



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JOBSON DUTRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ITRACONAZOL**

RECIFE

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOBSON DUTRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ITRACONAZOL**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia, da Universidade
Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da
Saúde, como requisito para a obtenção do título de
bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto.
Coorientadora: Dra. Larissa Pereira Alves.

RECIFE

2026

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

Silva, Jobson Dutra da .

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo itraconazol / Jobson Dutra da Silva. - Recife, 2026.

60 : il., tab.

Orientador(a): Pedro José Rolim Neto

Coorientador(a): Larissa Pereira Alves

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2026.

Inclui referências.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Quitosana. 3. Gelificação iônica. 4. Antifúngicos. 5. Esporotricose Felina. I. Rolim Neto, Pedro José. (Orientação). II. Alves, Larissa Pereira. (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 15/01/2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Laysa Creusa Paes Barreto Barros Silva
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Bruna Cristiane Souza França
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Ma. Bruna Fernanda de Lima Arruda Holanda
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

À minha mãe, minha maior inspiração.

Àquela que com sabedoria, humildade, serenidade e força me ensinou a seguir em frente mesmo diante das dificuldades. Me criou sozinha, nunca se ausentou e sempre acreditou em mim.

À minha irmã, Taís, por seu amor, carinho e amizade e por me apoiar em muitos momentos desta jornada.

À minha pequena Maria Alice, minha gratidão por ter chegado para encher minha vida de alegria.

O amor incondicional de vocês me trouxe até aqui.

Esta conquista é nossa! Com todo o meu amor,

Jobson Dutra da Silva

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser meu sustento nos momentos de dificuldade, fonte de força nas horas de cansaço e guia em cada passo dessa caminhada. Nada disso seria possível sem Sua graça.

À **minha mãe, Cristina**, minha profunda gratidão por todo o amor, dedicação e incentivo ao longo da minha trajetória. Mãe solo, criou-me sozinha com força e dignidade, sendo minha rainha e meu maior exemplo. Seus ensinamentos foram essenciais para a realização desta conquista. Te amo muito!

À minha irmã, **Taís Dutra**, agradeço por todo o cuidado, carinho e apoio ao longo da minha vida. Sua presença constante, seu amor e sua disposição em ajudar foram essenciais em minha trajetória.

À minha sobrinha **Alice**, minha gratidão por trazer leveza, alegria e novos significados à minha vida, mesmo em tão pouco tempo.

Ao meu cunhado, **Arlson Pereira**, pelo apoio e pela ajuda sempre presente nos momentos em que precisei.

Aos meus avós maternos, **Maria Francisca e José Gomes** (*in memoriam*), agradeço pelos valores de amor, dedicação e respeito que me foram ensinados. Embora não possam estar presentes, seus ensinamentos e carinho permanecem vivos em minha trajetória.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Pedro Rolim**, por ter me recebido em seu laboratório, por acreditar em meu trabalho e me mostrar os verdadeiros caminhos da ciência.

À minha coorientadora, **Dra. Larissa Pereira**, pela orientação cuidadosa, pela disponibilidade e pelo suporte ao longo de todas as etapas experimentais deste TCC. Sou grato pela confiança e pela excelência com que conduziu esse processo, contribuindo de maneira significativa para meu crescimento profissional e amadurecimento na área de pesquisa.

À minha melhor amiga e parceira de graduação, **Evellyn Monique**, pelo apoio incondicional ao longo desses cinco anos. Obrigado por estar ao meu lado nos momentos de estresse, sempre transformando a pressão em risadas, e por dividir comigo fases difíceis que só nós sabemos o quanto foi árduo superar para chegar até aqui. As longas caminhadas pela UFPE, os bolos de pote no CCS para aliviar a tensão, as voltas de ônibus CDU/UR-07 (Várzea) para casa e as incontáveis

conversas sem sentido — mas essenciais — ficarão para sempre na minha memória. Te amo, minha amiga!

Aos meus amigos de graduação, **Manuelle Miranda, José Luiz, José Deiwson, Maria Eduarda, Raiane Costa, Walker Costa, Monik Vieira, Pâmala, Letícia Dias e Davi**, pelo companheirismo, ajuda, amizade e convívio diário. Vocês foram essenciais neste ciclo.

Aos meus amigos e companheiros do LTM, **Vitor Matos, Beatriz Esther, Miguel Epifânio, Nébily Cristina, Bruna Holanda, Bruna França, Laysa e Rayana Falcão**, meu sincero agradecimento pelo apoio constante, pela valiosa colaboração nas etapas experimentais e por tornarem a rotina do laboratório mais leve, ajudando a aliviar a tensão nos momentos mais desafiadores.

Aos meus eternos amigos do ensino médio (vulgo amigos IFanos), **Adenise Pereira, Jainne Andréa, Victória Santiago, Ane Jéssica, Vinícius Henrique e Higor**, minha sincera gratidão por terem participado de uma fase tão decisiva da minha vida e por me incentivarem a seguir meu sonho.

A toda a equipe do **pré-vestibular Portal UFPE**, pelo conhecimento compartilhado e pela oportunidade de acreditar no sonho de ingressar em uma universidade pública, sonho esse que se tornou realidade. E claro, aos amigos que conquistei lá e levarei para o resto da vida, em especial **Michelle Adriana e Rinaldo Júnior**, meu profundo agradecimento por terem sido fundamentais para minha evolução pessoal e por me oferecerem apoio e acolhimento em um período no qual eu acreditava ser impossível alcançar uma universidade federal. Quero vocês sempre comigo.

A todo o **corpo docente e administrativo do Departamento de Ciências Farmacêuticas**, pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação ao ensino, que foram essenciais para a minha formação e para que eu me tornasse quem sou hoje.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho e contribuíram para que ele se tornasse possível.

“Rendei graças ao Senhor, porque Ele é bom; o seu amor dura para sempre.”

Salmos 118:1

RESUMO

A esporotricose é uma zoonose causada por fungos do gênero *Sporothrix* que acomete o tecido subcutâneo da pele. Sua transmissão ocorre por mordeduras e arranhaduras, principalmente de felinos não castrados, que atuam como importantes reservatórios do fungo. O itraconazol é o fármaco de primeira escolha, porém casos refratários e a necessidade de tratamento prolongado favorecem o abandono terapêutico pelos tutores. Com isso, as nanopartículas poliméricas destacam-se como sistemas promissores para a incorporação e liberação mais eficiente de fármacos. Entre elas, a quitosana tem recebido atenção por ser um biopolímero comprovadamente atóxico, com propriedades antimicrobianas e cicatrizantes. O objetivo do trabalho foi sintetizar nanopartículas poliméricas contendo itraconazol com propriedades físico-químicas otimizadas, avaliar a compatibilidade entre os componentes e validar o método analítico para a quantificação do fármaco. Para a formação das nanopartículas, utilizou-se o método de gelificação iônica, com adição de uma fase alcalina contendo tripolifosfato (TPP) em uma fase ácida contendo quitosana. Os ensaios por FTIR evidenciaram boa compatibilidade entre os componentes da formulação, sugerindo a incorporação do itraconazol à matriz polimérica de quitosana-TPP por interações eletrostáticas estáveis. A caracterização físico-química demonstrou índices de polidispersão (PDI) de 0,219 e 0,198 para as nanopartículas contendo o fármaco, indicando distribuição de tamanho homogênea ($PDI < 0,3$), com tamanhos médios de partícula adequados, em torno de 174,4 e 186,6 nm. Quanto ao potencial zeta, ambas as formulações contendo o princípio ativo apresentaram estabilidade eletrocinética moderada (+10,9 mV e +14,3 mV). O método analítico empregado para a quantificação do itraconazol foi devidamente validado, apresentando seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, com valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), atendendo aos critérios exigidos pela legislação brasileira. Esses achados reforçam o potencial das nanopartículas poliméricas como sistemas promissores para o carreamento do itraconazol.

Palavras-chave: esporotricose; antifúngicos; nanotecnologia; quitosana.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a zoonotic disease caused by fungi of the genus *Sporothrix* that affects the subcutaneous tissue of the skin. Transmission occurs through bites and scratches, mainly from unneutered cats, which act as important reservoirs of the fungus. Itraconazole is the first-line drug, but refractory cases and the need for prolonged treatment favor therapeutic abandonment by pet owners. Therefore, polymeric nanoparticles stand out as promising systems for the incorporation and more efficient release of drugs. Among them, chitosan has received attention for being a proven non-toxic biopolymer with antimicrobial and healing properties. The objective of this work was to synthesize polymeric nanoparticles containing itraconazole with optimized physicochemical properties, evaluate the compatibility between the components, and validate the analytical method for drug quantification. For the formation of nanoparticles, the ionic gelation method was used, with the addition of an alkaline phase containing tripolyphosphate (TPP) to an acidic phase containing chitosan. FTIR assays showed good compatibility between the formulation components, suggesting the incorporation of itraconazole into the chitosan-TPP polymeric matrix through stable electrostatic interactions. Physicochemical characterization demonstrated polydispersity indices (PDI) of 0.219 and 0.198 for the nanoparticles containing the drug, indicating a homogeneous size distribution ($PDI < 0.3$), with adequate average particle sizes, around 174.4 and 186.6 nm. Regarding the zeta potential, both formulations containing the active ingredient showed moderate electrokinetic stability (+10.9 mV and +14.3 mV). The analytical method employed for the quantification of itraconazole was duly validated, demonstrating selectivity, linearity, precision, accuracy, and robustness, with statistically significant values ($p < 0.05$), meeting the criteria required by Brazilian legislation. These findings reinforce the potential of polymeric nanoparticles as promising systems for the delivery of itraconazole.

Keywords: sporotrichosis; antifungals; nanotechnology; chitosan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	<i>Sporothrix schenckii</i> na forma de micélio, a 25°C.	20
Figura 2 –	<i>Sporothrix schenckii</i> na forma de levedura, a 37°C.	20
Figura 3 –	Gatas não castradas com lesões ulcerativas em plano nasal, apresentando tumefação na região, dificuldade respiratória e espirros frequentes.	22
Figura 4 –	Mecanismo de ação do itraconazol.	23
Figura 5 –	Estrutura química do itraconazol e de seu metabólito ativo, o hidroxí-itraconazol.	23
Figura 6 –	Representação esquemática das nanocápsulas e nanoesferas.	25
Figura 7 –	Estrutura química da quitina e da quitosana.	25
Figura 8 –	Gelificação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio.	26
Figura 9 –	Espectro de infravermelho dos componentes isolados da nanopartícula.	35
Figura 10 –	Estrutura química do itraconazol com seus principais grupos funcionais.	36
Figura 11 –	Espectro de infravermelho das misturas binárias e ternárias da nanopartícula.	37
Figura 12 –	Espectro de UV referente ao padrão e pellet de ITZ.	39
Figura 13 –	Cromatograma da seletividade do método de CLAE-DAD com o padrão de ITZ.	40
Figura 14 –	Cromatograma da seletividade do método de CLAE-DAD com o pellet de ITZ.	40
Figura 15 –	Representação gráfica da linearidade do padrão analítico de ITZ.	41
Figura 16 –	Representação gráfica da linearidade dos pellets de ITZ.	41
Figura 17 –	Gráfico de dispersão de resíduos do padrão de ITZ.	44
Figura 18 –	Gráfico de dispersão de resíduos do pellet de ITZ.	44
Figura 19 –	Nanopartículas (NP0, NP1 e NP2) após preparação.	49
Figura 20 –	Tamanho médio da gotícula e PDI avaliados pelo DLS para a NP0 (sem o ITZ).	50

