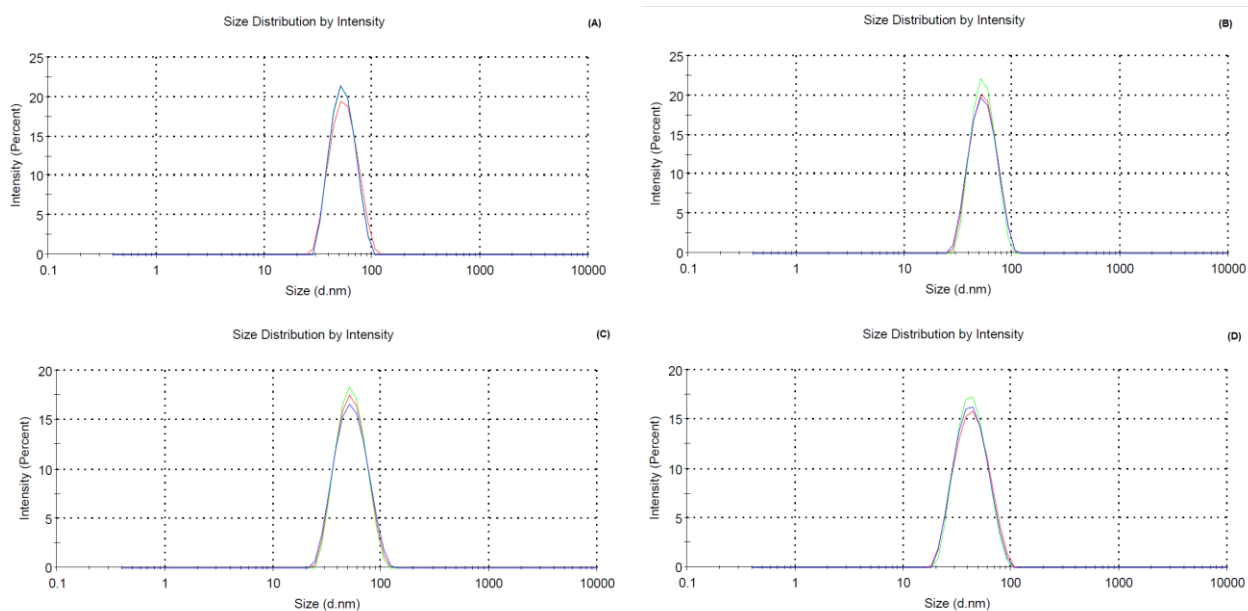
Tabela 23 - Caracterizações físico-químicas durante ensaio de estabilidade do CLNb armazenado em refrigerado e temperatura ambiente

	Armazenamento	PP	15D	30D	45D
Diâm. (nm)	Ref	36,91 ± 0,34	44,65 ± 0,28	42,88 ± 0,65	45,39 ± 0,14
	Amb	36,91 ± 0,34	32,69 ± 1,52	39,63 ± 1,52	43,03 ± 0,45
PDI	Ref	0,184 ± 0,009	0,224 ± 0,010	0,231 ± 0,007	0,213 ± 0,012
	Amb	0,184 ± 0,009	0,205 ± 0,008	0,329 ± 0,057	0,252 ± 0,006
PZ (mV)	Ref	-22,0 ± 1,18	-16,1 ± 0,46	-18,9 ± 2,55	-22,3 ± 1,10
	Amb	-22,0 ± 1,18	-18,9 ± 2,96	-12,2 ± 1,30	-13,6 ± 0,57
pH	Ref	5,93 ± 0,32	5,99 ± 0,89	5,98 ± 0,54	5,93 ± 0,23
	Amb	5,93 ± 0,32	5,53 ± 0,25	5,84 ± 0,19	5,61 ± 0,12

Legenda: Diâm. = diâmetro; PZ = potencial zeta; EE = eficiência de encapsulamento; PP = pós-preparo; Ref = refrigerado/ Amb= ambiente. Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE G - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS AMOSTRAS ANALISADAS NA ESTABILIDADE EM MEIOS GASTROINTESTINAIS SIMULADO

