



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE MEDICAMENTOS

SAMILLY GABRIELLY DOS SANTOS SALES

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO VISANDO A TERAPIA  
ANTILEISHMANIOSE**

RECIFE

2023

SAMILLY GABRIELLY DOS SANTOS SALES

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO VISANDO TERAPIA  
ANTILEISHMANIOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC2 como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Coorientadora: Dra. Myla Lôbo de Souza

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Sales, Samilly Gabrielly dos Santos.

ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO VISANDO TERAPIA  
ANTILEISHMANIOSE / Samilly Gabrielly dos Santos Sales. - Recife, 2023.

86 p. : il., tab.

Orientador(a): Pedro José Rolim Neto

Coorientador(a): Myla Lôbo de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

Inclui referências.

1. Tecnologia farmacêutica. 2. nanotecnologia. 3. Leishmaniose. 4. Doenças negligenciadas. 5. nanocarreadores lipídicos. I. Neto, Pedro José Rolim. (Orientação). II. Souza, Myla Lôbo de . (Coorientação). IV. Título.

670 CDD (22.ed.)

SAMILLY GABRIELLY DOS SANTOS SALES

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO VISANDO TERAPIA  
ANTILEISHMANIOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC2 como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 14 de Novembro de 2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto  
Universidade Federal de Pernambuco

---

MSc. Larissa Pereira Alves  
Universidade Federal de Pernambuco

---

MSc. Lucas Amadeu Gonzaga da Costa  
Universidade Federal de Pernambuco

---

MSc. Demis Ferreira de Melo (Suplente)  
Universidade Federal de Pernambuco

*Aos meus amados pais.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, expresso minha profunda gratidão a Deus, eterna verdade, que tem sido a fonte inesgotável de força, sabedoria e orientação, manifestação da graça divina em minha vida.

Continuando, agradeço:

À minha família, Lucielma Maria dos Santos Sales (mãe), Limuel Francisco Sales (pai), Maria José dos Santos (avó) e Manoel Vicente dos Santos (avô). Vocês foram os primeiros professores da minha vida, me ensinando valores e ética, me dando apoio moral e financeiro.

À Darlan por ser meu companheiro, meu apoio emocional e meu melhor amigo. Agradeço pela compreensão em meus momentos de ausência e por toda a fé que deposita em mim.

Aos meus amigos mais próximos que estiveram ao meu lado durante esse período, tornando meus dias mais leves, divertidos e me dando apoio emocional.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, por todo o apoio técnico e por me dar a oportunidade de fazer parte do LTM. Seu legado como educador e ser humano é verdadeiramente inspirador.

À minha co-orientadora Dra. Myla Lôbo de Souza, por toda paciência inabalável e orientação valiosa. Agradeço por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas, debater ideias e fornecer feedback construtivo. Sua paixão pelo conhecimento e comprometimento permanecerão comigo para sempre.

Aos mestres participantes desta banca de defesa, pela atenção dada ao trabalho e toda a contribuição científica oferecida.

Aos integrantes do grupo Nano por sempre fornecerem apoio para a elaboração desse projeto e por todo o bom humor, trazendo leveza ao ambiente. Aos demais integrantes do LTM que forneceram apoio técnico, orientação e disponibilidade para a realização dos ensaios deste trabalho.

Ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN), à Central multiusuário do Departamento de Física (DF) da UFPE por terem disponibilizado seu equipamento, espaço e pesquisadores para a realização das caracterizações necessárias para o desenvolvimento e finalização desse Estudo. Aos pesquisadores Valéria Pereira e Policarpo Sales por disponibilizarem de seu tempo e conhecimento para a realização dos ensaios de citotóxicidade atividade leishmanicida *in vitro* essenciais para a conclusão do presente trabalho.

Por fim, quero expressar minha gratidão à UFPE, em especial ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, e a todos os profissionais dedicados que fazem parte deste departamento.

Além disso, quero reconhecer a contribuição inestimável de tantos outros que, embora não mencionados nominalmente, desempenharam papéis essenciais em minha jornada. Cada um de vocês foi fundamental para minha trajetória, e muitas histórias me conduziram até este momento.

*Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.”*

(Santo Agostinho)

## RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas responsáveis por cerca de 1,5 milhões de novos casos em mais de 85 países todos os anos. No Brasil, o tratamento de primeira escolha é feito com o Antimoniato de meglumina (AM), que possui efeitos adversos. A nanotecnologia surge como alternativa promissora para melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e reduzir os efeitos adversos dos fármacos. O objetivo do trabalho foi desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo AM para o tratamento de leishmaniose. Foi realizado um estudo de pré-formulação contendo avaliação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), triagem de lipídeos, estudos de compatibilidade e planejamento quali-quantitativo. Os CLN foram preparados pelo método de dupla emulsificação e avaliados quanto ao diâmetro de partícula, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE). O CLN escolhido foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios-X (DRX). Também foi testado *in vitro* para avaliar citotoxicidade em macrófagos Raw 264.7 e atividade leishmanicida contra *L. infantum* e *L. amazonensis*. Os resultados da triagem lipídica indicaram a escolha do Miglyol<sup>®</sup>812 como lipídio líquido e o estudo do EHL resultou na escolha do Alckest<sup>®</sup> CSO 300 como o melhor tensoativo hidrofílico (EHL= 8,74). Os excipientes não apresentaram incompatibilidades com o AM. O planejamento quali-quantitativo permitiu a escolha do CLN mais promissor, o qual apresentou diâmetro de 29 nm, PdI de 0,251, PZ de -6,76 e EE > 90%. O FTIR indicou a incorporação do AM no CLN. O DSC indicou uma nanopartícula com matriz menos cristalina, que foi comprovado no DRX. O MET revelou nanopartículas esféricas e de tamanho compatível. Não houve citotoxicidade em macrófagos pelo AM, enquanto os CLN foram citotóxicos em diferentes concentrações. O AM não apresentou atividade em nenhuma forma de ambas as espécies. Em promastigotas *L. infantum*, o nanocarreador sem fármaco (CLNBr) e com fármaco (CLN16) apresentaram IC<sub>50</sub> de 73 µg/mL e 59,4 µg/mL respectivamente, enquanto nas amastigotas o IC<sub>50</sub> para o CLNBr e CLN16 foi de 73,5 e 89,4 µg/mL respectivamente. Já para *L. amazonensis*, o IC<sub>50</sub> em amastigotas frente ao CLNBr e CLN16 foram de 124,7 e 122,4 µg/mL respectivamente, enquanto em promastigotas o IC<sub>50</sub> foi de 101,6 µg/mL para o CLNBr e 79 µg/mL para o CLN16. Portanto, foi possível obter CLN com propriedades físico-químicas promissoras, alta eficiência de encapsulação e possível atividade leishmanicida. Estudos posteriores para avaliar a estabilidade e incorporação dos CLN em formas farmacêuticas serão conduzidos.

**Palavras-chave:** entrega de fármacos; Glucantime; nanocarreadores; planejamento qualitativo.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious diseases responsible for around 1.5 million new cases in more than 85 countries every year. In Brazil, the first-choice treatment is meglumine antimoniate (MA), which has adverse effects. Nanotechnology has emerged as a promising alternative for improving the stability, bioavailability and reducing the adverse effects of drugs. The aim of this study was to develop nanostructured lipid carriers (NLC) containing MA for the treatment of leishmaniasis. A pre-formulation study was carried out containing hydrophile/lipophile balance (HLB) evaluation, lipid screening, compatibility studies and qualitative-quantitative planning. The NLC were prepared using double emulsification method and were evaluated by particle size, polydispersion index (PDI), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (EE). Then, the chosen NLC was characterized by Transmission electronic microscopy (TEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier transform infrared (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). In addition, *in vitro* tests were carried out to assess cytotoxicity in Raw 264.7 macrophages and leishmanicidal activity against *L. infantum* and *L. amazonensis*. The results obtained in the lipid screening indicated the choice of Miglyol<sup>®</sup>812 as the liquid lipid and the HLB study resulted in the choice of Alkest<sup>®</sup> CSO 300 as the best hydrophilic surfactant (HLB= 8.74). The excipients showed no incompatibilities with the MA. The qualitative-quantitative planning allowed the choice of the most promising NLC, which had a diameter of 29 nm, PDI of 0.251, ZP of -6.76 and EE > 90%. FTIR indicated the incorporation of MA into NLC. DSC showed a nanoparticle with a less crystalline matrix, which was confirmed by XRD. TEM revealed spherical nanoparticles of compatible size. There was no cytotoxicity in macrophages by MA while NLC were cytotoxic in different concentrations. MA showed no activity against either form of both species. In *L. infantum* promastigotes, the nanocarrier without drug (NCLBr) and with drug (NCL16) showed IC<sub>50</sub> of 73 µg/mL and 59.4 µg/mL respectively, while in amastigotes the IC<sub>50</sub> value for NCLBr and NCL16 was 73.5 and 89.4 µg/mL, respectively. For *L. amazonensis*, the IC<sub>50</sub> values for amastigotes against NCLBr and NCL16 were 124.7 and 122.4 µg/mL, respectively, while in promastigotes, the IC<sub>50</sub> value was 101.6 µg/mL for NCLBr and 79 µg/mL for NCL16. Therefore, it was possible to obtain NLC with promising physicochemical properties, as well as high encapsulation efficiency and possible leishmanicidal activity. Further studies will be carried out to assess the stability and incorporation of NLC into pharmaceutical forms.

**Keywords:** Drug delivery; Glucantime; nanocarriers; qualitative-quantitative planning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	23
Figura 2 –	Método de obtenção e estrutura química do Antimoniato de meglumina (Glucantime <sup>®</sup> )	24
Figura 3 –	Estrutura cristalina de uma NLS e um CLN	27
Figura 4 –	Diferentes tipos de CLN, conforme composição e estado cristalino.	28
Figura 5 –	Diagrama Geral de um Calorímetro Diferencial de Varredura	34
Figura 6 –	Método de dupla emulsificação por ultrassom à quente	42
Figura 7 –	Curva DSC do lipídeo sólido Dynasan116 <sup>®</sup> e suas misturas binárias com os lipídeos líquidos ácido oleico e Miglyol <sup>®</sup> 812, respectivamente	48
Figura 8 –	Aspecto visual das amostras recém preparadas utilizando o Span 80 <sup>®</sup> e o Pluronic <sup>®</sup> F-127	51
Figura 9 –	Aspecto visual das amostras preparadas utilizando o Span 80 <sup>®</sup> e o Pluronic <sup>®</sup> F-127, após repouso de 24 hora	51
Figura 10 –	Aspecto visual das amostras recém preparadas utilizando o Span 80 <sup>®</sup> e o óleo de rícino etoxilado 30EO (Alkest <sup>®</sup> CSO 300)	52
Figura 11 –	Aspecto visual das amostras preparadas utilizando o Span 80 <sup>®</sup> e o óleo de rícino etoxilado 30EO (Alkest <sup>®</sup> CSO 300), após repouso de 24 horas	52
Figura 12 –	Gráfico DSC dos compostos isolados. Gráfico DSC das misturas ternárias e total.	54
Figura 13 –	Curvas TG das substâncias isoladas e misturas ternárias com o fármaco e mistura total	57
Figura 14 –	Curvas DTG das substâncias isoladas e misturas ternárias e mistura total avaliadas no ensaio de compatibilidade	58
Figura 15 –	Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total	61
Figura 16 –	Microfotografias obtidas por MET do CLN16	66
Figura 17 –	Microfotografias obtidas por MET do CLNB	67

Figura 18 –	Gráficos DSC do fármaco e lipídeo sólido isolados, da mistura física total e dos carreadores obtidos com e sem o fármaco	68
Figura 19 –	Difratogramas do fármaco e lipídeo sólido isolados, da mistura física de todos os componentes e dos carreadores obtidos com e sem o fármaco	70
Figura 20 –	Espectro de infravermelho do fármaco e lipídeo sólido isolados, da mistura física total e dos carreadores obtidos com e sem o fármaco	72
Figura 21 -	Citotoxicidade in vitro do fármaco e dos nanocarreadores frente aos macrófagos RAW 264.7	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Lipídeos utilizados na triagem lipídica e suas propriedades físico-químicas	49
Tabela 2 –	Parâmetros DSC do Lipídeo sólido Dynasan116 <sup>®</sup> e suas misturas binárias com os lipídeos líquidos ácido oleico e Miglyol <sup>®</sup> 812, respectivamente.	49
Tabela 3 –	Proporções de tensoativos para formulações contendo Span <sup>®</sup> 80 e Pluronic <sup>®</sup> e respectivos valores de EHL	50
Tabela 4 –	Proporções de tensoativos para formulações contendo Span <sup>®</sup> 80 e Alkest <sup>®</sup> CSO 300 e respectivos valores de EHL.	51
Tabela 5 –	Propriedades térmicas das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total avaliadas por DSC.	54
Tabela 6 –	Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e total avaliadas por TG/DTG	60
Tabela 7 –	Matriz do planejamento quali-quantitativo realizado no estudo de pré-formulação	63
Tabela 8 –	Propriedades térmicas das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total avaliadas por DSC.	68
Tabela 9 –	Citotoxicidade e atividade leishmanicida das amostras frente as cepas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Antimoniato de meglumina
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
DLS	Dynamic light scattering (Espalhamento de luz dinâmico)
DRX	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EE	Eficiência de encapsulamento
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
IC50	Concentração inibitória
IFA	Insumo farmacêutico ativo
ISO	Organização Internacional para Padronização
LC	Leishmaniose Cutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PdI	Polydispersity index (Índice de polidispersão)
PZ	Potencial zeta
TG	Termogravimetria

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Registered Sign (Marca registrada)
°	Grau
°C	Grau celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
cm	Centimetro
cm <sup>-1</sup>	Número de onda
EE%	Eficiência de encapsulação
h	Hora
KBr	Brometo de potássio
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mV	Milivolts
N°	Número
nm	Nanomêtro
p/p	Relação peso/peso
m/m	Relação massa/massa
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
Sb	Antimônio
Sb <sup>+3</sup>	Antimônio trivalente
Sb <sup>+5</sup>	Antimônio pentavalente
T%	Transmitância
™	Trademark symbol (Marca registrada)
α	Alfa
θ	Teta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Doenças tropicais negligenciadas: um panorama geral.....	20
2.2	As leishmanioses.....	21
2.3	Antimoniais pentavalentes.....	23
2.3.1	<i>Antimoniato de meglumina</i> .....	24
2.4	Nanotecnologia: tecnologia em nanoescala.....	25
2.4.1	<i>Carreadores lipídicos nanoestruturados</i> .....	26
2.4.2	<i>Metodologia de obtenção dos nanocarreadores lipídicos</i> .....	28
2.5	Ensaio de pré-formulação.....	31
2.5.1	<i>Cristalinidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados</i> .....	31
2.5.2	<i>Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo</i> .....	32
2.5.3	<i>Análises térmicas</i> .....	33
2.5.4	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier</i> .....	35
2.5.5	<i>Difração de raios-X</i> .....	36
2.6	Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	38
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Materiais.....	39
4.2	Métodos.....	39
4.2.1	<i>Ensaio de pré-formulação</i> .....	39
4.2.1.1	<i>Triagem lipídica</i> .....	39
4.2.1.2	<i>Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo da formulação</i> .....	40
4.2.1.3	<i>Ensaio de compatibilidade</i> .....	40
4.2.1.3.1	Calorimetria exploratória diferencial.....	41
4.2.1.3.2	Termogravimetria.....	41
4.2.1.3.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	41
4.2.2	<i>Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados</i> .....	42
4.2.3	<i>Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados</i> .....	42
4.2.4	<i>Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados</i> .....	43
4.2.4.1	<i>Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta</i> .....	43
4.2.4.2	<i>Análises térmicas</i> .....	44
4.2.4.3	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier</i> .....	44
4.2.4.4	<i>Difração de raios-X</i> .....	44
4.2.4.5	<i>Determinação da eficiência de encapsulação</i> .....	45
4.2.4.6	<i>Morfologia por microscopia eletrônica</i> .....	45
4.2.5	<i>Ensaio de viabilidade celular</i> .....	46
4.2.6	<i>Ensaio de atividade leishmanicida em amastigotas</i> .....	46

4.2.7	<i>Ensaio de atividade leishmanicida em promastigotas.....</i>	46
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	48
5.1	<b>Ensaio de pré-formulação.....</b>	48
5.1.1	<i>Triagem lipídica.....</i>	48
5.1.2	<i>Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo.....</i>	50
5.1.3	<i>Ensaio de compatibilidade.....</i>	53
5.1.3.1	<i>Calorimetria exploratória diferencial.....</i>	53
5.1.3.2	<i>Termogravimetria.....</i>	56
5.1.3.3	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....</i>	61
5.2	<b>Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....</b>	63
5.3	<b>Obtenção e caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....</b>	65
5.3.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	66
5.3.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....</i>	68
5.3.3	<i>Difratometria de raios-X.....</i>	70
5.3.4	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....</i>	71
5.4	<b>Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida <i>in vitro</i> dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....</b>	73
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	76
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	77

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as Leishmanioses são um grupo de doenças pertencentes as doenças tropicais negligenciadas (DTN). Estas que são doenças tropicais endêmicas causadas por agentes infecciosos ou parasitas que afetam principalmente países que possuem um considerável índice de pobreza (WHO, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2018, p. 221; Homma, Freire, Possas, 2020).

De acordo com dados da Organização Pan-americana de Saúde, no continente Americano entre 2001-2018 foram registrados 63.331 novos casos de leishmaniose visceral e 989.096 casos de leishmaniose tegumentar (cutânea e mucosa), e o Brasil se configura como um dos três primeiros países de incidência de casos mundiais. Embora haja uma alta demanda pelo tratamento, o potencial de mercado associado é limitado, pois essas populações não têm capacidade financeira para arcar com o custo do tratamento, sendo as pesquisas e desenvolvimentos de novos medicamentos fomentados principalmente pelos órgãos governamentais (Morel, 2004, p. 261; Morel, 2006, p. 1522; Lindoso e Lindoso, 2009, p. 247).

A apresentação clínica da doença é dependente da espécie do parasito envolvido na infecção, sendo as principais formas clínicas a leishmaniose tegumentar (LT) e a visceral (LV). O tratamento será determinado com base no tipo de doença, na espécie do parasita e na presença ou ausência de outras condições médicas simultâneas. No Brasil, tratamento disponível se resume na utilização dos antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica e o isetionato de pentamidina, todos por via parenteral (Brasil, 2017, p. 191). Os antimoniais pentavalentes são o tratamento de primeira escolha, sendo estes associados à efeitos adversos graves, como elevada cardiotoxicidade, administração prolongada e dificuldade de administração (Santos *et al.*, 2008, p. 1; Tiwari *et al.*, 2018, p. 26).

Apesar de as leishmanioses serem uma doença antiga e com uma alta incidência, inovações terapêuticas são escassas, particularmente no desenvolvimento de novos medicamentos. Uma das estratégias para enfrentar esse desafio é melhorar as formulações existentes por meio de abordagens inovadoras, como as baseadas na nanotecnologia. A nanotecnologia surge como uma alternativa promissora, com o objetivo de superar problemas clássicos relacionados à terapêutica medicamentosa, tais como altas dosagens terapêuticas, alta toxicidade dos fármacos, baixa biodisponibilidade, solubilidade e taxa de dissolução, meia-vida

curta, além da possibilidade de direcionamento da terapia (alvo-direcionada), aumentando a eficácia do tratamento (Weissig, Pettinger, Murdock, 2014, p. 4357).

Entre os nanocarreadores mais utilizados na área farmacêutica, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são bastante atrativos. Os CLN são nanopartículas lipídicas que possuem como característica a formação de sua matriz lipídica composta por lipídeos sólidos e lipídeos líquidos à temperatura ambiente e corporal. Os CLN possuem vantagens em relação às nanopartículas poliméricas, tais como um maior número de excipientes aceitos legalmente pela Food and Drug Administration (FDA) e outros órgãos reguladores, baixo custo de excipientes para sua produção, produção econômica em escala industrial, são biocompatíveis e biodegradáveis. Os CLN permitem a incorporação de insumos farmacêuticos ativos (IFA) lipofílicos e hidrofílicos e são frequentemente utilizados pela indústria farmacêutica para contornar problemas biofarmacotécnicos e melhorar eficácia e toxicidade de fármacos já utilizados na terapia de diversas doenças. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é realizar estudos de pré-formulação com o propósito de desenvolver CLN contendo o antimoníato de meglumina para potencial atividade leishmanicida.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doenças tropicais negligenciadas: um panorama geral

Segundo a organização mundial de Saúde (OMS), as DTN são um grupo de doenças tropicais endêmicas, causadas por agentes infecciosos ou parasitas, que acometem principalmente países que possuem um considerável índice de pobreza, como os que estão situados no continente Africano, Asiático e na América Latina. A persistência dessas doenças expõe um ciclo de desigualdade que é alimentado por um cenário ambiental, social e econômico complexo, resultado de falhas na ciência, no mercado e na saúde pública (WHO, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2018, p. 221; Homma, Freire, Possas, 2020). Atualmente, em 25 países da América Latina e Caribe, estima-se que em torno de 46 milhões de crianças residam em áreas de risco de infecção, reinfecção e coinfecção por helmintos transmitidos por contato com o solo e outros microorganismos, expondo um sistema de saúde precário e a falta de saneamento básico (OPAS, 2018). Dessa forma, em 2006 o Brasil definiu que doenças negligenciadas não só prevalecem em situações de pobreza como também contribuem para a manutenção de um sistema de desigualdade, visto que os indivíduos acometidos por tais enfermidades, além de sofrerem com o ônus da doença, diminuem sua qualidade de vida e produtividade, agravando a situação de pobreza na qual estão inseridos, o que contribui para o desinteresse das grandes indústrias farmacêuticas, haja vista a ausência de lucro (Morel, 2004, p. 261; Morel, 2006, p. 1522; Lindoso e Lindoso, 2009, p. 247).

