



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARIA CLARA CAVALCANTE ERHARDT

**CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO NITRATO
DE GÁLIO COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA INFECÇÕES
CUTÂNEAS**

RECIFE – PE

2024

MARIA CLARA CAVALCANTE ERHARDT

**CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO NITRATO
DE GÁLIO COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA INFECÇÕES
CUTÂNEAS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
Coorientadora: Myla Lôbo de Souza

RECIFE - PE

2024

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Erhardt, Maria Clara Cavalcante.

Carreador lipídico nanoestruturado contendo nitrato de gálio como alternativa terapêutica para infecções cutâneas. / Recife. – 2024.

89f. : il., fig.

Orientador: Pedro José Rolim.

Coorientadora: Myla Lôbo de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2024.

Inclui referências.

1. Infecções cutâneas. 2. Administração tópica. 3. Nanocarreador. 4. Fármacos - sistemas de entrega. 5. Resistência bacteriana I. Rolim, Pedro José. (Orient.). II. Souza, Myla Lôbo de. (Coorient.). III. Título.

MARIA CLARA CAVALCANTE ERHARDT

**CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO NITRATO
DE GÁLIO COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA INFECÇÕES
CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 30 / 04 / 2024 .

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Widson Michael dos Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Douglas Dourado Oliveira (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães - Pernambuco

Este trabalho é dedicado à minha mãe, Karla, minha irmã, Manuela, aos meus avós, Joaquim e Luza, e a todos os amigos e familiares que acreditaram em mim até quando eu desacreditei. Amo cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para superar o cansaço, as noites sem dormir, as inúmeras dificuldades encontradas no caminho da vida adulta. Agradeço por ter me mostrado que eu sou capaz e independente, e por ter inserido pessoas maravilhosas e essenciais em todas as etapas da minha vida.

À minha mãe, Karla, por sempre me incentivar e nunca duvidar do meu potencial, por nunca permitir que me faltasse nada, muito menos a educação. Tudo isso foi e é por você.

À minha irmã, Manuela, por ser uma das maiores incentivadoras da minha vida profissional. Aos meus avós, Joaquim e Luza, por todo afeto e investimento na construção do meu ser. Em especial ao meu avô, cujo um dos seus sonhos eu já consegui realizar: alcançar o diploma da graduação. Agora o sonho foi renovado: me ver alcançar o título de mestre. Vô, essa vitória é nossa.

À toda minha família.

Aos meus professores, obrigada por enxergarem potencial onde nem eu enxergava.

Ao IFPE, por ter aberto meus horizontes, por ter influenciado completamente na pessoa que sou hoje, por ter me dado a oportunidade de aprender com mestres e doutores tão incríveis que eu jamais poderia me imaginar tão capaz quanto eles. Hoje em dia estou chegando um degrau mais perto.

Obrigada especialmente ao grupinho Angry Birds: Lorena, Carol, Mica, Vitor, Kita, Ariane, Breninho, Teté, Ramon, Rayssa e Júlio. Seguem comigo desde o curso técnico e sei que me acompanharão em todas as outras etapas da vida.

À Maria Fernanda e Patrícia, que foram os presentes mais recentes que a profissão me deu. Dividiram comigo as dores e as angústias de um futuro incerto, mas nunca deixaram de me ajudar, mesmo estando tão exaustas quanto eu.

A John, por me inspirar a ser uma pessoa mais calma e positiva.

Aos meus queridos amigos e monitores, Luísa Almeida e Marcondes que desde o início me incentivaram a investir na pós-graduação.

Aos meus amigos de classe da faculdade: Isa, Guido, Mica, Dudinha, Netão e Heloísa. Foram cinco anos de parceria e incentivo mútuo, e, apesar da distância, meu eu profissional não teria sido o mesmo sem vocês.

À Clara Andrade, por ser a amiga mais fuleira de todos os tempos, mas que eu tenho plena certeza que torce por mim da forma mais genuína possível.

Aos meus amigos Fábio e Paulo Sabino, por estarem comigo em todos os momentos e por trazerem palavras de conforto e cheias de otimismo em todas as ocasiões.

A Lourenço, que foi uma das pessoas que mais acreditou em mim, que sempre me dirigiu uma palavra de conforto e de compadecimento. Nossas conversas matinais foram essenciais para eu não desistir.

À Myla, que nunca desistiu de tentar me ajudar, que me deu puxões de orelha necessários e que sempre se dispôs a sanar minhas dúvidas. Sigo dizendo que ela é uma inspiração desde a época do meu trabalho de conclusão de curso.

A Emerson, por desde a minha época de iniciação científica ser sempre tão disponível e prestativo, e por me acalmar nos momentos caóticos.

A Victor, que mesmo do outro lado do mundo continua me ajudando sempre que necessário.

À Fernanda, que sempre compreendeu minhas inquietações da vida profissional e que fez meus dias no laboratório mais alegres quando ela estava presente.

À equipe de nanotecnologia do LTM por toda troca de conhecimentos.

Aos demais integrantes do grupo de pesquisa e a todos que já passaram por lá e contribuíram imensamente para minha construção como pesquisadora, como: Ilka, Taysa, Camila, Marcos, entre outros.

Ao professor Pedro Rolim, que me acolheu no laboratório e me orientou com muito profissionalismo durante cerca de cinco anos de pesquisa que passaram por: iniciação científica, TCC e mestrado. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos integrantes do CRCN, professor Elvis e Alesx, por serem sempre prestativos, e à professora Thayza Stamford, pelos ensinamentos na área da microbiologia e por ser tão gentil na arte de ensinar.

À minha banca, Widson, que eu tanto admiro e que é sempre tão gentil e compreensivo, e a Douglas, que eu já admirava pelo seu trabalho, e agora admiro mais ainda por ter se esforçado para contribuir com a reta final do meu trabalho.

Ao meu namorado, Lucas Clemente, que me conheceu na fase caótica de final de mestrado e que sempre foi tão paciente, incentivador e compreensível. Obrigada por me ajudar a manter a sanidade e por todas as massagens depois de tantos dias cansativos.

À minha psicóloga, Luciana, por ajudar a acalmar o turbilhão de pensamentos de uma pessoa ansiosa e por me fazer entender que nem todas as coisas dependem de mim.

Aos preceptores de toda a minha jornada.

Aos profissionais da UFPE que contribuíram de forma direta ou não para a minha formação, assim como os órgãos de fomento (CNPq e CAPES).

Aos tantos outros não citados, saibam que vocês também são fundamentais para mim. Sem todos vocês, nada disso seria possível. Obrigada!

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e,
ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva
por toda a humanidade.”*

(Marie Curie)

RESUMO

Atualmente, grande parte do tratamento para as infecções cutâneas é realizado com medicamentos antimicrobianos, que, devido ao seu uso irracional e a sua prescrição indiscriminada, tem ocasionado o fenômeno da resistência bacteriana. Estudos demonstram a importância da captação de ferro pelas bactérias ferro dependentes. Nesse sentido, o Ga^{3+} surge como alternativa, visto que apresenta mimetismo com o Fe^{3+} e perturba os processos biológicos de microrganismos, reduzindo assim, a chance de desenvolvimento de resistência terapêutica, além de apresentar uma atividade anti-inflamatória potencial. Diante desse fator, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma alternativa para o tratamento de infecções a base de nanopartículas de origem lipídica para encapsulação de nitrato de gálio. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo nitrato de gálio foram produzidos por meio da técnica de dupla emulsificação por ultrassom, onde otimizações de formulação e de processo foram feitas através de planejamento experimental. O CLN que, através do planejamento, possibilitou a escolha da nanopartícula com melhor tamanho, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulamento (EE) foi caracterizado por valor de pH, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), ensaio da membrana córneo-alantoide (HET-CAM), avaliação do efeito oclusivo, bem como foi realizada a estabilidade de armazenamento. O planejamento experimental do tipo central composto resultou em um CLN com tamanho de 41,13 nm, PdI de 0,188, PZ de -7,512 mV, EE de 80,51% e pH 5,23. O FTIR confirmou a incorporação do nitrato de gálio no CLN e o DSC mostrou redução de cristalinidade da matriz da nanopartícula. O MET mostrou a morfologia esférica das partículas. No ensaio de HET-CAM não foi verificada toxicidade e irritação do CLN contendo Gálio e o efeito oclusivo foi acima de 35%. Portanto, foi possível obter CLN com propriedades físico-químicas e estabilidade adequadas, os quais são resultados encorajadores quanto ao potencial do sistema para uso em infecções cutâneas. Contudo, estudos de liberação e permeação cutânea, e também de avaliação de atividade antimicrobiana deverão ser desenvolvidos para garantir a viabilidade da formulação.

Palavras-chave: Infecções Cutâneas; Administração Tópica; Nanocarreador; Sistema de Entrega de Fármacos; Resistência Bacteriana.

ABSTRACT

Currently, a large part of the treatment for infectious infections is carried out with antimicrobial drugs, which, due to their irrational use and indiscriminate prescription, have caused the characteristics of bacterial resistance. Studies demonstrate the importance of iron uptake by iron-dependent bacteria. In this sense, Ga^{3+} appears as an alternative, as it mimics Fe^{3+} and disrupts the biological processes of microorganisms, thus reducing the chance of developing therapeutic resistance, in addition to presenting potential anti-inflammatory activity. Given this factor, the present work aims to develop an alternative for the treatment of infections based on nanoparticles of lipid origin for gallium nitrate encapsulation. Nanostructured lipid carriers (CLN) containing gallium nitrate were produced using the double ultrasound emulsification technique, where formulation and process optimizations were made through experimental planning. The CLN that, through planning, made it possible to choose the nanoparticle with the best size, polydispersity index (PDI), zeta potential (PZ) and encapsulation efficiency (EE) was characterized by pH value, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Transmission Electron Microscopy (MET), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), chorio-allantoic membrane assay (HET-CAM), evaluation of the occlusive effect, as well as storage stability. The central type experimental design was composed in a CLN with a size of 41.13 nm, PDI of 0.188, PZ of -7.512 mV, EE of 80.51% and pH 5.23. FTIR confirmed the incorporation of glyum nitrate into CLN and DSC showed a reduction in crystallinity of the nanoparticle matrix. The MET showed the spherical morphology of the particles. In the HET-CAM test, the toxicity and safety of CLN containing Gallium were not verified and the occlusive effect was above 35%. Therefore, it was possible to obtain CLN with adequate physicochemical properties and stability, which are encouraging results regarding the potential of the system for use in infections. However, defined release and permeation studies, as well as antimicrobial activity evaluation, must be developed to guarantee formulation prediction.

Keywords: Skin Infections; Topical Administration; Nanocarrier; Drug Delivery System; Bacterial Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fases da cicatrização de feridas	22
Figura 2 – Mecanismo de expulsão dos ativos da NLS durante a estocagem e sua transição para um cristal lipídico ordenado	28
Figura 3 – Diferença da matriz lipídica de NLS e CLN	28
Figura 4 – Estrutura química do Nitrato de Gálio	32
Figura 5 – Curva de Calibração.....	40
Figura 6 – Etapas para realização do HET-CAM.....	44
Figura 7 – Aspecto visual das amostras após 24h de repouso utilizando o Span 80® e Tween 80®	46
Figura 8 – Aspecto visual das amostras após 24h de repouso utilizando o Span 80® e Alkest CSO 300®	47
Figura 9 – Gráfico de Pareto para avaliação da variável de tamanho no planejamento experimental	51
Figura 10 – Gráfico de Pareto para avaliação da variável de PdI no planejamento experimental	51
Figura 11 – Gráfico de Pareto para avaliação da variável de potencial zeta no planejamento experimental	52
Figura 12 – Gráfico de superfície resposta para a variável tamanho em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan 118	53
Figura 13 – Gráfico de Pareto para avaliação da variável de potencial zeta no planejamento experimental	55
Figura 14 – Gráfico de Pareto para avaliação da variável de PdI no planejamento experimental	56
Figura 15 – Gráfico de Pareto para avaliação da variável de tamanho no planejamento experimental	56

Figura 16 – Gráfico de Pareto para avaliação da eficiência de encapsulamento no planejamento experimental	57
Figura 17 – Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro (A) e eficiência de encapsulamento (B) e PdI (C) em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das formulações feitas com Dynasan 118 contendo o fármaco.....	58
Figura 18 – Curva de DSC das substâncias isoladas, mistura física e nanopartículas	60
Figura 19 – Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, mistura física e nanopartículas	62
Figura 20 – Microfotografias obtidas por MET do CLNGa	64
Figura 21 – Microfotografias obtidas por MET do CLNBr	65
Figura 22 – Gráfico das variações de tamanho, PdI e potencial zeta no CLNBr armazenado em condições de refrigeração	67
Figura 23 – Gráfico das variações de tamanho, PdI e potencial zeta no CLNGa armazenado em condições de refrigeração	68
Figura 24 – Determinação do potencial de irritação pelo ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM)	71
Figura 25 –Potencial de Oclusão das amostras de água, da solução de nitrato de gálio e da nanopartícula contendo o nitrato de gálio.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporções de tensoativos para formulações contendo Span 80 e Tween 80.....	36
Tabela 2 – Proporções de tensoativos para formulações contendo Span 80 e Alkest CSO 300 ...	36
Tabela 3 – Variáveis utilizadas no planejamento composto central para ensaios com CLN sem fármaco	38
Tabela 4 – Variáveis utilizadas no planejamento composto central para ensaios com CLN com fármaco	39
Tabela 5 – Parâmetros utilizados para obtenção dos CLN	48
Tabela 6 – Matriz do planejamento experimental feito com Dynasan 118 mostrando as variáveis dependentes e independentes	54
Tabela 7 – Matriz do planejamento experimental feito com Dynasan 118 mostrando as variáveis dependentes e independentes	58
Tabela 8 – Valores encontrados de pH para CLNBr (sem fármaco) e CLNGa (com fármaco)....	68
Tabela 9 – Valores encontrados para eficiência de encapsulamento no decorrer do estudo de estabilidade	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
DLS	Dispersão de luz dinâmica (Dynamic light scattering)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR-X	Difração de Raios-X
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
FTIR	Espectroscopia de Absorção no IV com Transformada de Fourier
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
°C	Graus Celsius
μM	Micrometro
%	Porcentagem
cm ³	Centímetro cúbico
Fe	Elemento químico Ferro
Fe ²⁺	Cátion ferroso
Fe ³⁺	Cátion férrico
g	Gramas
Ga	Elemento químico Gálio
Ga ³⁺	Cátion gálico
h	Hora
Kv	Kilovolt
kN	Quilonewton
L	Litro
m	Metro
mA	Miliampère
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
sccm	Centímetros cúbicos de gás por minuto
min	Minutos
mW	Megawatt
μg/mL	Microgramas por mililitro
mg/mL	Miligramas por mililitro
mg	Miligramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 A pele e infecções de feridas	21
3.1.2 Tratamento de Infecções Cutâneas	21
3.2 Administração tópica	24
3.3 Nanopartículas	26
3.3.1 Nanopartículas lipídicas	27
3.4 Método de caracterização dos CLN	29
3.4.1 Espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta	29
3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	30
3.4.3 Eficiência de Encapsulação (EE).....	31
3.5 Nitrato de gálio	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material	35
4.2 Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)	35
4.3 Planejamento Experimental	37
4.4 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)	38
4.5 Caracterização físico-química dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados	39
4.5.1 Determinação do potencial Zeta, do índice de polidispersão e do diâmetro das partículas .	39
4.5.2 Determinação da eficiência de encapsulação	39
4.5.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	41
4.5.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	41
4.5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	41
4.6 Avaliação da estabilidade dos CLN	42
4.6.1 Aspecto macroscópico	42
4.6.2 Determinação do pH.....	42
4.6.3 Determinação do potencial Zeta, do índice de polidispersão e do diâmetro das partículas .	42

4.7 Avaliação do efeito oclusivo	42
4.8 Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM)	44
4.9 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)	46
5.2 Planejamento Experimental	48
5.3 Caracterização dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)	60
5.3.1 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	60
5.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	60
5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	63
5.4 Estabilidade de Armazenamento	65
5.4.1 Aspecto macroscópico.....	65
5.4.2 Determinação do pH.....	65
5.4.3 Características físico-químicas	66
5.4 Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM)	70
5.4 Avaliação do efeito oclusivo	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são uma classe de fármacos que inovaram no tratamento de doenças infecciosas e no avanço da medicina, diferenciando-se em suas respectivas classes de acordo com suas propriedades (Da Costa & Silva Junior, 2017). As características de um antibiótico ideal incluem: um fármaco com alvo seletivo, com baixo nível tóxico e elevados níveis terapêuticos, poucos efeitos adversos, sem afetar a microbiota saprófita, ter boa distribuição no local de infecção e não induzir resistência, entre outros. No entanto, todas essas características são difíceis de serem obtidas, o que leva ao baixo interesse da indústria farmacêutica a inserir novos fármacos no mercado, reforçando o uso irracional dos medicamentos já presentes no mercado, contribuindo para a disseminação de bactérias resistentes e reduzindo as opções de fármacos efetivos para a terapia medicamentosa (Baptista, 2013; Costa, 2016; Costa, 2017).

Medidas alternativas para evitar os constantes avanços da resistência antimicrobiana estão sendo amplamente pesquisadas, como o uso de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) metálicos, que interferem no metabolismo bioquímico de microrganismos dependentes de ferro (Deleon *et al.*, 2009; Lessa, 2012; Rai, 2013; Sales *et al.*, 2020; Timotéo *et al.*, 2020). O mecanismo de ação desses metais está frequentemente associado a interferências em funções celulares críticas, como síntese de DNA e resistência ao estresse oxidativo (Abdalla *et al.*, 2015). Pesquisadores demonstraram a atividade de compostos de gálio, como o Nitrato de Gálio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) contra a ação de bactérias de diferentes espécies e de fungos. Dessa forma, o gálio (III) atua como um “cavalo de Tróia” nas células dependentes de ferro, uma vez que não é reduzido ao gálio (II), impedindo a síntese de DNA em microrganismos patogênicos (Choi, Britgan & Narayanasamy, 2019). Atualmente, o Gálio (III) vem sendo estudado em diversas pesquisas como um potente agente anti-inflamatório. Bibi *et al.* (2014) e House *et al.* (2001) observaram que formulações contendo o Gálio (III) apresentaram feridas com menor grau de inflamação e menor área de trauma, assim como feridas infectadas pareciam fechar mais rápido com essas formulações (Sales *et al.*, 2020). Por isso, é importante que o medicamento usado no tratamento possua tais funções farmacológicas e seja adequado para uso na pele.

As preparações convencionais para uso tópico apresentam algumas desvantagens, como: facilidade de degradação enzimática, toxicidade e efeitos adversos, curto tempo de ação e permeação ineficaz, sendo este último a principal limitação por não alcançarem o local e/ou o

microrganismo alvo. Dentre as possibilidades de contornar esse problema, encontra-se o uso dos nanocarreadores, que atuam como *Drug Delivery System*, que proporcionam vantagens como: proteção do insumo farmacêutico de produtos químicos ou enzimáticos, proteção contra hidrólise, oxidação, inativação e decomposição, fotoestabilidade, aumento da solubilidade e biodisponibilidade, e também permite boas interações com fluidos fisiológicos e células, além de propiciarem um medicamento de ação prolongada, sendo possível a diminuição da concentração aplicada, frequência de administração e consequente diminuição da toxicidade (De Souza *et al.*, 2020).

As nanopartículas possuem propriedades físico-químicas singulares e muitas vezes aprimoradas quando comparadas às partículas com escalas maiores. Há diversas maneiras de categorizar as nanopartículas de acordo com sua composição química: orgânicas, inorgânicas e baseadas em carbono. Dentre elas, estão as nanopartículas lipídicas, as quais apresentam maior estabilidade, biocompatibilidade e maior aderência à pele em comparação às formulações convencionais. Além disso, formulações contendo nanopartículas tendem a aderir melhor à pele do que as formulações convencionais, devido, principalmente, ao tamanho da partícula e sua superfície de contato, que favorece a interação com a pele e permite uma distribuição mais uniforme dos ativos sobre a superfície cutânea, e tem uma maior capacidade de penetração, resultando em uma maior absorção de ativos. Durante o processo de cicatrização, também promovem o rearranjo e fluidização do estrato córneo, facilitando a permeabilidade do fármaco e formando uma área de oclusão na forma de película, prevenindo a desidratação e contaminação microbiana, favorecendo o reparo e a integridade da pele (De Souza *et al.*, 2020; Sanfelice *et al.*, 2022; Selmani *et al.*, 2022).