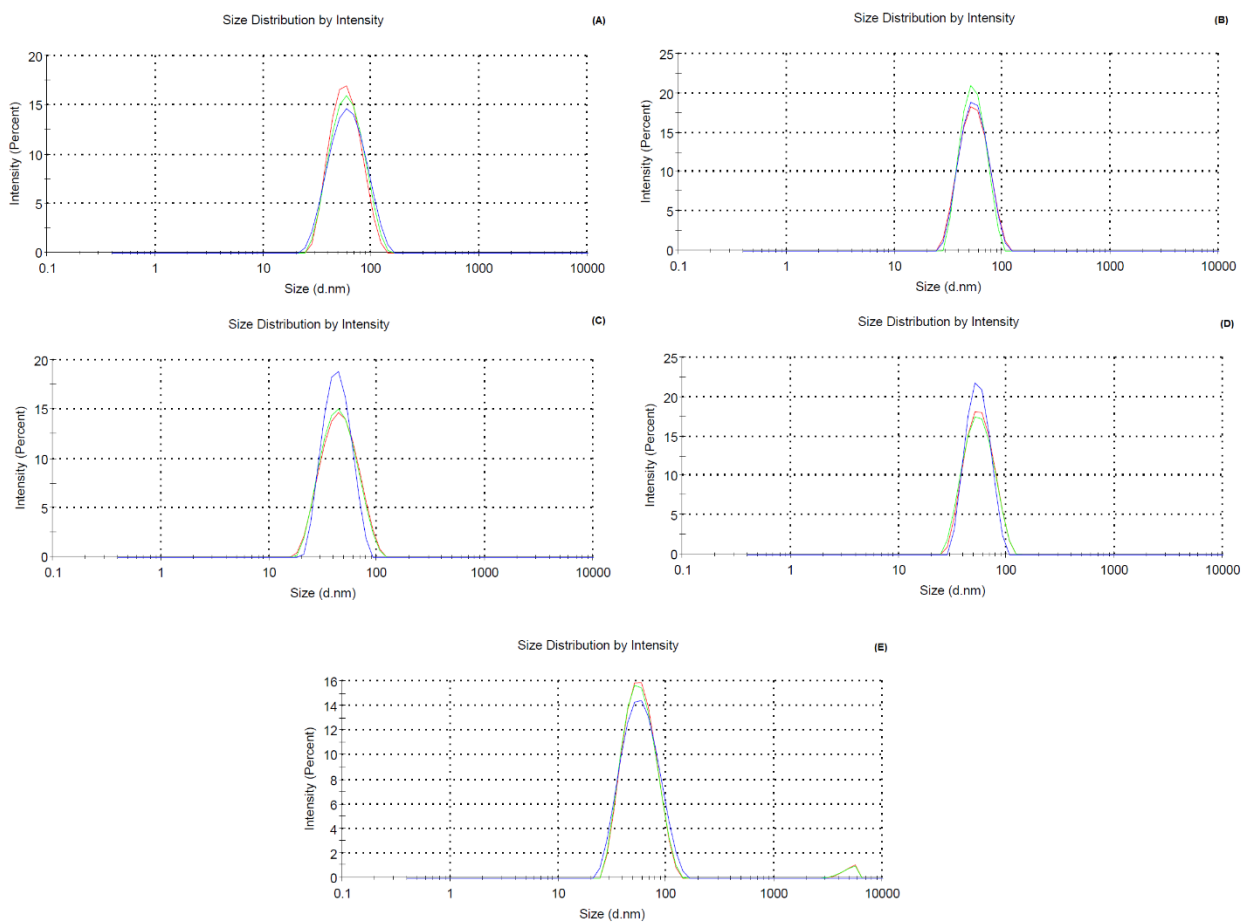
Figura 32 - Gráfico de distribuição de diâmetro obtido por DLS do CLN4 submetido ao ensaio de estabilidade gastrointestinal simulado em pH 1,2



Legenda: (A) tempo de 15 minutos; (B) tempo de 30 minutos; (C) tempo de 1 hora; (D) tempo de 2 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 33 - Gráfico de distribuição de diâmetro obtido por DLS do CLN4 submetido ao ensaio de estabilidade gastrointestinal simulado em pH 6,8



Legenda: (A) tempo de 15 minutos; (B) tempo de 30 minutos; (C) tempo de 1 hora; (D) tempo de 2 horas; (E) tempo de 4 horas. Fonte: Autoria própria.