Atualmente, as doenças negligenciadas são compostas por 20 doenças, entre elas pode-se citar as geo-helmintíases (tricuríase, estrogiloidíase, ascaridíase), a dengue, a filariose linfática, a hanseníase, a doença de Chagas, a esquistossomose e as leishmanioses. Tais doenças configuram um grupo de extrema relevância no Brasil, dada sua ocorrência em território nacional e afetam pelo menos um bilhão de pessoas no mundo, sendo um dos principais problemas de saúde pública devido à morbidade, mortalidade, incapacidade e estigma social gerados (WHO, 2015; Ferreira e Andricopulo, 2019, p. 125).

No ano de 2000, a Organização das Nações Unidas (ONU), reforçou a luta contra as DTN estabelecendo como meta a erradicação destas até o ano de 2030 (ONU, [s.d.]). Entretanto, as questões que envolvem as DTN seguem carentes de pesquisas e investimentos.

## 2.2 As leishmanioses

As leishmanioses ou leishmaníases são um complexo de doenças infecciosas zoonóticas provocadas por protozoários da Família Trypanosoma, que parasitam animais. São responsáveis por cerca de 1,5 milhões de novos casos em mais de 85 países todos os anos. São causadas por mais de 20 protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae que se caracterizam por duas formas principais: amastigota e promastigota (Vasconcelos *et al.*, 2018, p. 221).

A *Leishmania* spp apresenta um ciclo biológico heteroxênico. Ciclo biológico heretoxênico é aquele que necessita de mais de um hospedeiro, no caso da *Leishmania* spp, esses hospedeiros são um vertebrado e um invertebrado. Os hospedeiros vertebrados são mamíferos, como: roedores, edentados, marsupiais, canídeos e primatas, incluindo o homem. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos pertencentes ao gênero *Lutzomya*, comumente chamados no Brasil por birigui, mosquito-palha e tatuquira. Nesse contexto, indivíduos que têm um contato mais frequente com esses vetores, como trabalhadores rurais ou aqueles envolvidos em atividades de extrativismo, estão mais expostos à doença (Costa, 2005, p. 3).

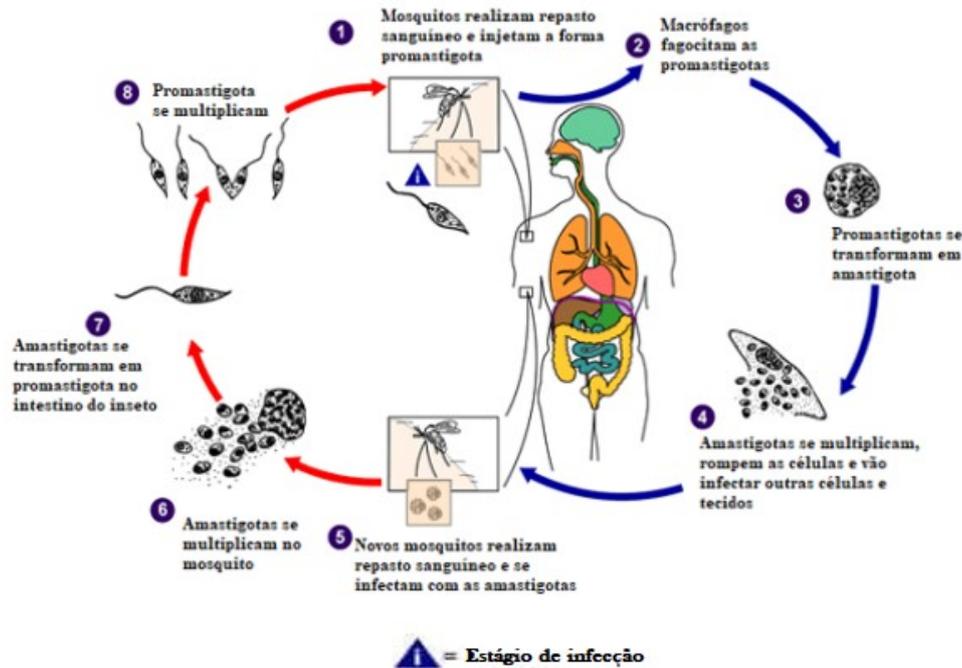
A infecção inicia-se quando o mosquito flebotomíneo fêmea infectado realiza o repasto sanguíneo. As formas promastigotas são inoculadas na derme do indivíduo. Durante a inoculação, as células destruídas pela probóscida do inseto e a saliva atraem para a área os macrófagos e outras células fagocitárias mononucleadas. Alguns macrófagos possuem a capacidade de eliminar o parasita de forma direta, enquanto outros requerem estímulos para realizar essa ação. Somente macrófagos fixos (histiócitos) não estimulados são hábeis para o estabelecimento da infecção. Ao serem fagocitadas pelos macrófagos, as promastigotas se transformam em amastigotas (estágio tecidual) e começam a se reproduzir através de sucessivas divisões binárias, o que atrai mais macrófagos para o local. Estes se fixam e tornam-se infectados. A lesão inicial é manifestada por um infiltrado inflamatório composto principalmente de linfócitos e macrófagos na derme, estando estes últimos abarrotados de parasitas (Neves *et al.*, 2016, p. 43). A figura 1 esquematiza o ciclo de vida das *Leishmania* spp.

A apresentação clínica da doença é dependente da espécie do parasita envolvido na infecção, sendo as principais formas clínicas a LTA e a LV, considerada mais grave devido ao

seu quadro clínico que pode levar o paciente à óbito (Santiago, *et al.*, 2021). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode apresentar a forma clínica cutânea e mucocutânea e tem como agentes causadores a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi*. No Brasil, a espécie de *Leishmania* responsável pela maioria dos casos de LTA é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, enquanto a leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar, esplenomegalia tropical ou febre dundun é causada principalmente pela *Leishmania chagasi*. A LV Tem perfil endêmico no continente Americano e cerca de 90% dos casos registrados na America Latina ocorrem no Brasil (Brasil, 2006b).

Segundo dados da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), no continente Americano entre 2001-2018 foram registrados 63.331 novos casos de leishmaniose visceral e 989.096 casos de leishmaniose tegumentar (cutânea e mucosa). Segundo a OMS, entre 2018-2020 o Brasil permaneceu entre os três primeiros países com o maior número de casos notificados (LC e LV). Também foi possível observar que, além do Brasil, países como Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Sudão do Sul, Sudão, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Iraque, Paquistão, Síria, Bolívia e Peru apresentaram uma elevada ocorrência de novos casos de leishmaniose (>90% dos casos mundiais). Reforçando o argumento de que as leishmanioses prevalecem em países que possuem elevado índice de pobreza humana (Leishmaniasis, 2022).

Atualmente, a terapia oferecida para o tratamento das leishmanioses se resume à utilização dos antimoniais pentavalentes, da anfotericina B e da sua formulação lipossômica, do isetionato de pentamidina e da Miltefosina. Apenas a Miltefosina é de uso oral. Embora a Miltesosina seja um avanço para a terapia medicamentosa contra a leishmaniose no que diz respeito a via de administração, não possui registro sanitário vigente no país, sendo adquirida de forma excepcional pelo Ministério da Saúde e apenas para o tratamento de leishmaniose cutânea. Assim, os medicamentos atualmente disponíveis no Brasil, atualmente, são o antimoniato de meglumina, Anfotericina B (desoxicolato sódico, lipossomal) e Pentamidina (Brasil, 2017, p. 191). Estes além de serem de uso exclusivo parenteral ainda exibem uma série de efeitos adversos graves, como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade (Ghorbani e FarhoudI, 2018, p. 25). Esses medicamentos também apresentam dificuldade de administração e possível surgimento de resistência por parte do parasito, além de não serem eficazes em pacientes imunocomprometidos (Santos *et al.*, 2008, p. 1; Tiwari *et al.*, 2018, p. 26).

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

Fonte: Adaptado de The Centers for Disease Control and Prevention, Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria (CDC) (2017).

### 2.3 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) representam o tratamento de primeira escolha para todas as formas clínicas da leishmaniose. No Brasil, o uso dos antimoniais pentavalentes teve origem na tentativa de reduzir os efeitos adversos causados pelos antimoniais trivalentes ( $Sb^{+3}$ ), utilizados no país desde 1912. As principais desvantagens relacionadas ao uso dos antimoniais trivalentes eram seus efeitos tóxicos e colaterais graves, como distúrbios gastrintestinais e problemas cardíacos (Rath *et al.*, 2003 p. 550; Hendrickx *et al.*, 2019, p. 2743).

Atualmente, as formas de administração dos antimoniais pentavalentes se resumem às vias de administração intramuscular (IM) e intravenosa (IV). Os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos que serão reduzidos em antimônio trivalente, sua forma ativa (Singh *et al.*, 2012, p. 485; Kip *et al.*, 2018, p. 151). Entretanto, apenas uma pequena quantidade de  $Sb^{+5}$  é reduzida à sua forma trivalente e quantidades similares de  $Sb^{+3}$  são oxidadas à sua forma pentavalente

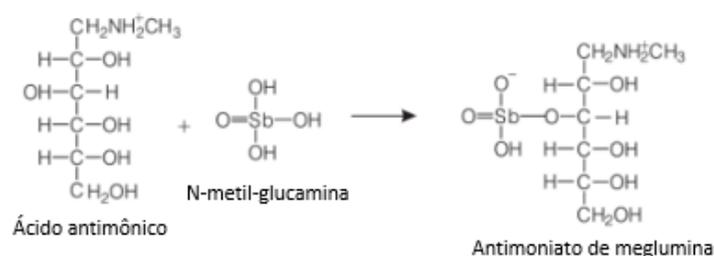
(Raht *et al.*, 2003, p. 550). Dois complexos antimoniais pentavalentes estão disponíveis para o tratamento da leishmaniose: o Antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>) (Tiwari *et al.*, 2018, p. 26). No Brasil o medicamento de escolha é o Glucantime<sup>®</sup> (Santiago *et al.*, 2021).

### 2.3.1 Antimoniato de meglumina

O antimoniato de meglumina é fármaco à base de antimônio que compõe o grupo dos antimoniais pentavalentes. O nome comercial do medicamento utilizado no Brasil é Glucantime<sup>®</sup> (antimoniato de N-metilglucamina) e é o tratamento de primeira escolha utilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para tratar as LT e LV causadas pelas diversas espécies. É obtido de forma sintética a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina (figura 2), é hidrofílico e possui baixa solubilidade em solventes orgânicos (Raht *et al.*, 2003, p. 550).

A estrutura do Glucantime<sup>®</sup> é coordenada por um único átomo de antimônio. A figura 2 detalha a organização estrutural do Glucantime<sup>®</sup>. Observa-se que suas características principais são a presença de grupos hidrofílicos (hidroxilas) que compõem a cadeia aberta do açúcar meglumina e a ligação de um átomo de oxigênio diretamente ao antimônio, todos esses fatores conferem a solubilidade do fármaco em meio aquoso (Demicheli e Frézard, 2005).

Figura 2 - Método de obtenção e estrutura química do Antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>)



Fonte: Adaptado de Demicheli & Frézard. Cadernos Temáticos de Química na Nova Escola (2005, N°6)

Uma outra característica do antimoniato de meglumina é sua baixa permeabilidade através das mucosas, por esse motivo, formas de administração por via oral não são viáveis. Dessa forma, é necessária a hospitalização do paciente em instalações médicas para a administração do medicamento por via IV ou IM. A dose sugerida é de 15mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia por um período de 20 dias. Em casos de leishmaniose cutânea, há a possibilidade da administração

intralesional. Nesses casos uma ampola de 405mg  $Sb^{+5}$  é aplicada na lesão com um intervalo de 15 dias após cada administração (Brasil, 2017, p. 191).

O Antimoniato de meglumina (AM) apresenta rápida absorção (aproximadamente 90%) após sua administração e sua excreção renal ocorre dentro de 48 horas, portanto, é absorvido e eliminado pelos rins em um período relativamente curto. Em razão desse perfil farmacocinético, há a necessidade da administração de doses elevadas e contínuas do fármaco para se alcançar a eficácia do tratamento (Raht *et al.*, 2003, p. 550).

Embora os antimoniais pentavalentes apresentem um perfil de toxicidade inferior as suas formas ativas trivalentes, o uso do antimoniato de meglumina, assim como o de outros antimoniais, pode resultar em sintomas adversos. Os sintomas mais relatados são dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, cefaleia, fadiga, febre, tosse, erupções cutâneas, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (Hendrickx *et al.*, 2019, p. 2743). Os efeitos tóxicos e o desconforto causado ao paciente para a administração do medicamento, favorecem a descontinuidade (não adesão) ao tratamento, possibilitando o desenvolvimento de formas resistentes do parasita (Raht *et al.*, 2003, p. 550).

Os mecanismos de ação do fármaco não são bem elucidados, entretanto, há indícios de que haja uma conversão metabólica intramacrofágica de  $Sb^{+5}$  em  $Sb^{+3}$ , sendo o  $Sb^{+3}$  o elemento tóxico às leishamanias. Esse processo afetaria a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e a glicólise do parasita, culminando em seu óbito. (Raht *et al.*, 2003, p. 550; Moreira, 2008). Uma outra teoria discutida é a interferência na expressão gênica do parasita através da supressão das enzimas tripanotona redutase ou glutathione redutase (Frézard *et al.*, 2013, p.1).

Considerando as dificuldades mencionadas, Os CLN urgem como uma grande promessa na promoção da eficácia terapêutica do antimoniato de meglumina pois possuem propriedades físico-químicas conferem diversos benefícios à terapia com insumos farmacêuticos ativos (IFAs). Entre esses benefícios estão o aumento da solubilidade e permeabilidade dos IFAs (hidrofílicos e lipofílicos), a liberação prolongada e/ou controlada, a amplificação da biodisponibilidade e do índice terapêutico do fármaco, diminuição da toxicidade, redução da dose bem como uma absorção e acumulação mais eficazes no local de ação (Liu *et al.*, 2018, p. 223; Azevedo *et al.*, 2020, p. 161).

## 2.4 Nanotecnologia: tecnologia em nanoescala

O conceito de nanotecnologia surgiu pela primeira vez no fim do século XX quando o famoso físico e ganhador do prêmio Nobel, Dr. Richard Feynman, abordou em uma de suas clássicas palestras científicas, que a matéria poderia ser operada em escala nanométrica. Feynman não usou especificamente o termo “nanotecnologia”. O conceito de nanotecnologia teve sua implementação atribuída à Taniguchi, por seu artigo intitulado “O conceito básico da nanotecnologia”. O prefixo “nano” remete a uma redução no tamanho de  $10^{-9}$ , com isso, para que um produto seja considerado nanotecnológico, ao menos um de seus componentes deve possuir suas dimensões na escala nanométrica, que é mil vezes menor que um micron (Mirsasaani, 2013, p. 41; Hulla, Sahu e Hayes, 2015, p. 1318; Hupffer *et al.*, 2019, p. 153; Kirtane *et al.*, 2021, p. 369).

O primeiro medicamento nanotecnológico a ser aprovado foi o Doxil<sup>®</sup> (doxorubicina lipossomal), e a partir de seu surgimento diversas formulações nanotecnológicas têm sido objetos de pesquisas, resultando em nanopartículas, lipossomas, nanoemulsões, nanocristais e diversos outros produtos em escala nanométrica (Bhatia, 2016, p. 33). Estes, que surgem para superar problemas clássicos relacionados à terapêutica medicamentosa, tais como altas dosagens terapêuticas, elevada toxicidade dos fármacos, baixa biodisponibilidade, solubilidade e taxa de dissolução do insumo ativo.

Através da aplicação de nanocarreadores, a nanotecnologia oferece a perspectiva de possibilitar o direcionamento específico da terapia (drug delivery), o que não apenas aprimora a eficácia do tratamento, mas também reduz os efeitos colaterais indesejados. O drug delivery permite o transporte direcionado e controlado dos medicamentos ao local de ação, promovendo uma terapia mais eficaz (Weissig; Pettinger; Murdock, 2014, p. 4357).

No recente cenário, os nanomateriais têm sido de suma importância no combate à pandemia do vírus da COVID-19, tanto na prevenção quanto para a terapia, contribuindo com novas vacinas e medicamentos, desenvolvimento de testes sorológicos mais específicos e agindo como ferramentas moduladoras do sistema imune (Weiss *et al.*, 2020, p. 6383).

#### **2.4.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados**

Por "nanopartícula" entende-se uma partícula que existe em um estado líquido, sólido ou super-resfriado e que está localizada na escala nanométrica. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) representam a primeira geração de nanopartículas lipídicas. Elas são compostas

por lipídios que mantêm sua estrutura sólida tanto em temperatura ambiente quanto corporal. Estes lipídios consistem em glicérides, ceras ou suas combinações. Nas NLS o fármaco pode ser incorporado sendo dissolvido no lipídeo fundido, para fármacos lipofílicos. No caso de fármacos hidrofílicos, ocorre a solubilização do ativo em uma fase aquosa para posterior incorporação à fase oleosa (Muller *et al.*, 2002, p. 131).

As NLS não conseguem aprisionar grandes quantidades de fármacos em suas matrizes, isso porque o lipídeo fundido tende a se recrystalizar durante o resfriamento de forma que acabam expulsando o ativo que deveria ser incorporado em sua matriz (figura 3) (Pathak, Keshri e Shah, 2011, p.357).

**Figura 3** - Estrutura cristalina altamente ordenada de uma NLS (à esquerda), levando à expulsão do fármaco e estrutura menos perfeita de uma CLN (à direita), apresentando melhor aprisionamento do fármaco.



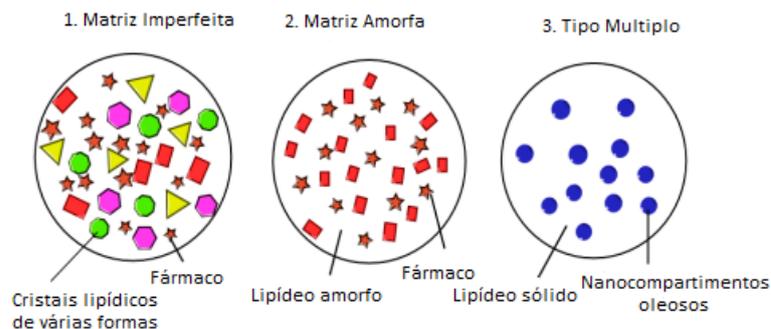
Fonte: Adaptado de Muller, *et al* (2016).

Para superar tal dificuldade, foram desenvolvidos os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), tendo sua matriz composta por lipídeos sólidos e lipídeos líquidos à temperatura ambiente e corporal.

A premissa dos CLN se baseia na formação de cristais menos perfeitos, utilizando lipídeos que diferem entre si em tamanho molecular e forma conformacional. Conforme exemplificado na figura 3, a matriz cristalina menos perfeita reduz ou evita a expulsão de fármacos, possuindo maior capacidade de aprisionamento destes. Por esse motivo a escolha da composição lipídica é uma fase fundamental para obtenção de uma matriz menos cristalina pois influencia diretamente na eficiência de encapsulação dos CNL (Pathak, Keshri e Shah, 2011, p.357). Os CLN permitem a incorporação de fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, além de possuírem propriedades como biocompatibilidade, baixa toxicidade e boa estabilidade (Muller *et al.*, 2002, p. 131; Li *et al.*, 2017, p. 122).

Para produzir CLN, lipídios sólidos e líquidos são misturados, resultando em nanopartículas lipídicas que apresentam uma diminuição no pico de fusão em comparação com o lipídeo sólido inicial, mas que ainda se mantêm sólidas à temperatura ambiente e corporal. Dependendo da composição e da forma de produção, três tipos de CLN podem ser obtidos, conforme ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Diferentes tipos de CLN, conforme composição e estado cristalino.



Fonte: adaptado de LI, *et al.* (2017).

O tipo matriz imperfeita é resultante da recristalização de uma matriz altamente desorganizada, é definido pela presença de lacunas que albergam o fármaco. O de matriz amorfa, recebe essa definição devido a não recristalização do lipídeo sólido após o resfriamento, sua matriz lipídica encontra-se no estado sólido, porém não é cristalina. Por fim, o tipo múltiplo é semelhante a uma emulsão água/óleo/água, com o lipídeo líquido localizado em nanocompartimentos oleosos envoltos pelo lipídeo sólido. O tipo múltiplo é frequentemente utilizado para fármacos onde a solubilidade em óleo é muito maior que a solubilidade em lipídeos sólidos, como o retinol (Muller; Radtke e Wissing, 2002, p. 131). São diversas as vias de administração dos CLN, dependendo do objetivo do tratamento e do local de ação desejado. Por possuírem tamanho reduzido, geralmente de 10 a 200 nm, apresentam boa permeação nas camadas mais externas da pele, o que ajuda a melhorar a penetração de medicamentos através da barreira cutânea, resultando em uma maior eficácia no tratamento, bem como melhorando a estabilidade e biodisponibilidade oral de fármacos hidrofóbicos (Li *et al.*, 2017, p. 122).