Diante da relevância que a resistência antimicrobiana apresenta no âmbito da saúde pública e o estigma social existente frente às infecções cutâneas crônicas, o desenvolvimento de medicamentos à base de nanoestruturas de gálio surge como uma alternativa promissora aos medicamentos convencionais para uso tópico, apresentando uma excelente margem de segurança e risco reduzido para o desenvolvimento de resistência terapêutica, além de garantir o alcance de microorganismos devido à alta difusão nos tecidos. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de um carreador lipídico nanoestruturado a base de nitrato de gálio para posterior incorporação em uma forma farmacêutica semissólida que atuará contra as infecções cutâneas, representando uma alternativa terapêutica de grande relevância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um carreador lipídico nanoestruturado contendo nitrato de gálio para o tratamento de infecções cutâneas.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver o carreador lipídico nanoestruturado contendo nitrato de gálio através de planejamento experimental (DoE);
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos carreadores lipídicos nanoestruturado (CLN) obtidos;
- Avaliar a estabilidade dos CLN;
- Avaliar o efeito oclusivo dos CLN;
- Realizar o ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM) da solução do nitrato de gálio e do CLN;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A pele e infecções de feridas

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, mantém a homeostase fisiológica do corpo, serve como reservatório de água e lipídeos, e apresenta funções na síntese de vitamina D e na excreção de água e sais. Além disso, sua estrutura é formada por queratinócitos, que produzem lipídeos que mantêm a hidratação da pele e criam a funcionalidade de barreira protetora, e pela presença de um tecido epitelial complexo que está susceptível a agressões que podem afetar a sua estrutura, levando a incapacidade funcional (Doughty, 2016; Lai-Cheong; Mcgrath, 2017; Mufti *et al.*, 2016; Voegeli *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017a).

Estima-se que 1 cm³ de pele contenha até três milhões de bactérias constituindo a microbiota saprófita (geralmente inofensivas). Contudo, em condições específicas, como no caso do rompimento das barreiras protetoras da pele, muitos desses microrganismos podem se tornar patogênicos e favorecer o desenvolvimento de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, caracterizada por crescerem em áreas da pele que contenham dobras, sendo úmidas e quentes, como no caso da axila e da virilha (Cogen; Nizet; Galo, 2008; Fredericks, 2008; Sales, 2020). Tais fatos podem acarretar o surgimento de feridas na pele.

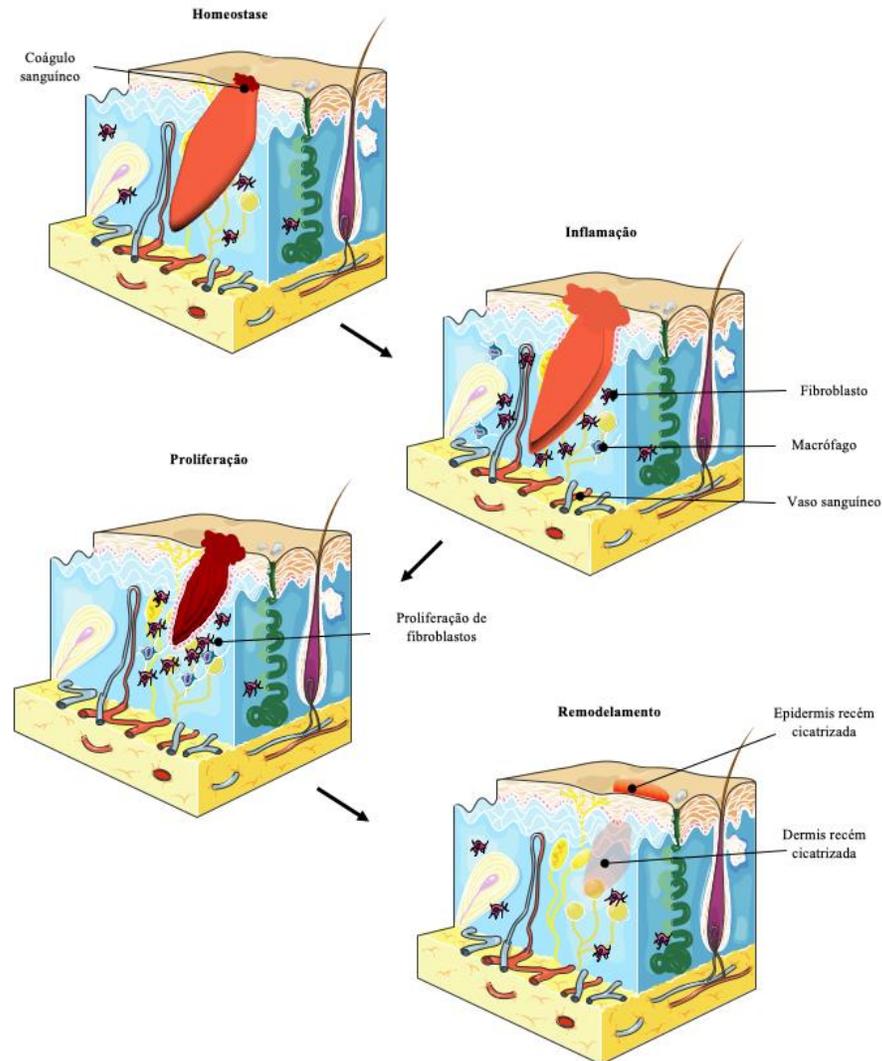
O surgimento de ferimentos, ulcerações e dermatoses constitui um problema de saúde pública que afeta a qualidade de vida da população, acarreta elevados gastos e também leva ao surgimento de um estigma social frente às suas manifestações clínicas (Resende *et al.*, 2006; Singh; Young; Mcnaught, 2017). Uma vez formados, os ferimentos podem ser classificados em feridas agudas e feridas crônicas, que são ocasionadas por traumas mecânicos ou associadas a deficiências fisiológicas que favorecem um estado inflamatório permanente e maiores chances de infecções, respectivamente (Diegelmann; Evans, 2004; Sheehan *et al.* 2006; Eming; Krieg; Davidson, 2007; Stojadinovic *et al.* 2008; Lee; Hansen, 2009; Sales, 2020).

3.1.2 Tratamento de Infecções Cutâneas

O processo da cicatrização de feridas é dividido em quatro fases: homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento, onde pode ser ocasionada a dor e dificuldade na restauração da

função do tecido (Oliveira; Castro; Granjeiro, 2013; Singh; Young; Mcnaught, 2017). Durante a hemostasia, forma-se um coágulo reparativo através da saída do sangue e da linfa, seguida de uma vasodilatação com influxo de trombócitos e células sanguíneas, iniciando a fase inflamatória com liberação de mediadores e citocinas (Reinke; Sorg, 2012; Mercandetti; Cohen, 2017). Na fase proliferativa, tem-se a deposição de colágeno e formação do tecido de re-epitelização, fechando a ferida com o passar do tempo (Reinke; Sorg, 2012; Sorg *et al.*, 2017). Na maturação, tem-se a remodelação e fortalecimento das fibras de colágeno, diminuindo a cicatriz e o tom vermelho. Esses processos podem ser visualizados na figura 1.

Figura 1 - Fases da cicatrização de feridas.



Fonte: adaptado de de Souza *et al.*, 2020.

Atualmente, existem três condutas para o tratamento de feridas: o encerramento primário com a utilização de material de sutura, a cicatrização secundária, sem intervenção cirúrgica, e a terciária, onde as feridas são fechadas cirurgicamente, após um período de cicatrização secundária. Além disso, pelo processo de cicatrização consumir muita energia, se faz necessário um estado nutricional apropriado, que demanda absorção de macro e micronutrientes para favorecer a restauração da integridade da pele. Ademais, além da alimentação, a radiação, uso de medicamentos, como os antiinflamatórios não esteroides (AINES), álcool, nicotina e fatores genéticos também podem dificultar o processo de cicatrização. (Almadani, Y. H. *et al.* 2021)

O gerenciamento da cicatrização de feridas visa obter a cura de maneira rápida e eficiente, com diminuição da dor, prevenção de infecções e restauração da função normal do tecido. Quando a ferida não pode ser tratada por meio do fechamento primário, curativos oclusivos podem apresentar relevância na cicatrização, devido ao fato da atração apresentada por macrófagos à ambientes úmidos, acelerando o processo de cicatrização e dificultando a desidratação celular (Devriendt; Rooste, 2017; Vowden; Vowden, 2017; Sales, 2020).

As infecções microbianas podem interferir na cicatrização de feridas de diversas maneiras, seja causando uma inflamação crônica no local da ferida, liberando enzimas e toxinas que destroem o tecido saudável ao redor da ferida, interferindo na migração de células importantes para o processo de cicatrização, como fibroblastos e células imunológicas (que compõem o tecido de granulação e reepitelização), diminuição da produção de colágeno (crucial na formação da matriz extracelular necessária para cicatrização), assim como podem retardar a neovascularização e sobrecarregar o sistema imunológico. Portanto, é crucial prevenir e tratar as infecções adequadamente durante o processo de cicatrização (Bernardes, 2020; Tabari, 2018).

Atualmente, o tratamento para infecções ocasionadas por bactérias e fungos se dá através do uso de antissépticos e antibióticos/antifúngicos, entretanto, esse tratamento apresenta limitações. No uso de antibióticos sistêmicos, pode ocorrer de não haver uma concentração bactericida efetiva *in situ*, levando ao desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento, devendo ser associado à terapia local (Daeschlein, 2013).

3.2 Administração Tópica

A administração tópica de fármacos é uma abordagem interessante para tratar doenças de pele, evitar dor e baixa adesão do paciente nos casos em que uma administração injetável é necessária. Possui vantagem da liberação *in situ*, que comparada à administração oral acarreta maior concentração no local de ação, sem efeito de primeira passagem e baixa excreção. No entanto, o estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, protege fortemente o organismo da entrada de substâncias, principalmente as hidrofílicas (Petrili & Lopez, 2018). Nesse sentido, a escolha da forma farmacêutica ideal para administração tópica de fármacos deve ser considerada para um tratamento eficaz.

Atualmente existem diversos tipos de formas farmacêuticas semissólidas, sendo as principais:

Pomadas: Preparações semissólidas que contêm uma fase oleosa (como vaselina ou lanolina) e uma fase aquosa, tem ação emoliente ou protetora. São agentes hidratantes que se mantêm fixos no local de aplicação e, devido à sua adesividade, podem obstruir poros, diminuindo a transpiração e favorecendo os edemas; por isso, são contraindicadas em lesões agudas, pois diminuem a troca gasosa cutânea, acentuando o processo inflamatório. Elas são usadas principalmente para aplicação na pele ou em mucosas (nasal, vaginal, ocular e anal) e podem ser medicamentosas ou não (UETA, 2016).

Crems: Similar às pomadas, os cremes são emulsões semissólidas com a substância medicamentosa dissolvida ou suspensa na fase aquosa ou oleosa. No geral, possuem efeitos mais lentos e intensos que as pomadas, mas sua consistência é mais suave e fácil de espalhar (UETA, 2016).

Geles: São formulações semissólidas transparentes ou translúcidas que contêm uma fase aquosa dispersa em um gelificante (gel hidrofílico), considerados dispersões coloidais. Possuem partículas inorgânicas ou grandes moléculas orgânicas encerradas por um líquido. Eles são frequentemente usados para aplicação na pele, como em géis de banho ou géis de cabelo, mas também podem ser usados para administração tópica de medicamentos (UETA, 2016).

Pastas: Preparações semissólidas espessas que geralmente contêm um alto teor de sólidos, como argilas ou óxido de zinco. Elas são usadas principalmente para proteção da pele ou tratamento de condições dermatológicas específicas (UETA, 2016).

Unguento: São espécies de pomadas mais resistentes, consistentes e estáveis. Contém resina, além da base, e são utilizados quando se necessita de um maior tempo de ação e um efeito de proteção nas superfícies externas sem elasticidade (UETA, 2016).

Emplastos: Base adesiva contendo um ou mais princípios ativos distribuídos em uma camada uniforme num suporte apropriado feito de material sintético ou natural. Atua como protetor ou agente queratolítico, possuem consistência firme que amolece em contato com a pele, originando uma massa plástica e adesiva (UETA, 2016).

Nos sistemas semissólidos, as moléculas de fármaco são liberadas, com maior ou menor dificuldade, consoante a atividade termodinâmica. Quanto maior for a atividade termodinâmica, mais facilmente o fármaco se liberta do veículo. A viscosidade do veículo também afeta a liberação do fármaco de uma forma inversamente proporcional, ou seja, quanto menor for a viscosidade do veículo, maior será a difusão do fármaco. No caso inverso, em altas viscosidades, a penetração do IFA é dificultada de diversas maneiras, dentre elas inclui-se a formação de uma barreira física que dificulta a dispersão uniforme do fármaco sobre a pele, tempo de contato reduzido entre o fármaco e a pele e, além disso, pode interferir na capacidade do IFA de penetrar nas camadas mais profundas da pele, limitando a eficácia do tratamento especialmente quando se faz necessário atingir tecidos específicos ou microrganismos alvo abaixo da superfície da pele (Gatieri T., Gelfuso G., Lopez R., 2008; Geng *et al.*, 2021).

Sistemas de entrega de fármacos correspondem a uma forma inovadora de administração de medicamentos e vêm sendo largamente utilizados para administração via tópica e transdérmica de fármacos. Essa administração baseia-se na aplicação local do medicamento através das vias dérmica e mucosa, sendo a pele o órgão mais acessível do corpo humano para esta forma de aplicação. O sistema de liberação do fármaco pode ser considerado dérmico ou transdérmico, o primeiro se refere ao fármaco direcionado à pele, enquanto o último, o fármaco tem que atravessar as camadas da pele para atingir seu alvo (Lasoñ E., 2020). Esses sistemas podem ser veiculados em formas farmacêuticas semissólidas para facilitar a penetração e permeação na pele, principalmente de IFAs hidrofílicos.

3.3 Nanopartículas

As nanopartículas são partículas com dimensões que variam de 1 a 1000 nanômetros (nm), e podem ser produzidas a partir de diversos materiais, como metais, óxidos, polímeros, entre outros, e apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas distintas em relação às suas formas macroscópicas. Devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas têm uma grande área de superfície, o que permite interações mais intensas com outras substâncias, como moléculas e células. Além disso, sua escala também permite que elas sejam facilmente modificadas para diferentes aplicações, como na indústria, medicina, eletrônica, entre outras áreas. Entretanto, a nanotecnologia na área da saúde apresenta inúmeros desafios atuais a serem enfrentados como estudos toxicológicos, pré-clínicos e clínicos, *scale-up*, regulamentação e de investimentos privados (Vassan *et al.*, 2019). Existem diversos tipos de nanopartículas, que podem ser classificadas de acordo com suas propriedades físicas, químicas e biológicas, bem como sua composição e forma. As nanopartículas têm sido cada vez mais exploradas na indústria farmacêutica devido às suas propriedades únicas, que podem melhorar a eficácia e a segurança dos medicamentos (dos Santos, 2014).

Atualmente, as nanopartículas têm sido amplamente utilizadas para melhorar a penetração cutânea de fármacos, visto que a pele é uma barreira protetora do corpo que impede ou dificulta a penetração de substâncias, incluindo fármacos, limitando a eficácia de muitas terapias. As nanopartículas são capazes de ultrapassar a barreira da pele de maneira tamanho dependente, devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, que permitem a penetração nas camadas mais profundas da pele, além de uma liberação controlada do fármaco. Apesar da penetração já ser facilitada no caso de um estrato córneo que não está íntegro, há estudos que relatam a fraca penetração de substâncias ativas, baixa incorporação pelas células e pouco alcance de microrganismos devido a baixa difusão nos tecidos, reafirmando a necessidade de nanocarreadores, principalmente para IFAs com limitações biofarmacêuticas (de Souza *et al.*, 2020). No entanto, é importante ressaltar que a utilização de nanopartículas em formulações cutâneas deve ser cuidadosamente avaliada para garantir a segurança e a eficácia do tratamento, uma vez que as nanopartículas podem apresentar efeitos tóxicos e imunológicos indesejados se não forem adequadamente desenvolvidas e testadas (dos Santos, 2014).

3.3.1 Nanopartículas lipídicas

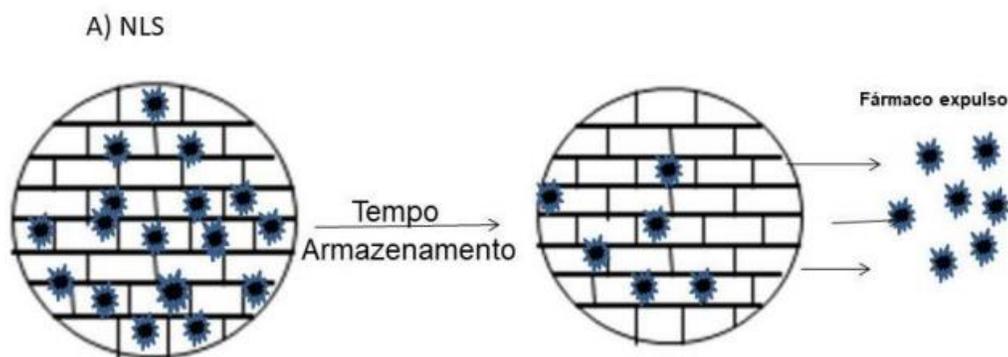
São partículas compostas por lipídios, que podem ser utilizadas em diversas aplicações, como em sistemas de liberação de fármacos, em terapias de gene, entre outras. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas organizados a partir de lipídios sólidos. Suas principais características incluem capacidade de proteção de substâncias instáveis frente à degradação, excelente tolerabilidade e biocompatibilidade, capacidade de formação de filme sobre a pele (demonstrando propriedades oclusivas), possibilidade de modular a entrega da substância encapsulada, além de não apresentarem problemas relacionados à produção em grande escala e à esterilização (Baril, 2012). As dispersões têm alto teor de lipídios, que incluem triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos, esteróides e ceras (Daudt, 2013). Contudo, um dos principais problemas associados a nanopartículas lipídicas sólidas e sua estabilidade físico-química durante o *shelf life* são as transformações polimórficas que a matriz lipídica pode sofrer. Estas formas polimórficas não são estáveis por um longo período, conduzindo para uma transformação gradual para modificações mais estáveis. Isso não é desejado, pois a mudança na estrutura lipídica é responsável pela expulsão do ativo durante a estocagem e mudanças no perfil de liberação do ativo incorporado, bem como mudanças nos parâmetros do tamanho de partícula (Rossan, 2011). Esse problema pode ser contornado com o uso dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que compreendem nanopartículas lipídicas compostas por lipídios sólidos e lipídios líquidos, podem ser uma opção promissora para a administração tópica de medicamentos. Tal formulação nanoestruturada biocompatível oferece as vantagens de capacidade de carga melhorada, melhoria de biodisponibilidade de fármacos, redução de efeitos adversos e liberação controlada do fármaco após aplicação tópica, o que evitaria a exposição sistêmica indesejada. Além disso, o CLN pode proteger seu conteúdo da irradiação de luz, o que seria uma vantagem interessante considerando fotoinstabilidade (Cola *et al.*, 2016; Duarte Junior, 2016).