Figura 21 –	Tamanho médio da gotícula e PDI avaliados pelo DLS para a NP1 (proporção 16:1).	50
Figura 22 –	Tamanho médio da gotícula e PDI avaliados para a NP2 (proporção 20:1).	51
Figura 23 –	Potencial zeta da nanopartícula branca (NP0) por análise eletroforética.	52
Figura 24 –	Potencial zeta da nanopartícula carregada com o fármaco (NP1) por análise eletroforética.	53
Figura 25 –	Potencial zeta da nanopartícula carregada com o fármaco (NP2) por análise eletroforética.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Condições cromatográficas utilizadas para a validação do itraconazol.	28
Tabela 2 –	Variação da concentração dos 7 pontos para a determinação da linearidade.	30
Tabela 3 –	Desenvolvimento das nanopartículas não-carregadas e carregadas com o ITZ.	34
Tabela 4 –	Análise de variância da linearidade do padrão de ITZ	42
Tabela 5 –	Análise de variância da linearidade do pellet de ITZ.	43
Tabela 6 –	Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade.	45
Tabela 7 –	Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermediária.	46
Tabela 8 –	Valores referentes à exatidão do método analítico em CLAE-DAD para o itraconazol.	47
Tabela 9 –	Resultados da robustez para a quantificação do itraconazol.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ; Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> ; Reflectância Total Atenuada
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Detecção de Arranjo de Diodo
CMD	Concentração Média Determinada
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> ; Espalhamento Dinâmico da Luz
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EE (%)	Eficiência de Encapsulação
GL	Graus de Liberdade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ITZ	Itraconazol
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MQ	Média dos Quadrados
NP0	Nanopartícula Branca
NP1	Nanopartícula incorporada ao itraconazol (proporção 16:1)
NP2	Nanopartícula incorporada ao itraconazol (proporção 20:1)
PDI	<i>Polydispersity Index</i> ; Índice de Polidispersão
PZ	Potencial Zeta
QTS	Quitosana
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQ	Soma Quadrática
TPP	Tripolifosfato de Sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
+	Mais
÷	Divisão
x	Vezes
H ₀	Hipótese nula
H ₁	Hipótese alternativa
°C	Graus celsius
cm ⁻¹	Número de onda
h	Horas
min	Minutos
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mV	Milivolts
m/v	Massa por volume
µg/mL	Microgramas por mililitros
µm	Micrômetros
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	ESPOROTRICOSE FELINA	20
3.2	ITRACONAZOL	22
3.3	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	24
3.4	QUITOSANA	25
3.5	GELIFICAÇÃO IÔNICA	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL	27
4.2	MÉTODOS	27
4.2.1	Estudo de compatibilidade físico-químico	27
4.2.1.1	<i>Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	27
4.2.2	Validação do método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Arranjo Diodo (CLAE-DAD)	27
4.2.2.1	<i>Parâmetros cromatográficos</i>	27
4.2.2.2	<i>Validação da metodologia analítica</i>	29
4.2.2.2.1	Seletividade	29
4.2.2.2.2	Linearidade	29
4.2.2.2.3	Limite de Detecção	30
4.2.2.2.4	Limite de Quantificação	31
4.2.2.2.5	Precisão	31
4.2.2.2.6	Exatidão	32
4.2.2.2.7	Robustez	32

4.2.2.2.8	Análise estatística	32
4.2.3	Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas	33
4.2.3.1	<i>Preparação das nanopartículas</i>	33
4.2.3.2	<i>Caracterização físico-química do sistema nanoparticulado</i>	34
4.2.3.2.1	Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICO	35
5.1.1	Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	35
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ARRANJO DIODO (CLAE-DAD)	38
5.2.1	Seletividade	38
5.2.2	Linearidade	40
5.2.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	45
5.2.4	Precisão	45
5.2.5	Exatidão	46
5.2.6	Robustez	47
5.3	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	48
5.3.1	Preparação das nanopartículas	48
5.3.2	Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	49
6	CONCLUSÃO	55
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea, subaguda ou crônica, causada por fungos do gênero *Sporothrix*, sendo que no Brasil a espécie mais prevalente é *S. brasiliensis* (Barros *et al.*, 2010). As espécies pertencentes a este complexo se caracterizam pelo dimorfismo, existindo na forma de hifa a 25°C e de levedura a 37°C. Trata-se de um fungo amplamente distribuído na natureza, associado principalmente a materiais vegetais e ao solo, podendo acometer de forma patogênica diversas espécies, principalmente os felinos domésticos, os quais têm se tornado grandes transmissores de esporotricose para os seres humanos (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Brum *et al.*, 2007).

Dentre os animais domésticos, os gatos são os mais frequentemente diagnosticados com esporotricose, apresentando lesões nodulares cutâneas e, em alguns casos, comprometimento de mucosas. As regiões mais afetadas são cabeça, nariz, orelhas, cauda e membros posteriores (Greene, 2015). Em situações mais graves, podem ocorrer manifestações sistêmicas envolvendo órgãos como pulmões, linfonodos, fígado, baço e rins (Schubach *et al.*, 2002).

A infecção nos felinos ocorre principalmente por inoculação traumática do fungo na pele, decorrente de arranhões, mordidas ou contato com materiais contaminados. Os gatos atuam como importantes reservatórios e transmissores da doença, contribuindo para a disseminação zoonótica (Jericó, 2015; Greene, 2015).

No Brasil, a esporotricose vem se consolidando como uma zoonose emergente. Em Pernambuco, no ano de 2023, foram notificados 297 casos humanos, dos quais 181 (61%) foram confirmados, 39 (13%) descartados e 77 (26%) permaneceram sem definição (SES/PE, 2023). Esses dados reforçam o impacto dessa micose na saúde pública e a necessidade urgente de estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras, tanto para o tratamento animal quanto para o controle da transmissão zoonótica.

O itraconazol, derivado triazólico, é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose felina. Apresenta boa absorção por via oral em meio ácido, elevada lipofilicidade e baixa solubilidade em água. Seu metabolismo é hepático, com eliminação predominantemente biliar (Rosa *et al.*, 2017). O tratamento é prolongado, podendo variar de 16 a 80 semanas, sendo recomendado manter a terapia por cerca de um mês após a cura clínica (Rocha, 2014). Entretanto, o

tratamento em felinos enfrenta dificuldades relacionadas à limitação de antifúngicos disponíveis, à ocorrência de casos refratários, às altas doses terapêuticas, ao longo tempo de tratamento e à dificuldade de administração oral, fatores que contribuem para o abandono terapêutico (Nakasu *et al.*, 2021).

Nesse contexto, tem-se buscado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos capazes de otimizar a dose, a frequência de administração e a eficiência terapêutica.

As nanopartículas poliméricas, com tamanho entre 10 e 1.000 nm, destacam-se por possibilitar liberação controlada e direcionada a sítios específicos de ação de fármacos, reduzindo efeitos adversos em comparação aos sistemas convencionais (Bangun; Tandiono; Arianto, 2018).

Dentre os polímeros de interesse farmacêutico, destaca-se a quitosana, obtida pela desacetilação da quitina, composta por resíduos de glucosamina e N-acetilglucosamina ligados por ligações β -1,4 (Damian *et al.*, 2005). A quitosana apresenta propriedades antimicrobiana, cicatrizante e elevada biodegradabilidade (Sreekumar *et al.*, 2018; Chen; Zeng, 2018), sendo amplamente estudada na produção de nanopartículas para veiculação de fármacos (Bowman; Leong, 2006). Entretanto, a atividade de nanopartículas de quitosana contendo itraconazol frente à esporotricose felina ainda não se encontra completamente elucidada.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de nanopartículas poliméricas de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) pelo método de gelificação ionotrópica, visando à melhoria das propriedades biofarmacêuticas do itraconazol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de quitosana-TPP contendo itraconazol, visando ao desenvolvimento de um sistema carreador do fármaco com propriedades físico-químicas otimizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

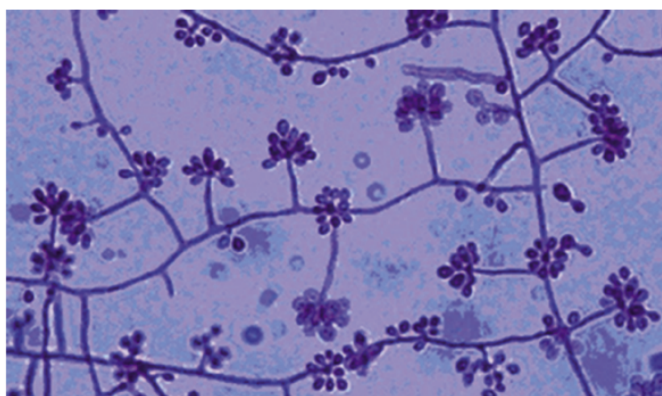
- Avaliar a compatibilidade entre os componentes da formulação por meio da Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Validar o método analítico para quantificação do itraconazol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD);
- Obter nanopartículas de quitosana-TPP incorporadas ao itraconazol, por meio do método de gelificação iônica;
- Proceder às caracterizações físico-químicas e confirmação da formação dos nanocarreadores.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESPOROTRICOSE FELINA

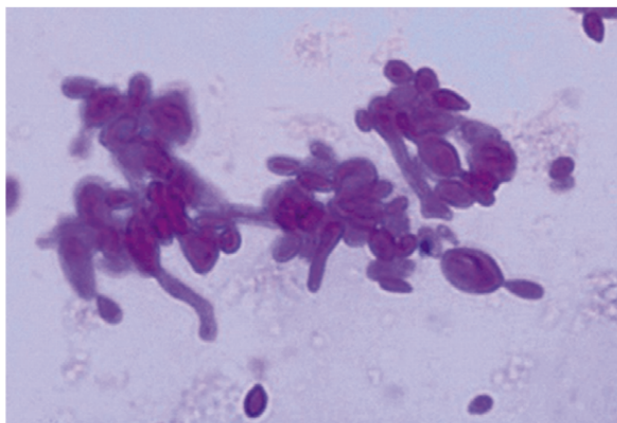
A esporotricose felina é uma infecção causada pelo fungo dimórfico e saprófito *Sporothrix schenckii* (Lloret *et al.*, 2013), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. luriei*, entre os quais *S. brasiliensis* é o mais comumente encontrado no Brasil (Rodrigues *et al.*, 2014). A doença afeta o homem e diversos animais, especialmente os felinos domésticos (Llorret *et al.*, 2013). a espécie *S. schenckii* encontra-se na forma de micélio (Figura 1) em temperatura ambiente de 25 a 30°C, e em temperatura corpórea de 37°C assume sua forma leveduriforme (Figura 2), a qual pode acometer a pele e a linfa, provocando uma doença sistêmica.

Figura 1 – *Sporothrix schenckii* na forma de micélio, a 25°C.



Fonte: Pires, C. (2017).

Figura 2 – *Sporothrix schenckii* na forma de levedura, a 37°C.



Fonte: Pires, C. (2017).

A transmissão da esporotricose ocorre por meio do implante traumático do fungo na pele, ou seja, para que a infecção se instale, é necessário que haja uma porta de entrada, como uma lesão cutânea (Gremião *et al.*, 2017). Os felinos são os principais transmissores da doença, podendo obtê-la mediante contato com o solo e ao arranhar madeiras e caule de árvores que estejam contaminados com o fungo, haja vista que a espécie *Sporothrix schenckii* encontra-se distribuída pelo meio ambiente (Gremião *et al.*, 2006).

A transmissão zoonótica da infecção pelo fungo tem sido associada ao contato com animais doentes, seja por mordeduras, arranhões ou pelo contato direto da pele ferida ou mucosas com lesões ou secreções, especialmente de gatos (Gremião *et al.*, 2017). Dessa forma, tutores de gatos infectados, assim como os veterinários são considerados os grupos mais vulneráveis à contaminação (Silva *et al.*, 2012). Nos felinos, o período de incubação da doença pode levar 14 dias, embora em alguns casos, as manifestações clínicas possam demorar meses para aparecer (Gremião *et al.*, 2021).

As formas clínicas da esporotricose são a cutânea, cutâneo-linfática e a disseminada. Nos felinos, a forma cutânea é a mais comum, envolvendo principalmente as mucosas do aparelho respiratório. As lesões apresentam formas nodulares, muitas vezes ulceradas e com secreção serosa a sanguinolenta, comumente observada na região cefálica, incluindo o nariz, pavilhão periauricular e auricular, além do dorso, tronco e membros, e em alguns casos, pode ocorrer comprometimento respiratório, ocasionando edema de plano nasal e espirros frequentes, como mostra a Figura 3 (Almeida *et al.*, 2018; Gondim; Leite, 2020; Nakasu *et al.*, 2020). No que diz respeito à disseminação da doença, podem estar presentes anormalidades oculares, linfáticas e neurológicas (Ettinger; Feldman, 2000), além de algumas alterações sistêmicas inespecíficas, como anorexia, febre, letargia e desidratação, fazendo com que o felino evolua para óbito (Pereira *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2018; Gondim; Leite, 2020).