#### 2.4.2 Metodologia de obtenção dos nanocarreadores lipídicos

As metodologias aplicadas para a obtenção dos NLS e CLN não diferem muito entre si. Cada método tem suas vantagens e desvantagens em termos de controle de tamanho e características dos nanocarreadores produzidos. A escolha do método depende da aplicação desejada e das propriedades específicas dos lipídeos, demais excipientes e ativos que irão compor o CLN. A seguir estão listadas algumas das metodologias mais utilizadas na produção das nanopartículas:

- A) Homogeneização de alta pressão a quente ou a frio: A homogeneização de alta pressão e suas versões “a frio” ou “a quente” é uma técnica comumente utilizada. Essa técnica é realizada pela aplicação de alta pressão e energia cinética à uma mistura de lipídeos em meio aquoso. Em sua versão à quente, o fármaco é dissolvido ou disperso na fase lipídica já fundida, formando uma pré-emulsão em uma solução de surfactante de temperatura equivalente por agitação constante. Posteriormente, a pré-emulsão será submetida a um homogeneizador de alta pressão. A alta pressão e energia cinética aplicadas nesse processo de homogeneização resultam na quebra e reorganização dos lipídeos, esse processo influencia diretamente no tamanho da nanopartícula obtida. O tamanho das nanopartículas podem ser controlados ajustando-se parâmetros como a pressão aplicadas, o tempo de homogeneização, número de ciclos, a composição lipídica e a escolha dos surfactantes. A nanoemulsão quente obtida recristaliza ao ser resfriada em temperatura controlada, formando o CLN (Duarte, 2016; Muller *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Por outro lado, na homogeneização à frio, há o uso do nitrogênio líquido. O nitrogênio líquido tem como função solidificar a mistura obtida entre o fármaco e o lipídeo previamente fundido. Após a solidificação, a mistura é triturada para obtenção de micropartículas lipídicas. O produto dessa trituração é misturado a uma solução de tensoativos, sob cisalhamento, formando uma pré-suspensão. Essa pré-suspensão será homogeneizada sob alta pressão, com posterior formação dos CLN (Muller *et al.*, 2000, p. 161; Wissing *et al.*, 2004, p. 1257).
- B) Emulsificação-difusão: Este método é caracterizado pela utilização de solventes orgânicos para solubilizar o lipídeo até a formação de uma solução lipídica. Essa solução lipídica será adicionada a uma fase aquosa (contendo emulsionante), resultando em uma emulsão O/A. Após a formação da emulsão, ocorre a etapa de difusão. Nesta etapa, será adicionada água em excesso à emulsão. Com isso, o solvente orgânico presente nas gotículas lipídicas começa a se difundir para a fase aquosa externa. Isso ocorre devido a uma diferença de concentração entre a fase lipídica interna e a fase aquosa externa.

Conforme o solvente orgânico é removido, ocorre a solidificação das nanopartículas lipídicas, dependendo da natureza do lipídio utilizado, provocando a precipitação das nanopartículas que podem ser separadas posteriormente por ultracentrifugação. É uma técnica eficiente para a preparação de nanopartículas lipídicas, oferecendo vantagens como a melhoria da solubilidade e estabilidade de compostos ativos lipofílicos (Mehnert; Mader, 2012, p. 83; Muller; Keck, 2011, p. 207).

- C) Microemulsão: o método de microemulsão é um dos métodos utilizados no processo de produção de nanocarreadores lipídicos. Envolve a formação de uma mistura termodinamicamente estável de lipídeo fundido, tensoativos e água. Essa mistura forma uma fase altamente dispersa e homogênea, conhecida como microemulsão. A microemulsão é utilizada como fase precursora da formação de nanopartículas, isso porque os CLN são obtidos após um processo de quebra da microemulsão por diluição em uma solução aquosa fria. A vantagem deste processo é que nenhum equipamento caro (homogeneizador) é necessário. Portanto, esse processo é muito popular em laboratórios menos equipados (Muller *et al.*, 2016, p. 161).
- D) Emulsificação-evaporação: Nesse método, utiliza-se um solvente orgânico para solubilizar os lipídeos. A fase lipídica é então emulsionada em uma fase aquosa contendo um emulsionante. Essa emulsificação pode ser realizada por meio de agitação mecânica, sonicação ou outro método adequado para garantir uma dispersão homogênea dos lipídios na fase aquosa. O solvente orgânico é então evaporado, geralmente por meio de aquecimento ou aplicação de vácuo, resultando na formação de nanocarreadores lipídicos sólidos. Uma vez que o solvente orgânico tenha sido completamente evaporado, os CLN são obtidos. Eles podem ser separados por meio de centrifugação, filtração ou outro método de separação adequado (Silva *et al.*, 2011, p. 158).
- E) Emulsificação-ultrassom: O método de emulsificação-ultrassom, também conhecido como método de dispersão por ultrassom, é uma técnica utilizada para produzir emulsões estáveis e nanoestruturadas por meio da aplicação de ondas ultrassônicas de alta frequência. O processo envolve a transformação de uma pré-emulsão em uma emulsão mais fina e homogênea, resultando em partículas de tamanho reduzido, muitas vezes na faixa nanométrica. Primeiramente, uma combinação dos lipídeos e do fármaco é aquecida até atingir uma temperatura 10°C acima do ponto de fusão do lipídeo sólido. A seguir, a fase aquosa, que contém os tensoativos, é incorporada gradualmente, resultando em uma pré-emulsão. Essa pré-emulsão é então submetida ao processo de ultrassom por meio de uma sonda especializada (Das e Chaudhury, 2011, p. 62).

F) Emulsificação dupla: O método de emulsificação dupla, também conhecido como método de dupla emulsificação ou método de emulsificação múltipla, é uma técnica empregada para a obtenção de sistemas emulsionados complexos, como emulsões múltiplas do tipo água/óleo/água. Esse método é especialmente útil para a encapsulação de substâncias hidrofílicas ou lipofílicas em múltiplas camadas de emulsões. Inicialmente fase interna, que contém o ativo a ser encapsulado e é normalmente aquosa, é emulsionada utilizando um agente emulsificante apropriado. Isso resulta na formação de pequenas gotículas da fase interna dispersas na fase contínua, que é geralmente uma fase oleosa. A emulsão interna recém-formada é então adicionada à fase externa, que pode ser uma fase aquosa ou oleosa, dependendo da natureza da emulsão interna. Novamente, um agente emulsificante é utilizado para dispersar as gotículas da emulsão interna na fase externa. A mistura é adicionada à uma fase externa, que contém seu determinado tensoativo. Por fim, a emulsão resultante segue para a sonda de ultrassom (Becker *et al.*, 2016, p. 317).

## 2.5 Ensaios de pré-formulação

Para que os nanocarreadores cheguem ao mercado como medicamentos, é essencial conduzir estudos de pré-formulação rigorosos, para garantir a segurança, eficácia e qualidade do medicamento. Em formulações compostas por múltiplas substâncias, como os CLN, é crucial realizar análises de compatibilidade entre o IFA e os excipientes. Isso se deve ao fato de que interações e incompatibilidades potenciais precisam ser investigadas. Nesse contexto, a utilização de ferramentas capazes de indicar interações entre os componentes da formulação se mostra benéfica para prevenir complicações resultantes de incompatibilidades (físicas ou químicas), auxiliando na seleção de excipientes (Chadha; Bhandari, 2014, p. 82; Alves *et al.*, 2017).

### 2.5.1 *Cristalinidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados*

A cristalinidade da matriz lipídica em CLN refere-se à organização estrutural dos lipídios dentro das nanopartículas. Essa organização pode variar de amorfos (não cristalinos) à cristalinos, dependendo das características dos lipídios utilizados, das proporções entre eles e dos processos de fabricação empregados. Matrizes cristalinas são caracterizadas por cadeias de

ácidos graxos dispostas em uma estrutura ordenada e regular. Durante a recristalização, decorrente do processo de resfriamento da emulsão obtida, os lipídeos sólidos tendem a sair de sua forma polimórfica menos estável e retornar à forma mais estável, induzindo à reorganização de sua estrutura para um estado altamente ordenado. Essa organização pode ter implicações significativas para o desempenho do nanocarreador e sua capacidade de liberar o fármaco encapsulado (Severino *et al.*, 2011, p. 101; Gordillo e Mora, 2018, p. 285).

Os CLN se diferenciam das NLS pela presença de um lipídeo em estado líquido em sua formulação. Essa característica confere vantagens, como a diminuição da rigidez típica da cristalinidade presente em lipídios sólidos. Essa modificação resulta em um aumento na capacidade de encapsulamento de fármacos, ao mesmo tempo em que reduz a propensão à liberação prematura desses fármacos a partir da matriz. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é frequentemente empregada na avaliação da cristalinidade da matriz lipídica composta por lipídeos sólidos e líquidos. Essa técnica é valiosa para determinar o índice de cristalinidade (IC) nas misturas lipídicas e nas nanopartículas, podendo ser refinada por meio da sua combinação com a Difração de Raios-X (DRX) (Kovacevic *et al.*, 2011, p. 163; Rocha *et al.*, 2022, p. 179143). Assim, diferentes lipídeos sólidos e líquidos podem ser usados para obtenção de CLN com distintos índices de cristalinidade. Essas variações são determinadas pela composição, que inclui diferentes tipos de ácidos graxos, além de combinações de mono, di e triglicerídeos e pela proporção de lipídeos empregada (Pathak; Keshri; Shah, 2011, p. 357). O índice de cristalinidade de nanopartículas pode ser calculado através da equação 1.

$$IC (\%) = \frac{\Delta H_{Np}}{\Delta H_{LS} \times \text{fase lipídica}} \times 100$$

Equação 1: Índice de cristalinidade

Onde,  $\Delta H_{Np}$  é a entalpia de fusão dos CLN,  $\Delta H_{LS}$  é a entalpia de fusão do lipídeo sólido e a fase lipídica é a quantidade de lipídeo sólido presente na nanopartícula (Kovacevic *et al.*, 2011, p. 163; Madureira *et al.*, 2015, p. 22665).

### **2.5.2 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo**

Em 1948 foi publicado pela primeira vez o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) para a classificação e seleção de emulsificantes pela Atlas Powder Company e, em 1949, o conceito

de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) foi apresentado pela primeira vez pelo químico William Griffin (Atlas, 1948). Segundo Griffin, o efeito emulsificante está relacionado ao EHL e representa o equilíbrio de força e tamanho de grupos hidrofílicos e lipofílicos que constituem esse emulsificante. O índice de EHL reflete um valor numérico, em uma escala adimensional de 1 a 18, e indica a capacidade de uma substância em se distribuir entre duas fases imiscíveis. Esse valor numérico pode variar de valores muito baixos (abaixo de 9), indicando maior afinidade com a fase orgânica (lipofílico), a valores muito altos (acima de 11), indicando maior afinidade com a fase aquosa (hidrofílico), valores entre 9 e 11 são considerados intermediários (Americas, 1984).

A determinação do EHL ideal para uma formulação auxilia na escolha correta do emulsificante que será adicionado à composição da nanopartícula, haja vista que influenciam diretamente na estabilidade diminuindo a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa. Medicamentos com EHL balanceado também podem apresentar maior estabilidade em formulações aquosas, evitando problemas como a separação de fases ou alterações de concentração durante o armazenamento (Americas, 1984; Jin *et al.*, 2008, p. 226).

Quando dois ou mais emulsificantes são misturados em uma emulsão, é possível calcular o EHL da emulsão a partir da equação 2.

$$EHL_{req} = \frac{(\%TensA \times EHLA) + (\%TensB \times EHLB)}{100}$$

Equação 2: EHL requerido

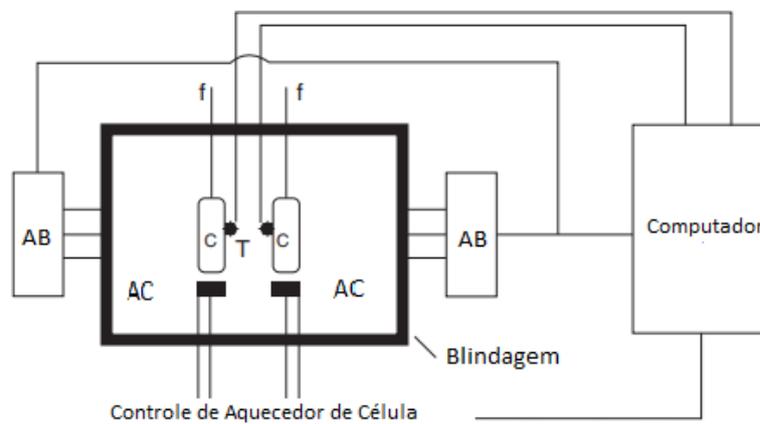
Onde, %TensA, EHLA, %TensB e EHLB são a porcentagem e EHL do tensoativo A e a porcentagem e EHL do tensoativo B, respectivamente. EHL<sub>req</sub> denota o valor de EHL obtido na formulação.

### 2.5.3 Análises térmicas

A Calorimetria exploratória diferencial (DSC) desempenha um papel fundamental na avaliação da compatibilidade de sistemas de liberação de fármacos. É uma técnica termoanalítica que mede as diferenças de calor absorvido ou liberado por uma amostra em relação a uma referência, à medida que é aquecida ou resfriada sob condições controladas. No

contexto de CLN, a DSC é de extrema importância para detectar interações físicas e químicas entre os componentes do nanocarreador, como lipídios, surfactantes e fármacos, através da análise das transições térmicas, como fusão e termodecomposição (Mura *et al.*, 1998, p.151). Ao realizar a DSC de diferentes combinações de componentes, é possível determinar quais lipídios, surfactantes e fármacos são mais compatíveis entre si. Essa informação é crucial para a seleção dos materiais adequados na formulação dos CLN, garantindo a estabilidade do sistema ao longo do tempo e evitando possíveis degradações (Rocha *et al.*, 2022, p. 179143). Para iniciar a análise, a amostra e a referência são colocadas em compartimentos separados e submetidas a um sistema de aquecimento controlado, conforme ilustrado na figura 5.

Figura 5 - Diagrama Geral de um Calorímetro Diferencial de Varredura.



Legendas: C = células; AB = aquecedores de blindagem; AC = aquecedores de células individuais; T = sensores de temperatura.

Fonte: Adaptado de Spink (2008).

Os materiais a serem analisados ficam localizados em células que estão envoltas por uma blindagem constantemente aquecida. Além do aquecimento da blindagem, a amostra e células de referência são aquecidas por aquecedores individuais nas células. São empregados também sensores de temperatura, que determinam se há uma diferença de temperatura entre as duas células e, por meio do controle do computador, aplicam o calor de compensação apropriado às células para manter a diferença de temperatura próxima de zero. Dessa forma, qualquer energia térmica absorvida ou liberada pela amostra é comparada à referência, permitindo a detecção de mudanças térmicas (Spink, 2008, p. 115). O resultado da variação de temperatura obtido em função do tempo ou da temperatura na análise é expresso através de uma curva. A curva mostra

picos e vales que correspondem às transições térmicas ocorrendo na amostra, como fusão, cristalização, transições de fase, reações químicas, decomposição térmica, entre outros eventos. Um pico endotérmico indica uma absorção de calor pela amostra, como fusão ou vaporização. Um pico exotérmico indica uma liberação de calor, como cristalização ou outras reações exotérmicas (Mura *et al.*, 1998, p. 151; Naziris *et al.*, 2021, p. 163).

Uma outra técnica termoanalítica que desempenha um papel significativo na avaliação da compatibilidade em emulsões multicomponentes, como os CLN, é a Termogravimetria (TG). A TG é usada para investigar mudanças de massa em uma amostra conforme ela é aquecida ou resfriada, fornecendo informações importantes sobre a degradação, volatilização e estabilidade térmica dos componentes presentes nos CLN. Mudanças na curva de massa-tempo indicam a ocorrência de processos de decomposição ou reações químicas, que podem impactar a estabilidade e a eficácia do sistema (Chadha; Bhandari, 2014, p. 82; Mansfield, 2015, p. 167). A TG se originou a partir da combinação de duas técnicas amplamente utilizadas: a termometria, que mede a variação de temperatura, e a gravimetria, que mede a variação de massa. A união dessas abordagens resultou em uma metodologia que possibilitou estudar a influência da temperatura na alteração da massa de uma amostra (Coats; Redfern, 1963, p. 906). A partir da TG, pode ser analisada a termogravimetria derivada (DTG), que como o próprio nome faz referência é uma técnica que calcula a derivada da curva de TG. Enquanto a termogravimetria tradicional mede a variação da massa de uma amostra em função da temperatura, a DTG fornece informações adicionais sobre as taxas de variação da massa em relação à temperatura, possibilitando a determinação com maior precisão dos pontos de perda ou ganho de massa (Peres, 2010).

#### ***2.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier***

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica baseada no princípio de que as moléculas têm diferentes vibrações e rotações e que um aumento dessa energia resultará numa variação do momento dipolar da molécula (Kamnev *et al.*, 2021, p. 1146). Através do algoritmo de Transformada de Fourier é possível obter um espectro infravermelho composto por bandas de absorção que correspondem a diferentes grupos funcionais presentes nas moléculas da amostra. Com isso, a FTIR permite a identificação de grupos funcionais presentes em lipídios, surfactantes e fármacos. Isso é crucial para determinar quais interações químicas são possíveis entre esses grupos funcionais, auxiliando na

compreensão das mudanças estruturais que podem ocorrer. Mudanças nos espectros FTIR podem indicar degradação dos componentes, reações indesejadas ou alterações estruturais que podem comprometer a qualidade e a eficácia dos CLN. Dessa forma, a FTIR oferece informações valiosas para o desenvolvimento e a otimização de formulações.

### **2.5.5 Difração de raios-X**

A difração de raio x (DRX) é uma técnica analítica utilizada para investigar a estrutura cristalina ou amorfa de uma molécula (Dorofeev *et al.*, 2012, p. 675) A técnica baseia-se na interação entre os raios X e os átomos presentes na amostra, quando um feixe de raios-X incide sobre uma amostra cristalina uma fração dos raios-X são refletidos em ângulos específicos determinados pelas distâncias interplanares dos átomos da molécula. Os raios-X difratados vão se dispersar, criando padrões de difração que irão fornecer informações detalhadas sobre a rede cristalina na amostra. A leitura feita pelo difratômetro de raios-X estabelece uma relação entre o ângulo de incidência dos raios-X, a distância entre os planos atômicos e o comprimento de ondas dos raios X difratados gerados pelo material e a intensidade da leitura, o que gera picos, linhas ou reflexões de Bragg (Pope, 1997, p. 129).

Na área farmacêutica, a DRX é uma técnica versátil e amplamente utilizada, a análise de pós por DRX é comum para investigar a presença de fases cristalinas e amorfas em amostras, além de avaliar a compatibilidade entre fármacos e excipientes haja vista que a mistura desses componentes pode resultar em processos de amorfização ou cristalização induzida, impactando na dissolução, biodisponibilidade e estabilidade do ativo. Possíveis interações entre fármacos e excipientes podem ser reveladas através da técnica de DRX, uma vez que materiais amorfos e cristalinos produzem padrões de difração distintos (Callister, 2002; Prado e Rocha, 2015, p. 2080).

## **2.6 Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados**

O planejamento quali-quantitativo de CLN é uma abordagem que combina métodos qualitativos e quantitativos para o desenvolvimento e a otimização desses sistemas de entrega de fármacos. Essa abordagem visa entender tanto os aspectos qualitativos, como interações químicas e estabilidade, quanto os aspectos quantitativos, como eficácia de liberação de

fármacos e tamanho de partículas, a fim de criar formulações eficazes e estáveis (Ebrahimi, Leardi, Jalali, 2014, p. 12). O planejamento envolve a avaliação dos melhores parâmetros a serem empregados para se obter uma formulação com características ideais, visando estabilidade e via de administração. Os parâmetros variáveis normalmente envolvem potência do equipamento, tempo de sonicação, temperatura, porcentagem total de lipídeos, concentração dos emulsificantes e proporção entre lipídeos líquidos e sólidos (Wu e Hamada, 2011).

A caracterização quantitativa envolve a interpretação de parâmetros físicos e químicos dos CLN, como índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), diâmetro médio das partículas e eficiência de encapsulação (EE). Essas medidas quantitativas são essenciais para avaliar a eficácia e o desempenho do sistema de liberação de fármacos. O objetivo é realizar o mínimo de formulações possíveis, variando os parâmetros ajustáveis à uma faixa de concentração pré-definida, seja por um planejamento estatístico ou por levantamento de dados na literatura (Duarte, 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o Antimoniato de Meglumina para o tratamento de leishmaniose.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Realizar triagem lipídica com diferentes lipídeos líquidos;
- b) Realizar estudos de EHL das formulações;
- c) Avaliar a compatibilidade do IFA com os excipientes;
- d) Realizar planejamento quali-quantitativo;
- e) Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN);
- f) Realizar caracterização físico-química dos CLN;
- g) Avaliar a potencial atividade leishmanicida *in vitro* dos CLN.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Os materiais utilizados no desenvolvimento dos nanocarreadores e nos estudos de compatibilidade foram obtidos a partir de fornecedores qualificados. Foram empregados: o lipídio sólido a temperatura ambiente, Dynasan® 116 (doado pela OIO Chemical), os lipídios líquidos a temperatura ambiente, Miglyol® 812 (doado pela OIO Chemical) e ácido oleico (doado pela Croda), os agentes surfactantes óleo de ricino etoxilado EO30 (doado pela MCassab) e Span™ 80 (doado pela Croda) e o fármaco (Antimoniato de Meglumina) adquirido da Acros organics. O tensoativo Pluronic® F-127 foi comprado da Sigma (St Louis, EUA). Além disso, foram utilizados solventes apropriados para a condução de testes de dosagem e outros ensaios.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Ensaio de pré-formulação

O estudo de pré-formulação é uma etapa essencial do desenvolvimento de novos medicamentos (Pani *et al.*, 2011, p. 219). Protocolos atuais recomendam a utilização de misturas em proporções (m/m) iguais entre o fármaco e demais excipientes. Além disso, o uso combinado de técnicas termoanalíticas com as espectroscópicas permite uma compreensão aprofundada e melhor visualização das interações físicas ou químicas e auxiliam na seleção dos excipientes adequados (Chadha; Bhandari, 2014, p. 82).