Durante a preparação das NLS, a fusão do lipídeo é seguida pelo resfriamento e solidificação ou cristalização com graus de organização tridimensional variados (Figura 2). Contudo, durante a recristalização da NLS, ocorre uma maior expulsão do IFA devido a conformação da sua matriz. Na CLN, a matriz lipídica constituída por lipídeos sólidos e lipídeos líquidos podem originar diferentes tipos de estrutura. Na imagem 3, é possível notar que há a

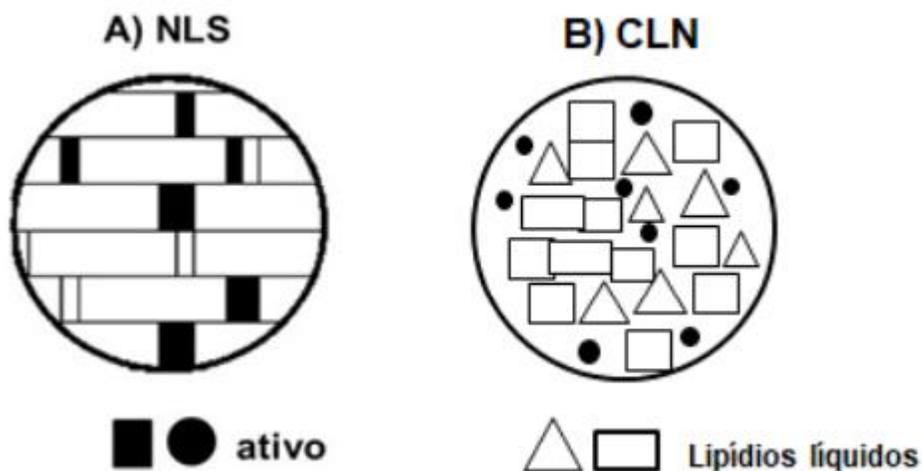
formação de uma estrutura cristalina perfeita em NLS, enquanto o CLN forma uma estrutura imperfeita resultante da recristalização de uma matriz desorganizada, com maior capacidade de carga de ativo que reduz a expulsão do fármaco, promovendo um maior encapsulamento do IFA (Muller *et al.*, 2016; Detoni *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017)

Figura 2 – mecanismo de expulsão dos ativos da NLS durante a estocagem e sua transição para um cristal lipídico ordenado.



Fonte: Fernandez, 2019

Figura 3 – diferença da matriz lipídica de NLS e CLN.



Fonte: Fernandez, 2019

A elevada variedade de lipídeos e agentes tensoativos biocompatíveis disponíveis para a preparação de nanopartículas lipídicas tem tornado estes sistemas alvo de investigação para várias

vias de administração farmacêutica (por ex. parenteral, oral, cutânea, ocular, pulmonar, nasal e vaginal) e para aplicações cosméticas (Chaves *et al.*, 2018). Quando as nanopartículas lipídicas são utilizadas na administração cutânea, verifica-se a formação de um filme oclusivo à superfície da pele, que está relacionado com as propriedades adesivas destas nanopartículas. Este filme oclusivo promove a hidratação da pele através de dois mecanismos, nomeadamente ao nível do estrato córneo, uma vez que impede a perda de água por evaporação e, por outro lado, fornece lipídeos fisiológicos, reforçando a barreira lipídica da pele (Bohr *et al.*, 2017). Notavelmente, a literatura descreve que o mecanismo de penetração do CLN carregado com fármacos aplicado à pele pode ser influenciado por folículos pilosos devido à tendência dessas partículas se acumularem nessa região cercada por sebo. Nesse sentido, a diferença fisiológica entre os diferentes tipos precisa ser considerada.

Por fim, as nanopartículas lipídicas são sistemas que apresentam várias vantagens. Quando usadas como transportadores de fármacos ou ingredientes ativos cosméticos, proporcionam boa estabilidade físico-química, evitando a necessidade de recorrer a processos de secagem, como a liofilização ou a secagem por atomização; versatilidade; biocompatibilidade, uma vez que são constituídas por lipídeos semelhantes aos fisiológicos; reduzida/ausência de toxicidade, porque na sua produção são utilizadas substâncias classificadas como seguras para utilização em humanos (Xie *et al.*, 2023).

3.4 Métodos de Caracterização dos CLN

3.4.1 Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta

Uma das primeiras caracterizações que devem ser avaliadas em sistemas nanométricos é o tamanho hidrodinâmico de partículas, para justamente avaliar se eles se encontram dentro de tais escalas. Existem diversas metodologias que são capazes de realizar a avaliação de tamanho de nanopartículas, sendo o espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic light scattering*) a mais utilizada (Spach, 2017).

Partículas nanométricas em dispersão são capazes de produzir o movimento Browniano, onde quanto menor a partícula, maior a velocidade do movimento, e o inverso também é verdadeiro. Através dessa movimentação, um espalhamento de luz é gerado e captado pelo

equipamento e, através da equação de Stoke-Einsten, calcula-se o diâmetro efetivo. Isso gera um gráfico de distribuição das populações baseado no tamanho das partículas presentes no sistema (Bhattacharjee, 2016). Com base nesse valor é gerado um índice, o índice de polidispersão (PDI) que nos permite avaliar a distribuição de tamanho de uma amostra, sendo os valores abaixo de 0,3 moderadamente monodispersos e condizentes com a homogeneidade dos tamanhos das partículas no sistema (Sales, 2023).

O potencial zeta, de modo resumido, é uma medida do potencial médio de superfície das partículas em dispersão. A superfície de tais partículas é revestida por uma camada de íons e outra de contraíons, que estão intimamente ligados a ela. À medida que ocorre afastamento da superfície da nanopartícula existe uma zona de cisalhamento dos íons intimamente ligados aos íons presentes na solução. O potencial zeta é justamente a diferença de potencial entre a camada elétrica mais íntima da partícula e as camadas mais distantes da mesma (Bhattacharjee, 2016). Quando aplicado um campo elétrico, essa camada mais íntima é deslocada conforme o movimento da partícula, se comportando como uma unidade eletrocinética. É ideal que o valor em módulo dessa medida seja alto para que as partículas suspensas tenham uma alta repulsão entre si e não se agreguem. Isso confere estabilidade eletrostática das nanopartículas (Schaffazick; Guterres, 2003).

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Um microscópio moderno de transmissão possui cerca de seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. As lentes projetoras produzem um feixe paralelo na superfície da amostra, e os elétrons saem pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados (Padilha, 2020).

A primeira aplicação da microscopia eletrônica de transmissão no estudo dos materiais foi a observação de defeitos cristalinos não observáveis por microscopia óptica ou por microscopia eletrônica de varredura, tais como discordâncias e defeitos de empilhamento. Atualmente, permitem a visualização do tamanho das partículas e da sua morfologia, onde podem ser visualizadas regiões com diferentes características eletrônicas, como lacunas ou presença de nano

compartimentos, além de permitir a comparação com o resultado de avaliação de tamanho (Beloqui *et al.*, 2016; Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2018; Padilha, 2020).

3.4.3 Eficiência de Encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação serve como parâmetro para avaliar a quantidade de fármaco que o carreador lipídico nanoestruturado conseguiu efetivamente encapsular, quando comparado a quantidade total empregada (Sena, 2016). Esse parâmetro também é de extrema importância para avaliar se os carreadores conseguem manter o fármaco encapsulado por determinado período de tempo, avaliando assim a sua estabilidade. Alguns métodos são utilizados para avaliar a quantidade de fármaco encapsulada nos sistemas, sendo eles: método direto e método indireto. No método direto, as nanopartículas são separadas do restante da suspensão em que estavam dispersas e sofrem um processo de ruptura, liberando o insumo farmacêutico ativo (IFA) contido no seu interior. No método indireto, realiza-se uma separação das nanopartículas geralmente através de filtração, onde a solução filtrada é doseada e a eficiência de encapsulação é calculada através da diferença da quantidade total utilizada pela quantidade encontrada na solução filtrada (fármaco não encapsulado) (Varshosaz; Tabbakhian; Mohammadi, 2010).

No que tange a espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS), método utilizado para quantificar o IFA no presente trabalho, é caracterizada por utilizar chama como fonte de atomização, conhecida por ser uma técnica analítica utilizada para análises elementares em baixas concentrações (mg/L), sendo possível a utilização de amostras em diversos estados físicos da matéria (Amorim *et al.*, 2008).

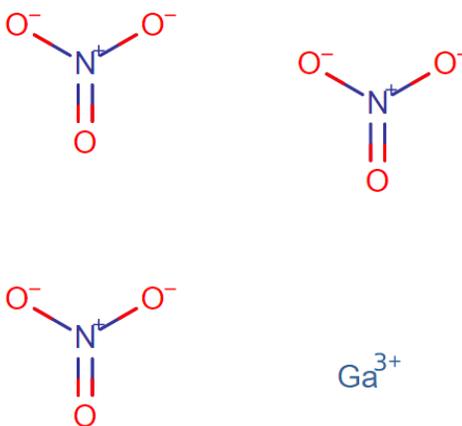
O equipamento contém uma câmara de pré-mistura, na qual o combustível e o oxidante são misturados, e também um queimador, que recebe a mistura combustível-oxidante. Os atomizadores presentes são dispositivos que convertem os íons nas formas livres ou associadas em átomos gasosos no estado fundamental. No que diz respeito à solução a ser analisada, ocorre a sua introdução através de um nebulizador pneumático, com eficiência de transporte de geralmente 3 a 5%, gerando um fino aerossol que é conduzido até a chama. A quantidade de energia que pode ser fornecida pela chama para a dissociação e atomização da amostra é proporcional à temperatura. As chamas mais comumente utilizadas são as produzidas por ar-acetileno (2100 °C a 2400 °C) e acetileno-óxido nitroso (2650 °C a 2850 °C), com a finalidade de transformar íons e moléculas em

átomos no estado fundamental (Krug; Nóbrega; Oliveira, 2004; Harris, 2005; Skoog, 2006; Dos Santos, 2019; ANVISA, 2020)

3.5 Nitrato de Gálio

O gálio tem se destacado como agente terapêutico, apresentando atividade contra diversos tipos de câncer, infecções e processos inflamatórios (Sales *et al.* 2021; Timóteo *et al.* 2020). Embora não seja utilizado fisiologicamente pelo organismo humano, o gálio no estado mais oxidado (Ga^{+3}) possui semelhança de carga elétrica, configuração eletrônica e diâmetro com o íon férrico (Fe^{+3}), e tal semelhança permite que o Ga^{+3} mimetize a ação do íon férrico, pois os seus principais carreadores (transferrina e lactoferrina) não conseguem distinguir os dois elementos, interferindo no metabolismo de microrganismos dependentes de ferro (Lessa, 2012; Timóteo, *et al.*, 2020; Sales *et al.*, 2021). Essa característica é importante em diversos processos bioquímicos, dentre eles: a eritropoiese, metabolismo energético e a síntese de DNA (Negri, 2013). No linfoma, há uma expressão alta de receptores de transferrina, sendo alta também a absorção celular do complexo gálio-transferrina, levando à inibição da proliferação celular, principalmente pela interrupção do transporte e homeostase do ferro e bloqueio da ribonucleotídeo redutase, afetando a síntese de DNA. Além disso, a captação de gálio também ativa as caspases, induzindo a apoptose (Berggren, 1993; Straus, 2003). A estrutura química do nitrato de gálio pode ser observada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura Química do Nitrato de Gálio



Fonte: Drugbank Online (2023).

O nitrato de gálio é considerado o primeiro composto a base de Gálio a exibir propriedades anticâncer em humanos (He *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012; Hizaji *et al.*, 2018), tendo como uma de suas maiores indicações o tratamento da hipercalcemia, geralmente como uma condição secundária a certos tipos de câncer (Drugbank, 2023). Dentre outras funções, o Gálio³⁺ também tem apresentado atividade como agente antiinflamatório; Bibi *et al.* (2014) e House *et al.* (2001) verificaram uma redução da área de trauma e da inflamação em feridas infectadas, quando tratadas com formulações contendo o Gálio (III), assim como as feridas parecem fechar mais rápido com essas formulações. Também é responsável pela regulação de citocinas e do estresse oxidativo, evidenciando uma resposta inibidora da inflamação com redução dos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias (Sales *et al.*, 2021). Além disso, o gálio possui a capacidade de se acumular e ficar retido em locais inflamatórios, sendo essa uma característica promissora para candidatos à formulações tópicas para o tratamento de infecções cutâneas (Edwards; Hayes, 1969; Lavender *et al.*, 1971; Littenberg *et al.*, 1973; Mimandri *et al.*, 2014; Sales, 2020).

Sabendo que as bactérias são dependentes do ferro para regulação de suas expressões gênicas, o mecanismo de ação do gálio interfere no ciclo de vida das bactérias e nos seus processos biológicos. Com isso, acredita-se que as bactérias sequestram o gálio por meio de seus sistemas de absorção de ferro, não conseguindo reduzi-lo e bloqueando vários processos bacteriológicos (Rzhepishevskaya *et al.*, 2011; Firmino *et al.*, 2019; Porcaro *et al.*, 2017; Chitambar, 2017; Sales, 2021). Hijazi *et al.* (2018) determinou a atividade antimicrobiana de compostos de gálio, onde 50% das cepas do *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* foram sensíveis (MIC < 32 µM) ao nitrato de gálio e ao gálio maltolado, especialmente nas condições que tendem a imitar os fluídos biológicos, inferindo também que a susceptibilidade bacteriana aos compostos de Ga é influenciada pela concentração de ferro e pela composição de nutrientes do meio. Ou seja, espécies aerófilas são mais suscetíveis que espécies fermentadoras, fator este relacionado ao comprometimento de processos que exigem ferro, como a respiração. Além disso, Bastos (2019) verificou o potencial dos compostos do gálio como agente antifúngico, sendo fungistático contra *Aspergillus fumigatus* e contra diversas espécies de *Candida*.

Entretanto, o nitrato de gálio apresenta uma alta solubilidade e baixa permeabilidade, pertencente à classe III do sistema de classificação biofarmacêutica. Essa problemática pode ser contornada através do uso de nanocarreadores, que atuam como *Drug Delivery System*, que

desempenham um papel crucial para melhorar a eficácia de fármacos com essas características (Vieira, 2015).

Em relação a segurança, toxicidade e farmacologia, o nitrato de gálio tem a aprovação do órgão americano FDA para o tratamento injetável da hipercalcemia maligna (Antunes *et al.*, 2012), devendo ser administrado como uma infusão intravenosa ininterrupta por até 5 dias (100-200 mg/m² diariamente), ou até que os níveis de cálcio no sangue sejam reduzidos a um nível seguro. Na infusão intravenosa, sua liberação é equivalente a 0,15 L/h/kg na dosagem de 200 mg/m² por cinco a sete dias. Seu uso é contraindicado em pacientes com insuficiência renal grave (Scr > 2,5 mg/dL), visto que apresenta uma nefrotoxicidade equivalente a 100 mg/kg (Warrell; Bockman, 1989). A hidratação e a coadministração de manitol com Nitrato de gálio aumentam a quantidade de gálio excretada na urina durante a primeira hora (Krakoff *et al.*, 1979). Não é metabolizado nem pelo fígado nem pelos rins, enquanto sua excreção é significativamente realizada pelos rins.

Portanto, para seu uso como antimicrobiano de uso dermatológico, será necessário corrigir suas propriedades biofarmacêuticas e veiculá-lo em formas farmacêuticas adequadas para penetração na pele. Tais características podem ser alcançadas utilizando sistemas de entrega de fármacos, como o CLN, e desenvolvendo medicamentos semissólidos de administração tópica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O nitrato de gálio nonahidratado ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) e os agentes surfactantes Tween™ 80 e Span™ 80 foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos), enquanto o Alkest CSO 300 (PEG) foi doado pela Oxiteno (Brasil). Para o desenvolvimento dos sistemas nanoparticulados, também foi utilizado o lipídio sólido a temperatura ambiente, Tristearina (Dynasan 118 - P.F. 73 °C), e o lipídio líquido a temperatura ambiente, Miglyol® 812, todos gentilmente cedidos pela OIO Chemical (Alemanha).

4.2 Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)

Foram preparadas dois tipos de amostras com diferentes pares de tensoativos, com a finalidade de avaliar o tensoativo que melhor se comporta na formulação através de seu aspecto físico. Para isso, foi realizado um comparativo testando dois pares de tensoativos, sendo eles o Tween® 80 (EHL 15) e Span® 80 (EHL 4,3), e Alkest CSO 300 (EHL 11,7) e Span® 80 (EHL 4,3).

Para determinação do EHL requerido (EHLreq) para a fase oleosa, foram preparadas 9 emulsões com diferentes proporções de dois tensoativos, sendo um hidrofílico e outro lipofílico para cada par citado. Para o preparo das emulsões, a fase aquosa foi composta por água e tensoativo hidrofílico (Tween® 80 ou Alkest CSO 300) e a fase oleosa composta pelo lipídeo sólido Dynasan 118 e o lipídio líquido Miglyol® 812, juntamente com o tensoativo lipofílico, Span® 80. As proporções de tensoativos hidrofílico e lipofílico necessárias para obtenção da emulsão de maior estabilidade foram determinadas pelo valor de EHL requerido, calculado de acordo com a equação 1. (Kim *et al.*, 2014; ICI AMERICAS, 1984; Griffin, 1949).

$$EHL_{req} = (\%TensA \times EHLA) + (\%TensB \times EHLB)$$

Equação 1: EHL requerido.

Onde %TensA, EHLA, %TensB e EHLB são a porcentagem e EHL do tensoativo A (Span® 80) e a porcentagem e EHL do tensoativo B (Tween® 80 ou Alkest CSO 300), respectivamente.

Nas tabelas abaixo, pode-se verificar as proporções de lipídeos, tensoativo e água utilizadas no preparo das amostras contendo os pares de Span® 80 e Tween® 80, e Span® 80 e Alkest CSO 300, respectivamente. O intervalo de EHL utilizado variou entre 5,37 e 13,95 para Span® 80 e Tween® 80 e 5,04 e 10,96 para Span® 80 e Alkest CSO 300.

Tabela 1 – Proporções de tensoativos para formulações contendo Span® 80 e Tween® 80.

Amostras	Lip. Sól/Lip. Liq.	Span 80	Tween 80	Água	EHL
A1	8%	90%	10%	80%	5,37
A2	8%	80%	20%	80%	6,44
A3	8%	70%	30%	80%	7,51
A4	8%	60%	40%	80%	8,58
A5	8%	50%	50%	80%	9,65
A6	8%	40%	60%	80%	10,72
A7	8%	30%	70%	80%	11,79
A8	8%	20%	80%	80%	12,86
A9	8%	10%	90%	80%	13,95

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 – Proporções de tensoativos para formulações contendo Span® 80 e Alkest CSO 300.

Amostras	Lip. Sól/Lip. Liq.	Span 80	Alkest CSO 300	Água	EHL
A1	8%	90%	10%	80%	5,04
A2	8%	80%	20%	80%	5,78
A3	8%	70%	30%	80%	6,52
A4	8%	60%	40%	80%	7,26
A5	8%	50%	50%	80%	8,00
A6	8%	40%	60%	80%	8,74
A7	8%	30%	70%	80%	9,48
A8	8%	20%	80%	80%	10,22

A9	8%	10%	90%	80%	10,96
----	----	-----	-----	-----	-------

Fonte: Dados da pesquisa.

As emulsões foram preparadas pelo método de emulsificação por ultrassom. Inicialmente foi feito aquecimento dos lipídios (até aproximadamente 5-10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido, que é equivalente a aproximadamente 73 °C) e da água ultrapura contendo os tensoativos separadamente. Em seguida, a fase aquosa foi vertida na oleosa sob agitação constante durante 1 minuto e levada para processador ultrassônico (Eco-sonics®) por 7 minutos com 50% de amplitude. A emulsão recém-obtida foi retirada do equipamento e resfriada, permanecendo em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Após o período de repouso, observou-se visualmente a aparência das emulsões obtidas com o objetivo de verificar sinais de instabilidade evidenciados por ocorrência de separação de fases ou cremagem (Gullapalli; Sheth, 1999).

4.3 Planejamento Experimental

Inicialmente, foi feito um planejamento experimental, conhecido como design de experimentos (DoE), dos CLN sem o emprego do fármaco, para avaliar quais proporções e parâmetros resultariam em carreadores com as melhores características de tamanho hidrodinâmico das partículas, potencial zeta e índice de polidispersão, sendo um planejamento experimental do tipo composto central com quatro fatores em dois níveis ($\alpha=2$) e repetições do ponto central, totalizando 31 experimentos. Os fatores avaliados foram a proporção de lipídeo da formulação, a proporção entre os lipídeos sólido e líquido, a potência do equipamento de ultrassom empregado na metodologia e o tempo de ultrassom empregado, parâmetros esses conhecidos como variáveis independentes, os quais estão representados na Tabela 3, sendo os seus níveis estabelecidos de acordo com estudos prévios. As respostas avaliadas foram o tamanho hidrodinâmico das partículas, o PDI e o potencial zeta, escolhidas como variáveis dependentes, visando otimização dos parâmetros que obtivessem as melhores formulações que seriam empregadas para uma outra etapa do estudo, ou seja, as formulações que apresentassem menor tamanho e índice de polidispersão e maior potencial zeta.