Figura 3 – Gatas não castradas com lesões ulcerativas em plano nasal, apresentando tumefação na região, dificuldade respiratória e espirros frequentes.

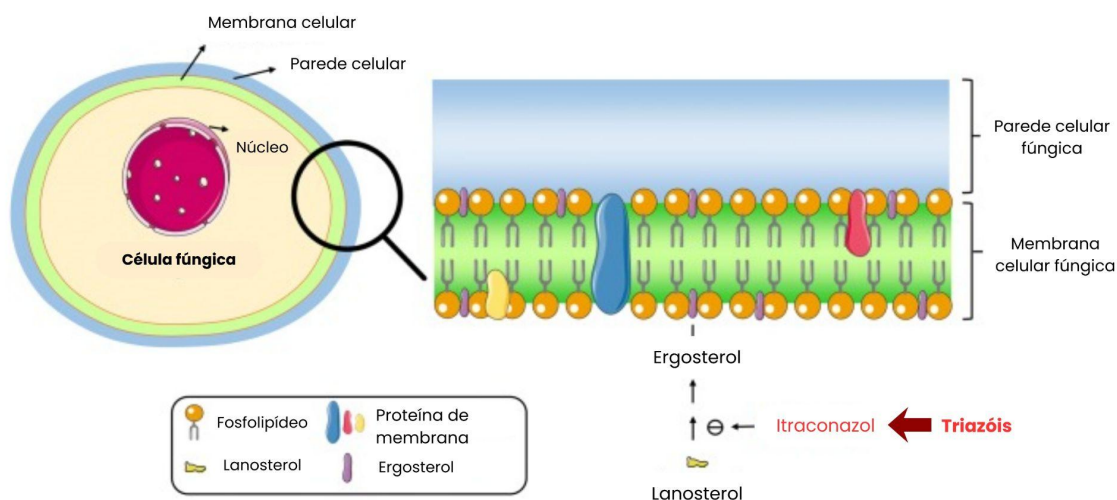


Fonte: Almeida *et al.* (2018).

O diagnóstico da esporotricose felina compreende anamnese, histórico do animal, exame clínico, bem como exames complementares. O isolamento do *Sporothrix* em cultura fúngica é considerado padrão-ouro para diagnóstico da doença, possuindo alta sensibilidade (95,2%) (Sales-Macêdo *et al.*, 2018). Tal diagnóstico é realizado por meio da coleta de amostras de lesões da pele do animal, secreções da mucosa, assim como biópsia das lesões (Gonsales *et al.*, 2019). As amostras podem ser cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol e ágar Mycosel, a incubação do meio de cultura é realizada a 27°C por um período de 14 dias, e a 35°C por 7 dias, para comprovação do dimorfismo (Nakasu *et al.*, 2021).

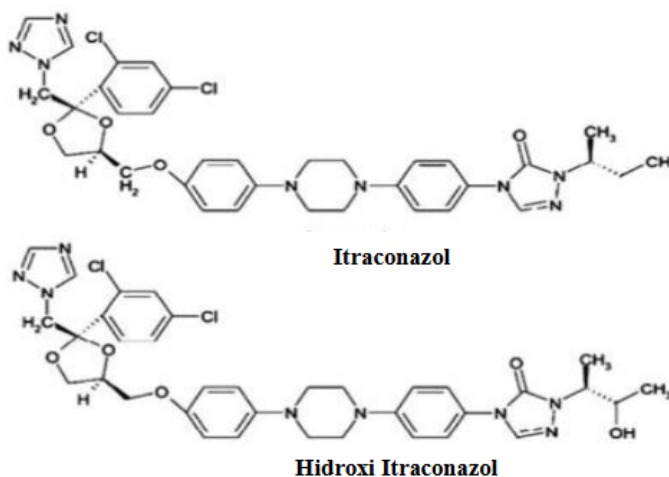
3.2 ITRACONAZOL

O itraconazol é considerado a droga de escolha para o tratamento da esporotricose felina, tendo em vista a sua segurança e eficácia frente a outros medicamentos. Agente antifúngico oral da classe dos azóis, é eficaz e bem tolerado e substituiu amplamente a anfotericina B com suas taxas de eficácia de 90–100% na esporotricose cutânea e extracutânea. Seu mecanismo de ação compreende a inibição da enzima citocromo P450 lanosterol 14-desmetilase, que converte lanosterol em ergosterol, o principal esterol presente na parede celular fúngica (Mahajan, 2014).

Figura 4 – Mecanismo de ação do itraconazol.

Fonte: Adaptado de Chen (2020).

Em relação à farmacocinética, a absorção do itraconazol, por via oral, depende altamente do pH gástrico, sendo indicada a sua administração juntamente com as refeições, pois potencializa de 2 a 3 vezes a biodisponibilidade deste fármaco. A ligação do itraconazol às proteínas plasmáticas é muito alta, por volta dos 99%. Além disso, possui caráter lipofílico e proteico, se distribuindo facilmente pelos tecidos orgânicos, exceto nos fluidos corporais, como saliva, líquido e fluidos oculares (Pereira *et al.*, 2009). O metabolismo é hepático, ocorrendo por meio da enzima CYP3A4, que faz a hidroxilação da cadeia lateral da molécula do itraconazol, produzindo o hidróxi-itraconazol, principal metabólito ativo (Dwivedi *et al.*, 2014).

Figura 5 – Estrutura química do itraconazol e de seu metabólito ativo, o hidróxi-itraconazol.

Fonte: Dwivedi *et al.* (2014).

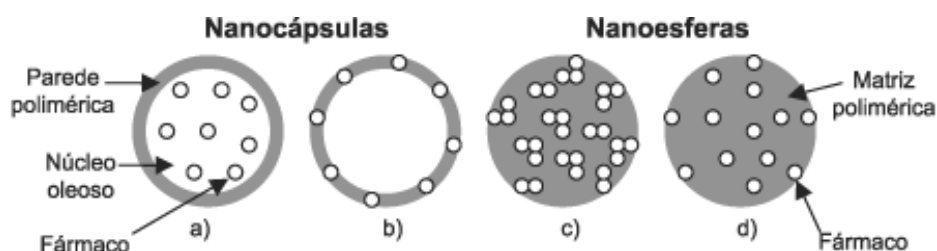
A dose de itraconazol recomendada para o tratamento da esporotricose em felinos é de 5-10 mg/kg/dia, por via oral. Um dos principais problemas é o tempo prolongado do tratamento, de 16 a 80 semanas, e a administração do fármaco deve ser continuada após 1 mês da cura clínica, para evitar recidivas. Os efeitos adversos são poucos, causando, geralmente, êmese e anorexia. Em alguns casos, pode ocorrer hepatotoxicidade, sendo importante monitorar a função hepática do animal durante o tratamento (Larsson, 2011; Santos *et al.*, 2018).

Apesar dos pontos positivos, há relato de casos de felinos com esporotricose refratária à monoterapia com itraconazol, acontecendo, assim, a recidiva da doença. Tal conjuntura pode ser provocada por diversos fatores, como a baixa solubilidade do fármaco em meio aquoso, dificuldade de administração da medicação, o abandono por parte dos tutores devido ao tempo prolongado de tratamento, a contaminação de um membro próximo ao felino e o uso inadequado do itraconazol (Rosa *et al.*, 2017). Além disso, o itraconazol não é fornecido pelos órgãos governamentais, impossibilitando o tratamento dos gatos que vivem em situação de rua (SBMT, 2020).

3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas são sistemas nanotransportadores de fármacos, que possuem diâmetro menor do que 1 μm , englobando as nanocápsulas e as nanoesferas, que divergem entre si quanto à organização estrutural e composição (Figura 6). As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, no qual a substância ativa pode estar dissolvida neste núcleo ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas, por sua vez, não apresentam óleo em sua composição, e são formadas por uma matriz polimérica, onde a diferenciação de núcleo não é observada, tratando-se de uma matriz mais homogênea, onde o fármaco pode estar dissolvido ou retido (Aouada, 2009). Sendo assim, as nanopartículas poliméricas estão sendo cada vez mais investigadas por suas propriedades de liberação sustentada, melhor biodisponibilidade e por alcançar sítios específicos de ação de fármacos.

Figura 6 – Representação esquemática das nanocápsulas e nanoesferas.

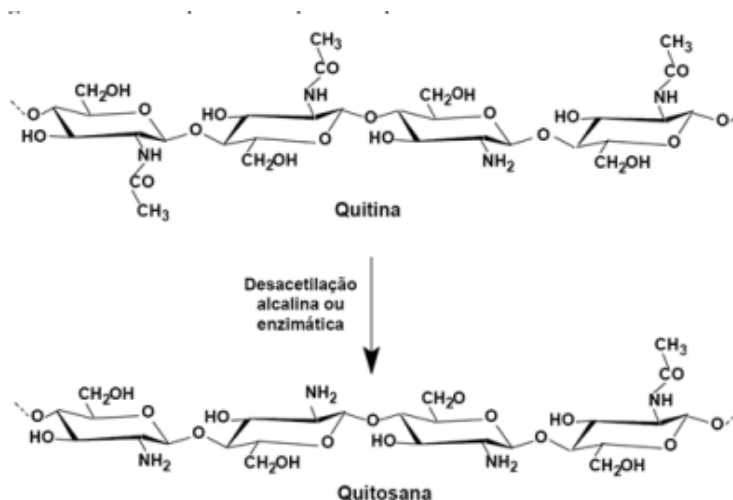


Fonte: Schaffazick *et al.* (2003).

3.4 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero natural abundante, obtido a partir do processo de desacetilação alcalina ou enzimática da quitina, presente no exoesqueleto de crustáceos, sendo marcada pela estrutura linear de β -(1-4) ligada à D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (Figura 7). Ela apresenta diversas características, como atoxidade, poder de adsorção, alta viscosidade, insolubilidade em água e solventes orgânicos, alto poder quelante e complexante, condutividade iônica, solubilidade em soluções ácidas aquosas diluídas e atua como um agente floculante ao interagir com moléculas carregadas negativamente, além de ser totalmente biodegradável. (Zargar; Asghari; Dashti, 2015; Nilsen-Nygaard *et al.*, 2015).

Figura 7 – Estrutura química da quitina e da quitosana.



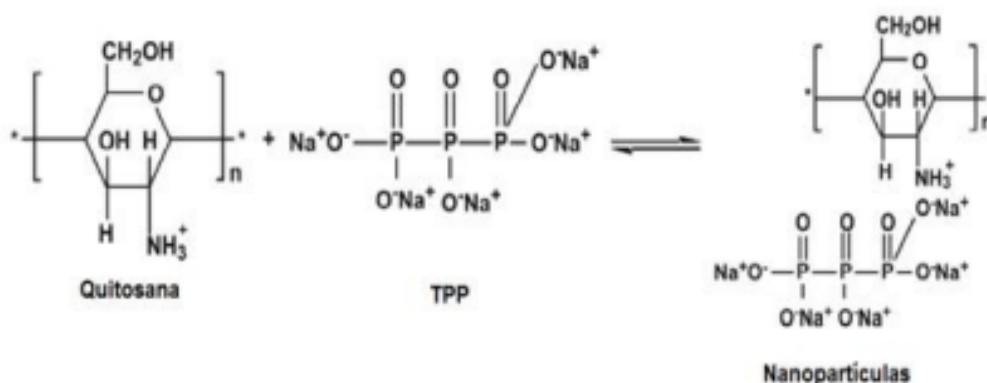
Fonte: Oliveira Júnior (2006).