##### 4.2.1.1 Triagem lipídica

Foram conduzidas análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC, sigla em inglês) do lipídeo sólido Dynasan116® e suas combinações com dois lipídeos líquidos (na proporção 1:1), nomeadamente Dynasan116® com Ácido oleico e Dynasan116® com Miglyol®812. Para a análise de DSC, aproximadamente  $2 \pm 0,05$  mg das amostras foram cuidadosamente depositadas em um cadinho de alumínio e posteriormente lacradas. O procedimento ocorreu em uma atmosfera dinâmica de nitrogênio, com uma vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e uma taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>, abrangendo a faixa de temperatura de 25°C

a 300°C. Mudanças significativas como diminuição ou desaparecimento de picos, redução do pico de fusão e entalpia serão utilizados como indicativos de diminuição do perfil de cristalinidade do lipídeo sólido.

#### 4.2.1.2 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo da formulação

Foram conduzidos experimentos empregando os lipídios selecionados, após o ensaio de triagem lipídica, em diversas formulações variando a proporção de diferentes tensoativos de EHL conhecido, um hidrofílico (EHL alto) e outro lipofílico (EHL baixo). Um procedimento experimental comparativo foi realizado, testando dois pares de tensoativos diferentes em nove emulsões para cada par. O objetivo era identificar a emulsão que apresentasse maior estabilidade e determinar o EHL requerido (EHLreq) para a fase oleosa. As análises foram realizadas combinando a proporção entre o Span<sup>®</sup> 80 (EHL=4,3) e o Pluronic<sup>®</sup> F-127 (EHL=22) e entre o Span<sup>®</sup> 80 (EHL=4,3) e o óleo de rícino etoxilado 30EO (Alkest<sup>®</sup> CSO 300) (EHL=11,7). A composição da emulsão foi de: tensoativos 10% (p/p), lipídeo sólido 7% (p/p), lipídeo líquido 3% (p/p) e água MilliQ 80% (p/p). A proporção entre os tensoativos hidrofílico e lipofílico para alcançar a emulsão mais estável foi calculada com base na equação de EHL requerido apresentada no tópico 3.5.2 (ICI Americas, 1984; Griffin, 1949, p. 311).

$$EHL_{req} = \frac{(\%TensA \times EHLA) + (\%TensB \times EHLB)}{100}$$

Equação 2: EHL requerido

Onde, %TensA, EHLA, %TensB e EHLB são a porcentagem e EHL do tensoativo A e a porcentagem e EHL do tensoativo B, respectivamente. EHLreq denota o valor de EHL obtido na formulação.

#### 4.2.1.3 Ensaios de compatibilidade

Foi realizado um ensaio de compatibilidade entre o fármaco e os excipientes com o objetivo de analisar possíveis incompatibilidades com os componentes que seriam utilizados

para o desenvolvimento dos CLN deste estudo. Análises dos componentes isolados, bem como suas misturas binárias, ternárias e totais foram realizadas por TG/DTG, DSC E FTIR.

#### 4.2.1.3.1 Calorimetria exploratória diferencial

A DSC dos compostos isolados e de suas misturas ternárias e mistura total foi realizada conforme procedimento descrito no tópico 4.2.1.1. Mudanças nos principais eventos térmicos característicos de cada substância foram avaliadas.

#### 4.2.1.3.2 Termogravimetria

A análise TG foi realizada sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, m temperatura entre 20 a 600 °C no equipamento DTG-60H (Shimadzu®, Japão). Nos testes conduzidos utilizaram cerca de  $5 \pm 0,05$  mg das amostras dos componentes isolados, suas misturas ternárias e mistura total. Os eventos térmicos e a derivada (DTG) foram determinados pelo software Shimadzu® TA-60WS e os gráficos gerados pelo OriginPro® 2018.

#### 4.2.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros correspondentes à região do infravermelho foram adquiridos através de uma varredura no infravermelho médio, abrangendo a faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  com 45 scans e resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ . A análise foi realizada utilizando pastilhas de KBr, com uma resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  baseado no método de Aminu (2021). Antes de cada medição, uma leitura do "branco" foi realizada, utilizando o suporte de amostras contendo exclusivamente a pastilha de KBr. Para obter os espectros vibracionais, um processo de mistura foi empregado, envolvendo uma quantidade específica da amostra juntamente com o KBr, na proporção de 1:100. Posteriormente, essa mistura foi pulverizada e comprimida utilizando prensa hidráulica Shimadzu® por aproximadamente 10 minutos, resultando em uma fina pastilha. Essa pastilha foi então colocada no suporte de amostras e a leitura foi efetuada em espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu®).

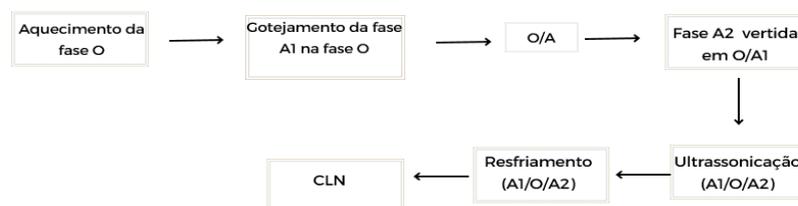
#### 4.2.2 Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Foi realizado um planejamento quali-quantitativo dos CLN com o objetivo de escolher o CLN mais promissor, sem a aplicação de um método estatístico. A análise qualitativa envolveu a observação e interpretação de propriedades visuais macroscópicas. O planejamento quantitativo, por outro lado, envolveu a análise de propriedades físicas, ópticas e térmicas dos CLN usando métodos instrumentais e técnicas de análise mais precisas. No presente trabalho as informações quantitativas consideradas foram o índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), Diâmetro médio das nanopartículas e eficiência de encapsulação (EE) (Soltani *et al.*, 1999, p. 7303; Miranda *et al.*, 2006, p. 1013; García e Palencia, 2021, p. 148524). Os parâmetros selecionados como variáveis foram a quantidade total de lipídeos na formulação, a proporção de lipídeos sólido e líquido, o tempo e a potência de sonicação. A escolha de tais fatores foi realizada com base em estudos disponíveis na literatura que relatam a influência dessas variáveis nos parâmetros críticos da qualidade das formulações, tais como PDI, PZ, diâmetro médio e EE (Silva *et al.*, 2011, p. 158; Zheng *et al.*, 2013, p. 76; Apostolou *et al.*, 2021, p. 2859). A escolha da faixa de variação de lipídeos, tempo de sonicação e potência do aparelho foi definida com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Costa, 2019; Souza, 2022). Com base nos resultados obtidos por Costa (2019) e Souza (2022), a faixa definida para o ensaio foi de 7 e 10% para porcentagem de lipídeos totais, 65/35 e 85/15 para proporção de lipídeo sólido/líquido, 50 e 70% de amplitude para a potência do equipamento de ultrassom e tempo de sonicação de 5 e 10 minutos. É importante enfatizar que a proporção entre o tensoativos hidrofílico/lipofílico foi definida anteriormente, em estudos prévios de EHL.

#### 4.2.3 Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados

O método utilizado para a elaboração dos CLN consistiu na técnica de dupla emulsificação por ultrassom à quente, conforme esquematizado na figura 6.

Figura 6 - Método de dupla emulsificação por ultrassom à quente



Fonte: Autoria própria.

Primeiramente, toda a fase oleosa (O), incluindo o tensoativo lipofílico (Span® 80), foi aquecida (5-10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido). Em seguida, a fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) contendo o fármaco foi adicionada à fase oleosa pelo método de gotejamento, sob agitação magnética por 1 min para a formação da emulsão primária O/A<sub>1</sub>. A fase aquosa externa (A<sub>2</sub>), com seu respectivo tensoativo hidrofílico (Alkest® CSO 300), foi aquecida separadamente e posteriormente foi vertida na emulsão primária (O/A<sub>1</sub>) e submetida ao processo de ultrasonicação por meio de um sonificador de sonda (Ecosonics® QR 800, São Paulo), utilizando os tempos e potência pré-determinados pela análise fatorial. A emulsão formada (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) foi resfriada em banho de gelo até a formação do CLN por recristalização da fase lipídica (Das e Chaudhury, 2011, p. 62; Becker *et al.*, 2016, p. 317). A potência, o tempo de sonicação, a porcentagem total de lipídeos e a proporção lipídeo sólido/líquido foram definidas pelo planejamento quali-quantitativo realizado previamente e a concentração de tensoativo total da formulação foi fixada em 10%, onde a proporção de tensoativo hidrofílico/lipofílico foi de 60% e 40%, respectivamente. A proporção de tensoativo hidrofílico/lipofílico foi fixada com base no resultado obtido no estudo de EHL. Em todas as formulações, a fase A<sub>1</sub> correspondeu à 29% da quantidade total de lipídeos e foi usada em uma concentração de 23 mg/mL.

Os CLN brancos foram obtidos pelo mesmo método, sendo a fase A<sub>1</sub> composta apenas por água. A formulação mais promissora identificada neste experimento de planejamento será escolhida para prosseguir com a pesquisa, na qual os CLN serão reproduzidos para fins de caracterização e outros ensaios.

#### **4.2.4 Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados**

##### **4.2.4.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta**

O tamanho médio e o PDI das nanopartículas foram analisados a 25°C, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com um ângulo de incidência de luz fixo de 90°, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). O PZ foi avaliado através da mobilidade eletroforética no mesmo instrumento (Cavalcanti *et al.*, 2018, p. 22). Para as medições, todas as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:10 (v/v) com água ultrapura. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Foi utilizada uma cubeta óptica para DLS, no primeiro caso, e cubetas capilares, para a medição do PZ.

#### 4.2.4.2 Análises térmicas

A avaliação do perfil de cristalinidade da matriz lipídica dos CLN obtidos, foi realizada por técnica de DSC. O índice de cristalinidade (IC) dos CLN, foi determinado com base na equação de IC.

$$IC (\%) = \frac{\Delta H_{NP}}{\Delta H_{LS} \times fase\ lipídica} \times 100$$

Equação 1: Índice de cristalinidade

Onde,  $\Delta H_{NP}$  é a entalpia de fusão dos CLN,  $\Delta H_{LS}$  é a entalpia de fusão do lipídeo sólido e a fase lipídica é a quantidade de lipídeo sólido presente na nanopartícula (Kovacevic *et al.*, 2011, p. 163; Madureira *et al.*, 2015, p. 22665).

#### 4.2.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A FTIR foi realizada com o objetivo de confirmar a incorporação do fármaco nas nanopartículas em dispersão e as possíveis interações entre os componentes. A análise foi realizada de acordo com metodologia descrita no tópico 4.2.1.3.3.

#### 4.2.4.4 Difração de raios-X

O grau de cristalinidade e a existência de formas polimórficas na dispersão de nanopartículas foram avaliados por meio da técnica de difração de raios-X (DRX). O DRX foi obtido utilizando um difratômetro Smartlab® (Rigaku, Japão) equipado com anodo de cobre, comprimento de onda 1,5443 Å. A análise foi realizada na Central multiusuário do Departamento de Física (DF) da UFPE. Foi utilizada taxa de varredura de 5° /min e passo de 0,03°/s (Aminu *et al.*, 2021, p. 1). Todas as amostras foram submetidas a análise em ângulo de difração 2  $\theta$  na faixa de 0 a 60°.

#### 4.2.4.5 Determinação da eficiência de encapsulamento

A determinação da eficiência de encapsulamento (EE%) foi conduzida utilizando o método indireto, que consiste em dosear o fármaco não encapsulado localizado na parte externa do CLN (Cavalcanti *et al.*, 2018, p. 22).

As dispersões das CLN foram diluídas em água ultrapura na proporção 1:1 (v/v) e posteriormente submetidas a um processo de separação do fármaco não encapsulado (livre) através da ultrafiltração. Esse procedimento utilizou filtros Amicon Ultra-0,5 (Millipore, Darmstadt, Alemanha) com um tamanho de poro de 30 kDa, sendo centrifugados a 8000 rpm por 45 minutos (centrífuga Daiki DTC-16000). O filtrado (fármaco não encapsulado) foi coletado e diluído novamente, dessa vez em solução de HCl 6M para a quantificação do Antimoniato de Meglumina (AM) por a espectroscopia de absorção atômica (FAAS), baseado no método de Souza (2022). CLN sem a presença do fármaco foram produzidas seguindo o mesmo procedimento e foram empregados como o branco (CLNBr). A análise foi realizada no Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN) e a EE% foi calculada de acordo com a equação 3:

$$EE (\%) = \frac{(F_{total}) - (F_{livre})}{F_{total}} \times 100$$

**Equação 3:** Eficiência de encapsulação.

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

#### 4.2.4.6 Morfologia por microscopia eletrônica

Os CLN foram diluídos em água ultrapurificada na proporção 1:10 (v/v). Uma alíquota de 20  $\mu$ L foi dispersa em grades de cobre, seguidas do agente de contraste ácido fosfotúngstico (PTA) e colocadas para secar em temperatura ambiente por 48h. 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).

#### 4.2.5 *Ensaio de viabilidade celular*

Foram realizados ensaios com MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos CLN, com e sem fármaco, em células de mamíferos. Para isso, foram utilizados macrófagos da linhagem RAW 264.7. Esses macrófagos foram colocados em placas de 96 poços na quantidade de  $0,2 \times 10^5$  células/poço e incubados por 24 horas a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os compostos (AM, CLN16 e CLNBr) foram adicionados nas concentrações entre 4,76 µg/mL e 700 µg/mL e incubados novamente por um período de 72 h. Para o controle negativo, foram utilizados poços apenas com meio de cultura. Já para o controle positivo, foi utilizado a Miltefosina. Após o período de 72 horas, foi acrescentado 25 µL de MTT a 5 mg/mL em PBS, com posterior incubação por 2h, a 37°C com ausência de luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado. Para a solubilização do formazan, resultante da redução do MTT, foi adicionado 100 µL de DMSO por poço. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

#### 4.2.6 *Ensaio de atividade leishmanicida em amastigotas*

Neste ensaio, macrófagos RAW 264.7 ( $0,2 \times 10^5$  células/poço) foram incubados por 1h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foram acrescentadas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* na proporção de 15 parasitas por macrófago, durante um período de 6 h, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foi realizada uma lavagem com o objetivo de remover os parasitas não internalizados nos macrófagos e a cultura foi submetida a uma nova incubação na presença de diferentes concentrações dos compostos (4,76 a 700 µg/mL) por 72h, a 37°C e atmosfera semelhante às incubações anteriores. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (chlorophenol red beta-D-galactopyranoside), seguida de nova incubação por um período de 2-6 h, a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

#### 4.2.7 *Ensaio de atividade leishmanicida em promastigotas*

As Formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, cepas WHOM/00 LTB 0016 e MHOM/MA/67/ITMAP-263, respectivamente, foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma). As cepas foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 0,0025 mg/mL de hemina e 1% de penicilina-estreptomicina (meio completo). Em todos os experimentos foram utilizados parasitas na fase exponencial de crescimento. Para o ensaio realizado, os parasitas foram contados e diluídos em meio Schneider's (Sigma) completo a  $1 \times 10^6$  células/mL e incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações das amostras (4,76 a 700µg/mL) por 72h. Após o período de incubação, foi adicionada solução de CPRG (500µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), nos poços já lavados. Posteriormente, foi realizada uma nova incubação (10 minutos, a 22°C). A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC 70 Multiskan FC. Os resultados foram expressos como porcentagem de redução da absorbância dos poços com as amostras em comparação com parasitas não tratados. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

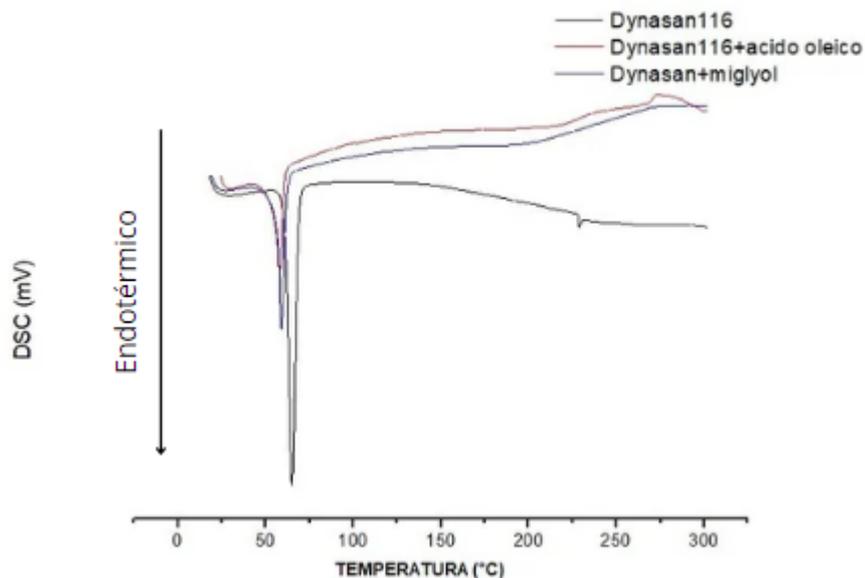
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaios de pré-formulação

#### 5.1.1 Triagem lipídica

Com o intuito de adquirir dados referentes ao estado físico e à cristalinidade dos lipídeos sólidos em sua forma pura, bem como para confirmar quaisquer mudanças na cristalinidade decorrentes da mistura com lipídeos líquidos, é possível empregar análises térmicas. Essas análises permitirão a avaliação de variações nas temperaturas e entalpias de fusão. Neste trabalho, foi avaliada a influência dos lipídeos líquidos Miglyol<sup>®</sup>812 e ácido oleico na promoção da diminuição do perfil de cristalinidade da matriz lipídica, tendo como lipídeo sólido de escolha o Dynasan<sup>®</sup>116. Para obter essas informações a metodologia de escolha foi a DSC cujos resultados estão expressos nos gráficos presentes na figura 7. As informações referentes as propriedades físico-químicas dos lipídeos líquidos e sólido utilizados neste ensaio podem ser conferidas na tabela 1.

Figura 7 - Curva DSC do lipídeo sólido Dynasan116<sup>®</sup> e suas misturas binárias com os lipídeos líquidos ácido oleico e Miglyol<sup>®</sup>812



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1 - Lipídeos utilizados na triagem lipídica e suas propriedades físico-químicas

<b>Lipídeo</b>	<b>Composição</b>	<b>Estado físico em temperatura ambiente</b>	<b>Temperatura de fusão (°C)</b>	<b>Ordenação da matriz</b>
Dynasan <sup>®</sup> 116	Triglicerídeo do ácido Tripalmitin (C:16)	Sólido	63-68	Altamente ordenado
Miglyol <sup>®</sup> 812	Triglicerídeo dos ácidos caprílico (C:8) e cáprico (C:10)	Líquido	-5	Desordenado
Ácido oleico	Ácido graxo de cadeia longa (C:18)	Líquido	± 14	Desordenado

Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, a triagem lipídica foi realizada com base em mudanças ocorridas nos picos originais do Dynasan<sup>®</sup>116 (lipídeo sólido). O pico endotérmico no gráfico do Dynasan<sup>®</sup>116 ocorre em torno da temperatura de 65°C, correspondendo ao seu ponto de fusão (Souto e Muller, 2006, p. 377; Teeranachaideekul *et al.*, 2017, p. 300). Os picos endotérmicos das misturas binárias com Miglyol<sup>®</sup>812 e ácido oleico ocorreram em 59 e 57,91°C, respectivamente. A diminuição no ponto de fusão, e conseqüentemente na entalpia das misturas binárias em comparação com o lipídeo sólido puro indica uma matriz menos cristalina (Severino *et al.*, 2011, p. 101; Rocha *et al.*, 2022, p. 179143). A tabela 2 mostra os dados de DSC correspondentes a pico de fusão, entalpia, início e fim do pico.

Tabela 2 - Parâmetros DSC do Lipídeo sólido Dynasan116<sup>®</sup> e suas misturas binárias com os lipídeos líquidos ácido oleico e Miglyol<sup>®</sup>812

<b>Amostras</b>	<b>T<sub>Fusão</sub> (°C)</b>	<b>Início (°C)</b>	<b>Final (°C)</b>	<b>Entalpia (J/g)</b>
Dynasan116 <sup>®</sup>	65,02	61,36	68,46	-188,24
Dynasan116 <sup>®</sup> + ácido oleico	57,91	55,05	60,45	-90,47
Dynasan116 <sup>®</sup> + Miglyol <sup>®</sup> 812	59,00	56,47	61,55	-85,24

Fonte: Autoria própria.

A diminuição na entalpia e na temperatura de fusão dos lipídeos sólidos, quando combinados com lipídeos líquidos, pode ser explicada pela solubilidade parcial desses componentes. Isso

torna o processo de fusão mais eficiente, exigindo menos energia (Severino *et al.*, 2011, p. 101; Cavendish *et al.*, 2020, p. 767).