Tabela 3 – Variáveis utilizadas no planejamento composto central para ensaios com CLN sem fármaco.

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

Fonte: Dados da pesquisa.

A partir dos resultados obtidos na triagem do planejamento experimental sem o fármaco, foram fixadas as variáveis de tempo e potência de sonicação, além de estabelecer o intervalo da quantidade de lipídeo, que forneceram as nanopartículas com as melhores características. Diante desses resultados, um novo planejamento composto central foi desenvolvido, com dois fatores e também de dois níveis e com repetição do ponto central, com CLN contendo o fármaco que resultou em 13 experimentos. As variáveis dependentes incluíram: potencial zeta, tamanho, PdI e eficiência de encapsulamento.

Tabela 4 – Variáveis utilizadas no planejamento composto central para ensaios com CLN com fármaco.

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

Fonte: Dados da pesquisa.

A melhor formulação obtida nesse DoE foi selecionada para dar continuidade ao estudo, onde foi repetido o CLN para caracterização e demais ensaios.

4.4 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)

A técnica utilizada para o preparo dos CLNs é conhecida como emulsificação múltipla por ultrasonicação à quente. Inicialmente, formou-se uma emulsão primária (A1/O) através do aquecimento (até aproximadamente 5-10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido) e posterior homogeneização da fase oleosa (O) composta pelo lipídio sólido, lipídio líquido e tensoativo lipofílico (Span® 80) e da fase aquosa interna (A1) contendo o fármaco, os quais permaneceram sob agitação magnética por cerca de 2 minutos. Em seguida, a fase aquosa externa (A2) contendo

o tensoativo hidrofílico (Alkest CSO 300), também aquecida à mesma temperatura, foi adicionada à emulsão primária, sendo submetidos à ultrasonicação através de um sonicador de sonda (Ecosonics® QR 800, São Paulo), durante tempo e potência pré-determinados através do planejamento experimental. A emulsão formada (A1/O/A2) foi resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente e formar o CLN por recristalização da fase lipídica (Becker Peres *et al.*, 2016). Além dos parâmetros de sonicação, a quantidade de lipídeos também foi definida pelo DoE. Já a concentração de tensoativos total foi fixada em 10% da formulação, baseada em estudos prévios, onde a proporção tensoativo hidrofílico/lipofílico foi determinado no estudo de EHL. Um CLN branco foi obtido da mesma forma, sem a presença do fármaco na A1.

4.5 Caracterização físico-química dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Os parâmetros avaliados durante tal caracterização foram o tamanho hidrodinâmico de partículas, o potencial zeta, o índice de polidispersão (PDI), a eficiência de encapsulação, a morfologia das partículas, o FTIR e o DSC.

4.5.1 Determinação do potencial zeta, do índice de polidispersão e do tamanho hidrodinâmico de partículas

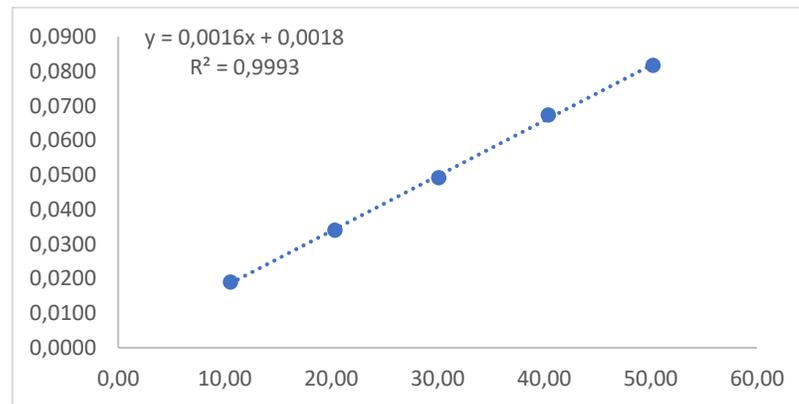
A determinação do tamanho hidrodinâmico das partículas e do índice de polidispersão foi realizada através do método de espalhamento de luz dinâmico (DLS), enquanto o potencial zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética. Ambas as análises foram feitas no equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern Instruments (Inglaterra), a temperatura ambiente (25°C) e ângulo de 90° para o DLS. Inicialmente foi realizada uma diluição inicial das partículas até uma proporção ideal (1:10 v/v) em água ultrapura, sendo empregada cubeta óptica para DLS, no primeiro caso, e cubetas capilares, no segundo.

4.5.2 Determinação da eficiência de encapsulação

O cálculo da eficiência de encapsulação foi realizado pelo método indireto (Souza *et al.*, 2011), feito em duas etapas: na primeira, foi doseado o fármaco na formulação total, sendo

realizada uma prévia digestão com HNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, de modo a ser obtido o valor real do mesmo; na segunda foi realizado o método indireto de doseamento em si (Melo; Silva, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011; Rodrigues, 2020). No método indireto, cerca de $0,5 \text{ mL}$ das amostras foram centrifugadas em tubos com membranas filtrantes Amicon® Ultra-4 a 9500 rpm durante 45 min , gerando um filtrado que foi analisado para doseamento do que não foi encapsulado. A metodologia empregada para a quantificação do gálio no filtrado foi a espectrometria de absorção atômica por chama (Varian AA), utilizando o software SpectrAA 220 FS, cujos parâmetros foram ajustados para análise a partir dos ajustes da lâmpada de cátodo oco específica para o elemento Gálio (Agilent Technologies, Serial/Lot No.: 17R0237), e o fluxo de gás monitorado (fluxo de ar e gás acetileno), com leitura realizada em $294,4 \text{ nm}$. Foi realizada uma curva de calibração com padrão de nitrato de gálio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) em $\text{HNO}_3 \text{ mol.L}^{-1}$ e concentração de Ga equivalente a 1000 mg/L - Merck) com cinco pontos e intervalo de 10 a $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Após a diluição das amostras, foram realizadas as leituras no aparelho de espectrometria de absorção atômica por chama. Foi feita diluição de modo que a concentração da amostra se encontrasse dentro da curva de calibração, conforme Figura 5.

Figura 5 – Curva de calibração



Fonte: Autoria própria.

O cálculo da eficiência de encapsulação foi feito através da equação (2):

$$EE\% = \frac{\text{GaNtotal} - \text{GaNlivre}}{\text{GaNtotal}} \times 100 \quad (2)$$

Em que EE% é a eficiência de encapsulação, GaN_{total} é a quantidade total de nitrato de gálio doseada na formulação e GaN_{livre} é a quantidade de nitrato de gálio doseada no sobrenadante.

A concentração de gálio nas amostras foi calculada através da regressão linear obtida pela curva de calibração previamente realizada, fornecida pelo software do próprio equipamento, gerando uma equação da reta referente à concentração x absorvância

4.5.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Para as análises feitas por DSC, uma massa de aproximadamente $2 \pm 0,5$ mg das amostras foi adicionada a um cadinho de alumínio hermético posteriormente selado. As amostras contendo a nanopartícula com e sem o fármaco foram previamente secadas em temperatura ambiente por 24h. O ensaio ocorreu em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ dentro do intervalo de 25 a 300°C .

4.5.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras para análises de FTIR foram preparadas como pastilhas de KBr, na proporção aproximada de 1 mg da amostra para 100 mg de KBr, que foram trituradas até que um pó fino fosse obtido. A mistura foi então submetida a uma força de 78,5 kN usando a prensa hidráulica Shimadzu® por 10 min. Os espectros de absorção no infravermelho das pastilhas com as amostras foram obtidos utilizando um espectrômetro de absorção infravermelho com transformada de Fourier (IRTracer-100, espectrômetro Shimadzu®), por meio de 45 varreduras, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 550 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Os gráficos foram criados pela utilização do software OriginPro® 2018.

4.5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os CLN foram diluídos em água ultrapurificada na proporção 1:10 (v/v). Uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ foi dispersa em grades de cobre, seguidas do agente de contraste ácido fosfotungico (PTA)

e colocadas para secar em temperatura ambiente por 48 h. As amostras foram visualizadas usando um microscópio MET Morgagni 268D (FEI), sob aceleração de 80 kV. A morfologia por microscopia eletrônica dos CLN com e sem fármaco foi realizada no Centro de tecnologias estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.6 Avaliação da estabilidade dos CLN

A estabilidade dos CLN gerados foi feita com caráter preliminar e de curta duração, sendo realizadas as seguintes leituras nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 90 dias. As amostras foram armazenadas à 4°C em geladeira em tubos de penicilina devidamente fechados.

4.6.1 Aspecto macroscópico

Foram avaliadas propriedades organolépticas como a cor, odor e o aspecto da formulação.

4.6.2 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

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

4.6.3 Determinação do potencial zeta, do índice de polidispersão e do tamanho hidrodinâmico de partículas

A determinação do potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho das partículas foi realizado conforme metodologia descrita na Seção 4.5.1.

4.7 Avaliação do efeito oclusivo

Para determinar o fator de oclusão, foi tido como base o teste de Vringer *in vitro*. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando 0,300 µL de cada amostra, as quais foram aplicadas homogeneamente sob papel filtro quantitativo cinetec (abertura de 2 µm, n° 42; 12,50 cm) faixa azul, que envolviam um recipiente (béquer) de 50mL com aproximadamente 45 mm de diâmetro, contendo 25 mL de água em seu interior. Após preparo, as amostras foram mantidas em estufa sob temperatura de 32°C por diferentes períodos. Após isso, as amostras foram pesadas nos tempos correspondentes a 6h, 8h e 12h para avaliar o fator oclusão a partir da seguinte equação: (Lacerda, 2009, Ferreira, 2012):

$$F = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

F = Fator de oclusão

A = Massa de água perdida do controle

B = Massa de água perdida da amostra

Usou-se água como controle neste teste de oclusão (nenhum efeito oclusivo) e as amostras analisadas foram a nanopartícula contendo o nitrato de gálio e a solução do nitrato de gálio.

4.8 Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM)

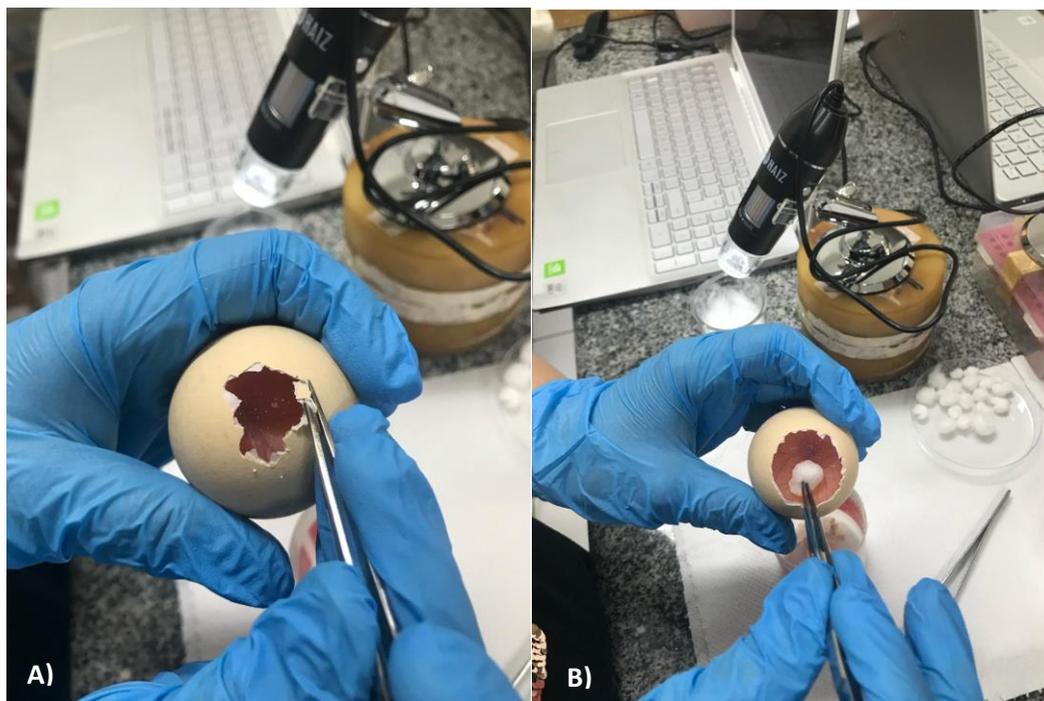
O teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha fecundado – HET-CAM foi utilizado para avaliar o potencial de irritação das nanopartículas de gálio sintetizadas. Como controle foram utilizados solução salina 0,9% (controle negativo para irritação) e lauril sulfato de sódio 1% (controle positivo para irritação), tendo o potencial de irritação (PI) estabelecido pela visualização microscópica da membrana corioalantóide, durante 5 minutos (300 segundos) contendo 0,300 µL das respectivas amostras, no intuito de verificar a ocorrência de efeitos irritantes (hemorragia, coagulação e vasoconstricção) (Equação 4).

$$PI = \frac{(301 - \text{hemorragia})5}{300} + \frac{(301 - \text{vasoconstricção})7}{300} + \frac{(301 - \text{coagulação})9}{300} \quad \text{Equação 4}$$

Após quantificação, as amostras foram classificadas como: não irritante (0-0,9); ligeiramente irritante (1-4,7); irritação moderada (5- 8,9); irritação grave/severa (9-21). Foram realizadas 4 repetições para cada substância teste e controle, segundo preconizado por Freire *et al.* (2015).

Na figura abaixo, é possível observar o passo a passo para a realização do teste.

Figura 6 – Etapas para realização do HET-CAM.





Legenda: A) Corresponde a quebra cautelosa da casca do ovo; B) Umedecimento da membrana com soro fisiológico; C) Membranas expostas para receber as amostras; D) Análise microscópica.

4.9 Análise Estatística

Todos os experimentos citados foram realizados em triplicata para garantir significância estatística e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A geração dos gráficos e informações contidas nas tabelas foram geradas ou pelo programa Origin® 8.5 ou pelo programa MiniTab® 18. Análises de regressão linear múltipla foram aplicadas para gerar modelos polinomiais, com inclusão dos termos de interação lineares e quadráticos, para todas as variáveis de resposta avaliadas. A influência significativa dos fatores independentes nas variáveis de resposta foi estimada através da análise de variância (ANOVA) e determinação do valor de p (no intervalo de confiança de 95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)

As amostras foram preparadas de acordo com as proporções e valores de EHL descritos na tabela presente na Seção 4.3. As figuras 7 e 8 mostram o aspecto visual das amostras após 24 horas de repouso, os tensoativos utilizados foram o Tween® 80 + Span® 80 e Span® 80 + Alkest CSO 300, respectivamente. Entre as emulsões contendo o Alkest, a mais estável visualmente após análise macroscópica (Figura 8) apresentou EHL em torno de 8,74 que corresponde à proporção de 40% de Span® 80 e 60% de Alkest CSO 300, valores esses que podem ser visualizados na Tabela 1 da Seção 4.2. As demais emulsões contendo Span® 80 e Alkest CSO 300 não apresentaram instabilidade evidenciadas por separação de fases ou cremagem, já no caso dos pares contendo o Span® 80 e Tween® 80, as formulações apresentaram instabilidade e cremagem nas proporções correspondentes a 10% e 50% de Span® 80 (Amostras 1 e 5 da Figura 7). Como a turbidez do sistema aumenta com a concentração das gotículas com tamanho suficiente para produzir espalhamento de luz, o aspecto leitoso observado nas amostras preparadas com o Tween® 80 pode estar relacionado ao maior tamanho de partículas ou de agregados formados. Além disso, o aspecto leitoso das formulações pode representar um parâmetro crítico de estabilidade, podendo antecipar a coalescência que leva a separação de fases (Lieberman; Rieger; Banker, 1998; Kheradmandnia *et al.*, 2010). Diante dos resultados da análise visual, a formulação escolhida para a continuidade do estudo que apresentou a melhor característica foi a amostra 6, utilizando o Span® 80 e Alkest CSO 300, podendo ser visualizada na Figura 8.

Figura 7 - Aspecto visual das amostras após 24h de repouso utilizando o Span® 80 e Tween® 80.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8 - Aspecto visual das amostras após 24h de repouso utilizando o Span 80® e Alkest CSO 300.



Fonte: Dados da pesquisa.

William Griffin (1949) afirma que os tensoativos consistem em uma molécula constituída de grupos hidrofílicos (polar) e lipofílicos (apolar) e que, o equilíbrio da força e do tamanho destes dois grupos opostos é definido como EHL (Pasquali; Taurozzi; Bregni, 2008). Cada emulsionante reflete um valor numérico, correspondente a uma escala adimensional de 1 a 18, onde emulsionantes com caráter lipofílico e maior afinidade pela fase orgânica apresentam um baixo número de EHL (menor 8,0), e emulsionantes com caráter hidrofílico e, conseqüentemente, com maior afinidade pela fase aquosa, apresentam um alto número de EHL (acima de 8,0). Com isso, o EHL indica a capacidade de uma substância se distribuir em fases imiscíveis. Emulsionantes que possuem baixo EHL formam emulsões A/O, por outro lado, emulsionantes com alto valor de EHL formam emulsões O/A (Americas, 1984; Jin *et al.*, 2008; Morais, 2006; Pasquali; Taurozzi; Bregni, 2008; Santos, 2011).

Diante da importância que a determinação do EHL apresenta frente à estabilidade do CLN através da redução da tensão interfacial, sua escolha é de extrema importância para a formulação (Americas, 1984; Jin *et al.*, 2008). A avaliação do EHL foi estimada a partir da análise macroscópica das emulsões recém obtidas e após 24 horas de repouso. Um dos principais fatores determinantes no processo de emulsificação é a estrutura e concentração de tensoativos, e conseqüentemente a tensão interfacial do sistema, uma vez que o aumento na concentração de tensoativos tende a provocar a diminuição da tensão interfacial, o que irá promover a emulsificação do sistema (Bouchemal *et al.*, 2004). Portanto, através do ensaio de EHL foi possível escolher o melhor par de tensoativos e a proporção ideal de cada um, que permitirá a formação do CLN com melhor estabilidade.

5.2 Planejamento Experimental

O uso do planejamento estatístico de experimentos, ou *Design of Experiments* (DoE), teve o objetivo de avaliar a influência de parâmetros utilizados para a obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados e quais fatores fornecem CLN com as melhores características físico-químicas. Diante desse fato e baseado em estudos anteriores realizados pelo grupo, foram estabelecidos os parâmetros críticos de qualidade, de processo e da formulação, sendo eles elencados na tabela abaixo:

Tabela 5 – Parâmetros utilizados para obtenção dos CLN.

ATRIBUTOS	FATORES
Parâmetros críticos de qualidade	Tamanho hidrodinâmico médio, PDI, Potencial Zeta e Eficiência de encapsulamento.
Parâmetros críticos de processo	Tempo e potência de sonicação.
Parâmetros críticos de formulação	Quantidade de lipídio e proporção de lipídio sólido/líquido.

Fonte: Autoria própria.

O experimento realizado foi do tipo composto central com quatro fatores e dois níveis, dividido em duas séries: a primeira série sem o fármaco, para avaliação e triagem dos parâmetros do método e da formulação das nanopartículas; e a segunda série contendo o fármaco com as variáveis da formulação em níveis otimizados da série anterior, para avaliação também da eficiência de encapsulamento do fármaco na nanopartícula.

Para a primeira série, os parâmetros selecionados como variáveis independentes (variáveis de entrada) totalizaram quatro fatores, sendo eles: a quantidade total de lipídeos na formulação (%Lip), a proporção de lipídeos sólido e líquido (Sol/Liq), o tempo (min.) e a potência de sonicação (A%). Já as variáveis dependentes (variáveis de saída) avaliadas foram o tamanho hidrodinâmico das partículas (Tam.), o índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) dos CLNs obtidos. Esse desenho experimental gerou 31 ensaios, dos quais os resultados estão apresentados na Tabela 6. Tais fatores, assim como seus níveis máximos e mínimos, foram escolhidos baseados em estudos prévios que mostraram suas influências nos parâmetros críticos da qualidade das formulações, 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 (Kumas; Singh; Garg, 2019; Luo *et al.*, 2022; Pucek-Kaczmarek, 2021; Siddiqui *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2011).