Além disso, este polímero possui propriedade cicatrizante e antimicrobiana, sendo fungistático e fungicida. Isso se explica pela presença de grupamentos amino em sua estrutura que, em contato com os fluidos fisiológicos, são protonados e se conectam aos grupos aniônicos dos microrganismos, ocasionando a aglutinação das células microbianas e no bloqueio do crescimento (Ravi Kumar, 2000). Outra importante característica biológica da quitosana é o seu potencial de contribuir para a cicatrização de lesões, pois possui a capacidade de ativar os macrófagos, células que atuam de forma direta na resposta imune do organismo frente a qualquer estímulo agressor físico, químico ou bacteriano (Castro *et al.*, 2004).

3.5 GELIFICAÇÃO IÔNICA

A gelificação ionotrópica é um método amplamente utilizado para microencapsulação de um princípio ativo, devido às condições brandas, sem haver aplicação de solventes orgânicos tóxicos, calor ou agitação vigorosa, de modo que torna o processo menos custoso e mais biocompatível (De Carvalho *et al.*, 2019). Este processo inclui a incorporação de uma fase alcalina contendo o TPP, pequeno íon com carga tripla negativa, em uma fase ácida contendo a quitosana. As nanopartículas são formadas de forma espontânea após estabelecimento das ligações inter e intramoleculares formadas entre os fosfatos do TPP e os grupos amino protonados da quitosana ($-\text{NH}_3^+$), como mostra a figura 8 (Aouada, 2009).

Figura 8 – Gelificação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio.



Fonte: Adaptado de Zhao *et al.* (2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Para o desenvolvimento das nanopartículas e validação do método analítico, foram utilizados: quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich®), tripolifosfato de Sódio (TPP), padrão secundário de itraconazol (Waming®, China), pellets de itraconazol (Copervet®, Índia), ácido acético glacial (Êxodo Científica®), membrana filtrante de 0,45 µm (Chromafil® Xtra PVDF), Seringa de vidro Luer Slip Arti Glass (10 mL), agulha hipodérmica estéril de uso único (0,8 x 30 mm), metanol (grau HPLC, Dinâmica®), acetonitrila, ácido fórmico (Êxodo Científica®), água ultra purificada (Milli-Q®).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Estudo de compatibilidade físico-químico

4.2.1.1 Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise por FTIR, avaliou-se as amostras puras de cada componente das nanopartículas, assim como as misturas binárias e ternárias preparadas na proporção 1:1 (m/m), combinando itraconazol (pellets) quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP). O espectro na faixa do infravermelho foi registrado utilizando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Ethiktechnology, Ethik 400). As medições empregaram a técnica de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco, considerando a média de 10 varreduras entre 4000 e 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros gerados pelo FTIR foram comparados com aqueles já descritos na literatura.

4.2.2 Desenvolvimento e validação do método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

4.2.2.1 Parâmetros cromatográficos

A análise por CLAE-DAD das soluções de Itraconazol foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador

automático (SIL- 20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0. Realizou-se a análise em triplicata e inicialmente nas seguintes condições cromatográficas: a fase estacionária utilizada foi uma coluna Supelco® C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm (Purospher® STAR RP-18 endcapped - Hibar RT). O desenvolvimento da validação analítica se baseou na metodologia descrita por Kolimi *et al.* (2022).

A escolha da fase móvel foi realizada por meio da mistura de solventes constituídos por acetonitrila e água acidificada 0,1% v/v (ácido fórmico + água ultrapurificada), numa proporção fixa de 80:20 v/v (método isocrático), pH 4,0, utilizando-se metanol para solubilizar as amostras. As soluções das amostras e de estoque foram preparadas no momento da sua utilização, sendo acomodadas na coluna Puroshper Star ® - N° 331600. As condições de operação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições cromatográficas utilizadas para a validação do itraconazol.

Parâmetros cromatográficos	
Coluna	Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila/água acidificada 0,1% v/v (80:20), pH 4,0 - eluição isocrática
Vazão	1,2 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25° C
Comprimento de onda	261 nm
Tempo de corrida	10 min

Fonte: Autoral (2025).

4.2.2.2 Validação da metodologia analítica

O método analítico foi validado de acordo com os critérios exigidos pela Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE 166/2017 (Brasil, 2017), em que os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez, tendo como finalidade atestar a eficiência do método.

4.2.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre os perfis cromatográficos do padrão e pellet de ITZ com a fase móvel (sem adição dos fármacos), visando analisar a existência de possíveis constituintes capazes de interferir no tempo de retenção do itraconazol. Para isso, foram injetadas amostras de metanol (grau HPLC, Dinâmica®), soluções do padrão analítico e dos pellets comerciais de ITZ a 40 µg/mL, a partir da solução-mãe. Todas as soluções foram preparadas em triplicata, empregando-se metanol como solvente, filtradas em membrana de 0,45 µm (Chromafil® Xtra PVDF) acoplada à seringa e acomodadas em vials de 1,5 mL. O parâmetro da seletividade foi analisado mediante a sobreposição dos cromatogramas obtidos em relação aos tempos de retenção e espectros de ultravioleta (UV) das substâncias.

4.2.2.2.2 Linearidade

Conforme a RDC nº 166 de 2017, para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 concentrações diferentes da SQR para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. Assim, a avaliação da linearidade contemplou a construção de curvas de calibração tanto para o padrão quanto para os pellets de itraconazol. Dessa maneira, preparou-se duas soluções-mãe (na concentração de 100 µg/mL), uma contendo o itraconazol na forma de pellet e outra contendo o padrão analítico de itraconazol, dissolvendo-os em metanol grau HPLC, sendo estas submetidas a 5 minutos de homogeneização em banho ultrassônico. Para a construção da curva de linearidade do itraconazol, estabeleceram-se sete níveis de concentração, preparados em triplicata, na faixa de 10 a 70 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Variação da concentração dos 7 pontos para a determinação da linearidade.

Solução	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Solução-mãe (mL)	Metanol grau HPLC (mL)
1	10 $\mu\text{g/mL}$	1	9
2	20 $\mu\text{g/mL}$	2	8
3	30 $\mu\text{g/mL}$	3	7
4	40 $\mu\text{g/mL}$	4	6
5	50 $\mu\text{g/mL}$	5	5
6	60 $\mu\text{g/mL}$	6	4
7	70 $\mu\text{g/mL}$	7	3

Fonte: Autoral (2025).

Em seguida, houve filtração de cada solução em membrana filtrante de 0,45 μm (Chromafil® Xtra PVDF) e procedeu-se às injeções das soluções em cromatógrafo a líquido. A curva de calibração foi construída a partir dos valores médios das áreas dos picos cromatográficos em função das concentrações. Os resultados foram tratados por meio da apresentação da equação da reta de regressão linear de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados para obtenção do coeficiente de determinação (R^2). Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

4.2.2.2.3 Limite de Detecção

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da menor concentração da faixa da linearidade (10 $\mu\text{g/mL}$) até a menor concentração detectável do analito. O resultado foi comparado ao limite de quantificação determinada pela curva de linearidade pela equação 1:

$$LD = 3,3 \cdot \left(\frac{DPy}{IC}\right) \quad (1)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração e DPy o desvio padrão do intercepto com o eixo y.

4.2.2.2.4 Limite de Quantificação

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da amostra com maior e menor concentração da curva de linearidade do itraconazol. Assim, foi determinada a menor e a maior amostra que manteve a linearidade da curva dentro do critério de aceitação de linearidade, coeficiente de determinação (R^2) igual ou superior a 0,990. O limite de quantificação inferior foi comparado ao resultado determinado pela curva de linearidade do ITZ pela equação 2:

$$LQ = 10 \cdot \left(\frac{DPy}{IC}\right) \quad (2)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração e DPy o desvio padrão do intercepto com o eixo y.

4.2.2.2.5 Precisão

Para a avaliação da precisão do método analítico, foram realizados ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária, considerando-se as mesmas condições operacionais e instrumentais, bem como uma única corrida analítica para ambas as amostras avaliadas, seguindo critérios estabelecidos pela RDC n° 166 de 2017.

No ensaio de repetibilidade, foram preparadas individualmente seis soluções de itraconazol, a partir da solução-mãe contendo itraconazol, na concentração média estabelecida a partir do estudo de linearidade do método (40 µg/mL), utilizando metanol grau HPLC como solvente. Procedeu-se às injeções das soluções no CLAE-DAD, previamente filtradas em filtros de 0,45 µm (Chromafil® Xtra PVDF), registrando-se os valores das áreas dos picos cromatográficos e calculando-se a estimativa do desvio padrão das determinações.

No ensaio de precisão intermediária, as amostras foram preparadas na mesma concentração por analistas diferentes e em dias distintos, com o objetivo de avaliar a concordância entre os resultados obtidos. Os resultados da precisão devem ser apresentados de acordo com a dispersão dos resultados, calculando-se o desvio

padrão relativo (DPR), conforme a Equação 3, onde DP é o desvio padrão da série de medições e CMD é a concentração média determinada.

$$DPR (\%) = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100\% \quad (3)$$

4.2.2.2.6 Exatidão

Segundo a RDC n° 166 de 2017, a exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível. Assim, a exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, onde foram preparadas, em triplicata, soluções de itraconazol, utilizando-se metanol grau HPLC como solvente. Volumes apropriados da solução-mãe (100 µg/mL) com o itraconazol foram utilizados para obtenção de três níveis de concentração na amostra, a saber: 10,0; 40,0 e 70,0 µg/mL. Foram feitas três determinações para cada concentração e calculadas as percentagens de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra (% R), a partir da Equação 4:

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

4.2.2.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante o preparo de soluções de itraconazol em triplicata, utilizando-se metanol grau HPLC como solvente, na concentração média de 40 µg/mL, que, após terem sido filtradas em filtros de 0,45 µm, foram injetadas no cromatógrafo. Porém, para verificar a reprodutibilidade do método frente a variações nas condições experimentais, este tipo de ensaio foi analisado por meio da alteração da composição da fase móvel, substituindo-se água acidificada (com ácido fórmico) por água ultrapura.

4.2.2.2.8 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). A análise estatística consistiu na

comparação entre múltiplos grupos de estudo por meio de ANOVA oneway com pós teste *t-student* no software Prism® 5 (EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram elaborados e analisados com o auxílio do software Origin® 8.5.

4.2.3 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas

4.2.3.1 Preparação das nanopartículas

As nanopartículas de quitosana foram preparadas com base no método de gelificação iônica entre o polímero quitosana e o sal tripolifosfato de sódio (TPP), conforme metodologia descrita por Hassanen e Colaboradores (2022). Para tanto, preparou-se uma solução estoque de quitosana de baixo peso molecular a 0,2% (m/v) solubilizada em ácido acético a 1% (v/v) sob agitação magnética, em temperatura ambiente, a 600 rotações por minuto (rpm), por aproximadamente 24 horas. Após a fase de agitação, o pH da solução de quitosana foi ajustado para 5,0 com a adição de uma solução de NaOH a 10 N. Posteriormente, a solução foi filtrada através de uma membrana de 0,45 μm (Chromafil® Xtra PVDF) para remover quaisquer impurezas macroscópicas. Em seguida, foi preparada uma solução aquosa de TPP (0,1% m/v), tendo seu pH alcalino mantido em 8,9.

Para a preparação das nanopartículas não carregadas com a substância ativa (NP0), um volume de 10 mL da solução aquosa de TPP (concentração de 0,1% m/v) foi injetado através de uma seringa de vidro acoplada a uma agulha hipodérmica estéril (0,8 x 30 mm) na solução de quitosana (10 mL), sob agitação magnética constante de 800 rpm, por aproximadamente 30 minutos, considerando-se a proporção final do nanossistema de 1:1 (quitosana-TPP).

Para a preparação das nanopartículas carregadas com a substância ativa (NP1 e NP2), o itraconazol foi incorporado à solução de quitosana previamente filtrada e submetido a agitação magnética constante a 800 rpm até que ocorresse a completa dissolução. Foram utilizadas duas proporções distintas de quitosana-itraconazol, estas sendo de 16:1 (NP1) e 20:1 (NP2), conforme mostra a tabela 3. A elaboração das nanopartículas de quitosana-TPP carregadas com o fármaco seguiu o mesmo método aplicado às nanopartículas não carregadas,

seguindo os parâmetros estabelecidos com base nas condições ótimas encontradas para as nanopartículas não carregadas.