Avaliando esses dados, o lipídeo líquido escolhido para compor a estrutura dos CLN e dar continuidade ao estudo foi o Miglyol<sup>®</sup>812, representando a mistura binária com boa diferença entre as temperaturas de início e final da fusão (alargamento de pico) e maior redução da entalpia de fusão do lipídeo sólido. Esses resultados significam uma menor cristalinidade da matriz da mistura lipídica.

### 5.1.2 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo da formulação

Um dos fatores cruciais no processo de emulsificação reside na estrutura e concentração de tensoativos, influenciando a tensão interfacial do sistema e no tamanho do CLN obtido (Mura *et al.*, 2021, p. 437). Aumentar a concentração de tensoativos tende a reduzir a tensão interfacial, o que, por sua vez, impulsiona o processo de emulsificação do sistema (Das, Wai e Tan, 2012, p. 139; Dutra *et al.*, 2015, p. 433). Dessa forma, a avaliação do EHL foi realizada através da observação macroscópica das emulsões em dois momentos distintos: o primeiro imediatamente após a preparação da emulsão e o segundo após um período de repouso de 24 horas. As proporções de tensoativos e valores de EHL estão expostos na tabela 3 e 4.

Tabela 3 - Proporções de tensoativos para formulações contendo Span<sup>®</sup> 80 e Pluronic<sup>®</sup> e respectivos valores de EHL.

<b>EMULSÃO</b>	<b>Span<sup>®</sup>80</b>	<b>Pluronic<sup>®</sup>F-127</b>	<b>EHL</b>
<b>A1</b>	90%	10%	6,07
<b>A2</b>	80%	20%	7,84
<b>A3</b>	70%	30%	9,61
<b>A4</b>	60%	40%	11,38
<b>A5</b>	50%	50%	13,15
<b>A6</b>	40%	60%	14,92
<b>A7</b>	30%	70%	16,66
<b>A8</b>	20%	80%	18,46
<b>A9</b>	10%	90%	20,23

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Proporções de tensoativos para formulações contendo Span<sup>®</sup> 80 e Alkest<sup>®</sup> CSO 300 e respectivos valores de EHL.

EMULSÃO	Span <sup>®</sup> 80	Alkest <sup>®</sup> CSO 300	EHL
<b>B1</b>	90%	10%	5,04
<b>B2</b>	80%	20%	5,78
<b>B3</b>	70%	30%	6,52
<b>B4</b>	60%	40%	7,26
<b>B5</b>	50%	50%	8,00
<b>B6</b>	40%	60%	8,74
<b>B7</b>	30%	70%	9,48
<b>B8</b>	20%	80%	10,22
<b>B9</b>	10%	90%	10,96

Fonte: Autoria própria.

A figura 8 e a figura 9 mostram o aspecto visual das amostras (compostas por Span80<sup>®</sup> e Pluronic<sup>®</sup>F-127) recém preparadas e após 24 horas em repouso, respectivamente.

Figura 8 - Aspecto visual das amostras recém preparadas utilizando o Span 80<sup>®</sup> e o Pluronic<sup>®</sup>F-127



Fonte: Autoria própria.

Figura 9- Aspecto visual das amostras preparadas utilizando o Span 80<sup>®</sup> e o Pluronic<sup>®</sup> F-127, após repouso de 24 horas



Fonte: Autoria própria.

A figura 10 e a figura 11 mostram o aspecto visual das amostras (compostas por Span80® e Alkest® CSO 300) recém preparadas e após 24 horas em repouso, respectivamente.

Figura 10 - Aspecto visual das amostras recém preparadas utilizando o Span 80®e o óleo de rícino etoxilado 30EO (Alkest® CSO 300)



Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Aspecto visual das amostras preparadas utilizando o Span 80®e o óleo de rícino etoxilado 30EO (Alkest® CSO 300), após repouso de 24 horas.



Fonte: Autoria própria.

Entre os dois pares de tensoativos utilizados, os que resultaram em emulsões com aspectos macroscópicos mais estáveis, foram as emulsões resultantes do par Span®80 e óleo de rícino etoxilado (Alkest® CSO 300). Entre essas, foi escolhida a emulsão com EHL em torno de 8,74, por apresentar aspecto mais translúcido entre as demais. Esse valor está associado à proporção de 40% de Span® 80 e 60% de óleo de rícino etoxilado (Alkest® CSO 300), e foi a proporção utilizada para o preparo dos CLN.

O aspecto leitoso das demais formulações representa um parâmetro crítico para avaliar a estabilidade de sistemas em relação a diferentes valores de EHL, porque essa ocorrência antecipa a coalescência, que por sua vez pode levar à separação de fases e à perda completa de estabilidade (Lieberman, Rieger e Banker, 1998). Além disso, o aspecto leitoso de uma formulação pode ser indicativo de que as partículas possuem tamanho maior que 200nm

(Kheradmandnia *et al.*, 2010, p. 753). As informações contidas nas tabelas mencionadas previamente neste tópico são valiosas para estudos futuros que dizem respeito à criação de diagramas de fases pseudoternárias. Esses diagramas delineam os limites da fase oleosa proposta, do surfactante e da água, fornecendo diretrizes para a criação de sistemas emulsionados (Barcelos *et al.*, 2013).

### 5.1.3 *Ensaio de compatibilidade*

Em formulações que envolvem múltiplos componentes, como é o caso dos CLN, é essencial conduzir uma análise de compatibilidade entre o IFA e os excipientes. Isso é crucial, uma vez que interações e incompatibilidades potenciais podem resultar em desafios na formulação e, ao longo do tempo, ocasionar impactos adversos no organismo.

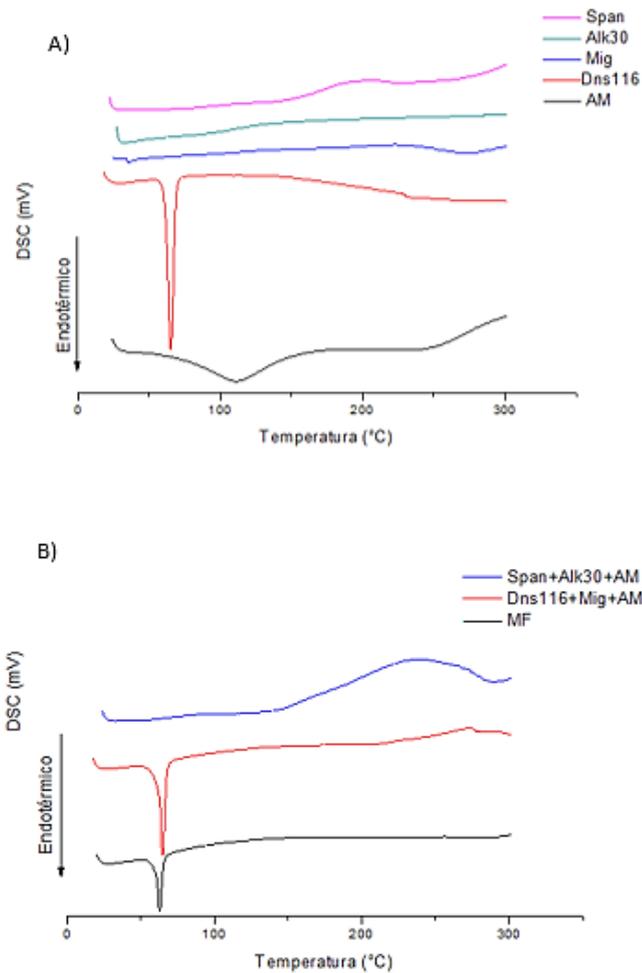
Os componentes selecionados para compor os CLN deste estudo foram o lipídeo sólido Dynasan<sup>®</sup> 116, o lipídeo líquido Miglyol<sup>®</sup> 812 e os emulsificantes Span<sup>®</sup> 80 (lipofílico) e Alkest<sup>®</sup> CSO 300 (hidrofílico).

Uma vez determinada a composição, foi conduzida uma avaliação de compatibilidade entre os insumos e o fármaco. Os ensaios de compatibilidade foram realizados através das técnicas de DSC, TG, FTIR (Pires *et al.*, 2017, p. 196), conforme detalhadas nos métodos deste trabalho.

#### 5.1.3.1 *Calorimetria exploratória diferencial*

A DSC foi realizada conforme especificada nos métodos, a curva obtida reflete os eventos termodinâmicos que ocorrem na amostra à medida que a temperatura aumenta. Especificamente, o aumento da temperatura provoca transições na amostra, manifestadas como picos, podendo ser endotérmicos ou exotérmicos (Mura *et al.*, 1998, p. 151). Inicialmente foi feita a DSC de toda a composição do CNL individualmente, como pode ser visto na figura 12. O resumo dos dados da DSC está presente na tabela 5. Na figura 12A observa-se as curvas dos compostos isolados que serão discutidos neste parágrafo.

Figura 12 - (A) Gráfico DSC dos compostos isolados. (B) Gráfico DSC das misturas ternárias e total.



Legenda: Span = Span<sup>®</sup>80, ALK30= Alkest<sup>®</sup>CSO 300, Mig = Miglyol<sup>®</sup>812, Dns116 = Dynasan<sup>®</sup>116, AM= Antimoniato de meglumina; MF= Mistura física de todos os componentes utilizados na análise.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total avaliadas por DSC.

<b>Amostra</b>	<b>P<sub>Fusão</sub>(°C)</b>	<b>Onset (°C)</b>	<b>Endset (°C)</b>	<b>Entalpia (J/g)</b>
<b>Span</b>	-	-	-	-
<b>Alk30</b>	-	-	-	-
<b>Dsn116</b>	65,02	61,36	68,46	-188,24
<b>AM</b>	110,80	74,95	145,55	-212,51
<b>Dns116+Mig+AM</b>	59,00	56,47	61,55	-85,24
<b>Span+Alk30+AM</b>	-	-	-	-
<b>MF</b>	62,73	60,49	65,18	-49,07

Legenda: Span = Span<sup>®</sup>80; Alk30 = Alkest<sup>®</sup>CSO 300; Dsn116= Dynasan<sup>®</sup>116; AM= Antimoniato de meglumina; MF= mistura física total.

Fonte: Autoria própria.

Na curva AM, é possível notar um primeiro evento endotérmico caracterização por um pico alargado na temperatura de  $\pm 110,80^{\circ}\text{C}$ , com um valor de  $\Delta H$  de  $-212,51 \text{ J/g}$ . O surgimento desse pico indica a fusão do AM ou/e a perda de água de solvatação. O início do evento exotérmico, pode estar relacionado a um evento de termodecomposição e pode ser identificado no final da curva, a partir de  $250^{\circ}\text{C}$ . É possível confirmar o estado amorfo do AM pela ausência de picos bem definidos de eventos térmicos.

O gráfico DSC do Dynasan<sup>®</sup>116, possui apenas um pico, este referente ao ponto de fusão do lipídeo. Para o Alkest<sup>®</sup>CSO 300 e Span<sup>®</sup>80 não foram visualizados eventos significativos na faixa estudada, visto que são substâncias líquidas com eventos de decomposição acima de  $290^{\circ}\text{C}$  e ponto de fusão não relatados. Assim como nas curvas dos tensoativos, não foi possível detectar o ponto de fusão do Miglyol<sup>®</sup>812 ( $-5^{\circ}\text{C}$ ) haja vista que requer uma temperatura inferior à faixa utilizada no método ( $25^{\circ}\text{C}$  a  $300^{\circ}\text{C}$ ) e que é um lipídeo líquido à temperatura ambiente. O início do evento exotérmico pode ser referente à decomposição do Miglyol<sup>®</sup>812 e é observado próximo à temperatura de  $290^{\circ}\text{C}$ .

A figura 12B expõe as curvas das misturas ternárias entre os lipídeos e o fármaco, os emulsificantes e o fármaco e a mistura de todos os componentes da formulação, na proporção 1:1 (m/m), obtidas pela DSC. Ao avaliar a mistura ternária, formada pelos lipídeos e o fármaco, é possível observar um pico endotérmico em  $64,69^{\circ}\text{C}$ , referente à fusão do Dynasan<sup>®</sup>116, sendo este um pouco superior ao pico de fusão analisado na mistura binária entre o Dynasan116<sup>®</sup> e o Miglyol<sup>®</sup>812. Entretanto, apresentou uma entalpia de  $-70,49 \text{ J/g}$ , consideravelmente inferior à entalpia obtida pela mistura binária Dynasan116<sup>®</sup> e o Miglyol<sup>®</sup>812. A diminuição quantidade de energia necessária para que ocorra transição energética, pode ser um indicativo de que o fármaco colabora com o aumento da desorganização da estrutura, haja vista que quanto menor a entalpia envolvida na fusão da mistura de lipídeos, maior a redução de cristalinidade da matriz lipídica na mistura física (Zheng *et al.*, 2013, p. 76). Além disso, é possível notar a ausência do pico endotérmico ( $110,80^{\circ}\text{C}$ ) referente à fusão do AM, indicando que o fármaco se encontra molecularmente disperso dentro dos lipídeos.

A combinação ternária (tensoativos e fármaco) exibiu um perfil de curva semelhante ao dos agentes tensoativos, não apresentando eventos consideráveis, nem mesmo do fármaco. Isso pode indicar a possibilidade de sua solubilização do AM na mistura líquida dos agentes tensoativos. A curva referente à mistura física de toda a composição do CLN apresenta um perfil semelhante à mistura ternária formada pelo AM e os lipídeos, com um pico que corresponde à fusão do Dynasan<sup>®</sup>116 em  $62,73^{\circ}\text{C}$  (antecipação de aproximadamente  $3^{\circ}\text{C}$ ), um

pouco alargado, menos intenso e com entalpia de  $-49,07$  J/g, embora a faixa de temperatura de fusão tenha sido menor na mistura binária (Dynasan<sup>®</sup>116/Miglyol<sup>®</sup>812). É possível notar a ausência total do pico de decomposição do AM ( $250^{\circ}\text{C}$ ), sugerindo uma possível termoproteção conferida pela mistura ao IFA. O início do pico exotérmico referente à decomposição do Miglyol<sup>®</sup>812 se mantém próximo de  $290^{\circ}\text{C}$ , sua finalização não pode ser detectada devido à faixa de temperatura utilizada neste estudo ( $25^{\circ}\text{C}$  a  $300^{\circ}\text{C}$ ).

A DSC permitiu a avaliação de mudanças em eventos térmicos quando os lipídeos foram combinados com o fármaco e outros excipientes presentes na formulação. As combinações individuais do fármaco com cada excipiente e entre os excipientes não foram efetuadas, com o objetivo de uma utilização eficiente de recursos e tempo. O enfoque foi direcionado para as combinações ternárias e totais, considerando que qualquer mudança significativa nos resultados das misturas ternárias, indicando possíveis incompatibilidades, conduziria à análise das combinações binárias para esclarecer possíveis incompatibilidades. Por último, avaliar a redução na temperatura de fusão identificada em algumas das misturas pode ser vantajoso para a produção dos CLN pois contribui para evitar o alcance de temperaturas elevadas que poderiam resultar na fusão do fármaco e na evaporação da solução aquosa utilizada nas nanopartículas.

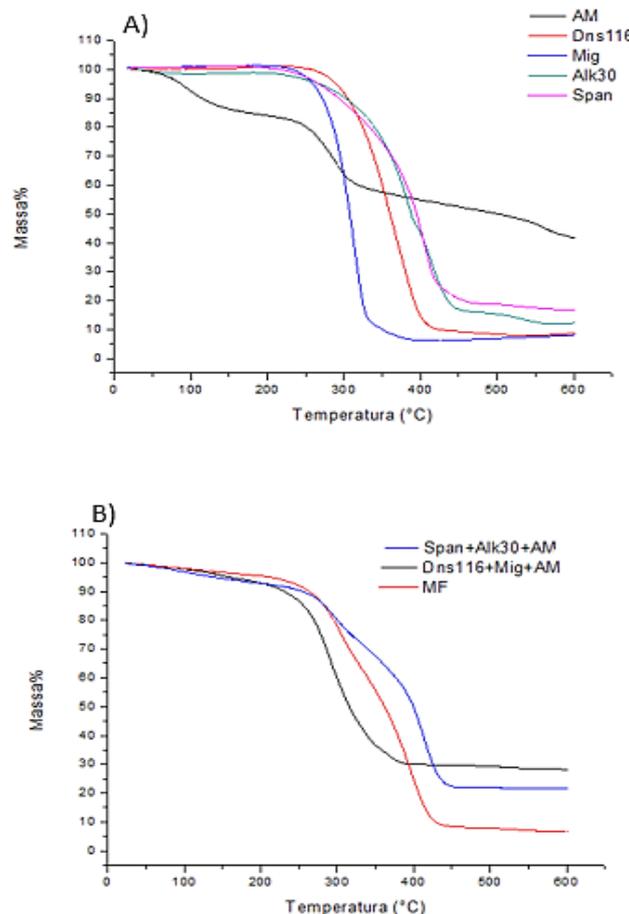
É valioso ressaltar que, resultados que apontam para a presença de alguma forma de interação não necessariamente denotam incompatibilidades. Algumas interações podem, de fato, serem benéficas. Chadha e Bhandari (2014) Ilustram um caso de estudo de compatibilidade envolvendo o fármaco Niclosamida e os excipientes. Nesse estudo as descobertas provenientes da DSC indicaram uma interação significativa entre os elementos, levando à completa ausência do pico relacionado ao fármaco na curva da mistura. Contudo, essa interação conduziu a um aumento notável na solubilidade e na taxa de dissolução da niclosamida. Assim como no estudo citado, no presente trabalho as curvas térmicas do AM desapareceram nas misturas ternárias ou totais, indicando uma dispersão do AM e até mesmo uma maior proteção térmica, elevando seu ponto de fusão e temperatura de degradação (Matos, 2017). Para confirmar esses resultados, outros métodos de análise de compatibilidade foram utilizados.

#### 5.1.3.2 Termogravimetria

Neste tópico, análises TG/DTG foram aplicadas com o objetivo de avaliar os eventos térmicos relacionados à perda de massa (%) em função do aumento da temperatura do sistema.

Foi analisada a curva TG dos compostos isolados em comparação com as misturas ternárias e a mistura total. A fim de eliminar a possibilidade de interpretações equivocadas ocasionadas por sobreposição de bandas ou instabilidades no sistema (antecipando ou adiando o início da decomposição), foi aplicada também a termografia derivada (DTG). A DTG é uma abordagem paralela que envolve a obtenção da primeira derivada da curva de TG, resultando em picos cujas áreas são proporcionais às perdas de massa. O termograma resultante é um gráfico que representa os picos de perda de massa da amostra, dispostos em formato descendente, em relação ao tempo e/ou temperatura onde é melhor evidenciado as perdas de massa, que podem não ser vistas na TG, através da presença de cada inflexão da curva. Isso é combinado com os dados da curva de TG original, permite uma análise mais precisa dos eventos térmicos da análise. A Figura 13, traz as curvas TG das amostras, sendo a figura 13A o resultado das substâncias isoladas e a figura 13B das misturas ternárias e total (mistura física entre todos os componentes da formulação).

Figura 13 – (A) Curvas TG das substâncias isoladas e (B) misturas ternárias com o fármaco e mistura total

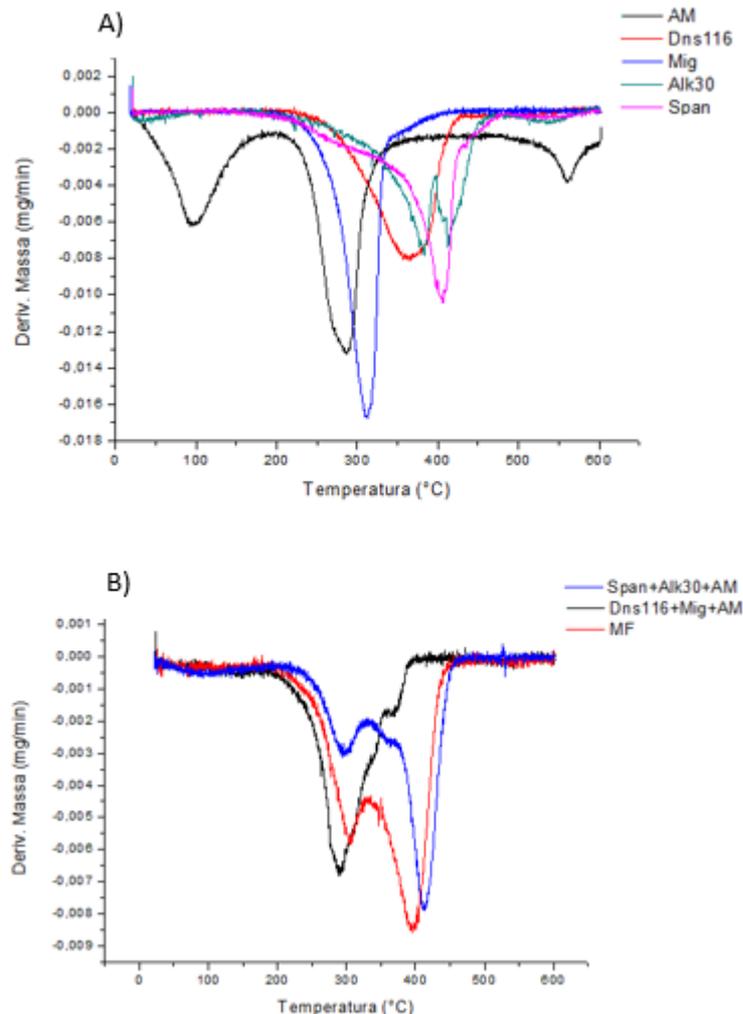


Legenda: AM = Antimoniato de meglumina; Dns116= Dynasan®116; Miglyol = Miglyol®812; Alk30=Alkest® CSO 300; Span = Span®80; MF = mistura composta por todas as substâncias avaliadas no estudo.