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental feito com Dynasan 118 mostrando as variáveis dependentes e independentes.

AMOSTRA	%Lip	S/L	Pot (%A)	Tempo (min.)	Tam (nm)	PDI	PZ (mV)
1	6	65	4	40	42,45	0,177	-5,86
2	10	65	4	40	154,70	0,016	-23,70
3	6	85	4	40	49,01	0,267	-9,31
4	10	85	4	40	320,30	1,000	-6,97
5	6	65	10	40	40,22	0,178	-9,87
6	10	65	10	40	72,38	0,300	-5,32
7	6	85	10	40	491,50	0,687	-9,70
8	10	85	10	40	95,93	0,008	-7,62
9	6	65	4	70	42,45	0,177	-5,86
10	10	65	4	70	29,24	0,425	-3,26
11	6	85	4	70	49,01	0,267	-9,31
12	10	85	4	70	167,80	0,511	-12,20
13	6	65	10	70	42,67	0,134	-20,30
14	10	65	10	70	35,43	0,430	-8,70
15	6	85	10	70	470,40	0,912	-7,54
16	10	85	10	70	1562,00	0,479	-8,50
17	4	75	7	55	27,00	0,197	-9,26
18	12	75	7	55	238,30	0,635	-6,12
19	8	55	7	55	42,32	0,179	-9,39
20	8	95	7	55	393,40	1,000	-9,97
21	8	75	1	55	234,90	0,515	-9,17
22	8	75	13	55	377,50	0,226	-16,70
23	8	75	7	25	70,63	0,550	-8,42
24	8	75	7	85	214,50	0,266	-11,00
25	8	75	7	55	528,70	0,750	-8,03
26	8	75	7	55	246,10	0,043	-5,85
27	8	75	7	55	88,55	0,395	-6,24
28	8	75	7	55	282,50	0,277	-15,00
29	8	75	7	55	165,70	0,248	-9,74

30	8	75	7	55	425,00	0,972	-8,56
31	8	75	7	55	246,10	0,043	-5,850

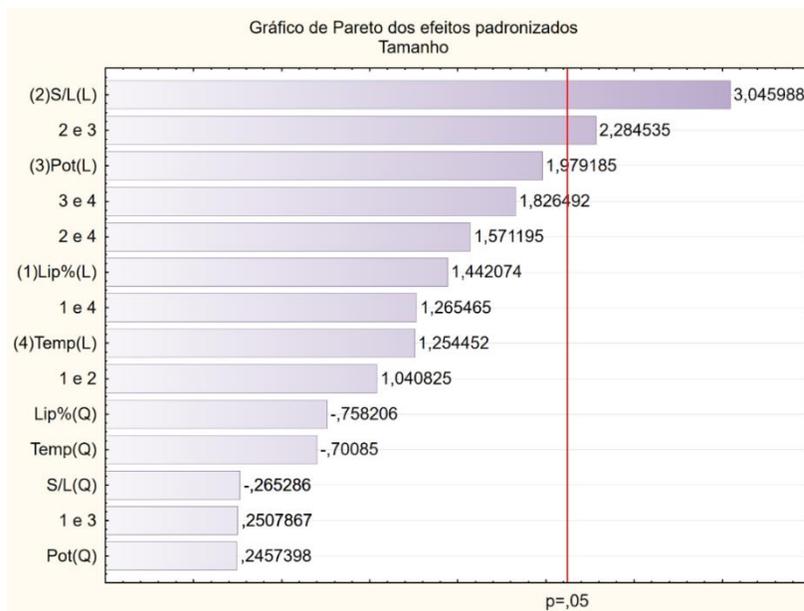
Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido;
Tam. = Tamanho (diâmetro médio); PZ = potencial zeta.

De acordo com os resultados mostrados pelas variáveis dependentes, foi possível obter CLNs com tamanho variando de 27,0 nm à 1562 nm, PdI entre 0,008 e 1,00 e potencial Zeta entre -3,260 e -23,7. As formulações apresentaram-se líquidas, com aspecto de translúcido à leitoso e de reflexo azulado, característico de nanopartículas. O tamanho ideal para as nanopartículas serem incorporadas em formulações tópicas, de acordo com a literatura, depende do objetivo da aplicação e das propriedades desejadas. A escolha do tamanho pode influenciar em fatores como a penetração cutânea e estabilidade, onde partículas menores tem maior probabilidade de penetrar nas camadas mais profundas da pele, assim como são mais susceptíveis a aglomeração, levando à instabilidade do sistema. Pesquisas também sugerem que nanopartículas de tamanhos extremamente pequenos podem ter potenciais efeitos adversos à saúde, afetando a segurança. Nesse sentido, tamanhos de nanopartículas considerados ideais devem ser inferiores à 300 nm, e, quanto menor o tamanho, melhor a eficiência de permeação. Contudo, deve-se atentar aos problemas citados acima em caso de partículas extremamente pequenas (Banerjee *et al.*, 2016; Danei *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Soares, 2014). Quanto ao PdI, valores inferiores a 0,300 garantem uma amostra menos polidispersa e conseqüentemente mais homogênea, sendo relacionada com um comportamento físico-químico, farmacocinético e farmacológico mais homogêneo (Danei *et al.*, 2018; Musielak; Feliczak-Guzik; Nowak, 2022). Já o potencial zeta, valores $\geq |30|$ mV são considerados ótimos para garantia de alta estabilidade eletrostática das nanopartículas. Contudo, esse valor pode ser menor sem prejuízo na estabilidade quando coexistir com uma estabilidade estérica, que pode ser fornecida com o uso de tensoativos não iônicos, como no caso do utilizado neste trabalho (Carvalho *et al.*, 2018; Honary; Zahir, 2013; Shah *et al.*, 2022; Varenne *et al.*, 2019). Sendo assim, 13 amostras obtiveram resultados inadequados para a pesquisa. As demais encontraram-se dentro das características ideais.

Através do processamento estatístico do planejamento experimental através de ANOVA, a falta de ajuste não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), indicando a adequação do modelo matemático gerado para as variáveis estudadas a partir do DoE. Os gráficos de Pareto (Figura 9, 10 e 11) foram elaborados para ilustração dos efeitos importantes e comparar a magnitude destes,

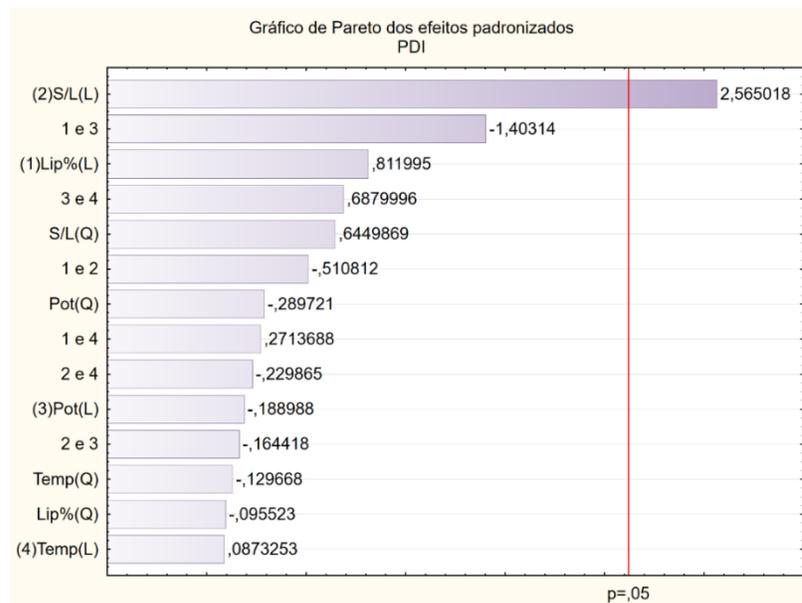
determinando os parâmetros que mais contribuem nas variáveis tamanho, PDI e PZ, correlacionando com os CLN de melhores resultados.

Figura 9 - Gráfico de Pareto para avaliação da variável de tamanho no planejamento experimental.



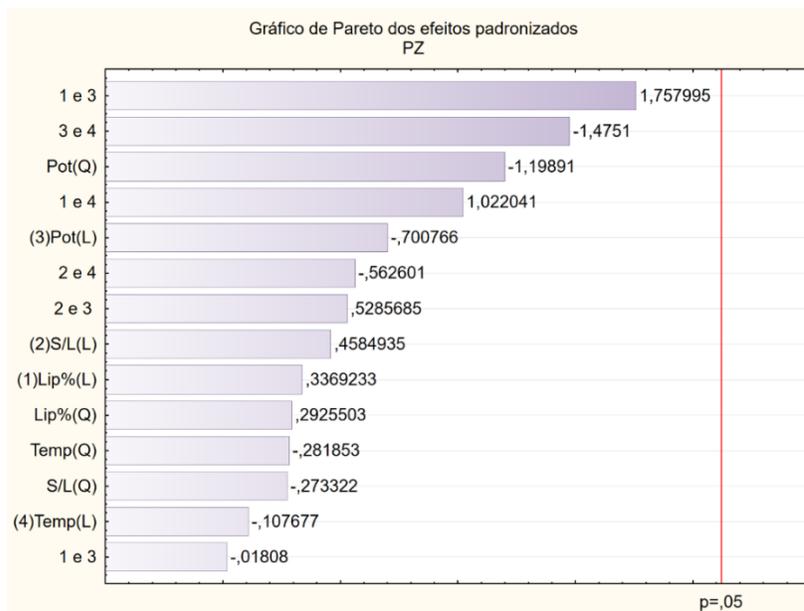
Fonte: Autoria própria. Legenda: Lip% = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido; Pot= potência de sonicação; Temp= tempo de sonicação.

Figura 10 - Gráfico de Pareto para avaliação da variável de PDI no planejamento experimental.



Fonte: Autoria própria. Legenda: Lip% = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido; Pot= potência de sonicação; Temp= tempo de sonicação.

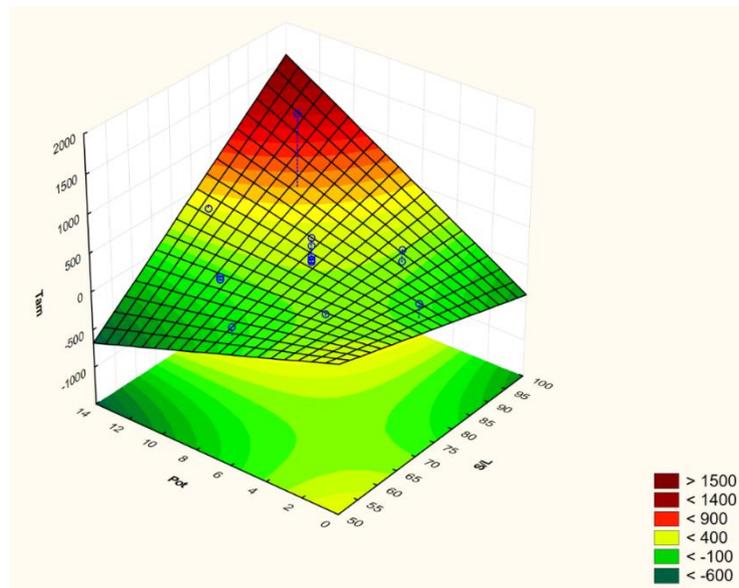
Figura 11 - Gráfico de Pareto para avaliação da variável de potencial zeta no planejamento experimental.



Fonte: Autoria própria. Legenda: Lip% = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido; Pot= potência de sonicação; Temp= tempo de sonicação.

Na figura 9, o gráfico de Pareto mostra que, além da proporção S/L, a outra variável que apresentou efeito significativo no tamanho dos CLN foi a interação da variável S/L e a potência de sonicação, o que significa que essas variáveis juntas apresentam influência no tamanho. Para o PdI (Figura 10), apenas a proporção de lipídeo sólido/lipídeo líquido (S/L) teve uma influência, similar à do tamanho. Em ambos os casos, as variáveis significativas apresentaram influência positiva na resposta, o que significa que o aumento dessas variáveis aumenta a resposta, tanto o tamanho quanto para o PdI. Quanto ao potencial zeta (Figura 11), nenhuma variável testada teve efeito significativo. Para uma melhor visualização desses efeitos significativos, foi gerado o gráfico de superfície resposta, mostrados na Figura 12. É possível observar que a região com melhor tamanho é encontrada na região de coloração verde escura no gráfico, a qual corresponde às maiores potências e proporção S/L até aproximadamente 70.

Figura 12 - Gráfico de superfície resposta para a variável tamanho em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental



Fonte: Autoria própria.

Atualmente, há relatos existentes na literatura de que elevadas concentrações de lipídeos na formulação necessitam de maior potência para atingirem a escala nanométrica, podendo levar a um aumento e má distribuição de tamanho por fatores como 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). Quanto aos parâmetros de sonicação, estudos mostraram que a redução do tamanho de partículas é proporcional à potência (Becker Peres *et al.*, 2016; Behbahani *et al.*, 2017; Cortial *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2020). Entretanto, o excesso de energia em altas potências podem levar à muitos choques entre as partículas, aglomerando-as e aumentando o seu tamanho, bem como favorecendo saída da fase aquosa interna contendo o fármaco de dentro da matriz do CLN.

No que tange os parâmetros da formulação, pesquisas relatam 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). Entretanto, como o CLN utilizado contém um fármaco hidrofílico, como no caso do nitrato de gálio, foram produzidos pelo método de emulsificação múltipla, onde o fármaco é adicionado em forma de solução aquosa, e 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 (Awadeen; Boughdady; Meshali, 2020; Becker Peres *et al.*, 2016; Fangueiro *et al.*, 2012; Ghasemian *et al.*, 2017). Portanto, para obtenção de CLN com melhores tamanhos e PDI nessa pesquisa, foi determinado como parâmetros potências intermediárias e menores quantidades de lipídeos sólidos.

Assim, 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, enquanto as variáveis dependentes foram o tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento. O parâmetro de sonicação foi fixado em 10 minutos e potência de 40% de amplitude, baseado no DOE anterior, considerando também que potências muito altas podem elevar os choques entre as partículas, favorecendo a instabilidade e diminuição da eficiência de encapsulação. Esses critérios foram utilizados em planejamento experimental do tipo composto central, 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 7.

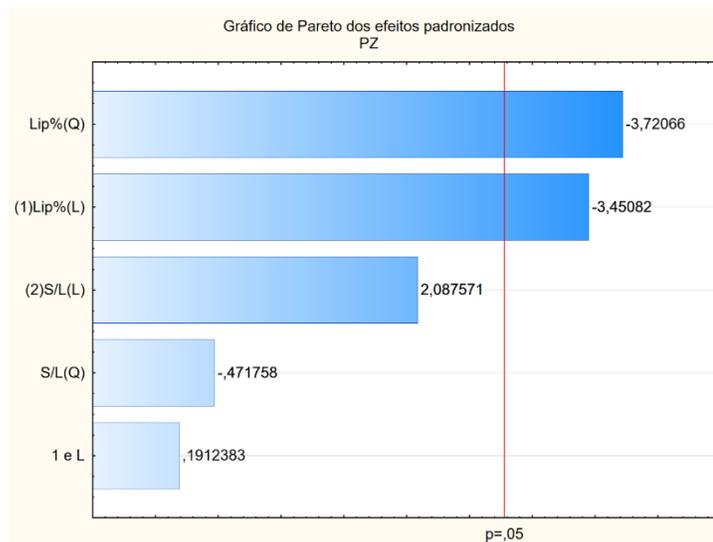
Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental feito com Dynasan 118 mostrando as variáveis dependentes e independentes.

AMOSTRA	%LIP	S/L	TAM (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)
1	6,00	65,00	66,73	0,094	-10,40	78,30
2	8,00	65,00	64,99	0,171	-12,20	22,31
3	6,00	75,00	68,09	0,151	-7,09	53,97
4	8,00	75,00	156,20	0,817	-8,55	48,45
5	5,59	70,00	53,99	0,105	-7,47	75,05
6	8,41	70,00	116,60	0,371	-11,30	49,90
7	7,00	62,93	59,59	0,121	-6,59	60,17
8	7,00	77,07	73,37	0,204	-7,80	33,19
9	7,00	70,00	69,05	0,157	-8,39	85,31
10	7,00	70,00	60,93	0,100	-7,45	75,05
11	7,00	70,00	66,95	0,163	-6,08	81,87
12	7,00	70,00	96,97	0,369	-8,09	83,02
13	7,00	70,00	68,35	0,151	-7,55	77,30

Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido dentro do total de lipídeos; Tam. = Tamanho (diâmetro médio); PZ = potencial zeta; EE = eficiência de encapsulamento.

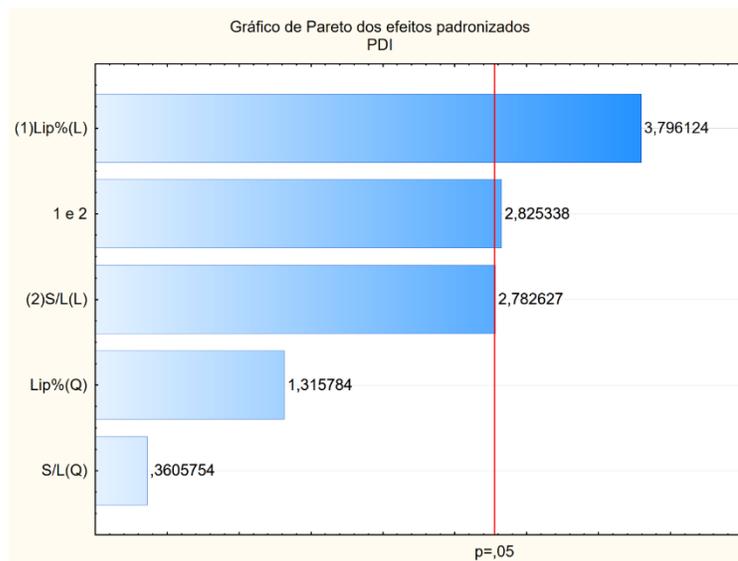
É possível observar na tabela que os resultados mostram a obtenção de CLN com diâmetro médio variando de 53,99 nm à 156,2 nm, PdI entre 0,094 e 0,817, potencial zeta entre -6,08 e -12,2 e eficiência de encapsulamento entre 22,309% e 85,309%. As formulações apresentaram-se líquidas, com aspecto translúcido condizente com os tamanhos encontrados, além de reflexo azulado característico de nanopartículas. Considerando os parâmetros ideais para esse estudo já mencionados, todas as amostras desse experimento apresentaram resultados adequado em relação ao diâmetro, exceto as amostras 4, 6 e 12, que apresentaram um PdI acima do recomendado. O potencial zeta sofreu variação, com valores muito abaixo do considerado ideal, mas sua estabilidade pode ser considerada devido ao uso do tensoativo polietoxilado, que confere estabilidade estérica. O modelo mostrou-se ajustado para as variáveis avaliadas. Os gráficos de Pareto obtidos para esse planejamento estão dispostos nas Figuras 13, 14, 15 e 16, onde é possível visualizar os parâmetros de maior magnitude e significativos nas variáveis independentes testadas.

Figura 13 - Gráfico de Pareto para avaliação da variável de potencial zeta no planejamento experimental.



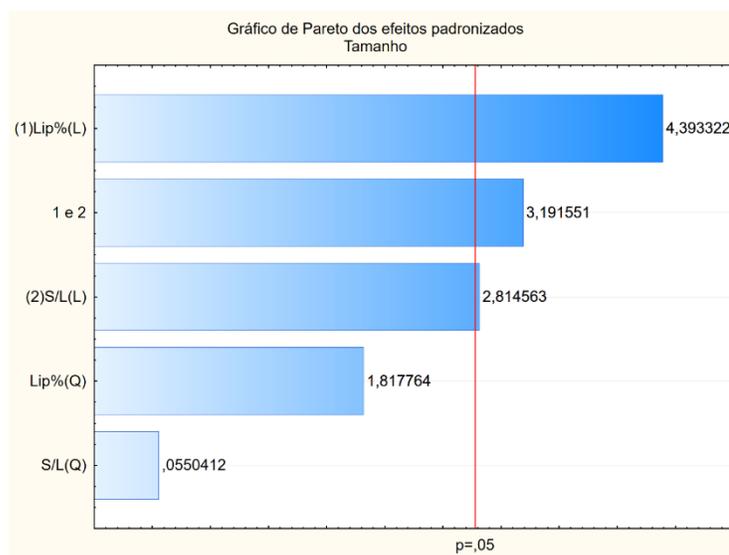
Fonte: dados da pesquisa. Legenda: Lip% = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido; Pot= potência de sonicação; Temp= tempo de sonicação

Gráfico 14 - Gráfico de Pareto para avaliação da variável de PDI no planejamento experimental.