Tabela 3 – Desenvolvimento das nanopartículas não-carregadas e carregadas com o ITZ.

Nanopartícula	Proporção (QTS:ITZ)	Solução de QTS 0,2% m/v (mL)	Solução de TPP 0,1% m/v (mL)	ITZ (mg)
NP0	-	10	10	-
NP1	16:1	10	10	1,25
NP2	20:1	10	10	1

Fonte: Autoral (2025).

4.2.3.2 Caracterização físico-química do sistema nanoparticulado

4.2.3.2.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta foram determinados, utilizando-se um Zetasizer (ZEN 3690, Malvern Instruments®). O tamanho das partículas e o PDI foram analisados utilizando a técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), enquanto o potencial zeta foi determinado por meio de microeletroforese a laser Doppler. As nanopartículas não carregadas (NP0) e carregadas com o fármaco (NP1 e NP2) foram diluídas em água ultrapura até atingir uma concentração adequada para as medições, sendo que a diluição utilizada foi de 1:100, com o objetivo de evitar efeitos de múltipla dispersão. Aproximadamente 1 mL de cada amostra foi transferido para cubetas de poliestireno, e as medições foram realizadas a 25°C, com ângulo de detecção de 90° e comprimento de onda de 633 nm. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, registrando-se três leituras independentes por amostra.

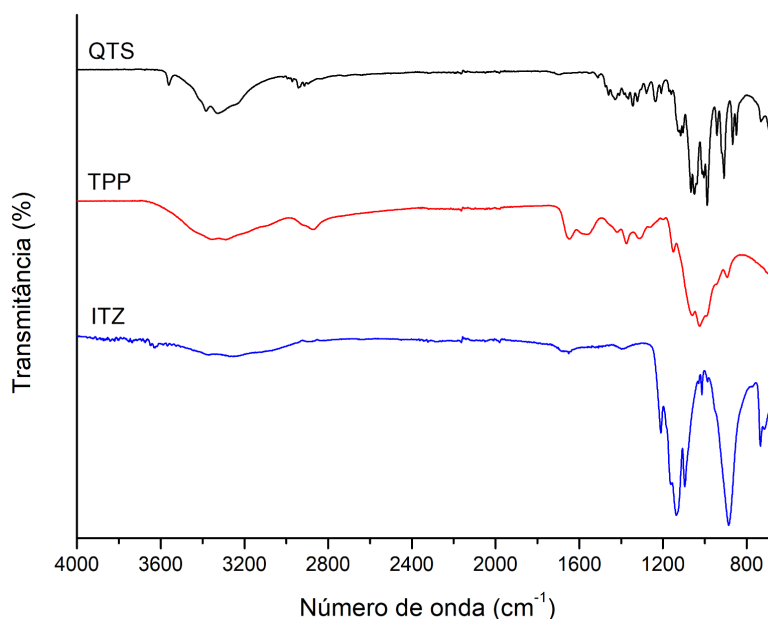
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICO

5.1.1 Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR foi empregada para avaliar as interações moleculares e compatibilidade entre os componentes da nanopartícula, isoladamente, e em associação com o fármaco (na proporção 1:1:1), como mostram as figuras 9 e 11.

Figura 9 – Espectro de infravermelho dos componentes isolados da nanopartícula.



Legenda: Quitosana (QTS); Tripolifosfato de sódio (TPP); Itraconazol (ITZ).

Fonte: Dados da Pesquisa.

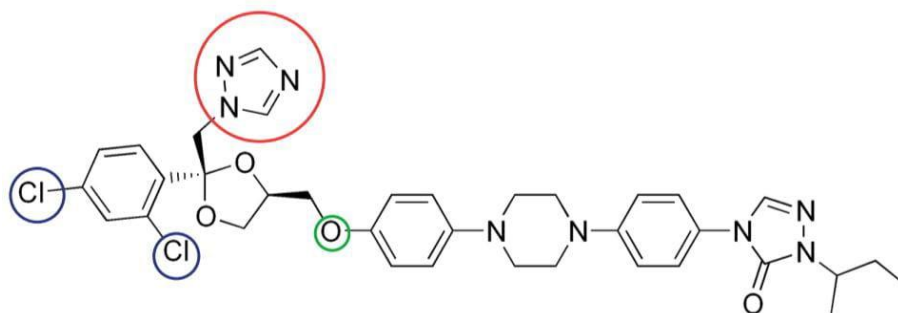
O espectro de FTIR da quitosana exibe bandas típicas de um polissacarídeo parcialmente desacetilado. Nota-se uma banda ampla na faixa de 3400–3200 cm⁻¹, atribuída ao estiramento das ligações O–H, com contribuição do estiramento N–H. As bandas localizadas em 2920 e 2870 cm⁻¹ correspondem aos estiramentos C–H de cadeias alifáticas. Na região de aproximadamente 1650 cm⁻¹ observa-se a presença da banda de amida primária, associada ao estiramento C=O de grupos acetil remanescentes. Já a banda em torno de 1590 cm⁻¹ é atribuída à amida

secundária, relacionada à flexão N–H e ao estiramento C–N. Outras absorções características incluem a deformação O–H em 1420 cm^{-1} , a vibração da ligação C–O–C em 1150 cm^{-1} e os estiramentos C–O observados em 1080 e 1025 cm^{-1} . Esses resultados corroboram a estrutura polimérica característica da quitosana (Hadidi *et al.*, 2023).

O tripolifosfato de sódio (TPP), por sua vez, apresenta um espectro de FTIR caracterizado principalmente pelas vibrações dos grupos fosfato. Observa-se, na região entre 3200 e 3600 cm^{-1} , uma banda associada aos estiramentos O–H, possivelmente relacionada à presença de umidade adsorvida. As bandas de maior intensidade situam-se na faixa de 1250 a 850 cm^{-1} , sendo atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação P=O ($1250\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$), bem como aos estiramentos das ligações P–O–P e P–O⁻ ($1120\text{--}850\text{ cm}^{-1}$). Essas absorções estão de acordo com a assinatura espectroscópica típica de sais fosfatados, conforme descrito na literatura (Yu *et al.*, 2023).

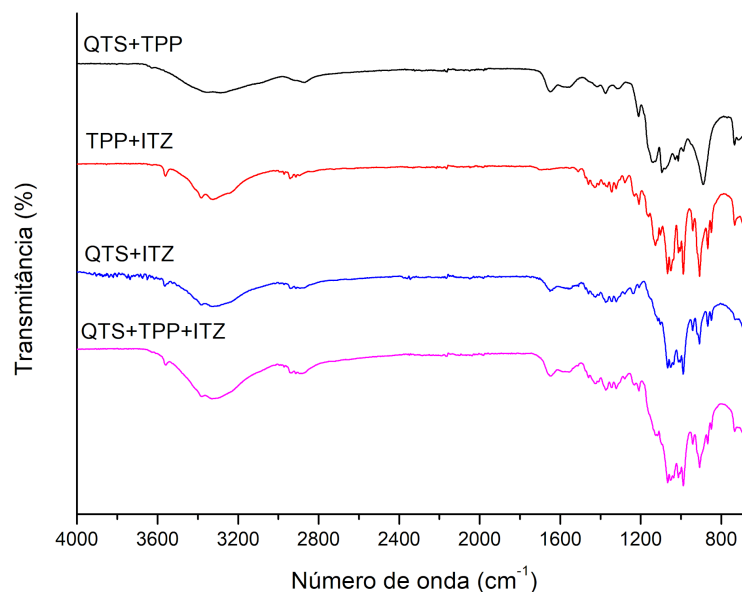
Já o espectro FTIR do itraconazol (pellets comerciais) destaca bandas intensas e bem definidas de C=C e C=N (iminas) dos anéis aromáticos e heterocíclicos nas regiões de $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ e $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. As bandas de absorção entre 1250 e 1000 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações C–O, associadas aos grupos éter presentes na estrutura do fármaco. Já as absorções localizadas na região de 800 a 600 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento C–Cl, características de compostos aromáticos clorados, comprovando a estrutura química do itraconazol, como mostra a figura 10 (Silverstein; Webster; Kiemle, 2005).

Figura 10 – Estrutura química do itraconazol com seus principais grupos funcionais.



Fonte: Adaptado do Google.

Figura 11 – Espectro de infravermelho das misturas binárias e ternárias da nanopartícula.



Legenda: Quitosana (QTS); Tripolifosfato de sódio (TPP); Itraconazol (ITZ).

Fonte: Dados da Pesquisa.

A mistura binária composta por quitosana e TPP apresenta um espectro resultante da interação entre os dois componentes em relação aos espectros individuais. A banda larga em cerca de $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ teve um alargamento e leve deslocamento. Isso pode estar atribuído aos estiramentos O-H e N-H da quitosana, indicando a formação de interações intermoleculares (especialmente ligações de hidrogênio). As bandas características dos grupos fosfato do TPP, na região de $1250\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, apresentaram redução de intensidade e leve deslocamento, devido às interações eletrostáticas entre os grupos amônio protonados da quitosana (--NH_3^+) e os grupos fosfato carregados negativamente do TPP. Essas modificações comprovam a reticulação polimérica característica da preparação das nanopartículas (Das *et al.*, 2019).

No espectro da mistura binária TPP+ITZ, é possível observar a presença das bandas características do TPP e do itraconazol. As bandas intensas relacionadas aos estiramentos P=O e P–O–P do TPP ($1250\text{--}850\text{ cm}^{-1}$) permanecem perceptíveis, mas com alterações na intensidade. Já as bandas características do ITZ, especialmente aquelas associadas aos estiramentos C–O ($1250\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) e às vibrações C–Cl ($800\text{--}600\text{ cm}^{-1}$), também podem ser observadas, embora parcialmente sobrepostas às bandas do TPP. Assim, a ausência de novas bandas

sugere que a interação entre TPP e ITZ ocorre por forças físicas fracas, como ligações de hidrogênio, sem formação de novas ligações covalentes.

O espectro da mistura binária entre a QTS e o ITZ apresenta alterações na banda larga de 3400–3200 cm^{-1} , indicando interações entre os grupos hidroxila e amina da quitosana e os grupos funcionais do itraconazol. Ainda, é possível observar a presença das bandas características do ITZ na região de 1250–800 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos C–O e às vibrações C–Cl, sobrepostas às bandas da quitosana. A redução da intensidade e o leve deslocamento dessas bandas sugerem que o ITZ está fisicamente incorporado à matriz de quitosana, possivelmente por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, sem alteração significativa de sua estrutura química.

No espectro da mistura ternária (QTS + TPP + ITZ), há algumas mudanças que podem ser observadas. A banda de absorção em 3400–3200 cm^{-1} torna-se ainda mais alargada e menos intensa, sugerindo um aumento das interações intermoleculares entre as substâncias. As bandas dos grupos fosfato do TPP (1250–850 cm^{-1}) apresentam deslocamentos e redução de intensidade, enquanto as bandas características do ITZ permanecem evidentes, embora estejam sobrepostas. Com isso, pode-se sugerir que o itraconazol está incorporado à matriz polimérica de quitosana-TPP por interações eletrostáticas estáveis. Essas alterações espectrais podem até indicar a presença do fármaco na matriz polimérica, mas não garantem totalmente que houve uma associação efetiva. Por isso, é importante realizar técnicas complementares, como a eficiência de encapsulação.