Fonte: Autoria própria.

Todas as misturas foram preparadas na proporção 1:1 (m/m), visando maximizar as possíveis interações (Chadha; Bhandari, 2014, p. 82). A curvas de DTG obtidas a partir do TG estão apresentadas na figura 14.

Figura 14 – (A) Curvas DTG das substâncias isoladas e (B) misturas ternárias e mistura total avaliadas no ensaio de compatibilidade



Legenda: AM= Antimoniato de meglumina; Dns116= Dynasan®116; Miglyol=Miglyol®812; Alk30=Alkest® CSO 300; Span = Span®80; MF= mistura total de todos os compostos avaliados no estudo.

Fonte: Autoria própria.

A curva de análise termogravimétrica (TG) do AM apresenta três eventos térmicos distintos. O primeiro ocorre na faixa de temperatura entre 65,9 °C e 130,8 °C, com uma perda de aproximadamente 15,3% da massa, atribuída à perda da água de solvatação. O segundo evento ocorre entre 254,9 °C e 305,6 °C, com uma perda de cerca de 28,43% da massa, sendo relacionado ao início do processo de decomposição. O terceiro evento é observado entre 553

°C e 599 °C, com uma perda de cerca de 14% da massa, associada à continuação do evento de decomposição e à perda de matéria orgânica. É importante ressaltar que, devido à faixa de temperatura avaliada, não foi observada a completa decomposição da amostra. Esses resultados estão em concordância com os achados de estudos anteriores (Ferreira, 2010; Silva, 2016). A curva do Dynasan®116 apresenta apenas um evento endotérmico em uma faixa de temperatura de 247,9°C à 420,74°C, com perda de 90,37% de massa, indicando a decomposição quase completa da amostra (>90%). O Miglyol®812 apresentou apenas um evento térmico de decomposição (perda de 94,5%) na faixa de 292-329°C, confirmando os eventos exotérmicos dos gráficos da DSC. A curva TG/DTG do Span®80 puro sugere um perfil de degradação com um evento térmico expressivo compreendido na faixa de 366-422°C, responsável pela decomposição de 85,66% da amostra. O Alkest® CSO 300 exibiu três eventos térmicos relacionados à sua decomposição, apresentando uma perda de massa consecutiva de 50,29% (faixa de 344,02 e 388,74 °C), 26,96% (faixa de 404,19 e 432,88 °C) e 2,67% (faixa de 513,40 – 547,96 °C). Nenhuma das duas substâncias surfactantes demonstrou uma decomposição completa de suas massas.

Na mistura ternária composta pelos lipídeos e o fármaco, observa-se o aparecimento de um único evento térmico, correspondendo a uma perda de 64,02% e ocorre na faixa de 178,33-390,43°C. O início da termodecomposição se encontra próximo ao do Miglyol®812 e AM e seu final compreende a temperatura de decomposição do Dynasan®116. É importante destacar que a porcentagem de massa perdida na mistura ternária (lipídeos/fármaco) foi superior apenas à massa perdida pelo fármaco isolado (57,73%). Ao analisar os gráficos da mistura ternária de fármaco e tensoativos, é evidenciada uma decomposição em duas fases distintas. A primeira etapa ocorre no intervalo de 269,36 a 313,13 °C, resultando em uma perda de massa de 18,89%. A segunda etapa ocorre entre 390,58 e 433,14 °C, com uma perda de massa de 48,86%. É importante notar que, assim como nos componentes individuais, a mistura não apresentou uma decomposição completa.

Quanto à mistura total, as curvas TG mostraram um comportamento que se assemelha à soma das curvas das misturas ternárias (fármaco/lipídeos e fármaco/tensoativos), com o desaparecimento do primeiro evento de decomposição (65,9 °C e 130,8 °C) e do último evento de decomposição (553 °C e 599 °C) do AM, essa observação pode ser atribuída a uma possível interação mais eficaz entre o fármaco e todos os componentes quando estão combinados. É possível notar que a temperatura necessária para o primeiro evento de decomposição na mistura total se assemelha à temperatura de início de decomposição do Miglyol e AM bem como o

último evento de decomposição da mistura (referente ao lipídeo sólido) aparece de forma tardia com início em 351°C em comparação com o Dynasan®116 isoladamente que inicia em 247,9°C. Além disso, a mistura total apresentou decomposição de 71,5% , que é superior ao AM sozinho (57,73%) e à mistura AM e tensoativos (67,7%), porém inferior a decomposição do lipídeo sólido isolado (90,37%).

Todas as temperaturas de decomposição das misturas avaliadas ocorrem acima de 150°C. Considerando que as formulações não serão expostas a essa temperatura em nenhuma fase do seu processo de obtenção ou armazenamento, é possível propor que os excipientes e lipídeos definidos para compor o CLN neste estudo possuem boa estabilidade térmica em conformidade com o fármaco. Ademais, não houveram alterações indicativas de incompatibilidade entre os compostos analisados, sendo o gráfico das misturas a soma dos comportamentos térmicos de suas substâncias isoladas Os dados referentes aos eventos de térmicos de cada ensaio realizado podem ser conferidos na tabela 6.

Tabela 6 - Propriedades térmicas das substâncias isoladas e das misturas físicas ternárias e total avaliadas por TG/DTG

AMOSTRA	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Total de Perda (%)
	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	Perda (%)	Temp (°C)	
Dns116	90,37	247-418	-	-	-	-	90,37
AM	15,29	65,90 - 130,80	28,44	254,96- 305,65	14,01	547,73- 575,38	57,74
Miglyol	94,57	292,21 - 329,80	-	-	-	-	94,57
Span	85,66	366,83 - 422,27	-	-	-	-	85,66
Alk30	50,29	344,02 - 388,74	26,96	404,19- 432,88	2,67	513,40 - 547,96	79,92
Dns116+Mig+AM	64,02	178,33- 390,43	-	-	-	-	64,02
Span+Alk30+AM	18,89	269,36 - 313,13	48,86	390,58- 433,14	-	-	67,75
MF	25,77	247,52- 323,87	49,71	341,67- 441,55	-	-	75,48

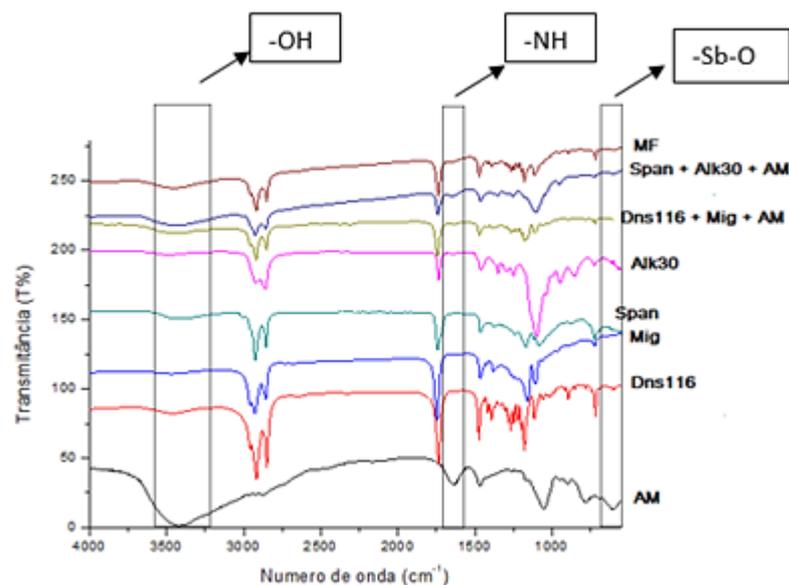
Legenda: Dns116 = Dynasan®116; AM= Antimoniato de meglumina; Span = Span®80; Alk30 = Alkest® CSO 300; Mig=Miglyol; MF=mistura de todas as substâncias analisadas no estudo.

Fonte: Autoria própria.

### 5.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A FTIR possibilita a avaliação de potenciais interações químicas entre os compostos, as quais podem resultar em modificações na composição manifestadas por notáveis mudanças na forma e posição das bandas nos espectros (Beganskienė, *et al.*, 2004, p. 287; Chadha e Bhandari, 2014, p. 82). A técnica de FTIR utilizada para obter os espectros já foi descrita anteriormente nos métodos. Na Figura 15, estão apresentados os espectros das amostras individuais, bem como das misturas ternárias e total.

Figura 15 - Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total



Legenda: AM= Antimoniato de meglumina; MF =mistura total com todos os componentes analisados; Span = Span®80; Alk30=Alkest®CSO 30; Mig =Miglyol®812; Dns116= Dynasan®116.

Fonte: Autoria própria.

O Miglyol®812 e o Dynasan®116 apresentaram picos e bandas característicos de lipídeos, como picos fortes em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  referentes às vibrações do estiramento dos grupos  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$ . Apresentaram também picos em  $1740\text{ cm}^{-1}$  do estiramento de  $\text{C}=\text{O}$  das carbonilas (características de ésteres), em  $1465\text{ cm}^{-1}$  e  $1380\text{ cm}^{-1}$  dos dobramentos de  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  (características de alcanos), em  $1172\text{ cm}^{-1}$  e  $1110\text{ cm}^{-1}$  do estiramento assimétrico de  $\text{C}-\text{O}$  (característico de ésteres), um pico pequeno em  $1060\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento  $\text{C}-\text{O}$  de álcool secundário, e em  $721\text{ cm}^{-1}$  de dobramento dos grupos  $\text{CH}_2$  de cadeias longas. Ademais, o Dynasan®116 apresentou também picos justapostos entre  $1215$  e  $1288\text{ cm}^{-1}$  do estiramento assimétrico  $\text{C}-\text{O}$  (característico em triglicerídeos). Os tensoativos apresentaram espectros com

picos semelhantes aos dos lipídeos já detalhados, justificado pelo fato de são derivados de lipídeos. O Span<sup>®</sup>80 particularmente também que possui uma banda de baixa intensidade  $3400\text{ cm}^{-1}$  relacionada aos estiramentos dos grupos -OH (presentes nos monoglicerídeos) e um pico em  $1080\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O (álcool secundário). O Alkest<sup>®</sup> CSO 300, além dos espectros já citados nos lipídeos, apresenta um pico de forte intensidade em  $1090\text{ cm}^{-1}$  característico do estiramento C-O-C (característico de éter alifático), presente em sua molécula devido à etoxilação, sobreposto C-O de álcoois secundários e ésteres presentes na estrutura química. Estes resultados estão de acordo com os disponíveis na literatura (Ibrahim, Alomrani e Yassin, 2014, p. 129; Arshad *et al.*, 2019, p. 2879; Souza, 2020; NIST, 2023).

Sobre o espectro vibracional apresentado pelo AM isolado, as principais bandas se encontram em uma frequência de  $3410\text{ cm}^{-1}$  (vibrações de estiramento dos grupos -OH e -NH),  $2800\text{ cm}^{-1}$  (referente aos estiramentos -CH),  $1641\text{ cm}^{-1}$  (dobramento intraplano -NH),  $1465\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular no plano dos grupos C-O),  $1060\text{ cm}^{-1}$  (estiramento dos grupos C-N e C-O). A ligação do átomo de antimônio é discernível na banda a  $601\text{ cm}^{-1}$  (estiramento Sb-O) (Demicheli *et al.*, 1999, p. 63; Souza, 2020). Nas misturas ternárias com os lipídeos, apenas picos de muito baixa intensidade relacionado ao fármaco foram identificados, sendo o  $1641\text{ cm}^{-1}$  referente ao -NH das amins secundárias e ausência em  $601\text{ cm}^{-1}$  do Sb-O. Na análise da mistura ternária contendo os tensoativos, a presença do AM foi confirmada através da detecção dos picos a  $1641\text{ cm}^{-1}$  (-NH) e  $601\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento Sb-O. Além disso, uma banda mais intensa a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , relacionada ao estiramento do grupo -OH.

Na mistura total, apenas uma banda fraca em  $3400\text{ cm}^{-1}$  e o sinal fraco em  $1641\text{ cm}^{-1}$  foram identificados. A diminuição da intensidade dos picos do IFA ou ausência deles no espectro pode ser justificada pela proporção diminuída do AM nas misturas ou por uma dispersão mais facilitada do fármaco nas misturas. Em todas as análises das misturas ternárias e total não foram identificadas mudanças abruptas nas posições das bandas de absorção, tampouco surgiram picos em novas regiões do espectro. Com base nesses resultados de compatibilidade, pode-se concluir que as interações observadas nas análises térmicas não foram resultado de reações químicas perceptíveis na espectroscopia FTIR. Esses resultados sugerem que as alterações observadas nas análises térmicas anteriores podem ser oriundas de alterações físico-químicas nas misturas, com indícios de solubilização (Chadha e Bhandari, 2014, p. 82).

## 5.2 Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados

O planejamento qualitativo e quantitativo se refere a uma abordagem metodológica que combina aspectos qualitativos e quantitativos na análise e caracterização dos CLN. O planejamento qualitativo envolve a observação, descrição e interpretação de fenômenos, características e comportamentos dos CLN sem a aplicação de um método estatístico. A avaliação qualitativa envolve a identificação de propriedades visuais macroscópicas ou microscópicas observáveis, onde são variados os componentes da formulação. O planejamento quantitativo, por outro lado, envolve a avaliação das propriedades físico-químicas dos CLN usando métodos instrumentais e técnicas de análise mais precisas. No presente trabalho as informações quantitativas que foram consideradas são o PDI, PZ, Diâmetro médio das nanopartículas e EE% (Soltani *et al.*, 1999, p. 7303; Miranda *et al.*, 2006, p. 1013; García e Palencia, 2021, p. 148524). Os parâmetros selecionados como variáveis foram a quantidade total de lipídeos na formulação, a proporção de lipídeos sólido e líquido, o tempo e a potência de sonicação. A escolha de tais fatores foi realizada com base em estudos disponíveis na literatura que relatam a influência dessas variáveis nos parâmetros críticos da qualidade das formulações, tais como PDI, PZ, diâmetro médio e EE (Silva *et al.*, 2011, p. 158; Zheng *et al.*, 2013, p. 76; Apostolou *et al.*, 2021, p. 2859). A escolha da faixa de variação de lipídeos, tempo de sonicação e potência do aparelho foi definida com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Costa, 2019; Souza, 2022). Com base nos resultados de Costa (2019) e Souza (2022), para obter os melhores resultados as faixas definidas para o ensaio foram de 7 e 10% para porcentagem de lipídeos totais, 65/35 e 85/15 para proporção de lipídeo sólido/líquido, 50 e 70% de amplitude para a potência do equipamento de ultrassom e tempo de sonicação de 5 e 10 minutos. É importante enfatizar que a proporção entre o tensoativos hidrofílico/lipofílico foi definida anteriormente, em estudos prévios de EHL realizados neste trabalho. E os CLN foram preparados de acordo com metodologia descrita previamente. A tabela 7 expõe os resultados obtidos em função das variáveis.

Tabela 7 - Matriz do planejamento quali-quantitativo realizado no estudo de pré-formulação.

Amostra	Lip (%)	Sol/liq	Tempo (min)	Potência (A %)	Diam (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)
F1	7	65	5	70	35,96 ± 0,058	0,162 ± 0,006	-14,5 ± 0,60	78,007
F2	7	65	10	70	35,72 ± 0,025	0,179 ± 0,009	-12,4 ± 2,03	77,478
F3	7	85	10	50	31,38 ± 0,114	0,260 ± 0,003	-10,4 ± 1,60	84,498

<b>F4</b>	7	65	10	50	34,49 ± 0,165	0,320 ± 0,032	-20,4 ± 0,55	77,788
<b>F5</b>	7	85	5	70	34,66 ± 0,438	0,300 ±0,004	-19,2 ± 1,62	59,000
<b>F6</b>	7	85	10	70	58,17 ± 0,275	0,488 ± 0,020	-24,0 ± 0,72	77,901
<b>F7</b>	7	65	5	50	34,59 ± 0,319	0,267 ± 0,004	-17,7 ± 0,70	80,507
<b>F8</b>	7	85	5	50	38,05 ± 0,553	0,221 ± 0,01	-22,6 ± 2,27	79,107
<b>F9</b>	10	85	10	50	58,47 ± 0,049	0,244 ± 0,008	-11,3 ± 0,57	77,863
<b>F10</b>	10	65	5	50	49,73 ± 0,419	0,241 ± 0,004	-14,1 ± 0,56	79,472
<b>F11</b>	10	85	10	70	54,39 ± 0,248	0,284 ± 0,002	-13,9 ± 0,53	80,217
<b>F12</b>	10	65	5	70	49,41 ± 0,225	0,270 ± 0,006	-18,1 ± 0,94	80,919
<b>F13</b>	10	85	5	70	54,23 ± 0,342	0,297 ± 0,006	-11,8 ± 0,65	81,827
<b>F14</b>	10	85	5	50	53,27 ± 0,474	0,284 ± 0,009	-12,4 ± 0,52	87,080
<b>F15</b>	10	65	10	50	49,53 ± 0,424	0,258 ± 0,004	-18,1 ± 0,87	88,528
<b>F16</b>	10	65	10	70	29,00 ± 0,193	0,251 ± 0,007	-6,76 ± 0,25	94,333

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

Fonte: Autoria própria.

Avaliando os resultados apresentados na tabela 7, foi possível obter CLN com diâmetro médio variando de 29 à 58 nm, PdI entre 0,162 e 0,448 e potencial zeta entre -6,76 e -24 mV. As formulações foram obtidas em estado líquido, exibindo um aspecto que variou entre translúcido e leitoso, o que está em concordância com os tamanhos observados. Além disso, também foi notado um reflexo azulado, característico das nanopartículas (Bechtold, 2011).

Informações disponíveis na literatura indicam que, para garantir uma penetração eficaz na pele por meio de aplicação tópica, o tamanho das partículas não deve ultrapassar 100 nm, devido às propriedades da camada córnea e sua limitada permeabilidade (Baroli, 2010, p. 485). Por outro lado, nanopartículas ideais para uso oral devem possuir tamanhos inferiores à 300nm, haja vista que esse tamanho promove a permeabilidade intestinal e absorção sistêmica (Banerjee *et al.*, 2016, p. 1; Li *et al.*, 2017, p. 122; Thuy *et al.*, 2022, p. 100064; Palaria *et al.*, 2023, p. 23). Em todas as formulações obtidas através do planejamento quali-quantitativo o tamanho de partícula (<100 nm) se mostrou promissor, seja para administração tópica ou oral. Somado a isso, nanopartículas de natureza lipídica frequentemente apresentam excelentes propriedades oclusivas quando aplicadas em quantidades adequadas sobre a área afetada. Elas desenvolvem

um filme lipídico que demonstra uma notável capacidade de hidratação da camada dérmica, resultando na redução da perda de água (Muller, Radtke e Wissing, 2002, p. 131). No que diz respeito ao Pdl, é recomendado que ele seja mantido abaixo de 0,300. Isso assegura uma distribuição de tamanhos mais estreita, indicando uma amostra com menor dispersão, o que resulta em uma homogeneidade mais proeminente nos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos e farmacológicos. A respeito do PZ, valores em módulo iguais ou maiores que 30 mV são considerados ideais, indicando estabilidade eletrostática que juntamente com a estabilidade estérica fornecida pelos tensoativos não iônicos promovem melhora na estabilidade da formulação (Schaffazick; Guterres, 2003; Kiss *et al.*, 2019, p. 679; Andrade *et al.*, 2020).

No que diz respeito à eficácia de encapsulamento, fármacos hidrofílicos, como o antimoniato de meglumina, também podem apresentar valores elevados em CLN (Poonia *et al.*, 2016). Levanto em consideração os valores de Pdl, PZ, diâmetro e EE a formulação mais promissora e escolhida para seguir com as análises de caracterização desse trabalho foi a amostra F16, que apresentou o menor diâmetro (29 nm) e melhor eficiência de encapsulação (>94%), bem como foi a formulação que apresentou a maior quantidade de fármaco. Embora o PZ da formulação F16 não esteja dentro do valor de melhor estabilidade (>20mV), o tensoativo Alkest® CSO 300, utilizado nos CLN deste estudo, é um tensoativo polietoxilado, o que confere estabilidade estérica às nanopartículas e auxilia em casos de baixa estabilidade eletrostática (PZ < 20mV) (Schaffazick e Guterres, 2003, p. 726; Kiss *et al.*, 2019, p. 679; Andrade *et al.*, 2020, p. 101784). Além disso, estudos posteriores empregando o método de liofilização poderão ser conduzidos avaliando o efeito de estabilização promovido pelos crioprotectores para a veiculação das nanopartículas em formas farmacêuticas semissólidas e sólidas. A literatura aponta que o PZ de uma nanopartícula pode ser aumentado pelo tipo e concentração do crioprotetor empregado no processo de liofilização (Ball, 2017, p. 305; Lima, 2019).