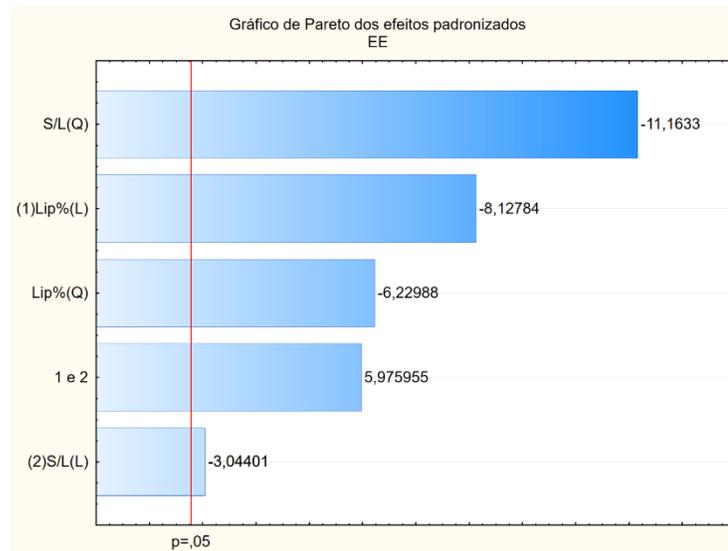
Fonte: dados da pesquisa. Legenda: Lip% = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido;

Gráfico 15 - Gráfico de Pareto para avaliação da variável de tamanho (diâmetro médio) no planejamento experimental.



Fonte: dados da pesquisa. Legenda: Lip% = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L = proporção de lipídeo sólido e líquido;

Gráfico 16 - Gráfico de Pareto para avaliação da eficiência de encapsulamento no planejamento experimental.

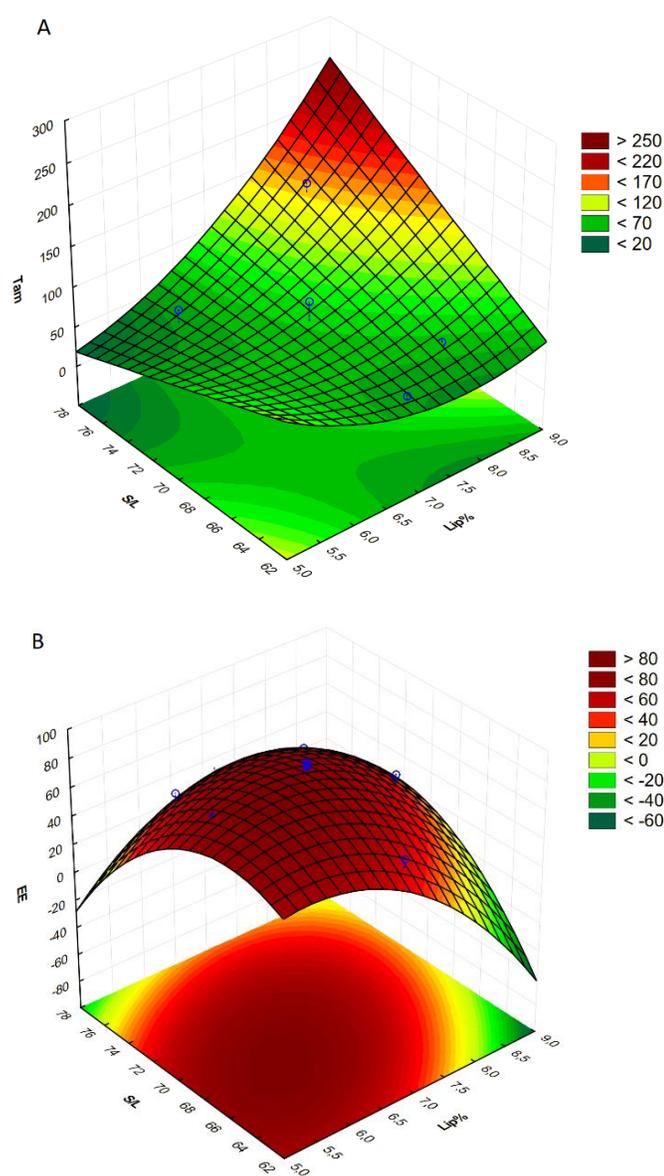


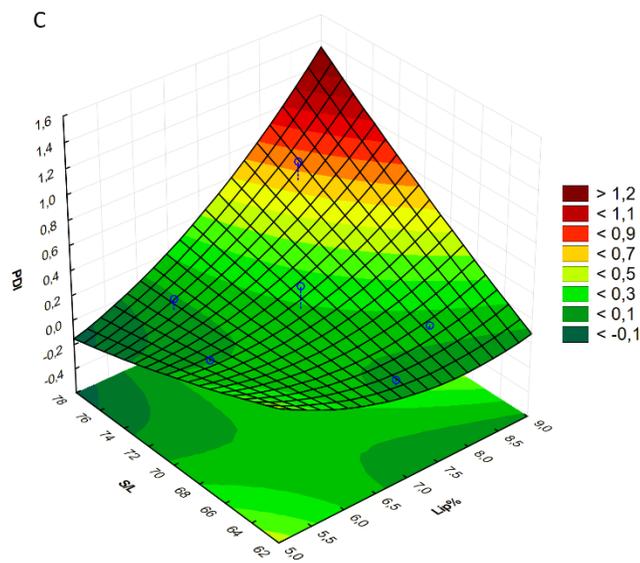
Legenda: %Lip = quantidade de lipídeo na formulação total; S/L= proporção de lipídeo sólido e líquido; EE = eficiência de encapsulamento. Fonte: autoria própria

Como mostram os gráficos acima, as variáveis que tiveram efeito significativo para o tamanho e para o PDI foram, na ordem, a quantidade de lipídeos total (%Lip), a proporção de lipídido sólido/lipídido líquido (S/L) e a interação desses dois fatores, sendo todos com efeito positivo em ambas as variáveis. Para a eficiência de encapsulamento, todas as variáveis tiveram efeito significativo, inclusive as interações lineares e as quadráticas. A ordem de maior significância foi a quadrática da proporção de lipídido sólido/lipídido líquido (S/L), a quantidade de lipídeos total (%Lip) linear e quadrática, todas com efeito negativo, a interação entre %Lip e S/L com efeito positivo, além da S/L com efeito negativo. As interações quadráticas significam que a relação entre as variáveis possui influência significativa de forma não linear, ou seja, não é uniforme (Forlogic, 2016). Logo, um aumento dos fatores S/L, %Lip isolados levam à diminuição da EE, enquanto o aumento da interação dos fatores leva ao aumento da EE. No caso do potencial zeta, apenas a quantidade de lipídeos total (%Lip) teve efeito significativo negativo (tanto linear quanto da sua quadrática), ou seja, a diminuição da %Lip causará um aumento do PZ. Portanto, como as variáveis influenciaram de forma diferentes as respostas, 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 17). No que tange a eficiência de encapsulamento, uma maior

proporção de lipídeo líquido pode reduzir a cristalinidade da 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 e manutenção do mesmo (Cavalcanti *et al.*, 2018; Dara *et al.*, 2019; Ghadiri *et al.*, 2012; Ghasemian *et al.*, 2017; Khezri *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2014; Rostamkalei *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2012; Shtay *et al.*, 2019; Varshosaz; Tabbakhian; Mohammadi, 2010; Zhao *et al.*, 2014).

Figura 17 - Gráfico de superfície resposta para a variável diâmetro (A), eficiência de encapsulamento (B) e Pdl (C) em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental contendo o fármaco.





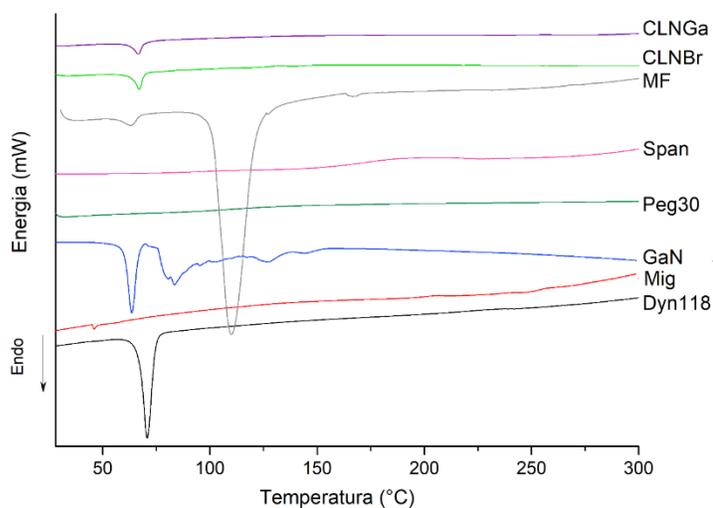
No gráfico A é possível visualizar que os melhores tamanhos estão presentes na região verde escura, que corresponde à proporção S/L acima de 70% de lipídeo sólido e quantidade de lipídeo total acima de 7%. Os mesmos valores podem ser observados para o PDI no gráfico C. Já no gráfico B, observa-se que as melhores EE estão nas regiões relacionadas às proporções Sol/Liq abaixo de 72% de lipídeo sólido e quantidade total de lipídeo abaixo de 8%. Esses resultados apontam para as amostras 1, 2, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13 como as melhores do ensaio e, como as amostras de 9 a 13 são repetições do experimento, apenas 5 amostras (1, 2, 5, 7 e 9) foram consideradas como as formulações ideais para a obtenção dos CLN. Considerando, entre estas, que todas possuem tamanhos ótimos para a finalidade do estudo, PDI dentro da faixa de baixa dispersão 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, o ponto médio/central dos fatores avaliados foram selecionados, onde as amostras de repetição (9 a 13) foram definidas como a melhor formulação para obtenção das nanopartículas que continuam no estudo, as quais correspondem à 7% de lipídeos totais e 70% de S/L. Portanto, através do DOE foi possível conhecer as variáveis e níveis ideais para obtenção do CLN com as melhores características e escolher a composição do melhor CLN que continuou o estudo.

5.3 Caracterização dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)

5.3.1 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é extremamente importante para avaliar a compatibilidade de sistemas de liberação de fármacos, detectando interações físicas e químicas entre os componentes do nanocarreador, através da análise das transições térmicas, como fusão e termodecomposição, além de auxiliar na avaliação da cristalinidade da matriz lipídica do CLN. (Mura *et al.*, 1998). Para o Alkest®CSO 300 e Span® 80, não foram observados eventos em suas análises isoladas, visto que são substâncias líquidas com eventos de decomposição acima de 290 °C.

Figura 18 – Curva de DSC das substâncias isoladas, mistura física e nanopartículas



Legenda: CLNGa = nanopartícula com o fármaco; CLNBr = nanopartícula sem o fármaco; MF = mistura física; Span = tensoativo; PEG30 = tensoativo; GaN = nitrato de gálio; MIG = miglyol; Dyn118 = Dynasan118.

Fonte: autoria própria

O gráfico DSC do Dynasan® 118, possui apenas um pico referente ao seu ponto de fusão (em torno de 73,86°C com entalpia -199,14 J/g), conforme preconiza a literatura. Não foi possível detectar o ponto de fusão do lipídeo líquido à temperatura ambiente, o Miglyol® 812 (-5°C), visto que a faixa utilizada no método é equivalente a 25 °C - 300 °C. O início do evento exotérmico pode ser referente à decomposição do Miglyol® 812 e é observado próximo à temperatura de 290°C. Para o composto isolado do nitrato de gálio, observa-se um evento de natureza endotérmica com

pico em torno de 52°C (-123,29 J/g). Além disso, após esse evento percebe-se o surgimento de vários picos, sendo um indicativo da perda de água de cristalização do nitrato de gálio.

Na mistura física contendo todos os componentes (MF), observa-se um evento em torno de 65°C, referente ao do pico de fusão do Dynasan 118 e o nitrato de gálio juntos. A diminuição do pico e temperatura de fusão do Dynasan é indicativo da sua solubilidade no lipídeo líquido, denotando também uma redução na sua cristalinidade. Além disso, nota-se o pico referente à perda de água da fase A1 da nanopartícula. (Benival; Devarajan, 2012; Liu *et al.*, 2014; Mirchandani; Patravale; Brijesh, 2021; Saeedi *et al.*, 2021). Já na nanopartícula branca, com todos os componentes exceto o nitrato de gálio, observa-se o deslocamento do ponto de fusão do lipídeo sólido.

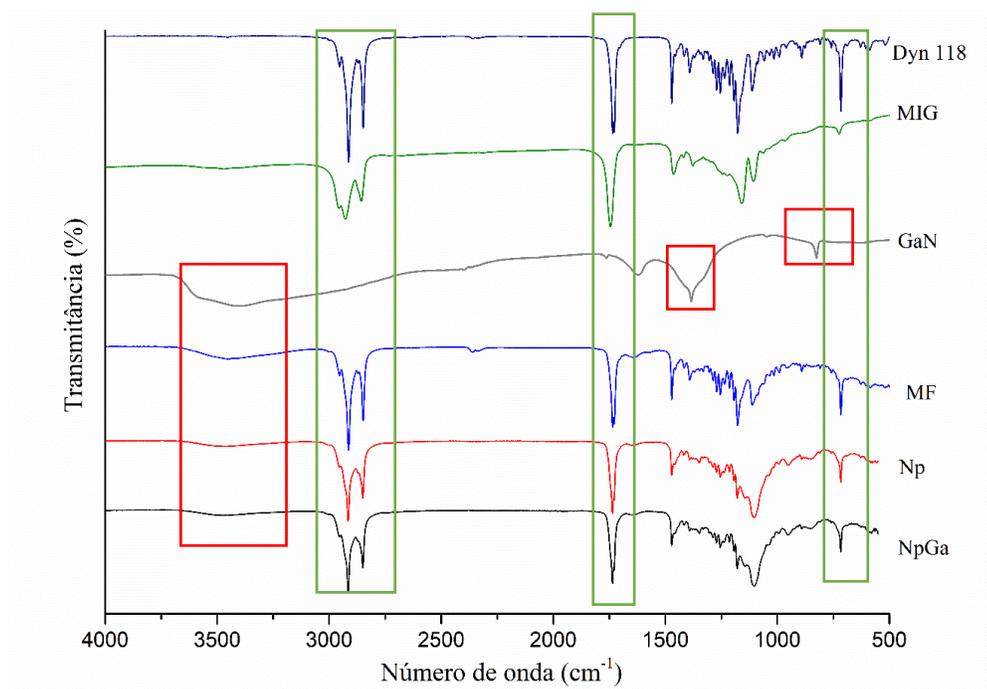
No que tange a nanopartícula contendo o nitrato de gálio, a análise do DSC é essencial para avaliar o comportamento térmico e a cristalinidade das nanopartículas, que desempenham um papel crucial na previsão da sua estabilidade física e conseqüentemente na capacidade de manter o fármaco encapsulado (Horoïwa *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2021). Não se observa o ponto do pico de fusão do fármaco (52°C), sendo indicativo do alto encapsulamento na matriz da CLN. Também não é observado o pico da perda de água de cristalização do nitrato de gálio, visto que o mesmo encontra-se solúvel. Verifica-se que existe um pico pequeno e alargado, referente ao deslocamento do ponto de fusão do lipídeo sólido, que pode ser justificado à estruturação da nanopartícula que possui menor cristalinidade, alterando a faixa de fusão e entalpia, que passa a ser equivalente a -64,65 J/g. Essa redução da entalpia em comparação ao lipídeo sólido pode ser justificada pela redução da cristalinidade devido à nanoestruturação. Além disso, componentes como água, lipídeos líquidos e agentes surfactantes, podem causar alterações na estrutura cristalina da amostra, levando a uma diminuição na entalpia de fusão (Başaran *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017). Essa redução de cristalinidade é o ideal para melhor incorporação do fármaco e manutenção do encapsulamento ao longo do tempo.

5.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR permite a identificação de grupos funcionais presentes nas moléculas, determinando interações químicas são possíveis, assim como reações indesejadas e degradações

(Pavia *et al.*, 2012; Kamnev *et al.*, 2021). É uma ferramenta voltada para identificação de compostos orgânicos, pois é capaz de identificar diferentes ligações químicas entre átomos pelas deformações rotacionais e vibracionais, proporcionando uma certa dificuldade na visualização de sinais de amostras inorgânicas devido à presença de ligações fracas do tipo iônica (Skoog *et al.*, 2010). Diante desse fato, podem ser úteis para corroborar os dados de DSC e confirmar a incorporação do Nitrato de Gálio no CLN. Os espectros das amostras isoladas, da mistura física e da nanopartícula sem o fármaco e com o fármaco são mostrados na Figura 19, na qual foram destacadas as principais bandas relacionadas aos grupos funcionais dos lipídeos em verde e do IFA em vermelho.

Figura 19 - Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, mistura física e nanopartículas.



Legenda: GaN = nitrato de gálio; Dyn118 = Dynasan118; MIG = miglyol; MF = mistura física total; NP = nanopartícula sem o fármaco; NpGa = nanopartícula com o fármaco. Fonte: autoria própria

Os padrões de espectroscopia de infravermelho apresentados mostram bandas características esperadas para o nitrato de gálio (GaN). As bandas em torno de 3450 cm^{-1} e em 1630 cm^{-1} , estão relacionadas com vibrações de estiramento de grupos hidroxilas (Hou, 2010). A banda observada próximo de 750 cm^{-1} é similar à reportada por Hou et al. (2010) e por Escribano e colaboradores (2005), que estudaram o óxido de gálio, correspondente às vibrações entre as

ligações Ga-O-Ga, enquanto a banda em aproximadamente 1300 cm^{-1} corresponde à vibrações dos nitratos.

No espectro do Dynasan118, nota-se picos nas regiões de 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , característicos dos lipídeos, tais como os do estiramento dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, em 1740 cm^{-1} e dos seus dobramentos, em 1172 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} do estiramento de C=O das carbonilas características de ésteres, em 1465 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} , do estiramento C-O de ésteres, e em 721 cm^{-1} de dobramento de grupos CH_2 de cadeias longas. Também apresentam picos justapostos na faixa entre 1215 e 1288 cm^{-1} do estiramento assimétrico C-O comum em triglicerídeos, além da ausência da banda de alta intensidade na região de 3400 cm^{-1} , uma vez que se refere a um triglicerídeo e não possui grupos OH livres. O Miglyol apresentou espectro semelhante, com picos característicos de triglicerídeos (de Souza, 2022; Sales, 2023).

Na mistura física, foram observados os picos encontrados nos demais componentes isolados sem deslocamentos ou surgimento de novos picos de absorção, nota-se apenas uma diminuição na intensidade dos picos, especialmente na faixa de 3450 cm^{-1} e em 1630 cm^{-1} , referentes a vibrações de estiramento de grupos hidroxilas e do nitrato do composto do nitrato de gálio.