ANEXO A – PRODUÇÕES

IMAGEM 1 – RESUMO PUBLICADO EM ANAIS DO CONGRESSO DE CIÊNCIAS APLICADAS A FARMÁCIA – 2020

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS VISANDO O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE

Lucas Amadeu Gonzaga da Costa¹; Myla Lôbo de Souza¹; Elvis Joacir de França²; Pedro José Rolim Neto¹

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Recife, Pernambuco, Brasil.
lucasamadeusc2@hotmail.com

A leishmaniose cutânea é uma doença negligenciada expressiva no mundo, sendo o tratamento de primeira escolha feito com antimoniato de meglumina, que possui vários efeitos adversos e uso exclusivo parenteral, o que exige internação e gera menor adesão dos pacientes. Formulações nanotecnológicas podem diminuir a dose necessária e toxicidade, promover liberação prolongada, melhorar permeabilidade e biodisponibilidade, contornando tais problemas. O delineamento experimental permite decisões racionais, fundamentadas e com o menor número de experimentos e recursos, obtendo condições experimentais otimizadas para o desenvolvimento de tais formulações. Baseado nisso, este trabalho visou desenvolver planejamento experimental para o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo o fármaco antimoniato de meglumina (AM) como alternativa de tratamento para leishmaniose cutânea. Foram realizadas caracterizações do fármaco e dos excipientes e estudo de pré-formulação para selecionar os parâmetros que obtém CLNs com melhores características. A caracterização do AM foi feita por análises térmicas, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e difratometria de raios X. O estudo de pré-formulação ocorreu com ensaios de compatibilidade fármaco/excipiente, além de planejamento experimental. Os CLNs foram preparados por sonicação pelo método de emulsões múltiplas, e avaliados frente ao diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulação e microscopia. Os resultados mostraram que o fármaco estava de acordo com as especificações e o estudo de compatibilidade permitiu a seleção de quatro lipídeos. O planejamento experimental demonstrou que as melhores nanopartículas foram obtidas com a combinação dos lipídeos Dynasan[®] 114 e ácido oleico, e os parâmetros de sonicação de 7 minutos e potência de 55W. O experimento fatorial completo determinou a formulação que resultou em CLN com melhor eficiência de encapsulação, cujas caracterizações revelaram diâmetro médio de 165,5nm, PDI de 0,206, PZ de -60,7mV, eficiência de encapsulação de 48,97%, morfologia esférica/elíptica, sendo resultados compatíveis com a literatura para CLN contendo fármacos hidrofílicos. Conclui-se que o planejamento experimental auxiliou na triagem da formulação e parâmetros metodológicos ideais, que resultaram no desenvolvimento de um nanocarreador, contendo fármaco leishmanicida, promissor como uma alternativa terapêutica da leishmaniose cutânea. Estudos para avaliação de atividade farmacológica serão realizados, além de incorporação em forma farmacêutica semissólida visando administração tópica.

Palavras-chave: Sistemas de liberação de medicamentos. Administração tópica de medicamentos. Nanotecnologia. Leishmaniose cutânea. Doenças negligenciadas.

Apoio: CAPES e FACEPE.