### **5.3 Obtenção e caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados**

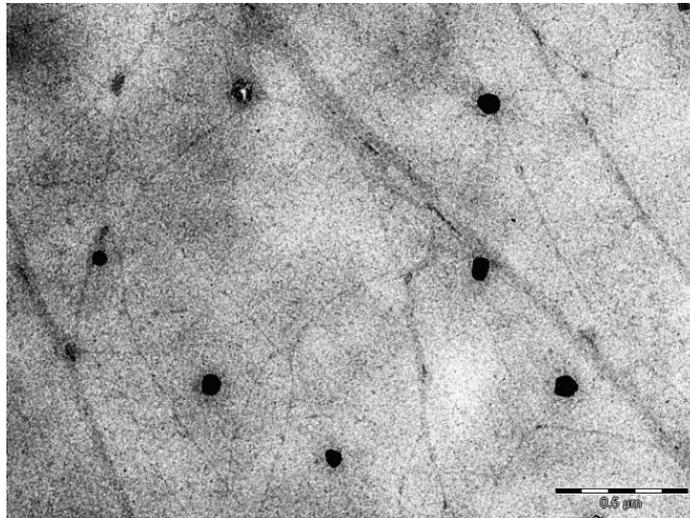
A formulação mais promissora escolhida através do planejamento quali-quantitativo foi eleita para dar seguimentos aos ensaios de caracterização discutidos nesse tópico. Foram desenvolvidos os CLN com e sem o fármaco, de agora em diante denominados CLN16 (Pdl = 0,251 e PZ = -6,76 mV) e CLNBr (Pdl = 0,224 e PZ = -12,6 mV) respectivamente. Os carreadores foram obtidos por ultrasonicação à quente pelo método de emulsão múltipla já descrito anteriormente neste trabalho. Com base nos resultados no planejamento quali-

quantitativo foram definidos parâmetros de 10 minutos de sonicação e uma potência de 70% de amplitude, utilizando 10% de lipídeo, na proporção 65% Dynasan®116 e 35% Miglyol®812, e 10% de tensoativo na proporção 40% Span®80 e 60% Alkest® CSO 300, para o CLN16 e CLNBr. Para o CLN16 a solução contendo o fármaco correspondeu a 29% da fase lipídica e a concentração utilizada foi de 23 mg/mL.

### 5.3.1 *Microscopia eletrônica de transmissão*

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 CLN16 pode ser observado na figura 16.

Figura 16 - Microfotografias obtidas por MET do CLN16

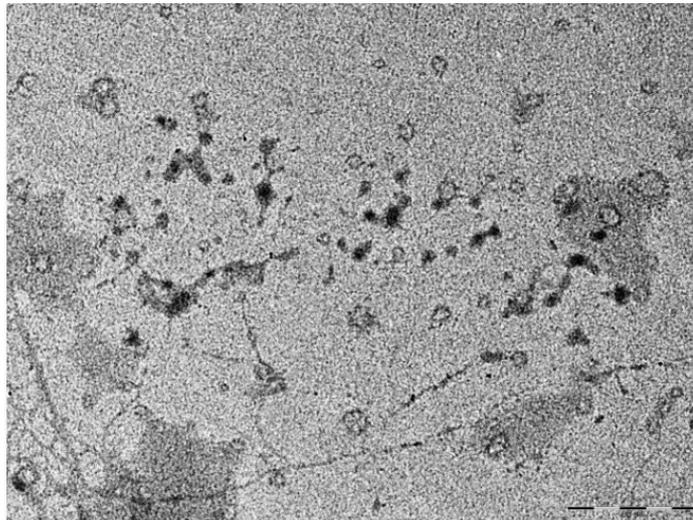


Fonte: dados da pesquisa.

Na análise do CLN16, foi possível observar que a maioria das partículas apresentavam uma morfologia esférica, sugerindo uma alta eficiência no processo de emulsificação e formação dos nanocarreadores. Para o CLN16, as imagens de MET exibiram partículas com tamanhos inferiores à 100 nm, confirmando os resultados obtidos pelo DLS desta mesma formulação (diâmetro < 30 nm). O MET do CLN16 mostra partículas mais escuras em comparação com o MET do CLNBr, isso pode ser atribuído ao fármaco, que possui um metal na molécula e pode gerar maior contraste na microscopia.

A figura 17 mostra os CLN sem o fármaco, com a mesma composição da formulação selecionada, a fim de permitir a comparação das estruturas.

Figura 17 - Microfotografias obtidas por MET do CLNBr



Fonte: dados da pesquisa.

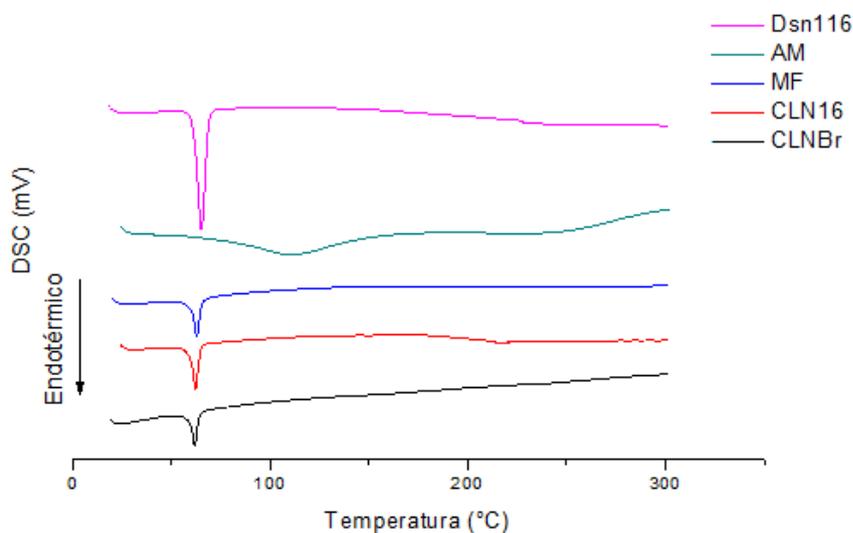
Conforme pode ser observado, os CLN sem fármaco também possuíram tamanhos inferiores à 100 nm, entretanto, sua morfologia se apresentou menos esférica e algumas partículas exibiram tamanhos ligeiramente maiores, o que pode indicar a presença de aglomerados ou uma variação na técnica de produção.

Em suma, 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, visando uma aplicação clínica eficaz e segura.

### 5.3.2 Calorimetria exploratória diferencial dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Foram conduzidas análises utilizando DSC para avaliar comportamento térmico dos nanocarreadores, bem como compará-los com as substâncias isoladas. Essas avaliações têm o propósito de examinar a cristalinidade da matriz lipídica nos CLN bem como o comportamento térmico do fármaco após encapsulado. Tais estudos são essenciais, uma vez que o comportamento térmico e a cristalinidade desempenham um papel crucial na previsão da estabilidade física de longo prazo das nanopartículas e na capacidade de manter o fármaco encapsulado. Os gráficos estão apresentados na Figura 18 e o valores obtidos pela DSC estão expressos na tabela 8.

Figura 18 - Gráficos DSC do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dyn116) isolados, da mistura física total (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN16) e sem o fármaco (CLNBr)



Fonte: Autoria própria.

Tabela 8- Propriedades térmicas das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total avaliadas por DSC.

Amostra	$P_{Fusão}(^{\circ}C)$	Onset ( $^{\circ}C$ )	Endset ( $^{\circ}C$ )	Entalpia ( $\Delta H/Jg^{-1}$ )
CLNBr	61,82	59,34	63,73	-61,63
CLN16	62,16	59,54	64,40	-68,34
AM	110,80	74,95	145,55	-212,51
MF	62,73	60,49	65,18	-49,07
Dsn116	65,02	61,36	68,46	-188,24

Legenda: CLNBr = nanopartícula sem o fármaco; CLN16 = nanopartícula com o fármaco; Dsn116= Dynasan®116; AM= Antimoniato de meglumina; MF= mistura física total.

Fonte: autoria própria.

É possível observar que o evento de fusão do fármaco ( $\pm 110^{\circ}\text{C}$ ) não aparece no CLN16, indicando sua solubilização nos excipientes e incorporação da solução do fármaco na matriz lipídica (Liu *et al.*, 2014, p. 223; Navaei *et al.*, 2014, p. 701; Horoiwa *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2021, p. 102813). Com relação ao Dynasan®116 é possível perceber um deslocamento de seu pico de fusão de  $65,02^{\circ}\text{C}$  para  $\pm 62^{\circ}\text{C}$  no CLN16. No CLN branco, o pico de fusão reduz ainda mais chegando à  $61,82^{\circ}\text{C}$  em comparação com CLN16 que apresenta pico de fusão de  $62,16^{\circ}\text{C}$ , confirmando a presença do fármaco, que por ser uma substância a mais na composição, eleva a faixa e o pico de fusão.

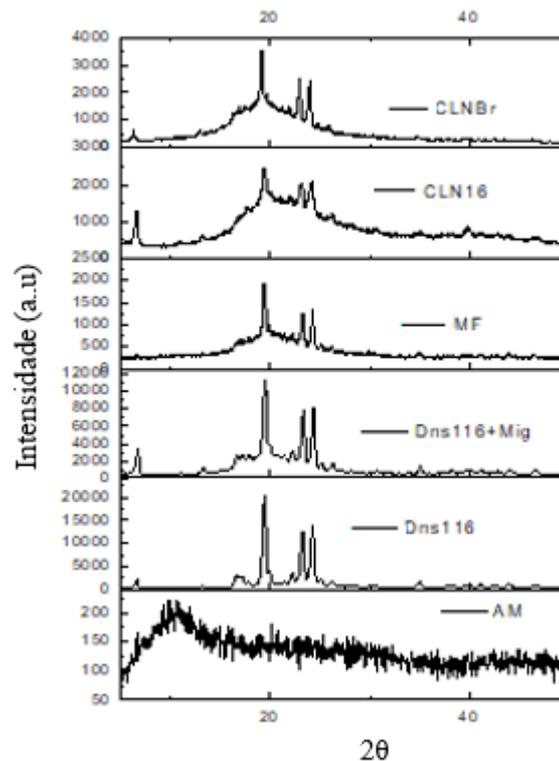
Entre as amostras analisadas em comparação com o lipídeo sólido isolado, tanto o CLNBr quanto o CLN16 apresentaram reduções consideráveis de  $-188,24$  para  $-61,63$  e  $-68,34^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. As diminuições de fusão com relação ao lipídeo sólido puro são justificáveis com base na estruturação do CLN contendo lipídeo líquido que resulta em uma matriz menos cristalina (Liu *et al.*, 2017, p. 2032). Além disso, a adição da solução contendo o fármaco ou de água nos CLN também favorece a diminuição da cristalinidade. Ademais, componentes como surfactantes, que são incorporados na fase lipídica em estado líquido causam alterações na estrutura cristalina, levando a uma diminuição na entalpia de fusão (Başaran *et al.*, 2010, p. 37).

Com o intuito de obter conclusões mais precisas sobre a diminuição da cristalinidade do lipídeo durante o processo de formação das nanopartículas, utilizou-se o resultado da DSC para calcular o Índice de cristalização. A Equação de índice de cristalização, descrita nos procedimentos, foi empregada para esse cálculo. O resultado mostrou um IC de  $55,8\%$  para o CLN16, indicando que aproximadamente  $55\%$  por cento da matriz lipídica voltou para sua conformação mais estável (cristalinizada). Um IC% baixo indica uma cristalização menor que, como já mencionado, é um parâmetro desejável para a obtenção de nanocarreadores mais estável e com maior tempo de retenção do fármaco em sua matriz (Pathak, Keshri e Shah, 2011, p. 357). Entretanto, um IC% muito baixo não é ideal, haja vista que deixa os CLN susceptíveis a processos de instabilidade e pode reduzir a eficiência de encapsulamento (Madureira *et al.*, 2015, p. 22665; Teeranachaideekul, Chantaburanan e Junyaprasert, 2017, p. 300; Nelis *et al.*, 2019, p. 196). Dessa forma, os resultados de IC% do nanocarreador obtido informam que a incorporação do lipídeo líquido foi eficaz para a redução da cristalinidade e favoreceu o encapsulamento do fármaco, com base no resultado de EE obtido para o CLN16 ( $>90\%$ ).

### 5.3.3 Difractometria de raios-X

A análise por DRX foi conduzida com o propósito de examinar a estrutura das substâncias quando isoladas, as mudanças estruturais quando em combinação e quando incorporadas no nanocarreador, além de corroborar os resultados adquiridos por meio da DSC. O gráfico resultante da análise por DRX pode ser conferido na figura 19.

Figura 19 - Difratomogramas do fármaco (AM) e lipídeo sólido (Dns116) isolados, da mistura física de todos os componentes (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN16) e sem o fármaco (CLNBr)



Fonte: Autoria própria.

O padrão DRX do AM confirma sua morfologia amorfa e geometria estrutural indefinida, favorável para sua maior incorporação nas matrizes lipídicas devido à menor necessidade de gasto energético para incorporação (Frézard, Demicheli e Ribeiro, 2009, p. 2317; Prado e Rocha, 2015, p. 2080; Silva, 2016). O Dynasan®116 exibiu picos intensos em ângulos  $2\theta$  aproximados de 19,52, 23,19, 24,27, indicando natureza cristalina. Esses picos estão relacionados às formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\beta/\beta'$  respectivamente (Liu *et al.*, 2017, p. ; Severino *et al.*, 2012; Kupetz; Bunjes, 2014; Krishnam; Sudhakar; Murthy, 2014; Kipriye; Şenel; Yenilmez, 2017). De modo geral, lipídeos de cadeia longa, como o Dynasan, têm uma tendência a cristalizar em duas ou três fases distintas:  $\alpha$  e  $\beta'$  ou  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\beta/\beta'$ . A conformação  $\beta$  é a mais

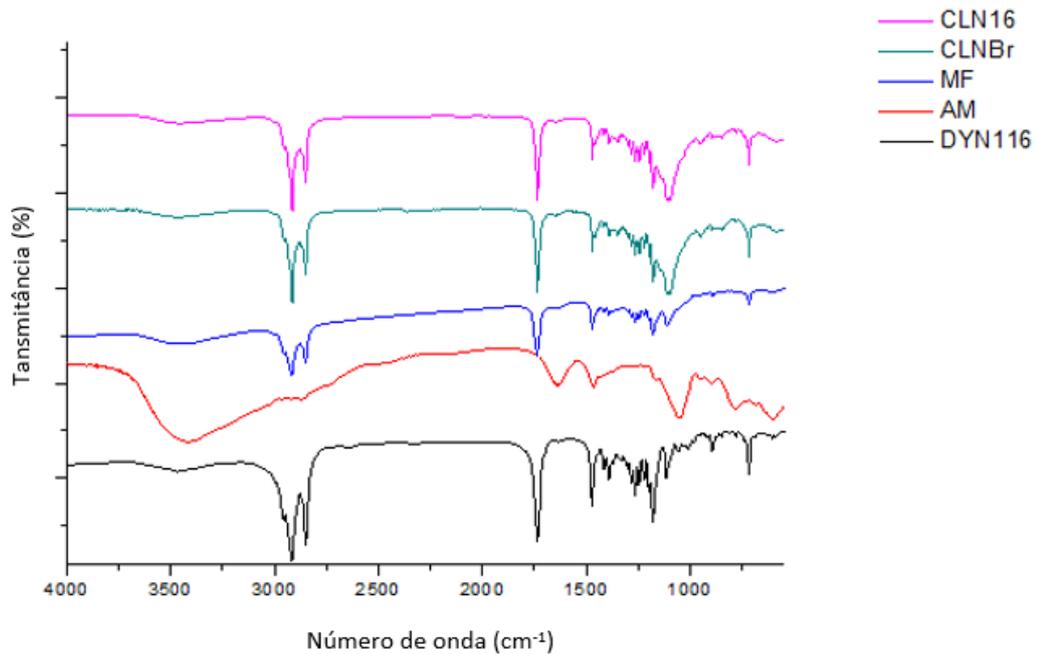
estável e de maior ponto de fusão, sendo também a mais cristalina, enquanto as conformações  $\alpha$  e  $\beta'$  são mais instáveis, possuindo menor ponto de fusão e contribuindo para arranjos menos cristalinos (Severino *et al.*, 2012; Nelis *et al.*, 2019).

Na mistura física, já se observou um grau de amorfização, devido à presença de um halo amorfo originado dos outros componentes da mistura (AM, tensoativos e lipídeo líquido). Esse halo sobrepõe os picos menores da região mais cristalina ( $\beta$ ) e reduz os picos mais proeminentes, característicos de substâncias cristalinas como o lipídeo sólido. Os CLNs apresentaram difratogramas semelhantes, com um grande halo amorfo e com uma sobreposição maior dos picos diminuição da intensidade destes em relação à mistura física. A presença dos picos cristalinos nos CLN (com e sem fármaco), mesmo que com menos intensidade, confirmam o resultado de IR obtido pelo DSC, que demonstrou um grau de recristalização da matriz lipídica considerável (55,8%). Também é possível notar que o CLN16 apresentou uma sobreposição pelo halo amorfo superior ao CLNBr, o que é justificável pela presença do fármaco e sua característica mais amorfa que contribui para a apresentação de formas polimórficas  $\alpha$  e  $\beta'$  (menos estáveis), indicando redução de picos bem definidos no DRX (Liu *et al.*, 2017, p. 2032). Por fim, esses resultados corroboram as descobertas apresentadas na DSC, que indicaram uma redução na cristalinidade tanto da mistura física quanto CLN, evidenciada pela diminuição nos picos de fusão, temperaturas e entalpias. Essa observação, acompanhada pela ausência dos picos no DRX, confirma um aumento na amorfização dos nanocarreadores. Portanto, foi possível obter uma matriz mais desordenada, o que facilita a incorporação de uma quantidade maior de medicamento (AM), potencialmente diminuindo a sua expulsão durante o armazenamento e permitindo a modulação da sua liberação.

#### ***5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier***

Para confirmar a incorporação do fármaco na estrutura dos CLN, bem como para avaliar possíveis interações e a estabilidade físico-química, foi conduzido um ensaio de FTIR. Os gráficos correspondentes a esses resultados estão ilustrados na Figura 20.

Figura 20 - Espectro de infravermelho do fármaco (AM) e lipídeo sólido (DYN116) isolados, da mistura física total (MF) e dos carreadores obtidos com (CLN16) e sem o fármaco (CLNBr)



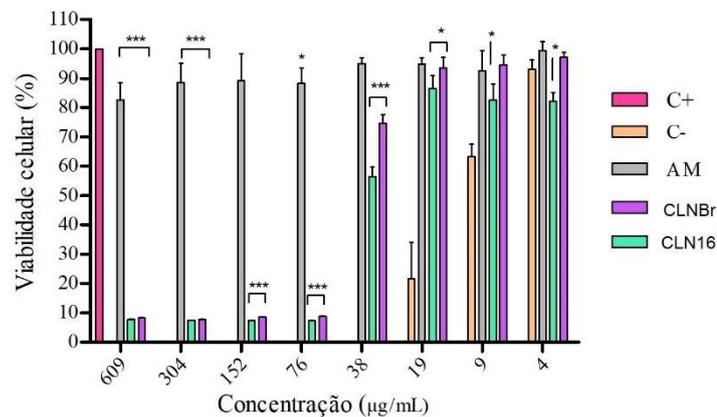
Fonte: Autoria própria.

O CLNBr e CLN16 apresentaram espectros similares ao da mistura física, com sutis diferenças. Primeiramente, a banda em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento do grupo  $\text{-OH}$ , se apresentou mais proeminente nos na mistura física, haja vista proporção do fármaco é maior (1:1). Nos CLN a quantidade de fármaco é inferior em relação aos excipientes, bem como o mesmo se encontra encapsulado. Além disso, na MF é possível visualizar o pico do Sb-O em  $600$ , este que não aparece nos CLN. Em todos foram mantidos os picos característico do lipídeo, conforme discutido no tópico 5.1.3.3. A semelhança entre os espectros do CLNBr e CLN16 pode ser atribuída à alta taxa de eficiência de encapsulação (EE) do CLN16 ( $> 94\%$ ), que ocasionou o desaparecimento ou diminuição dos picos característicos do AM reafirmam o resultado da EE% discutidos previamente e sugere a boa incorporação do fármaco na matriz lipídica (Demicheli *et al*, 1999, p. 63; Khezri *et al.*, 2020, p. 841; Saedi *et al.*, 2021, p. 102813). Por fim, os resultados de FTIR em questão demonstram a obtenção de um nanocarreador com características físico-químicas ideais e boa incorporação do fármaco.

#### 5.4 Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida *in vitro* dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Um ensaio de citotoxicidade por meio de cultura celular foi realizado, com o objetivo de avaliar as concentrações tóxicas do AM frente aos macrófagos RAW 264.7 bem como comparar com as avaliações feitas com o CLN16 e o CLNBr. As concentrações avaliadas dos CLN foram entre 4,76  $\mu\text{g/mL}$  e 696  $\mu\text{g/mL}$ . De acordo com os resultados expressos na Figura 21, a viabilidade dos macrófagos, quando expostos ao AM, sofreu alterações significativas em comparação ao controle positivo nas concentrações mais elevadas, embora não seja considerado citotóxico, visto que os níveis de viabilidade permaneceram superiores a 82%. Os CLN apresentaram toxicidade acima da concentração de 38  $\mu\text{g/mL}$ , onde o CLNBr apresentou 74,5% de viabilidade celular, enquanto o CLN16 apresentou 56,5% de viabilidade nessa concentração. As variações na citotoxicidade dos compostos nas diferentes concentrações examinadas estão apresentadas na Tabela 9.

Figura 21 – Citotoxicidade *in vitro* do fármaco e dos nanocarreadores frente aos macrófagos RAW 264.7.