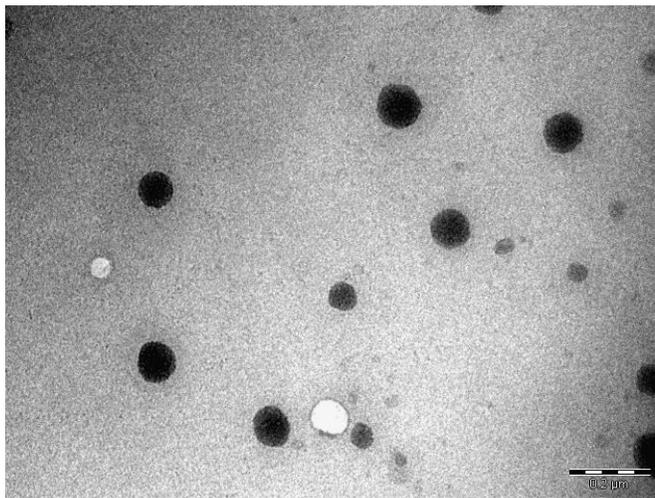
Os espectros das nanopartículas com e sem o fármaco se mostraram bem semelhantes, com predominância de picos característicos dos lipídeos. Esse fato pode ser devido à eficiência de encapsulamento, onde sinais do gálio ficaram bem reduzidos, não sendo possível identificá-los (Paiva, 2008). Não foram encontrados deslocamentos bruscos de bandas de absorção ou novos picos. Baseados nesses resultados, foi possível verificar apenas alteração com indícios de solubilização entre os componentes (Chadha; Bhandari, 2014; Pani *et al.*, 2012; Rojek; Wesolowski, 2019). Nesse caso, trata-se de uma interação que pode favorecer a formação de nanopartículas com maiores concentrações de fármaco.

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiu a visualização direta dos CLN, com e sem fármaco, revelando informações sobre sua forma, tamanho. O resultado do MET do CLNGa (contendo o fármaco) pode ser observado na figura 20. Na análise do CLNGa, foi possível observar que as nanopartículas apresentavam uma morfologia esférica, sugerindo uma alta eficiência no processo de emulsificação e formação dos nanocarreadores. As imagens de MET exibiram partículas com tamanhos inferiores à 100 nm , confirmando os resultados obtidos pelo

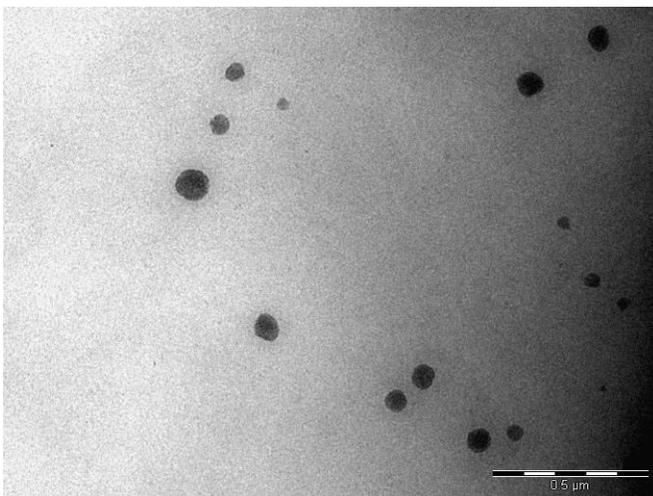
DLS desta mesma formulação. O MET do CLNGa mostra partículas mais escuras em comparação com o MET do CLNBr (sem fármaco), isso pode ser atribuído ao fármaco, que possui um metal na molécula e pode gerar maior contraste na microscopia. A figura 21 mostra o CLNs sem o fármaco, com a mesma composição da formulação selecionada, a fim de permitir a comparação das estruturas. Conforme pode ser observado, o CLNBr também possui tamanhos inferiores à 100 nm e morfologia esférica, com menor contraste. Com isso, a análise dos resultados de microscopia eletrônica de nanocarreadores lipídicos proporcionou uma compreensão mais profunda da morfologia, tamanho e estrutura interna desses sistemas. Essa compreensão é essencial para orientar o desenvolvimento e a otimização desses nanocarreadores.

Figura 20 – Morfologia dos CLN obtidas por MET do CLNGa



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 21 - Microfotografias obtidas por MET do CLNBr (sem o fármaco)



Fonte: Dados da pesquisa.

5.4 Estabilidade de Armazenamento

5.4.1 Aspecto macroscópico

As formulações apresentaram características organolépticas semelhantes as iniciais durante o decorrer do estudo de estabilidade (90 dias). Mantiveram um aspecto translúcido com reflexo azulado característico de nanopartículas, com ausência de grumos e de cremeação.

5.4.2 Determinação do pH

O pH também é considerado um parâmetro essencial para avaliar a estabilidade, pois alterações nos seus valores podem indicar hidrólise ou oxidação dos lipídeos existentes na formulação, gerando ácidos graxos livres que diminuem o pH, impactando na solubilidade e degradação do IFA (Khanum; Thevanayagam, 2017; Lball; Bajaj; Whitehead, 2017; Li *et al.*, 2013; Muramatsu *et al.*, 2022).

Na tabela abaixo, é possível verificar que o CLNBr apresentou variação significativa a partir do dia 30, enquanto o CLNGa apresentou a partir do dia 60, porém com mínima variação, demonstrando a estabilidade do pH das amostras, sendo um indicativo de que os lipídeos permaneceram com as características estáveis na formulação. Vale ressaltar que para o preparo da nanopartícula com o fármaco, a solução do nitrato de gálio não teve seu pH corrigido, apresentando

assim um caráter muito ácido (pH ~3,0), devido a formação de ácido nitroso. Assim, como ficou verificado o caráter fortemente ácido no CLNGa, será necessário corrigir o pH do fármaco para a obtenção do CLN, visando o pH adequado para aplicação cutânea e para demais ensaios *in vitro*.

Tabela 8 – Valores encontrados de pH para CLNBr (sem fármaco) e CLNGa (com fármaco).

DIAS	CLNBr	CLNGa
PP	5,67 ± 0,02	2,7 ± 0,05
15D	5,59 ± 0,04	2,73 ± 0,03
30D	6,03 ± 0,07 ^a	2,73 ± 0,04
60D	6,06 ± 0,05 ^a	2,96 ± 0,07 ^b
90D	6,06 ± 0,05 ^a	2,98 ± 0,08 ^b

Fonte: dados da pesquisa. Legenda: letras sobrescritas iguais na mesma coluna representam diferença significativa em relação ao pós-preparo.

5.4.3 Características físico-químicas

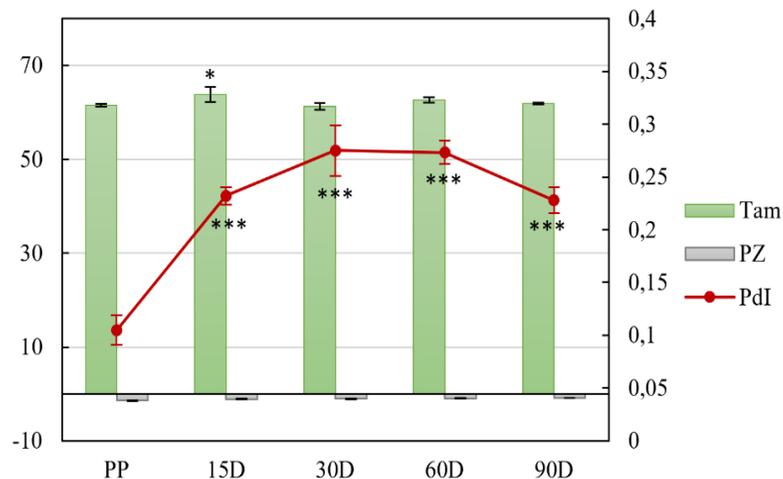
O ensaio foi realizado com o intuito de verificar alterações nas propriedades físico-químicas dos carreadores lipídicos nanoestruturados e, para isso, foram determinados os valores do tamanho hidrodinâmico médio, potencial zeta, PdI, pH e também a eficiência de encapsulamento. Diversos fatores corroboram para a interferência nessas características físico-químicas mencionadas, sendo os principais deles a composição e a forma de armazenamento, responsáveis pela manutenção das características de formulações estáveis, ou seja, com homogeneidade das características físico-químicas (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2021; Shah, 2014; Zhao *et al.*, 2020).

No que diz respeito ao nanocarreador sem o fármaco (CLNBr), as variações de tamanho foram significativas apenas no dia 15, porém com variação mínima, sendo no pós preparo equivalente a 61,5 nm e no dia 90 equivalente a 61,88 nm. O potencial zeta variou de -1,41 mV a -0,869 mV. Esse valor pode ser justificado devido a oxidação da cubeta utilizada na análise. Já o valor do PdI teve um aumento significativo e considerável desde o dia 15 até o final do estudo, saindo de 0,105 para 0,228, podendo ser um indicativo de maior chance de agregação ou floculação com o passar do tempo. O potencial zeta também pode servir como um indicativo de instabilidade, visto que está relacionado com a barreira eletrostática existente entre as partículas que causam repulsão em possíveis choques durante o movimento Browniano. O valor considerado ideal para

manter essa repulsão eletrostática é de $\geq |30|$ mV. É importante ressaltar que a escolha do tensoativo também é crucial para a repulsão das partículas, visto que tensoativos não-iônicos polietoxilados formam uma camada interfacial, causando impedimento estérico e contribuindo positivamente para a repulsão das partículas e, conseqüentemente, a estabilidade (Bhattacharjee, 2016; Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2021; Kovacevic *et al.*, 2011).

Diante dos resultados, o PdI no decorrer dos 90 dias analisados ainda é considerado de baixa polidispersão ($PdI \leq 0,300$), mas a variação ocorrida no tempo de ensaio pode indicar início de instabilidade (Bhattacharjee, 2016; Shah, 2014; Yang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2020).

Figura 22 - Gráfico das variações de tamanho hidrodinâmico, PdI e potencial zeta do CLNBr armazenado em condições de refrigeração.

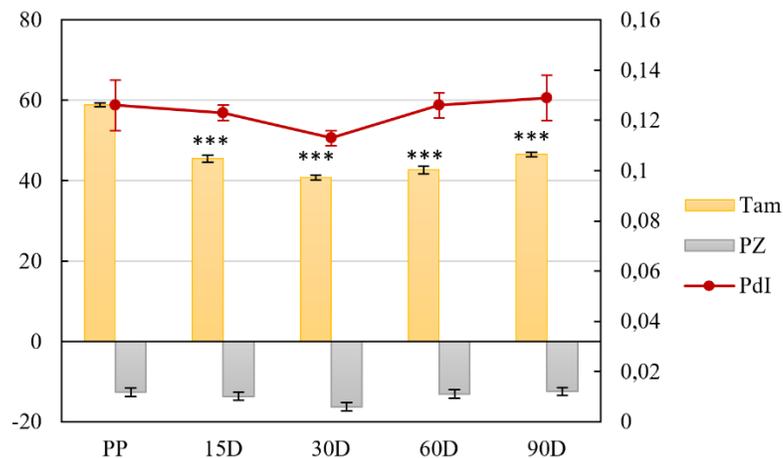


Legenda: Tam = tamanho; PZ = potencial zeta; PdI = índice de polidispersão. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao pós-preparo

No que diz respeito ao nanocarreador com o fármaco (CLNGa), as variações de tamanho foram significativas, porém com diminuição de tamanho, sendo no pós preparo equivalente a 58,82 nm e no dia 90 equivalente a 46,52 nm. O motivo do tamanho ser significativamente maior inicialmente pode estar relacionado a alguns fatores, sendo eles: após o preparo, as nanopartículas podem estar propensas a se aglomerarem ou agregarem devido às forças de Van der Waals ou outras interações interparticulares. Essas aglomerações podem inicialmente resultar em um aumento aparente no tamanho das partículas. Com o tempo, se as condições forem favoráveis, essas aglomerações podem se desfazer, levando a uma redução no tamanho aparente (Souto, 2012). Também pode estar relacionada com reorganizações estruturais ao longo do tempo, resultando em

uma diminuição do tamanho médio (Schaffazick, 2003) ou com alterações na dispersão, onde as partículas podem estar bem dispersas inicialmente, sendo medidas como partículas maiores e, com o decorrer do tempo, se a dispersão melhorar, o tamanho aparente pode diminuir (Ferreira, 2009).

Figura 23 - Gráfico das variações de tamanho hidrodinâmico, PdI e potencial zeta do CLNGa armazenado em condições de refrigeração.



Legenda: Tam = tamanho; PZ = potencial zeta; PdI = índice de polidispersão. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao pós-preparo.

O potencial zeta variou de -12,62 a -12,43, sem significância. Como citado acima, o valor considerado ideal para manter essa repulsão eletrostática é de $\geq |30|$ mV porém, mesmo com os resultados apresentados abaixo de 30 mV, as formulações apresentaram boas características de estabilidade, podendo ser justificado pelo uso do tensoativo com grande estabilidade estérica (Bhattacharjee, 2016; Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2021; Kovacevic *et al.*, 2011). O valor do PdI também se manteve sem variação estatisticamente significativa, sendo equivalente a 0,126 no pós-preparo e 0,129 no dia 90. O PdI das nanopartículas contendo o nitrato de gálio no decorrer dos 90 dias analisados também foi considerado de baixa polidispersão ($\text{PdI} \leq 0,300$), garantindo a qualidade e a homogeneidade do sistema, demonstrado pela manutenção dos valores ao longo do tempo (Bhattacharjee, 2016; Shah, 2014; Yang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2020).

Com base nos resultados acima citados, observa-se que a nanopartícula contendo o nitrato de gálio apresentou melhores valores para as variáveis de tamanho, PdI e potencial zeta, bem como sua manutenção, sendo um indicativo de que o nitrato de gálio influencia positivamente na

estabilidade da formulação. O teste não foi realizado em temperatura ambiente baseado em resultados de estudos prévios do nosso grupo e da literatura, onde CLN armazenados em temperatura ambiente possuem um aumento de energia cinética e da agitação de partículas, elevando o número de choques no movimento Browniano e favorecendo a agregação, assim como afetam a microviscosidade garantida pelo tensoativo, possibilitando a fusão das camadas do filme de tensoativo existente entre as partículas e diminuem a eficiência de encapsulamento, especialmente de fármacos hidrossolúveis (devido a afinidade pela fase aquosa), pois facilitam a conversão dos lipídeos para sua forma cristalina (Galvão *et al.*, 2016; Masiwa; Gadaga, 2018; Sandhu *et al.*, 2021; Zhang; Kirsch, 2004).

A eficiência de encapsulamento também está relacionada com a estabilidade, pois diz respeito a farmacocinética, onde rearranjos lipídicos para formas mais cristalinas (estáveis) podem ocasionar a expulsão do IFA e diminuir o encapsulamento o (Galvão *et al.*, 2016; Mehnert; Mader, 2012; Pathak; Keshri; Shah, 2011). Durante os intervalos do estudo, também foi analisada a eficiência de encapsulamento da nanopartícula. O teste foi realizado em duplicata e os resultados estão expressos na Tabela abaixo através de uma média dos valores encontrados.

Tabela 9 – Valores encontrados para a eficiência de encapsulamento no decorrer do estudo de estabilidade.

Dias	EE(%)
PP	86,729 ± 0,909
15D	92,297 ± 0,808 ^a
30D	85,667 ± 1,234
60D	90,047 ± 0,982 ^a
90D	83,126 ± 1,053 ^a

Fonte: dados da pesquisa. Legenda: letras sobrescritas representam diferença significativa em relação ao pós-preparo.

Através dos resultados, foi mostrado que as variações da EE do nitrato de gálio na nanopartícula contendo o fármaco (CLNGa) armazenada em refrigeração foram significativas, mas com manutenção de valores aceitáveis até o momento avaliado. O nitrato de gálio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) é uma substância iônica que é considerada hidrofílica. Os íons nitrato (NO_3^-) presentes no nitrato de gálio são altamente hidrofílicos devido à sua carga negativa e à natureza polar das ligações entre átomos de oxigênio e nitrogênio. Assim, o nitrato de gálio tende a se dissolver facilmente em água e interagir bem com moléculas polares. Ainda assim, houve manutenção dos valores da EE. Outros estudos com CLN contendo IFAs hidrofílicos também têm mostrado boa manutenção do

encapsulamento do fármaco (Banerjee *et al.*, 2018; Kamboj; Verma, 2018; Kasongo; Mller; Walker, 2012; Khezri *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2018), condizentes com os resultados encontrados nesse estudo.

Portanto, considerando que a estabilidade é um ponto crítico para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, pois está relacionada com a eficácia e a segurança, os resultados obtidos através de amostras mantidas em refrigeração foram considerados promissores.

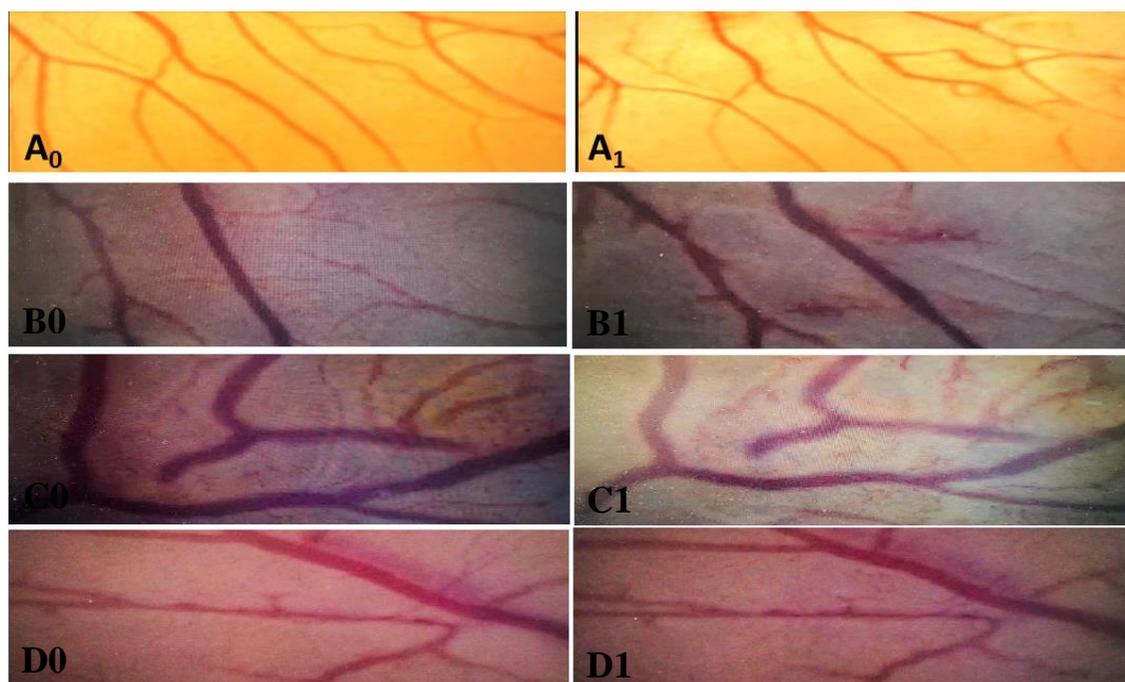
5.5 Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM)

O ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM) é considerado um ensaio de irritação *in vitro*, até o 10º dia de fecundação do ovo, tendo grande aplicabilidade por ser de baixo custo, ser efetivo, e de rápida análise, quando comparada com outros testes *in vivo*, tais como o teste Draizer do olho do coelho (BAGLEY; WATERS; KONG, 1994). Inclusive, o HET-CAM tem sido propostos como uma alternativa *in vitro* para substituição do teste do olho do coelho (FREIRE *et al.*, 2015). O ensaio de HET-CAM permite se aferir o potencial de irritação pela visualização de efeitos agudos induzidos por uma substância sobre os pequenos vasos sanguíneos e proteínas da membrana corioalantóide, uma vez que se assemelha a mucosa de mamíferos (BAGLEY; WATERS; KONG, 1994; FREIRE *et al.*, 2015). Contudo, o ensaio de HET-CAM apresenta algumas limitações, como não ser possível a realização do teste quando a substância a ser avaliada apresenta alta viscosidade, não é solúvel em solventes compatíveis ao teste, ou quando é muito opaca, ou de cor intensa, dificultando a visualização da membrana corioalantóide (VARGAS *et al.*, 2007; SAW; HENG; LIEW, 2008).