Área: Farmácia

IMAGEM 2 – ARTIGOS PUBLICADOS

Current Pharmaceutical Design, 2022, 28, 410–426

SYSTEMATIC REVIEW ARTICLE



A Systematic Review of Functionalized Polymeric Nanoparticles to Improve Intestinal Permeability of Drugs and Biological Products



Myla Lôbo de Souza¹, Victor de Albuquerque Wanderley Sales¹, Larissa Pereira Alves¹,
 Widson Michael dos Santos¹, Leslie Raphael de Moura Ferraz², Gustavo Siqueira de Andrade Lima¹,
 Larissa Morgana dos Santos Mendes¹, Larissa Araújo Rolim¹ and Pedro José Rolim Neto²*

¹Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos, Federal University of Vale do São Francisco (UNIFASF), Petrolina-PE, Brazil

Abstract: Background: The oral route is the most frequently used and the most convenient route of drug administration since it has several advantages, such as ease of use, patient compliance, and better cost-effectiveness. However, physicochemical and biopharmaceutical limitations of various active pharmaceutical ingredients (API) hinder suitability for this route, including degradation in the gastrointestinal tract, low intestinal permeability, and low bioavailability. To overcome these problems, while maintaining therapeutic efficacy, polymeric nanoparticles have attracted considerable attention for their ability to increase drug solubility, promote the controlled release, and improve stability. In addition, the functionalization of nanocarriers can increase uptake and accumulation at the target site of action, and intestinal absorption, making it possible to obtain more viable, safe and efficient treatments for oral administration.

Objective: This systematic review aimed to seek recent advances in the literature on the use of polymeric nanoparticles functionalized to increase intestinal permeability of APIs that are intended for oral administration.

Methods: Two bibliographic databases were consulted (PubMed and ScienceDirect). The selected publications and the writing of this systematic review were based on the guidelines mentioned in the PRISMA statement.

Results: Out of a total of 1036 studies, 22 studies were included in this article based on our eligibility criteria. The results were consistent for the application of nanoparticle functionalization to increase intestinal permeability.

Conclusion: The functionalized polymeric nanoparticles can be considered an earlier system that improve the intestinal permeability and bioavailability of APIs, with the potential to result, in the future, in the development of oral medicines.

Keywords: Drug delivery systems, nanocarrier, functionalization, oral use, bioavailability, intestinal absorption, permeability.

1. INTRODUCTION

Oral administration is undoubtedly the most approachable drug delivery route during drug research and development. However, some limitations often hinder the suitability of an active ingredient for this route, such as low solubility, low intrinsic permeability through cell membranes, rapid degradation through the gastrointestinal tract (GIT), the lability of the active pharmaceutical ingredient (API) to cross the intestinal mucosal barrier, efflux by intestinal transporters, and intense liver metabolism: all factors that individually or in combination can dramatically reduce the oral bioavailability of an API [1–3].

The absorption of drugs after oral administration occurs extensively in the small intestine due to its high surface area (approximately 400 m²) and its various mechanisms of transporting substances to the systemic circulation. Before reaching this organ, the active ingredients must withstand the gastric acidic conditions, which mainly contain various enzymes and bile salts. In the intestine, they must cross the gastrointestinal barrier, composed of a mucosal barrier followed by submucosal and epithelial cell barriers, so then reach the blood and lymphatic circulation [4–7].

Several advances have been made in recent decades to improve the efficiency of oral drug administration in an attempt to maximize therapeutic efficacy and reduce the toxicity of various APIs [8, 9]. Amongst many possible applications, polymeric nanoparticles have attracted considerable interest in recent years due to their characteristics such as easy preparation process, increased solubility, prolonged drug release, enhanced bioavailability, improved uptake and accumulation at the target site, ability to improve stability, increased therapeutic index through targeted delivery and high residence time of the encapsulated API in the GIT [10–13].

Polymeric nanoparticles can be defined as solid colloidal particles that vary in the size range from 1 to 100 nm and are produced from polymers obtained from natural, synthetic, or semi-synthetic sources, and may or may not be biodegradable [14–16]. The composition and particle sizes can be manipulated to obtain products with specific properties for the therapeutic application. Polymers such as poly lactic acid (PLA), poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), polycaprolactone (PCL) and poly glycolic acid (PGA), alginate, and chitosan are widely used as polymeric matrices for nanoparticles, mainly because they are biodegradable, biocompatible, non-toxic, non-immunogenic and present flexibility properties, bio adhesion and permeability [17–21]. However, these promising nanocarriers often face limitations due to their mucus entrapment and vulnerability to aggregation, making it challenging within