Legenda: CLN16= nanocarreador com AM; AM = antimoniato de meglumina; CLNBr = nanocarreador sem AM.

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 9 - Citotoxicidade e atividade leishmanicida das amostras frente as cepas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

AMOSTRA	IC <sub>50</sub> sobre Promastigotas (µg/mL)		IC <sub>50</sub> sobre Amastigotas (µg/mL)		CC <sub>50</sub> sobre Macrófagos (µg/mL)
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	
CLNBr	101,6	73	124,7	73,5	39,3
CLN16	79	59,4	122,4	89,4	39,2
AM	Inativo	Inativo	>700	>700	Inativo

Fonte: Dados da pesquisa.

Considera-se citotóxico um produto que provoca uma inibição no crescimento celular acima de 30% (ISO, 2009, p. 42). Assim, os resultados indicaram que o medicamento AM em solução não exibiu citotoxicidade nas concentrações estudadas para os macrófagos. Por outro lado, os CLN apresentaram citotoxicidade em diferentes concentrações, sendo o CLNBr considerado citotóxico acima de 38 µg/mL (CC<sub>50</sub>=39,3 µg/mL) e o CLN16 a partir de 19 µg/mL (CC<sub>50</sub>=39,2 µg/mL). A citotoxicidade do CLNBr pode ser explicada pela presença dos tensoativos presentes na formulação. Estudos relatam que tensoativos não iônicos polietoxilados em concentrações acima de 0,02% podem manifestar citotoxicidade (Grant *et al.*, 1992, p. 153). Já o aumento da citotoxicidade do AM que ocorreu quando incorporado no CLN16 se dá ao fato de que a interação e internalização do fármaco nas células são acentuadas pelo nanocarreador, devido ao seu tamanho reduzido e aumento da área superficial de contato (Villanueva *et al.*, 2020, p. 132002). É importante ressaltar que o CLN, ao favorecer a internalização do fármaco nas células, permite sua conversão para a forma ativa, que é a forma tóxica para as leishmanias. Comparativamente a outras investigações, concentrações tóxicas do AM já foram relatadas entre variou entre 112,1 e 1125 µg/mL em macrófagos J774 (Treiger *et al.*, 2011, p. 4341; Borborema *et al.*, 2016, p. 196; Barazesh *et al.*, 2018, p. 416; Albalawi *et al.*, 2021, p. 891). Já em diferentes tipos de carreadores as concentrações tóxicas abrangem uma faixa de 148,1 - 1000 µg/mL (Borborema *et al.*, 2016, p. 196; Barazesh *et al.*, 2018, p. 416; Albalawi *et al.*, 2021, p. 891).

Para além da citotoxicidade em macrófagos, as amostras foram testadas em diferentes espécies da *Leishmania* spp., nas duas formas evolutivas (amastigotas e promastigotas). As

espécies escolhidas para realização desse ensaio foram a *L. infantum*, causadora da leishmaniose visceral, e a *L. amazonensis*, responsável pela leishmaniose cutânea.

A Tabela 9 mostra os valores de IC<sub>50</sub> para cada amostra testada e suas respectivas espécies e formas evolutivas. Como é possível observar, o AM só apresenta atividade em concentrações acima de 700 µg/mL em ambas as espécies e formas evolutivas (amastigota e promastigota). A necessidade de uma alta concentração de AM para a obtenção de alguma ação leishmanicida, pode ser justificada pela hipótese de que métodos que utilizam espécies transgênicas podem interferir na sensibilidade já conhecida ao fármaco, o qual precisa ser metabolizado pelo parasita para reduzir o Sb<sup>+5</sup> para Sb<sup>+3</sup> (forma ativa).

Em estudos onde a atividade leishmanicida foi avaliada por métodos clássicos (cepas não transgênicas), as concentrações tóxicas para as *leishmanias* variam de 60,28 - 176 µg/mL µg/mL e 11,26 µg/mL, para amastigota e promastigota de *L. infantum*, respectivamente (Pujals *et al.*, 2008, p. 1243; Borborema *et al.*, 2016, p. 196). Já para *L. amazonensis* os resultados de IC<sub>50</sub> variam de 112,2 µg/mL e 146,0 µg/mL, para amastigotas (Zauli *et al.*, 2010, p. 68). Em todos os ensaios pelo método clássico, a concentração necessária para atividade leishmanicidas foram consideravelmente inferiores à concentração necessária para se obter essa atividade utilizando as cepas transgênicas.

Ademais, os ensaios de atividade *in vitro* dos CLN16 demonstram sua potencial atividade leishmanicida para o tratamento de leishmanioses. Os CLN apresentaram atividade contra as duas espécies testadas e formas evolutivas, conforme resultados expostos na tabela 9. É possível notar a proximidade entre o IC<sub>50</sub> do CLN16 e CLNBr. Isso é possível devido parcialmente à toxicidade dos tensoativos. No caso do CLN16, há a encapsulação quase total do fármaco (>90%), dessa forma, precisa-se de um certo tempo para se ter a liberação do AM a partido do nanocarreador em concentrações suficientes para apresentar atividade, bem como para ocorrer a redução do Sb<sup>+5</sup> para Sb<sup>+3</sup> (forma ativa), o que pode não acontecer nas leishmanias modificadas como já mencionado. Mesmo com esses fatores, o IC<sub>50</sub> do CLN16 ainda se apresentou um pouco melhor em comparação com CLNBr, devido à presença do fármaco encapsulado. Esses resultados refletem um padrão similar ao observado no teste de citotoxicidade em macrófagos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que os ensaios de pré-formulação foram realizados com êxito, resultando em um CLN com características físico-químicas promissoras para o alvo terapêutico. O tamanho e sua distribuição homogênea, bem como sua eficiência de encapsulação mostraram-se adequados para nanocarreadores tanto para a administração oral quanto tópica. Embora o PZ não demonstre potencial estabilidade dos CLN, estudos posteriores empregando a técnica de liofilização podem ser aplicados visando melhorar a estabilidade desses nanocarreadores em diferentes formas farmacêuticas.

A triagem lipídica realizada nesse estudo foi realizada com o objetivo de obter uma matriz lipídica menos cristalina e teve seu resultado confirmado nas técnicas de caracterização empregadas nesse estudo, que comprovaram a incorporação do fármaco na nanopartícula e confirmaram a obtenção de um CLN com matriz lipídica amorfizada. Todos esses fatores influenciaram no bom encapsulamento do antimoníato de meglumina, confirmando na análise quali-quantitativa dos CLN, onde o melhor carreador obteve uma eficiência de encapsulação >90%.

O ensaio de viabilidade celular permitiu conhecer concentrações citotóxicas do fármaco e das nanopartículas em macrófagos, assim como a avaliação da atividade anti-leishmania forneceu um perfil de atividade que foi diferente para as espécies estudadas. Os estudos de atividade leishmanicida forneceram resultados inferiores aos já relatados na literatura, alertando quanto ao método de avaliação utilizado. Espera-se, então, como perspectivas futuras do trabalho, realizar ensaios de estabilidade prolongada dos nanocarreadores obtidos, bem como avaliar sua possível incorporação em formas farmacêutica sólidas ou semissólidas, empregando técnicas de liofilização afim de se aumentar a estabilidade dos CLN.

## REFERÊNCIAS

- ALBALAWI, Aishah E. *et al.* Therapeutic Potential of Green Synthesized Copper Nanoparticles Alone or Combined with Meglumine Antimoniate (Glucantime®) in Cutaneous Leishmaniasis. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 891, 2021.
- ALVES, Guilherme Liberato *et al.* **Administração transdérmica de cloridrato de raloxifeno encapsulado em nanopartículas lipídicas: estudos de pré-formulação para seleção dos lipídeos e tensoativos**. Orientadora: Dra. Stephânia Fleury Taveira. 2017. 108 f. Dissertação (Pós-graduação) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- AMERICAS, I. C. I. The HLB System: A Time-saving Guide to Emulsifier Selection. **ICI Americas, Incorporated**, 1984.
- AMINU, Nafiu *et al.* Physicochemical compatibility studies of triclosan and flurbiprofen with excipients of pharmaceutical formulation using binary, ternary, and multi-combination approach. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 148, 2021.
- ANDRADE, Luciana Nalone *et al.* Praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles: Production, physicochemical characterization, release profile, cytotoxicity and in vitro activity against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 58, p. 101784, 2020.
- 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.
- ARSHAD, Shumaila *et al.* Compatibility analysis of bergapten with different pharmaceutical excipients used in nanostructured lipid carriers. **Pak. J. Pharm. Sci.**, [s. l.], 2019.
- ATLAS POWDER COMPANY. Surface Active Agents. **Atlas Powder Company**, Wilmington, Delaware, 1948.
- AZEVEDO, Cláudia *et al.* Engineered albumin-functionalized nanoparticles for improved FcRn binding enhance oral delivery of insulin. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 327, p. 161–173, 2020.
- BALL, Rebecca; BAJAJ, Palak; WHITEHEAD, Kathryn. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. Volume 12, p. 305–315, 2016.
- 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.], v. 46, n. sup1, p. 540–558, 2018.
- BARAZESH, Afshin *et al.* Preparation of meglumine antimonate loaded albumin nanoparticles and evaluation of its anti-leishmanial activity: an in vitro assay. **Journal of Parasitic Diseases**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 416–422, 2018.

BARCELOS, Soraia Fiorini *et al.* DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO PARA SISTEMAS TÓPICOS MICROEMULSIONADOS. **Ciências**, v. 2, n. 1, 2013.

BAROLI, Biancamaria. Skin Absorption and Potential Toxicity of Nanoparticulate Nanomaterials. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 485–496, 2010.

BAŞARAN, Ebru *et al.* Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 37–47, 2010.

BECHTOLD, Micheline. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poiuretânica hidrossolúvel**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

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.

BHATIA, Saurabh; BHATIA, Saurabh. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. **Natural polymer drug delivery systems: Nanoparticles, plants, and algae**, p. 33-93, 2016.

BORBOREMA, Samanta Etel Treiger *et al.* Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine liposomes: physicochemical evaluation and antileishmanial activity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 196–203, 2016.

BRASIL. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Brasília, 2006b (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose\\_viscerasal\\_grave\\_normas.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_viscerasal_grave_normas.pdf). Acesso em: 16 mai. 2023.

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. [Brasília]: Ed. do Ministério da Saúde, 2017. p. 191. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana\\_2edicao.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana_2edicao.pdf). Acesso em: 12 jul. 2023.

CALLISTER, W. D., **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. John Wiley & Sons, Inc., 2002

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.

CAVENDISH, Mariana *et al.* Study of pre-formulation and development of solid lipid nanoparticles containing perillyl alcohol. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 767–774, 2020.

CHADHA, Renu; BHANDARI, Swati. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 87, p. 82–97, 2014.

COATS, A. W.; REDFERN, J. P. Thermogravimetric analysis. A review. **The Analyst**, [s. l.], v. 88, n. 1053, p. 906, 1963.

COSTA, Lucas Amadeu Gonzaga da. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea**. Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto. 2019. 77 f. TCC (Graduação) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

DAS, Surajit; CHAUDHURY, Anumita. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011.

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**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012.

DE MIRANDA SANTO, Marcio *et al.* Text mining as a valuable tool in foresight exercises: A study on nanotechnology. **Technological Forecasting and Social Change**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1013–1027, 2006.

DEMICHELI, Cynthia *et al.* Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. [s. l.],

DEMICHELI, Cynthia; FRÉZARD, Frédéric. Antimônio no tratamento de zoonoses. **Cadernos Temáticos de Química na Nova Escola**. Nº6, Julho, 2005. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/06/a07.pdf>. Acesso em: 06 set. 2023.

DOROFEEV, G. A. *et al.* Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction. **Colloid Journal**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 675–685, 2012.

DUARTE JUNIOR, Anivaldo Pereira. **Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo dexametasona para tratamento tópico de inflamações cutâneas**. 2016. 190 f. Tese (Doutorado em Nanotecnologia Farmacêutica) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

DUTRA, Lillian Maria Uchôa *et al.* Binary mixture micellar systems of F127 and P123 for griseofulvin solubilisation. **Polímeros**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 433–439, 2015.

EBRAHIMI-NAJAFABADI, Heshmatollah; LEARDI, Riccardo; JALALI-HERAVI, Mehdi. Experimental Design in Analytical Chemistry—Part II: Applications. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 12–18, 2014.

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.

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

- FRÉZARD, Frédéric *et al.* Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–12, 2013.
- FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.
- GARCÍA-QUINTERO, Angélica; PALENCIA, Manuel. A critical analysis of environmental sustainability metrics applied to green synthesis of nanomaterials and the assessment of environmental risks associated with the nanotechnology. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 793, p. 148524, 2021.
- GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. Volume 12, p. 25–40, 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.
- GRANT, Roberta L. *et al.* Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. **Toxicology**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 153–176, 1992.
- GRIFFIN, William C. Classification of surface-active agents by "HLB". **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 1, p. 311-325, 1949.
- H. MULLER, Rainer; SHEGOKAR, Ranjita; M. KECK, Cornelia. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 207–227, 2011.
- HENDRICKX, Sarah; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 118, n. 10, p. 2743–2752, 2019.
- HOMMA, Akira; FREIRE, Marcos Da Silva; POSSAS, Cristina. Vaccines for neglected and emerging diseases in Brazil by 2030: the “valley of death” and opportunities for RD&I in Vaccinology 4.0. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 36, n. suppl 2, p. e00128819, 2020.
- HOROIWA, Thais Aragão *et al.* Process evaluation of sugar-based polymeric colloidal nanocarrier formation. **Materials Research**, v. 22, 2019.
- HULLA, Je; SAHU, Sc; HAYES, Aw. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 2015.
- HUPFFER, Haide Maria; LAZZARETTI, Luisa Lauermann. NANOTECNOLOGIA E SUA REGULAMENTAÇÃO NO BRASIL. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 153, 2019.
- IBRAHIM, Waheed M.; ALOMRANI, Abdullah H.; YASSIN, Alaa Eldeen B. Novel sulpiride loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 129--144, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. In: ISO 10993-5. **BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES**. 3th. ed. Geneva: [s. n.], 2009. p. 42.

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**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 226–233, 2008.

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**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1146, 2021.

KHERADMANDNIA, Soheila *et al.* Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s. l.], 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. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 841–853, 2020.

KIP, Anke E. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 151–176, 2018.

KOVACEVIC, A. *et al.* Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 406, n. 1–2, p. 163–172, 2011.

L. KISS, Eszter *et al.* Design and Optimization of Nanostructured Lipid Carrier Containing Dexamethasone for Ophthalmic Use. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 679, 2019.

LEISHMANIASIS. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 01 abril 2023.

LI, Qianwen *et al.* A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 122, 2017.

LIEBERMAN, Herbert A.; RIEGER, Martin M.; BANKER, Gilbert S. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. **(No Title)**, 1988.

LIMA, Marini Nascimento de. **Caracterização de nanopartículas de PCL liofilizadas contendo dietilcarbamazina**. Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira. 2019. 38 f. TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2019.

LINDOSO, José Angelo L.; LINDOSO, Ana Angélica B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009.

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.

- LIU, Jingying *et al.* The impact of particle preparation methods and polymorphic stability of lipid excipients on protein distribution in microparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 2032–2042, 2017.
- MADUREIRA, Ana Raquel *et al.* Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 29, p. 22665–22673, 2015.
- MANSFIELD, E. Recent advances in thermal analysis of nanoparticles. *In*: MODELING, CHARACTERIZATION, AND PRODUCTION OF NANOMATERIALS. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 167–178. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782422280000065>. Acesso em: 28 maio 2023.
- MATOS, FLÁVIO CARDOSO DE. **Análise do comportamento do equilíbrio sólido-líquido de sistemas graxos através do uso da calorimetria exploratória diferencial**. 2017. 233 f. - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, [s. l.], 2017.
- MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, p. 83–101, 2012.
- MIRSASAANI, Seyed Shahabeddin *et al.* Measurement of Solubility and Water Sorption of Dental Nanocomposites Light Cured by Argon Laser. **IEEE Transactions on NanoBioscience**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 41–46, 2013.
- MOREL, Carlos M. A pesquisa em saúde e os objetivos do milênio: desafios e oportunidades globais, soluções e políticas nacionais. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 261–270, 2004.
- MUÈLLER, Rainer H; MAÈDER, Karsten; GOHLA, Sven. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], 2000.
- MULLER, R H; RADTKE, M; WISSING, S A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], 2002.
- MÜLLER, Rainer H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): The second generation of solid lipid nanoparticles. *In*: PERCUTANEOUS PENETRATION ENHANCERS CHEMICAL METHODS IN PENETRATION ENHANCEMENT: NANOCARRIERS. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 161–185.
- MURA, P. *et al.* Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 18, n. 1–2, p. 151–163, 1998.
- MURA, Paola *et al.* Evaluation and Comparison of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Vectors to Develop Hydrochlorothiazide Effective and Safe Pediatric Oral Liquid Formulations. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 437, 2021.

National Institute of Standards and Technology - NIST. **Livro de química na web**, SRD 69. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C555442&Mask=80>. Acesso: 06 set. 2023.

NAVAEI, Ali *et al.* Double-walled microspheres loaded with meglumine antimoniate: preparation, characterization and *in vitro* release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 701–710, 2014.

NAZIRIS, Nikolaos *et al.* Differential scanning calorimetry (DSC) on sartin/cyclodextrin delivery formulations. **Supramolecules in Drug Discovery and Drug Delivery: Methods and Protocols**, p. 163-174, 2021.

NELIS, Veronique *et al.* Fat crystallization and melting in W/O/W double emulsions: Comparison between bulk and emulsified state. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 566, p. 196–206, 2019.

NEVES, David Pereira; MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos; VITOR, Ricardo Almeida. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016. 616 p.

NGUYEN, Van Hong *et al.* Nanostructured lipid carriers and their potential applications for versatile drug delivery via oral administration. **OpenNano**, [s. l.], v. 8, p. 100064, 2022.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável | As Nações Unidas no Brasil**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 05 set. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Organização Mundial da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. Organização Pan-Americana da Saúde, 2018. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6\\_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y). Acesso em: 12 jul. 2023.

PANI, Nihar Ranjan *et al.* Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 219–226, 2012.

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, 2011a.

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, 2011b.

PERES FILHO, Marco Júnio. **Estudo de pré-formulação, desenvolvimento farmacotécnico e caracterização de formas farmacêuticas sólidas da olanzapina**. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

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

POPE, Christopher G. X-Ray Diffraction and the Bragg Equation. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 129, 1997.

PRADO, Livia D.; ROCHA, Helvécio Vinícius A. Solid State in the Pharmaceutical Industry: A Brief Review. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.2080-2112, 2015.

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

RATH, Susanne *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

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

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.

SANTIAGO, Alexandre Silva; PITA, Samuel Silva Da Rocha; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.

SANTOS, Dilvani O. *et al.* Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 1–10, 2008.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SEVERINO, Patrícia *et al.* Crystallinity of Dynasan®114 and Dynasan®118 matrices for the production of stable Miglyol®-loaded nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 101–108, 2012.

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

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

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

SINGH, Nisha; KUMAR, Manish; SINGH, Rakesh Kumar. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SOLTANI, Ali M. *et al.* An evaluation scheme for nanotechnology policies. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 7303–7312, 2011.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 377–388, 2006.

SOUZA, Myla Lôbo de. **Carreador lipídico nanoestruturado contendo antimoniato de meglumina como alternativa terapêutica de uso oral contra a Leishmaniose**. 2022. 189 f. Tese (Pós-graduação) - Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

SPINK, Charles H. Differential Scanning Calorimetry. *In*: METHODS IN CELL BIOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2008. v. 84, p. 115–141. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X07840052>. Acesso em: 28 maio 2024.

TEERANACHAIDEEKUL, Veerawat; CHANTABURANAN, Thitirat; JUNYAPRASERT, Varaporn Buraphacheep. Influence of state and crystallinity of lipid matrix on physicochemical properties and permeation of capsaicin-loaded lipid nanoparticles for topical delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 39, p. 300–307, 2017.

TIWARI, Neeraj *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2017. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/151864/article>. Acesso em: 28 maio 2024.

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

VASCONCELOS, Jaira Maria *et al.* American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], v. 50, n. 3, 2018. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.21877/2448-3877.201800722>. Acesso em: 28 maio 2024.

VILLANUEVA-FLORES, Francisca *et al.* Understanding cellular interactions with nanomaterials: towards a rational design of medical nanodevices. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 13, p. 132002, 2020.

WEISS, Carsten *et al.* Toward Nanotechnology-Enabled Approaches against the COVID-19 Pandemic. **ACS Nano**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 6383–6406, 2020.

WEISSIG, Volkmar; PETTINGER, Tracy; MURDOCK, Nicole. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], p. 4357, 2014.

WISSING, S.A; KAYSER, O; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 1257–1272, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Generic framework for control, elimination and eradication of neglected tropical diseases.** Geneva, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-NTD-2016.6>. Acesso em: 20 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Scientific Working Group. Report of the Scientific Working Group meeting on dengue: Geneva, 1-5 october, 2006.** Geneva, 2007. (TDR/SWG/08). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/tdr-swg-08>. Acesso em: 12 jul. 2023.

WU, CF Jeff; HAMADA, Michael S. **Experiments: planning, analysis, and optimization.** John Wiley & Sons, 2011.

ZAULI-NASCIMENTO, Rogéria C. *et al.* *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine & International Health**, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3156.2009.02414.x>. Acesso em: 28 maio 2023.

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.