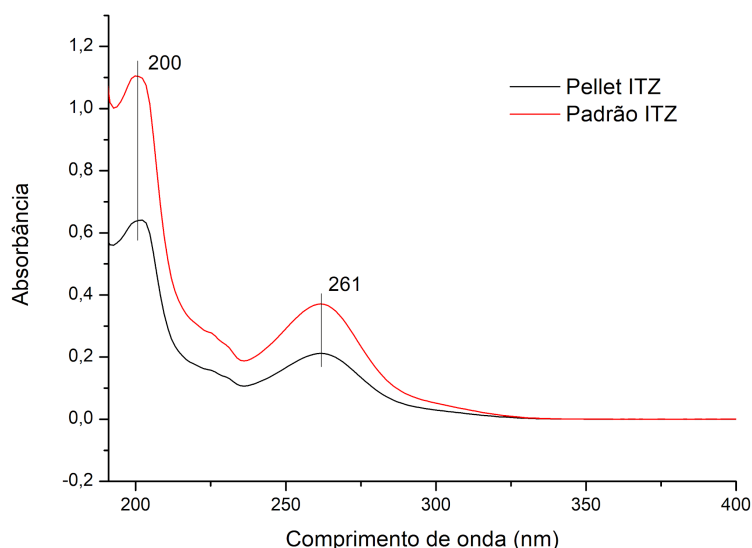
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

5.2.1 Seletividade

Para a confirmação da identidade do ITZ, ao verificar a varredura do espectro de UV-visível pelo DAD do pico do padrão de ITZ e do pellet, ambos os perfis de absorção apresentaram valores máximos (λ máx) em 200 e 261 nm no espectro de ultravioleta (figura 12), optando-se pela utilização do comprimento de onda de 261 nm para a quantificação do itraconazol. Isso porque trata-se de uma região espectral menos suscetível à interferência de solventes e componentes da matriz, além de

apresentar maior estabilidade do sinal e melhor relação sinal/ruído quando comparada à região próxima de 200 nm. Dessa forma, o comprimento de onda de 261 nm mostrou-se mais adequado para fins de análise quantitativa por CLAE-DAD.

Figura 12 – Espectro de UV referente ao padrão e pellet de ITZ.



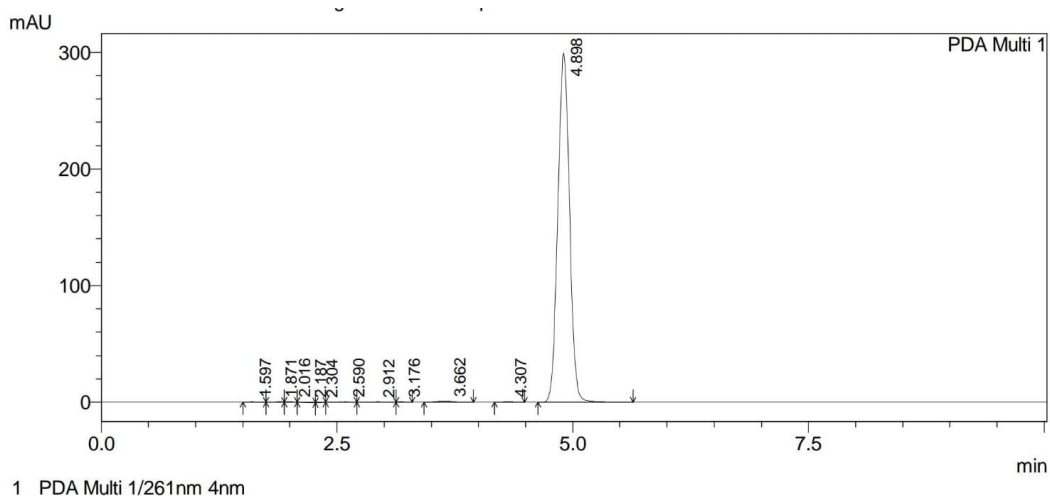
Fonte: Dados da Pesquisa.

No cromatograma referente ao padrão de itraconazol, observa-se um pico bem definido, simétrico e de elevada intensidade, com tempo de retenção de 4,898 min a 261 nm. A ausência de picos relevantes coeluinto nesse mesmo tempo de retenção indica que o sinal obtido é específico para o itraconazol, conforme apresentado na Figura 13.

De forma semelhante, o cromatograma do pellet apresentou um pico intenso no tempo de retenção de 4,895 min, coincidente com o observado para o padrão (Figura 14). Embora sejam visualizados outros picos de baixa intensidade em diferentes tempos de retenção, não há coeluição com o pico do itraconazol, indicando que os componentes da matriz não interferem na detecção do fármaco.

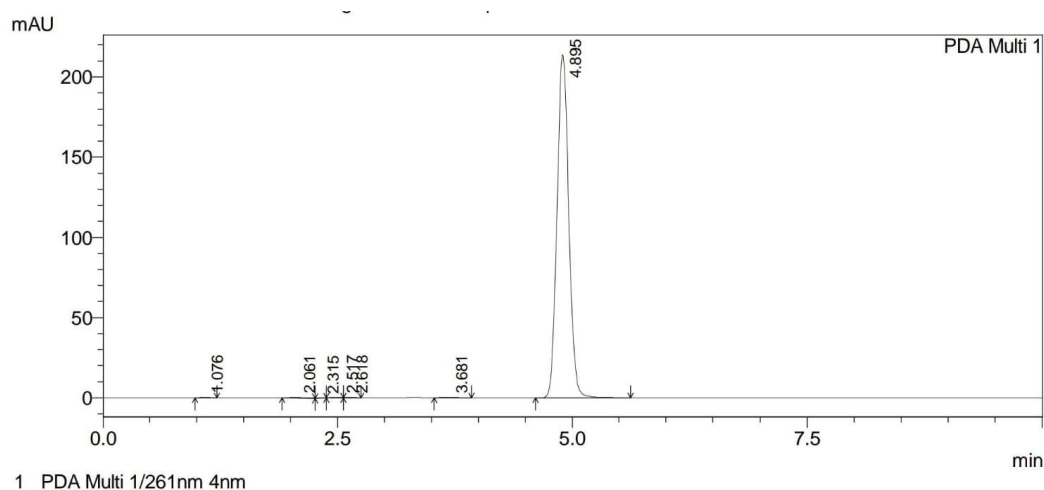
Assim, a comparação entre os cromatogramas demonstra a reprodutibilidade do tempo de retenção do itraconazol entre o padrão e o pellet, bem como a ausência de interferentes no tempo de eluição do analito, comprovando a seletividade do método e seu atendimento aos critérios estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 2017).

Figura 13 – Cromatograma da seletividade do método de CLAE-DAD com o padrão de ITZ.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 14 – Cromatograma da seletividade do método de CLAE-DAD com o pellet de ITZ.



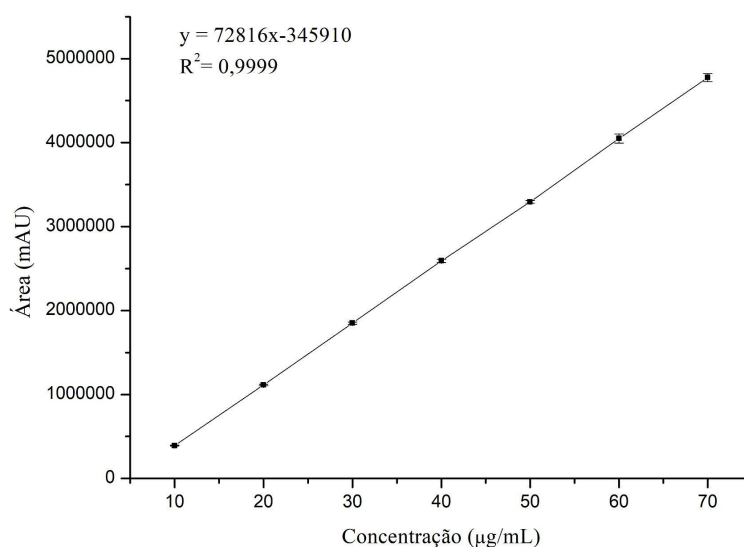
Fonte: Dados da Pesquisa.

5.2.2 Linearidade

Os parâmetros do método de linearidade foram determinados tanto para o padrão analítico do itraconazol, quanto para a formulação comercial em pellets, com o objetivo de estabelecer uma relação de concordância entre a concentração calculada e a área do pico cromatográfico, demonstrando que existe uma relação proporcional entre estas duas variáveis para ambas as amostras analisadas. As curvas de linearidade, bem como as equações da reta de regressão (de y em x) para cada um dos intervalos de concentrações determinadas, estão apresentadas nas Figuras 15 e 16. A análise por regressão linear, utilizando o método dos mínimos

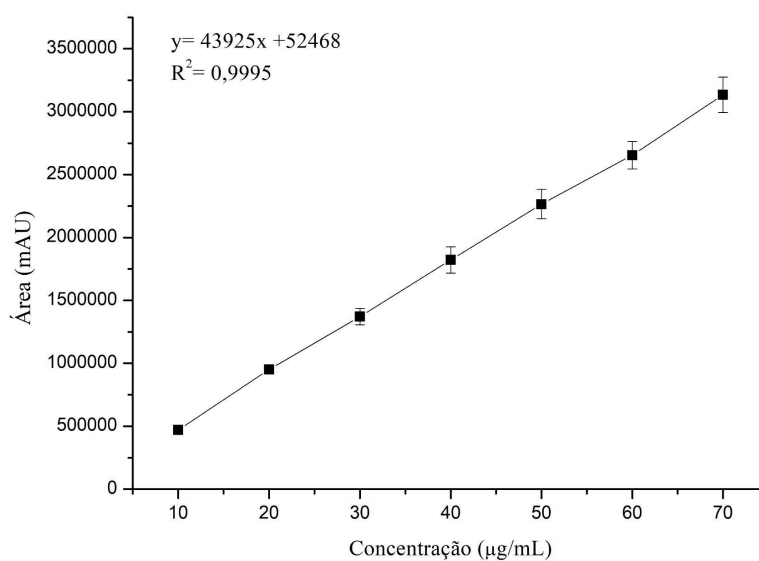
quadrados, revelou que o coeficiente de determinação (R^2) dos dados das duas curvas de calibração (padrão e pellet) apresentou valor superior a 0,990, atendendo aos critérios exigidos pela legislação brasileira.

Figura 15 – Representação gráfica da linearidade do padrão analítico de ITZ.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 16 – Representação gráfica da linearidade dos pellets de ITZ.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Com o objetivo de verificar estatisticamente a existência de uma possível relação linear entre a concentração e a absorvância no estudo de linearidade, empregou-se a análise de variância da regressão para avaliar a significância do modelo, utilizando a estatística t de *Student* para o teste das hipóteses. As hipóteses analisadas consistem na hipótese nula (H_0), que pressupõe a ausência de correlação linear significativa entre concentração e absorvância, e na hipótese alternativa (H_1), que indica a presença de correlação linear entre as variáveis. A ANOVA da regressão utilizada está apresentada nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Análise de variância da linearidade do padrão de ITZ.

Fonte	GL	SQ	MQ	Fc	Ft	Valor-P
Modelo	1	$4,4539 \times 10^{13}$	$4,4539 \times 10^{13}$	44.582,3	4,38	< 0,0001
Resíduo	19	$1,8981 \times 10^{10}$	$9,9902 \times 10^8$	-		-
Falta de ajuste	5	$6,5900 \times 10^9$	$1,3180 \times 10^9$	1,49	2,96	0,2552
Erro puro	14	$1,2391 \times 10^{10}$	$8,8509 \times 10^8$	-		-
Total	20	$4,4558 \times 10^{13}$	-	-		-

*GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática dos resíduos; MQ: média dos quadrados.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 5 – Análise de variância da linearidade do pellet de ITZ.

Fonte	GL	SQ	MQ	Fc	Ft	Valor-P
Modelo	1	$5,374 \times 10^{12}$	$5,374 \times 10^{12}$	$8,2 \times 10^3$	4,38	< 0,0001
Resíduo	19	$1,24 \times 10^{10}$	$6,51 \times 10^8$	-	-	-
Falta de ajuste	5	$9,10 \times 10^9$	$1,82 \times 10^9$	2,9	2,96	> 0,05
Erro puro	14	$3,33 \times 10^9$	$2,38 \times 10^8$	-	-	-
Total	20	$5,386 \times 10^{12}$	-	-	-	-

*GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática dos resíduos; MQ: quadrado média dos quadrados.