1874-4280/22 \$40.00+.00 © 2022 Bentham Science Publishers

Tropical medicine rounds

Cutaneous leishmaniasis: new oral therapeutic approaches under development

Myla Lôbo de Souza, MSc,  Widson Michael dos Santos, MSc,  André Luiz Moreira Domingues de Sousa, MSc,  Leslie Raphael de Moura Ferraz, PhD,  Lucas Amadeu Gonzaga da Costa, BSc,  Emerson Oliveira Silva, MSc,  and Pedro José Rolim Neto, PhD 

Laboratory of Drug Technology,
 Department of Pharmaceutical Sciences,
 Federal University of Pernambuco, Av. Prof.
 Ator de Sá, S/N, Recife - Pernambuco,
 Brazil

Correspondence:
 Myla Lôbo de Souza, MSc,
 Av. Prof. Ator de Sá,
 S/N, Recife - Pernambuco
 Brazil
 E-mail: myla.lobo.souza@gmail.com

Conflict of Interest: None.

Funding source: None.

doi: 10.1111/jcpt.15902

Abstract

The World Health Organization (WHO) classifies leishmaniasis as a disease for which the development of new treatments is a priority. Available drugs are not fully effective in all cases; they have parenteral administration and exhibit serious and common adverse effects. The only oral drug available (miltefosine) has shown resistance, is expensive, and is not available in many endemic countries. Thus, the development of an oral medicine may solve many of these issues. Based on that, this review aimed to investigate which therapeutic alternatives have been studied for the development of oral drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. A literature search for keywords "leishmania and oral" was performed in PubMed and ScienceDirect, considering articles published in the last 5 years. The articles were selected based on the objective of the review. The main problem in the current treatment of leishmaniasis is the administration of injectables, since it requires patients to travel to health centers, hospitalization, and professional administration, conditions that are not adapted to the socioeconomic reality of patients. Therefore, many research studies have evaluated oral alternatives for the treatment of cutaneous leishmaniasis. The main tested approaches were obtaining new molecules, repackaging drugs, and new formulations of old drugs. The prospects are encouraging but still require more in vivo bioavailability and clinical trials.

Introduction

Leishmaniasis comprises a group of neglected tropical diseases (NTDs) caused mainly by a parasitic protozoan of the *Leishmania* species and transmitted by the infected female from one of the more than 30 known sandfly species, mainly *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. Combined, leishmaniasis affects more than 12 million people worldwide. They are endemic in more than 90 countries, with a high incidence rate—about 1 million new cases per year—and prevalence, mainly in Brazil, Ethiopia, India, Kenya, Somalia, South Sudan, and Sudan.^{1,2} This wide geographical distribution is related to not only the country's level of development and environmental conditions but also to migration, deforestation, urbanization, and cultural values, which contribute to the spread of infected vectors and hosts.^{3,4}

Among them, cutaneous leishmaniasis (CL) stands out for representing one of the major public health problems, especially in old world countries.⁵ CL is caused by more than 20 *Leishmania* species, commonly classified according to the affected area, in the old-world countries, the occurrence of *L. major* (related to the zoonotic form of the disease), *L. tropica* (main causative

agent of Anthepthonic CL), *L. aethiopica*, and *L. infantum* (rare and sporadic) is common in the new world countries, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis* are observed.^{5,6}

The factors that cause CL to have a significant impact on the health system are: its rapid and dispersed geographical spread, the difficulty of an early and differential diagnosis, which, in turn, brings consequences related to underreporting and therapeutic failure, and the great spectrum of clinical manifestations.⁷ This heterogeneity of manifestations occurs due to a wide variety of protozoan and vector species and is usually classified into: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). Other intermediate forms can be found, such as mucocutaneous, disseminated, or recurrent leishmaniasis.⁸