Como verificado na Figura 24, o CLNGa e a solução de nitrato de gálio foram consideradas como não irritantes, com PI de 0,0, ausência dos efeitos inflamatórios e vasculares de vasoconstrição, hemorragia e coágulo, durante dos 5 minutos (300 segundos) de observação. Já o CLNBr (sem o nitrato de gálio) foi considerada como levemente irritante com PI correspondente a 1,8, onde apresentou hemorragia ($200 \pm 5,0$ segundos). Esse resultado pode ser justificado pela característica antiinflamatória do nitrato de gálio, que também foi mantida quando encapsulado no nanocarreador. Por outro lado, como esperado, o lauril sulfato de sódio 1% (controle positivo para irritação) apresentou PI de $17,74 \pm 0,4$, sendo visualizado vasoconstrição ($6,0 \pm 1,0$ segundos), coágulo ($63,0 \pm 3,0$ segundos) e hemorragia ($48 \pm 3,0$ segundos), sendo classificado como irritante

severo/grave. Assim, os resultados obtidos no teste de HET-CAM sugerem que as nanopartículas de nitrato de gálio, quanto ao potencial de irritação, podem compor formulações antiinflamatórias seguras para uso em humanos. Testes de citotoxicidade devem ser empregados para verificar a segurança das substâncias quanto a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Figura 24 - Determinação do potencial de irritação pelo ensaio da membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (HET-CAM) para os CLN, solução do gálio e controles



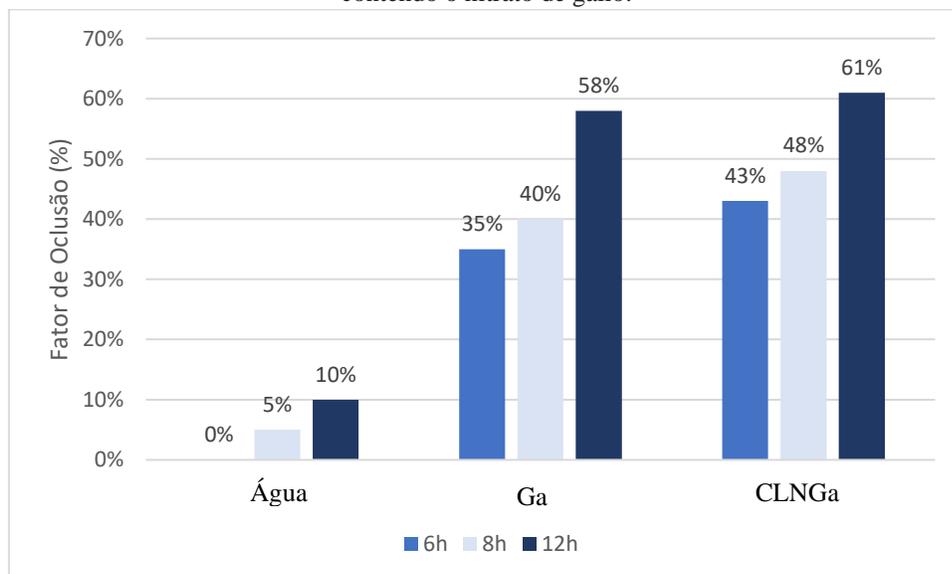
Fonte: Dados da Pesquisa. Legenda: A0= Lauril sulfato de sodio 1% tempo zero; A1= Lauril sulfato de sodio 1% tempo 300 segundos; B0= CLNBr tempo zero; B1= CLNBr tempo 300 segundos; C0= nitrato de gálio tempo zero; C1= nitrato de gálio tempo 300 segundos; D0= CLNGa tempo zero; D1= CLNGa tempo 300 segundos;

5.6 Avaliação do efeito oclusivo

Atualmente, já existem formulações contendo lipídicos nanoestruturados em sua composição, visando melhorar as características de hidratação cutânea. Como já citado anteriormente, isto é possível porque os carreadores lipídicos formam um filme oclusivo que dificulta a perda transepidermal de água (Baumann, 2009; Conceição, 2014; Pardeike et al., 2009; Ferreira, 2012).

Quando espera-se obter uma forma farmacêutica semissólida, o efeito oclusivo é um parâmetro importante para ser avaliado nas formulações. Esse efeito pode ser calculado pelo fator de oclusão que varia de 0-100%, sendo o efeito de 0% correspondente ao fato de não ocorrer oclusão (controle) e 100% a máxima oclusão (Souto; Muller, 2008; Ferreira, 2012). A Figura 25 apresenta os resultados obtidos do efeito oclusivo do controle (água), da solução de nitrato de gálio e do carreador lipídico nanoestruturado contendo nitrato de gálio. É possível observar que mesmo no menor tempo (6h), o CLNGa apresentou oclusão superior ao controle e à solução do fármaco, o que indica que o CLN desenvolvido pode representar um efeito oclusivo da mesma ordem de grandeza de sistemas da mesma natureza (lipídicos), conforme descrito na literatura (Conceição, 2014; Souto; Muller, 2008; Lacerda, 2009). Além disso, a oclusão foi dependente do tempo. Vale salientar também que o tamanho das partículas influencia diretamente no caráter oclusivo, pois quanto menor o tamanho das partículas, maior é a barreira para a evaporação, e quanto maior o tamanho destas partículas, uma maior quantidade de água será evaporado (Ferreira, 2012). O efeito oclusivo evidenciou que os CLN possuem um caráter oclusivo até quando comparado a solução de nitrato de gálio, demonstrando seu potencial para incorporação em forma farmacêutica semissólida (Ferreira, 2012).

Figura 25 – Potencial de Oclusão das amostras de água, da solução de nitrato de gálio e da nanopartícula contendo o nitrato de gálio.



Legenda: Água 6h: $0\% \pm 0,9$, 8h: $5\% \pm 0,69$ e 12h: $10\% \pm 0,45$ de oclusão; Gálio 6h: $35\% \pm 0,06$, 8h: $40\% \pm 0,06$ e 12h: $58\% \pm 0,017$ de oclusão; NPGa: 6h: $43\% \pm 0,1$, 8h: $48\% \pm 0,23$ e 12h: $61\% \pm 0,02$ de oclusão. Todas as amostras apresentaram diferença significativa entre si, em todos os tempos ($p < 0,001$).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através do planejamento experimental se mostraram favoráveis para o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo nitrato de gálio, visto que, através da triagem realizada, foram obtidos CLN com características físico-químicas para a aplicação desejada. As técnicas de caracterização comprovaram a incorporação do fármaco à matriz da nanopartícula com característica amorfizada, possibilitando um bom resultado de eficiência de encapsulamento não só após o preparo, mas também ao longo do estudo de estabilidade de 90 dias sob condições de refrigeração. Além disso, sua baixa irritabilidade evidenciada pelo teste de HET-CAM, somado ao seu potencial de oclusão, corrobora sua aplicação para uma forma farmacêutica de uso cutâneo, possibilitando eficácia e segurança. Ademais, o tamanho, PDI e potencial zeta encontrados mostraram que os CLN possuem potencial para uso em infecções cutâneas, sendo o objetivo do presente trabalho. Estudos de permeação cutânea e atividade antimicrobiana devem ser realizados para garantir sua viabilidade.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Repetir o estudo de estabilidade de 90 dias da amostra de CLNBr (sem o fármaco) para reavaliar os valores encontrados no potencial zeta;
- Avaliar citotoxicidade e atividade microbiológica *in vitro* das nanopartículas;
- Realizar ensaios de cinética de liberação de permeação, mimetizando a administração cutânea das nanopartículas;
- Desenvolver creme com as nanopartículas lipídicas contendo nitrato de gálio.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. Y.; SWITZER, B. L.; GOSS, C. H.; AITKEN, M. L.; SINGH, P. K.; BRITIGAN, B.E. Gallium compounds exhibit potential as new therapeutic agents against *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 4826–4834, 2015.

ALMADANI, Y. H. et al. Wound Healing: A Comprehensive Review. **Seminars in Plastic Surgery**, v. 35, n. 3, 15 jul. 2021.

AMERICAS, I. C. I. The HLB System: A Time-saving Guide to Emulsifier Selection. **ICI Americas, Incorporated**, 1984.

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 antimoniato 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.

AWADEEN, Randa Hanie; BOUGHDADY, Mariza Fouad; MESHALI, Mahasen Mohamed. Quality by Design Approach for Preparation of Zolmitriptan/Chitosan Nanostructured Lipid Carrier Particles – Formulation and Pharmacodynamic Assessment. **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-zolmitriptanchitosannan-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 13 maio 2022

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.

BAGLEY, D.M.; WATERS, D.; KONG, B.M.. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Food Chem Toxicol**, 32, 1155–1160, 1994.

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: 16 set. 2023.

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.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 42f., 2013.

BARIL, M. B.. Nanotecnologia Aplicada à Cosméticos. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.45-54, Universidade Federal do Parana, 28 nov. 2012.

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. 2023

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.

Berggren MM, Burns LA, Abraham RT, Powis G. Inhibition of protein tyrosine phosphatase by the antitumor agent gallium nitrate. *Cancer Res.* 1993 Apr 15;53(8):1862-6. PMID: 8467506.

BERNARDES, R.. Recurso educacional sobre prevenção e manejo da lesão por pressão – Universidade de São Paulo, 2020. Acesso em: < http://eerp.usp.br/feridasronicas/recurso_educacional_lp_4_7.html> 11/04/2024 às 02:14h.

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. 2023.

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.com/science/article/pii/S0928098718302732?via%3DIihub>. Acesso em: 25 junho 2023.

CHITAMBAR, C.R. Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 7, n. 5, p. 2337–2361, 2010.

CHITAMBAR, C. R. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1863, p. 2044–2053, 2016.

CHITAMBAR, C. R. The therapeutic potential of iron-targeting gallium compounds in human disease: From basic research to clinical application. **Pharmacological Research**, v. 115, p. 56–64, 2017.

CHOI, S. R.; BRITIGAN, B.E.; NARAYANASAMY, P. Iron/heme metabolism-targeted gallium(III) nanoparticles are active against extracellular and intracellular pseudomonas aeruginosa and acinetobacter baumannii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, p. 1–17, 2019.

COGEN A.L., NIZET V., GALLO R.L.: Skin microbiota: a source of disease or defence? **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 158, p. 442–455, 2008.

CONCEIÇÃO, R. Avaliação da incorporação de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) contendo hidroxiapatita em formulação creme. Universidade Federal de Sergipe, 2014.

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.

COSTA, A. L. P da; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, maio/ago. 2017

COSTA, L. A. G. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

COSTA, S. P. M. **Obtenção de sistemas poliméricos microparticulados para o aumento da velocidade de dissolução do efavirenz na terapia anti-HIV**. 152 p. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

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.

DAESCHLEIN, G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. **International Wound Journal**, v. 10, p. 9–14, 2013.

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.

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; 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.

DAUDT, Renata M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DELEON, K.; BALLDIN, F.; WATTERS, C.; HAMOOD, A.; GRISWOLD, J. Gallium Maltolate Treatment Eradicates *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Thermally Injured Mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 1331-1337, 2009.

DE SOUZA, M. L.; DOS SANTOS, W. M.; DE SOUSA, A. L. M. D.; SALES, V. A. W.; NÓBREGA, F. P.; DE OLIVEIRA, M. V. G.; ROLIM NETO, P. J. Lipid Nanoparticles as a Skin Wound Healing Drug Delivery System: Discoveries and Advances. **Curr Pharm Des**. 26(36) 4536-4550, 2020.

DEVRIENDT, N.; ROOSTE, H. Initial Management of Traumatic Wounds. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 47, p. 1123-1134, 2017.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Biosciences**, v. 9, p. 283–289, 2004.

DOS SANTOS, P. C. Nanopartículas: Toxicidade Biológica. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Paraíba, 2014.

DOUGHTY, D. Wound, Ostomy, and Continence Nursing Education Center's wound core curriculum. Atlanta (GA): Emory University WOCNEC; 2016. p. 1–312.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514–525, 2007.

Fang, Y., & Wu, J. (2020). Nanoparticle-Based Topical Delivery Systems for Skin Cancer: A Review. *Pharmaceutics*, 12(9), 815. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090815>

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.

Ferreira, H. S., & Rangel, M. do C.. (2009). Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Química Nova*, 32(7), 1860–1870. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700033>

FERREIRA, Leonardo LG; ANDRICOPULO, Adriano D. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 125-127, 2019.

FREDRICKS D.N. Microbial ecology of human skin in health and disease. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, p. 167–169, 2011.

FREIRE, P.L.L., et al. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents** 2015; 45:183-187

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 out 2023.

GRATIERI T, GELFUSO GM, LOPEZ RFV. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quím Nova** 31(6):1490–8, 2008.

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: 13 jun 2023.

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 set 2023.

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.

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.

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 nov 2023.

JIN, Xixuan et al. Application of hydrophilic–lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v. 46, n. 2, p. 226-233, 2008.

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 2023

KAMNEV, Alexander A. et al. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1146, 2021.

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.

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 2023.

KHERADMANDNIA, Soheila et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.

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://wwwtandfonline.ez16.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/21691401.2020.1770271>. Acesso em: 12 jul 2023.

KRAKOFF, I. H.; NEWMAN, R. A.; GOLDBERG, R. S. Clinical toxicologic and pharmacologic studies of gallium nitrate. **Cancer**, v. 44, p. 1722-1727, 1979.

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 nov 2023.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, v. 45, p. 347-351, 2017.

LASOÑ, E. Topical Administration of Terpenes Encapsulated in Nanostructured Lipid-Based Systems. *Molecules*, v. 25, n. 23, p. 5758, 7 dez. 2020.

LEE C. K., HANSEN S. L. Management of acute wounds. *Surgical Clinics of North America*, v. 89, p. 659–676, 2009.

LESSA. J.A; PARRILHA.G.L; BERALDO.H. Gallium Complexes as New Promising Metallodrug Candidates. *Inorganica Chimica Acta*, v. 393, n. 1, p. 53–63, 2012.

LESSA, J. A.; PARRILHA, G. L.; BERALDO, H. Inorganica Chimica Acta Gallium complexes as new promising metallodrug candidates. *Inorganica Chimica Acta*, v. 393, p. 53–63, 2012.

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 nov 2023.

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. 2022.

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. 2023.

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.

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.

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.

MERCANDETTI, M.; COHEN, A. J. Wound Healing and Repair. **Medscape**, 2017. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>>. Acesso em: 08 de dez. de 2023.

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.

MUFTI, A. et al. Anatomy and physiology of the skin. *In*: DOUGHTY, D. B.; MCNICHOL, L. L. **Wound, Ostomy, and Continence Nurses Society core curriculum**: wound management. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016. p. 3–23.

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.

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 2023.

NEGRI, J. L. Metabolismo do ferro e eritropoiese. *Ac&T Científica*, v. 1, n. 10, p.1-10, 2013.

OLIVEIRA, N. T. C. **Crescimento e caracterizações de óxidos pela técnica MOCVD: aplicações em medicina e odontologia**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2016.

PASQUALI, R. C.; TAUROZZI, M. P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic–lipophilic balance system. **International journal of pharmaceutics**, v. 356, n. 1, p. 44-51, 2008.

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.

Petrilli, R., & Lopez, RFV. (2018). Métodos físicos para administração tópica de fármacos na pele: conceitos e aplicações. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54 (Braz. J. Pharm. Sci., 2018 54(spe)), e01008. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001008>

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.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos, **Ciência e Cultura**, v. 65, p. 44–48, 2013.

REINKE, J. M, SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, p. 35-43, 2012.

RESENDE, D. M.; BACHION, M. M.; ARAUJO, L. A. O. Integridade da pele prejudicada em idosos: estudo de ocorrência numa comunidade atendida pelo Programa Saúde da Família. **Revista Acta Paulista de Enfermagem**, v. 19, p. 168-173, 2006.

Rigo, L. A., da Silveira, E. F., da Silva, C. B., & Sayer, C. (2021). Nanoparticles as Promising Tools to Improve Skin Permeation of Drugs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 651974. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.651974>

ROSSAN, Marcos Roberto. **Preparação e caracterização de micro e nanopartículas lipídicas sólidas para aplicação em cosméticos**. 2011. 181 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP

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.

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.

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.

SALES, S. G. S. **Estudos de pré-formulação para o desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado visando terapia antileishmaniose**. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

SALES, V.A.W. **Desenvolvimento de pomada protetora à base de nanoestruturas de gálio como alternativa de um novo antimicrobiano**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

SALES, V. A. W.; TIMÓTEO, T. R. R.; SILVA, N. M.; MELO, C. G.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. V. G. et al. A systematic review of the anti-inflammatory effects of gallium compounds. *Current Medicinal Chemistry*, v. 27, p. 1-16, 2021.

SANDHU, Simarjot Kaur *et al.* Systematic development and characterization of novel, high drugloaded, photostable, curcumin solid lipid nanoparticle hydrogel for wound healing. *Antioxidants*, [s. l.], v. 10, n. 5, 2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8148018/](http://pmc/articles/PMC8148018/). Acesso em: 17 maio 2022.

SAW, C. L. L., HENG, P. W. S., & LIEW, C. V.. Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 34(11), 1168–1177, 2008.

Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. de L., & Pohlmann, A. R.. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), 726–737. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>

SELMANI, A.; KOVAČEVIĆ, D.; BOHINC, K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. ***Advances in Colloid and Interface Science***, v. 303, p. 102640, maio 2022.

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: </pmc/articles/PMC3660870/>. Acesso em: 11 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.

SHEEHAN P, JONES P, GIURINI JM, et al. Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial. ***Diabetes Care***, v. 26, p. 1879-1882, 2003.

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.

Silva, A. C., Santos, D., Ferreira, D., & Souto, E. B. (2020). Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatological applications: Current status and future prospects. *Drug Discovery Today*, 25(7), 1286–1301. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.04.011>

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. ***Surgery***, v. 35, p. 473-477, 2017.

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.

SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, S. HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, p. 81-94, 2017.

Souto, E. B., Severino, P., & Santana, M. H. A.. (2012). Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. *Polímeros*, 22(1), 101–106. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000005>.

STOJADINOVIC, A.; CARLSON, J. W.; SCHULTZ, G. S.; DAVIS, T. A.; ELSTER, E. A. Topical advances in wound care. **Gynecology Oncology**, v. 111, p. 70–80, 2008.

Straus DJ. Gallium nitrate in the treatment of lymphoma. *Semin Oncol*. 2003 Apr;30(2 Suppl 5):25-33. doi: 10.1016/s0093-7754(03)00173-8. PMID: 12776257.

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, T. R. R.; SALES, V. A. W.; SOUZA, A. L. M. D.; OLIVEIRA, M. V. G.; MELO, C. G.; SILVA, E. O.; FERREIRA, A. S.; SILVA, R. M. F.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J.; Therapeutic Applications of Gallium Compounds. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, 07(01), p. 1662-1674, 2020.

UETA, J. Formas Farmacêuticas – Entendendo como se apresenta. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, 2016.

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.

VARGAS A, et al.. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 59:1162-1176, 2007.

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.

VOEGELI, D. Understanding the main principles of skin care in older adults. **Nursing Standard**, v. 27, p. 59-68, 2012.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**, v. 35, p. 489-494, 2017.

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.

WANG, J.; MING, H.; GUANGBIN, W.; QIN, F. Organic Gallium Treatment Improves Osteoporotic Fracture Healing Through Affecting the OPG/RANKL Ratio and Expression of Serum Inflammatory Cytokines in Ovariectomized Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 183, p. 270–79, 2017(a).

WANG, P.; HUANG, B.; HORNG, H.; YEH, C.; CHEN, Y. Wound Healing. **European Surgical Research**, v. 58, p. 81–94, 2017(b).

WARRELL, R. P.; COONLEY, C. J.; STRAUS, D. J.; YOUNG, C. W. Treatment of patients with advanced malignant lymphoma using gallium nitrate administered as a seven-day continuous infusion. **Cancer**, v. 51, p. 1982–1987, 1983.

WARRELL, R. P.; ALCOCK, N. W.; BOCKMAN, R. S. Gallium nitrate inhibits bone turnover in patients with bone metastases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, p. 292–298, 1987.

WARRELL, R. P.; BOCKMAN, R. S. Gallium in the treatment of hypercalcemia and bone metastasis. **Important Advances in Oncology**, v. 9, p. 205–220, 1989.

WARRELL, R. P.; LOVETT, D.; DILMANIAN, F. A.; SCHNEIDER, R.; HEELAN, R.T. Low-dose gallium nitrate for prevention of osteolysis in myeloma: Results of a pilot randomized study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 2443–2450, 1993.

WARRELL, R. P. Gallium for treatment of bone disease. *In*: DEKKER, M. **Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Medicine**. New York: Berthon, 1995, p. 1253–1265.

ZHANG; PORNPATTANANGUKUL; H. U; HUANG. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 585-594, 2010.

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.