Fonte: Dados da Pesquisa.

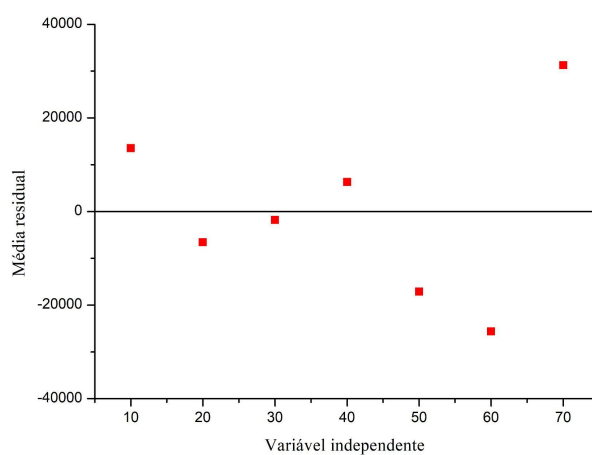
Assim, em ambas as análises, o modelo apresentou valor de F calculado (Fc) muito superior ao F tabelado (Ft) e o valor p menor que (0,05 – nível de significância). Assim, a hipótese nula (H_0) foi rejeitada, evidenciando que há uma correlação linear entre a absorbância e concentração do itraconazol, concluindo que a curva em estudo é linear. A avaliação da adequação e a significância estatística do modelo linear, por meio do teste de falta de ajuste, consideram válidos os princípios de normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos. Em relação ao nível de significância de 5%, o valor de F calculado foi inferior ao F tabelado, indicando ausência de falta de ajuste significativa e comprovando a adequação do modelo linear. Além disso, a análise de variância evidenciou que a regressão é estatisticamente significativa.

A distribuição F é utilizada para avaliar a significância global da regressão, enquanto a distribuição t é empregada na análise da significância dos coeficientes da reta. A significância do coeficiente angular foi avaliada por meio do teste t de Student. O valor de t calculado foi superior ao valor de t tabelado ($\alpha = 0,05$), permitindo rejeitar a hipótese nula e confirmando que o coeficiente angular de

ambas as retas é significativamente diferente de zero, em concordância com os resultados obtidos na análise de variância da regressão ($p < 0,05$).

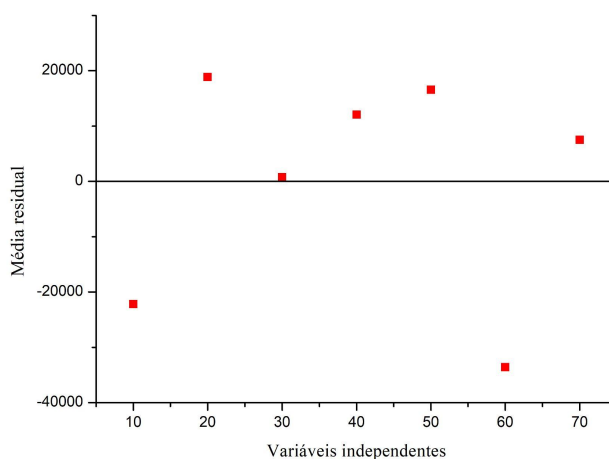
A homocedasticidade da dispersão dos resíduos referentes aos dados de linearidade, a qual indica que os erros se mantiveram constantes ao longo dos ensaios, é apresentada nas Figuras 17 e 18. Nesses gráficos, observa-se a distribuição dos pontos em torno do valor zero, evidenciando que os erros ocorreram de forma aleatória e independente, o que contribui para a confiabilidade do método.

Figura 17 – Gráfico de dispersão de resíduos do padrão de ITZ.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 18 – Gráfico de dispersão de resíduos do pellet de ITZ.



Fonte: Dados da Pesquisa.

5.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) diz respeito à obtenção da menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada e diferenciada do ruído, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, sob condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

O LD e LQ podem ser determinados a partir da análise de soluções e concentrações conhecidas e decrescentes do analito de interesse, até atingir os níveis mínimos detectável e quantificável. Esses parâmetros podem ser estabelecidos a partir de 3 métodos diferentes: método visual, método de relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica. No presente estudo, para a análise espectrofotométrica do itraconazol, utilizou-se o método baseado na curva analítica, considerando-se a equação da reta obtida no estudo de linearidade. A partir dessa equação, foram utilizados o desvio padrão do intercepto e a inclinação da reta da curva analítica do ITZ para o cálculo do LD e do LQ. Dessa forma, obtiveram-se valores de 1,8678 µg/ml para o LD e 5,66 µg/mL para o LQ.

5.2.4 Precisão

Os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária estão expressos em conteúdo de soluções de ITZ (µg/mL), nas tabelas 6 e 7 a seguir. Cada uma das 6 amostras das soluções de ITZ (na concentração de 40 µg/mL) foram preparadas de forma individual para as respectivas análises, de acordo com as determinações da RDC 166/2017. Para o ensaio de repetibilidade, as soluções do ITZ a 40 µg/mL apresentaram concentração média de 46,33 µg/mL de ITZ, com desvio padrão relativo de 0,95%, entre as 6 amostras analisadas, mostrando a precisão na obtenção de resultados muito próximos entre si (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade.

Amostra	1	2	3	4	5	6	Média	DP	DPR (%)
Repetibilidade	46,22	46,55	46,66	45,52	46,30	46,70	46,33	0,44	0,95

DP: Desvio padrão. DPR: Desvio padrão relativo. *Valores da concentração em média por µg/mL.

Fonte: Dados da pesquisa.

Ademais, a avaliação da precisão intermediária, com base nas respostas analíticas obtidas, demonstrou que não foram verificados valores de DPR superiores a 5% (Tabela 7). As análises estatísticas mostram que não houve diferenças significativas entre as médias obtidas pelos diferentes analistas, evidenciando que as condições operacionais do sistema cromatográfico, a atuação de distintos operadores, os procedimentos de preparo das soluções e a variabilidade intradia não influenciaram de forma significativa os resultados. Dessa forma, o desvio padrão relativo para repetibilidade e precisão intermediária indicou que a precisão do método foi satisfatória.

Tabela 7 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermediária.

Amostra	1	2	3	4	5	6	Média	DP	DPR (%)
Repetibilidade – Analista 1	46,22	46,55	46,66	45,52	46,30	46,72	46,33	0,44	0,95
Repetibilidade – Analista 2	43,08	41,47	42,66	42,77	41,19	42,04	42,20	0,76	1,80

DP: Desvio padrão. DPR: Desvio padrão relativo. *Valores da concentração em média por µg/mL. p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida mediante o grau de concordância entre os resultados individuais estabelecidos pelo método em estudo em relação a um valor teórico, considerando a faixa de trabalho (80 a 120%) para determinação do teor (Brasil, 2017). Este método analítico foi calculado com base no percentual de recuperação, considerando a análise apenas das concentrações baixa, média e alta de ITZ (10, 40 e 70 µg/mL), em triplicata. Os resultados estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores referentes à exatidão do método analítico em CLAE-DAD para o itraconazol.

Concentração teórica de ITZ (µg/mL)	Amostra	Concentração experimental de ITZ (µg/mL)	Média	DPR (%)	Taxa de recuperação (%)
10	1	9,54	9,57	0,67	95,7
	2	9,64			
	3	9,52			
40	1	41,49	41,58	1,03	103,9
	2	41,20			
	3	42,04			
70	1	68,77	68,42	0,66	97,7
	2	68,58			
	3	67,92			

Fonte: Dados da pesquisa.

As taxas de recuperação obtidas para o ITZ, nas concentrações avaliadas, variaram entre 95,7% e 103,9%, enquanto os valores de desvio padrão relativo (DPR) permaneceram inferiores a 5% (Tabela 9). Com isso, os valores de desvio padrão relativo (DPR) demonstraram que a variabilidade das medições é controlada. De acordo com a RDC nº 166/2017, recuperações dentro da faixa de 80% a 120%, indicam que o método é preciso e exato para a quantificação do analito nas condições avaliadas.

5.2.6 Robustez

A robustez de um método analítico indica a sensibilidade que este apresenta frente às variações de parâmetros cromatográficos, tais como a concentração do solvente orgânico, fase móvel, pH, temperatura, substituição de coluna, entre outros. Dessa forma, considera-se que o método é robusto, quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, sem perder exatidão e precisão. Estas mudanças introduzidas avaliam as alterações que podem acontecer quando o método é transferido de equipamento, de laboratório ou até mesmo, de analista (Ribani *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi modificada a composição da fase

móvel, substituindo água acidificada (com ácido fórmico) por água ultrapura, o que, consequentemente, também alterou o pH (6,0).

Para o fator analisado no ensaio de robustez (alteração da composição da fase móvel), o baixo valor de desvio padrão relativo observado ($DPR < 5\%$) sugere que pequenas variações nas condições cromatográficas não influenciaram significativamente a resposta analítica, indicando adequada precisão e robustez do método para a quantificação do itraconazol. A taxa de recuperação foi de 104,4%, indicando adequada exatidão do método sob as condições avaliadas, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da robustez para a quantificação do itraconazol.

Concentração teórica de ITZ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental de ITZ ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DP	DPR (%)	Taxa de recuperação (%)
40	41,19	41,78	0,80	1,03	104,4
	41,48				
	42,67				

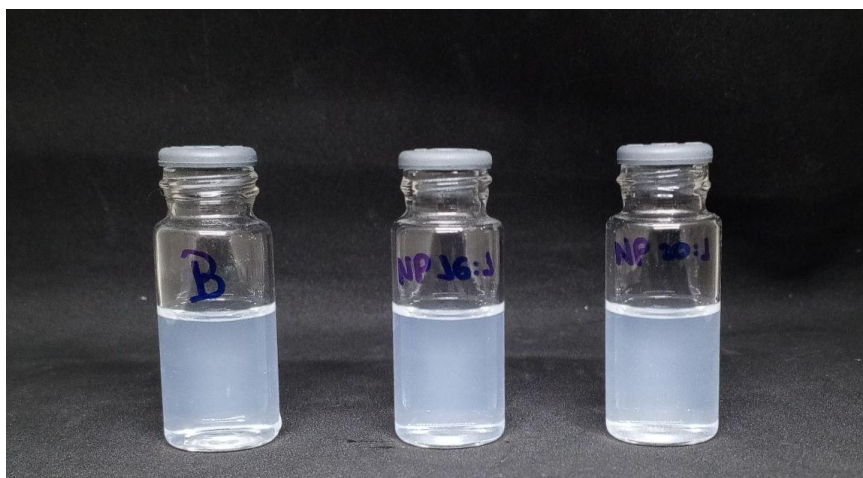
Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.3.1 Preparação das nanopartículas

Macroscopicamente, tanto a nanopartícula branca (NP0) quanto as nanopartículas contendo itraconazol (NP1 e NP2), nas proporções 16:1 e 20:1, apresentaram-se como suspensões homogêneas, com aspecto opalescente e ausência de precipitados visíveis (Figura 19). Esse comportamento é compatível com a formação de sistemas nanoparticulados obtidos pelo método de gelificação iônica, no qual a dispersão coloidal estável resulta em aparência opalescente característica.

Figura 19 – Nanopartículas (NP0, NP1 e NP2) após preparação.



Fonte: Dados da Pesquisa.