LCL is represented by defined and easily regenerated lesions, and DCL is a more severe form of the disease, with nodules spread throughout the body, refractory to conventional treatment.¹ Clinically, the lesions will be defined according to the characteristics of the vector, the parasite and the host, the type of immune-cellular response, and the existence of comorbidities, such as leukemia, human immunodeficiency virus (HIV) infection, transplanted, and immunosuppressed patients. Although they

IMAGEM 3 – ARTIGOS PUBLICADOS

Received: 1 April 2020 | Revised: 24 April 2020 | Accepted: 28 April 2020
DOI: 10.1002/ddr.21484



RESEARCH ARTICLE

DDR | WILEY

Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis

Myla Lôbo de Souza¹ | Lucas Amadeu Gonzaga da Costa¹ |
Emerson de Oliveira Silva¹ | André Luiz Moreira Domingues de Sousa¹ |
Widson Michael dos Santos¹ | Pedro José Rolim Neto¹

Laboratory of Technology of Medicines,
Federal University of Pernambuco (UFPE),
Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondence
Myla Lôbo de Souza, Departamento de
Ciência Farmacológica, Av. Prof. Artur de Sá,
S/N - Cidade Universitária, UFPE, CEP
50740-525, Recife, PE, Brazil.
Email: myla.lobo@ufpe.br

Funding Information
Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de
Pernambuco; Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Abstract

Considered prevalent in many countries on five continents, especially in low-income regions, leishmaniasis is a neglected tropical disease classified by World Health Organization as one of the diseases for which the development of new treatments is a priority. It is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, whose species may cause different clinical manifestations, such as cutaneous and visceral leishmaniasis (VL). Treatment is exclusively by drug therapy, as it has not been possible to develop vaccines yet. Currently available drugs are not fully effective in all cases; they have parenteral administration and exhibit a number of serious and very common adverse effects. The only oral drug available is expensive and it is not available in many endemic countries. Injectable administration is the main problem of treatments, since it requires patients to go to health centers, hospitalization and professional administration, which are conditions that are not adapted to the reality of the poverty conditions of patients with the disease. In this context, the development of an oral medicine has become a focus as it may solve many of these issues. Based on this scenario, this review aimed to investigate which therapeutic alternatives have been studied for the development of oral drugs directed to the treatment of human VL.

KEYWORDS

innovation, kala-azar, medicine, oral administration, therapy

1 | INTRODUCTION

Leishmaniasis is a group of neglected tropical diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which has more than 20 species known to be infectious to humans, being transmitted through the bites of infected female sand flies (Burza, Croft, & Bordin, 2018). The epidemiology of leishmaniasis depends on the characteristics of the parasite species, the ecological characteristics of the transmission sites and the current and past exposure of the human population to the parasite. According to World Health Organization (WHO), it is a disease considered prevalent in 98 countries on five continents,

especially in low-income regions. Although the number of cases has decreased substantially in the last decade, it is estimated almost 1 million new cases per year worldwide. Statistics provided by WHO in 2018 pointed that more than 85% of the cases were reported in Latin America, East Africa, Southwest and South Asia (DNDI, 2018; WHO | Leishmaniasis, 2018).

The Visceral Leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is the most severe form of the disease, affecting the lymph nodes, spleen, and liver, causing hepatosplenomegaly, presenting a mortality rate of 75%, reaching 95% if not treated. The global incidence has decreased from 200,000–400,000 new cases in 2012 to 50,000–90,000 in 2017. In

Send Orders for Reprints to reprints.benhamscience.net
Current Pharmaceutical Design, 2020, 26, 1–15

REVIEW ARTICLE

Lipid Nanoparticles as a Skin Wound Healing Drug Delivery System: Discoveries and Advances

Myla Lôbo de Souza¹, Widson Michael dos Santos¹, André Luiz Moreira Domingues de Sousa¹, Victor de Albuquerque Wanderley Sales¹, Fernanda Pontes Nóbrega¹, Marcos Victor Gregorio de Oliveira¹ and Pedro José Rolim Neto^{1,*}

¹Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Abstract: Chronic wounds are a remarkable cause of morbidity, requiring long-time treatments with a significant impact on the quality of life and high costs for public health. Although there are a variety of topical skin preparations commercially available, they have several limitations that frequently impair wound healing, such as drug instability, toxicity, limited time of action and ineffective skin penetration. In recent years, researchers have focused on the development of new effective treatments for wound healing and chronic frequent interest in nanoscale drug delivery systems to overcome such obstacles. In dermatology, lipid nanoparticles (LNPs) have received great attention from researchers due to their great functionalities, greater adhesion to the skin and film formation, enabling the hydration and maintenance of skin integrity, as well as prevent a more effective penetration through the skin barrier. This review provides an update on topical formulations based on Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as wound healing treatments. Both SLNs and NLCs are able to increase solubility and stability of active pharmaceutical ingredients and increase skin penetration compared to the free drugs. Additionally, SLNs and NLCs can increase pharmacological activity, increase the release profile of the drugs, promote synergistic effects and improve the sensory properties of the final formulation. Topical dosage forms containing nanoparticles have been extensively evaluated for wound healing activity, mainly the dressings, films and scaffolds. Therefore, lipid nanoparticles have contributed in improving wound healing therapies when incorporated into other dosage forms with better efficacy and lower adverse effects than conventional formulations.

ARTICLE HISTORY

Received: January 30, 2020

Accepted: April 11, 2020

DOI:

10.1002/ddr.21484

Keywords: Nanocarriers, lipid nanoparticles, cicatrization, wound healing, topical use, skin penetration.

1. INTRODUCTION

Wound healing is a complex process that contains coordinated and dynamic processes, including homeostasis, inflammation, proliferation and remodeling (Fig. 1). When an injury occurs, the initial phase is always an effusion of lymphatic fluid and blood. It is during this process that adequate hemostasis is achieved, initiating the inflammatory phase. At this stage, both white blood cells and thrombocytes accelerate the inflammatory process, releasing more mediators and cytokines, attracting many cells by chemotaxis. Macrophages are essential cells in the transition from the inflammatory to the proliferative phase, as they produce growth factors that attract fibroblasts to the wound and stimulate them to produce collagen fibers. Thus, the proliferative phase is characterized by the process of collagen deposition, neoangiogenesis, formation of granulation tissue and reepithelialization, where the migration of cells from the periphery of the wound and adjacent edges occurs. Initially, only a thin superficial layer of epithelial cells is deposited, generating a thicker and more durable layer of cells that closes the wound over time. Finally, the remodeling phase results in the strengthening and remodeling of collagen fibers, which are reorganized. This process can be observed clinically as the scar reduces in size, becomes thin and loses its intense red tone due to less vascularization [1–3]. This process aims to recombine missing and

devitalized cell structures and tissue layers, restoring the skin barrier function and protecting the body against unwanted influences from the environment, fluid imbalance, and thermal dysregulation [3–5]. Despite a great body of literature concerning wound healing mechanisms, there has been an ongoing expansion to not only understand the vast array of its intrinsic and extrinsic factors, but also the intracellular, extracellular, molecular, and biochemical mechanisms and interactions that facilitate this process [6,7].

The time course between an acute versus chronic wound can be divided when healing requires more than six weeks, which brings serious implications for the patient's quality of life [8–10]. However, the main difference between acute and chronic wounds is that the latter stagnate in a permanent inflammatory state, hindering the healing process, as inflammation maintains a constant infiltration of inflammatory cells, which produce an excessive amount of enzymes and reactive oxygen species that degrade healing mediators [11–13]. In addition, prolonged and open lesions present higher chances of infections, endangering the life of the patient [14,15]. In this sense, many research studies have focused on the pathophysiology of wound healing, showing several targets for the development of topical therapies [13,17]. However, conventional topical skin preparations have some disadvantages, such as the unavailability of using unstable active pharmaceutical ingredients (APIs), the lack of protection of APIs against enzymatic degradation, which makes the use of protein-based biomolecules undesirable, adverse effects triggered by drug toxicity, short action time, and ineffective skin permeation [18–20].

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; E-mail: pedrorolim.neto@gmail.com