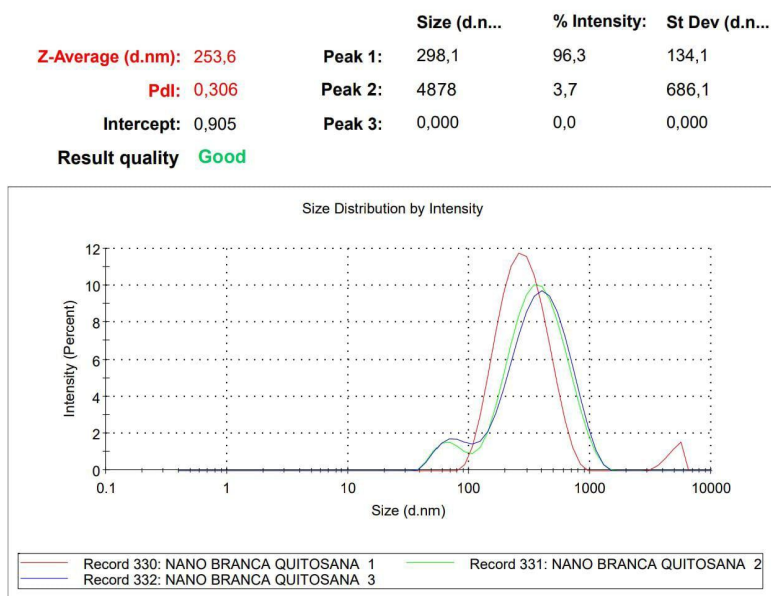
5.3.2 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

A caracterização físico-química é uma etapa fundamental no desenvolvimento de nanopartículas, tendo em vista que permite avaliar parâmetros que influenciam diretamente na estabilidade, aplicabilidade e eficácia da formulação. Dentre esses parâmetros, destacam-se o índice de polidispersão (PDI), tamanho das partículas e o potencial zeta, os quais fornecem informações cruciais sobre a uniformidade, dispersão e estabilidade eletrocinética do sistema coloidal (Santos *et al.*, 2021). A técnica de DLS fundamenta-se na análise do movimento browniano das partículas dispersas em meio líquido, sendo o tamanho hidrodinâmico estimado a partir da equação de Stokes-Einstein (Tosi *et al.*, 2020).

Na avaliação da nanopartícula branca (NP0), foi possível observar um tamanho médio de partícula (Z-Average) de 253,6 nm, valor que indica um tamanho moderado para um sistema nanoparticulado. O índice de polidispersão obtido foi de 0,306, valor que indica uma distribuição moderadamente polidispersa (Figura 20). Já na caracterização das nanopartículas contendo o princípio ativo (NP1 e NP2), a formulação na proporção QTS-ITZ 16:1 apresentou tamanho médio hidrodinâmico (Z-Average) de 174,4 nm, com um único pico de distribuição em 180,4 nm, evidenciando um perfil monomodal, além de índice de polidispersão (PDI) de 0,198 (Figura 21). A formulação de QTS-ITZ 20:1, por sua vez, exibiu tamanho médio

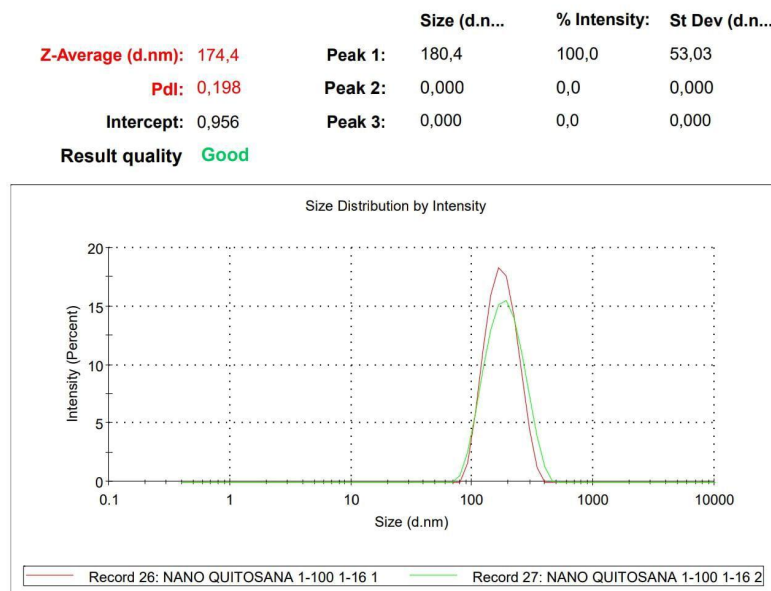
hidrodinâmico de 186,6 nm, com pico de distribuição em 196,9 nm, também apresentando um perfil monomodal, com PDI de 0,219 (Figura 22).

Figura 20 – Tamanho médio da gotícula e PDI avaliados pelo DLS para a NP0 (sem o ITZ).



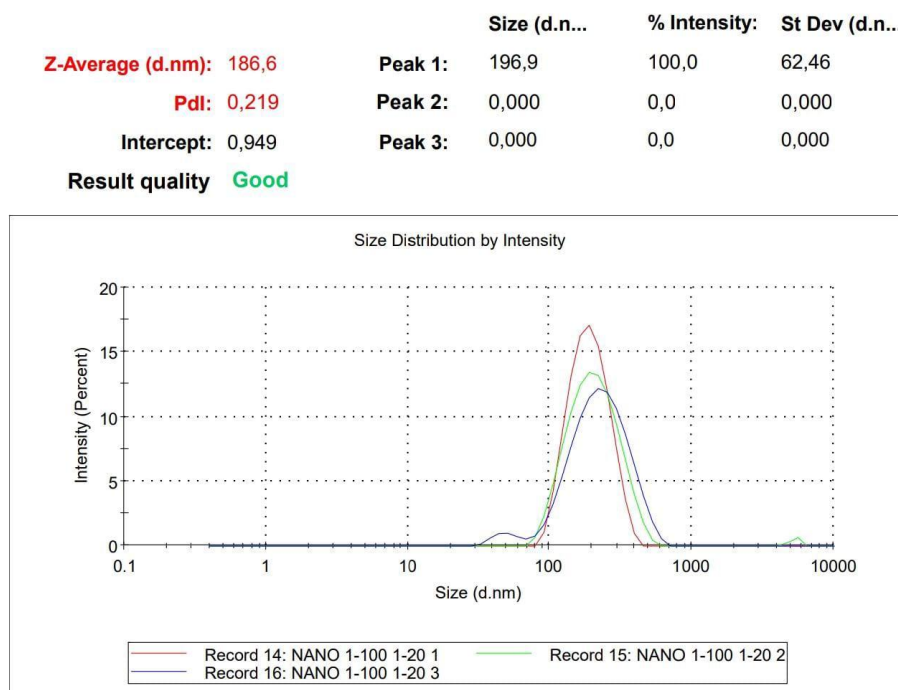
Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 21 – Tamanho médio da gotícula e PDI avaliados pelo DLS para a NP1 (proporção 16:1).



Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 22 – Tamanho médio da gotícula e PDI avaliados pelo DLS para a NP2 (proporção 20:1).



Fonte: Dados da Pesquisa.

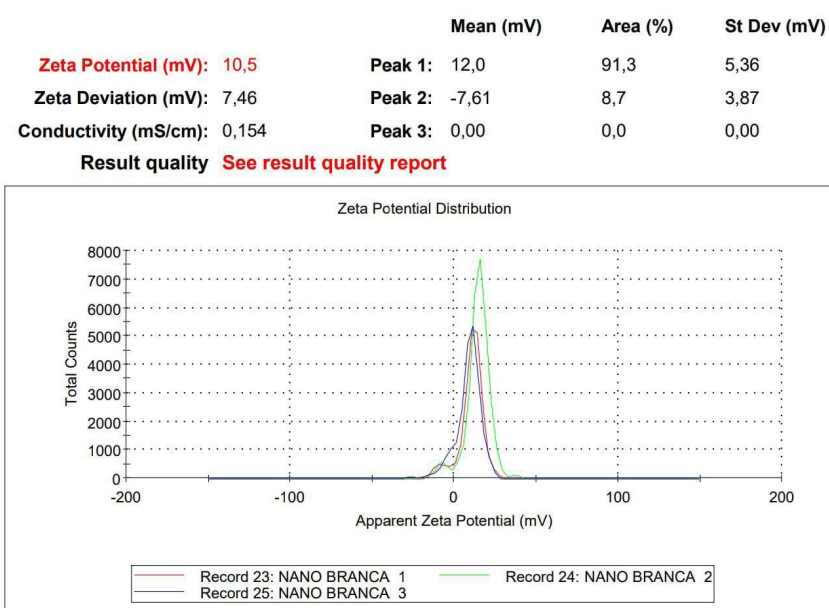
A partir dos resultados obtidos, é possível observar que foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas incorporadas ao itraconazol, em duas proporções de QTS-ITZ (16:1 e 20:1), com tamanho de partícula e PDI adequados, sendo considerados sistemas promissores, quando comparados aos valores obtidos pela nanopartícula branca, principalmente a NP1. Isso é explicitado, pois o tamanho na escala em torno de 1–200 nm é essencial para aplicações como entrega de fármacos, pois garante penetração adequada em tecidos e internalização celular (Kaplan *et al.*, 2023). Já um índice de polidispersão (PDI) até a faixa de 0,3 indica homogeneidade e exibe distribuição estreita da população de partículas, garantindo reprodutibilidade e favorecendo liberação controlada de fármacos (Hoseini *et al.*, 2023).

O potencial zeta está diretamente relacionado à estabilidade eletrocinética dos sistemas nanoestruturados. Isso porque potenciais zeta com valores absolutos superiores a ± 30 mV são considerados adequados para assegurar a estabilidade eletrocinética, uma vez que favorecem a repulsão entre partículas e diminuem significativamente a possibilidade de agregação (Ghaderi *et al.*, 2021).

O valor do potencial zeta obtido para a nanopartícula branca (NP0) foi de +10,5 mV, enquanto que para as nanopartículas de quitosana incorporadas ao itraconazol, os valores encontrados foram de +10,9 mV (NP1) e +14,3 mV (NP2), conforme mostram as Figuras 23, 24 e 25. Esse resultado pode ser explicado pela estrutura cristalina rígida da quitosana, resultante das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Em meio aquoso, a repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas promove uma conformação mais estendida, conferindo maior flexibilidade às moléculas de quitosana. Assim, a mistura do TPP com quitosana em solução de ácido acético favoreceu a formação espontânea de nanocomplexos compactos, apresentando um sistema com moderada estabilidade coloidal e com superfície carregada positivamente, característica atribuída à protonação dos grupos amina da quitosana (NH₃⁺) em meio ácido (Souza *et al.*, 2021).

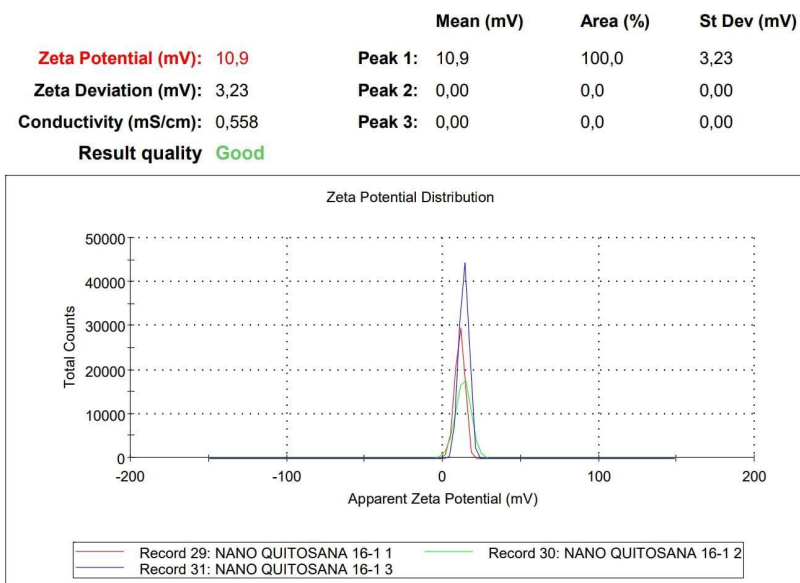
Nanopartículas de quitosana obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica com TPP tendem a apresentar potencial zeta positivo, com valores que podem variar entre +10 e +50 mV, dependendo da proporção entre quitosana e TPP, bem como do pH do meio e do grau de reticulação do sistema (Calvo *et al.*, 1997). Em sistemas biopoliméricos, a estabilidade eletrostática não depende de forma exclusiva do potencial zeta, mas também de outros fatores estéricos e da matriz polimérica (Rampino *et al.*, 2013).

Figura 23 – Potencial zeta da nanopartícula branca (NP0) por análise eletroforética.



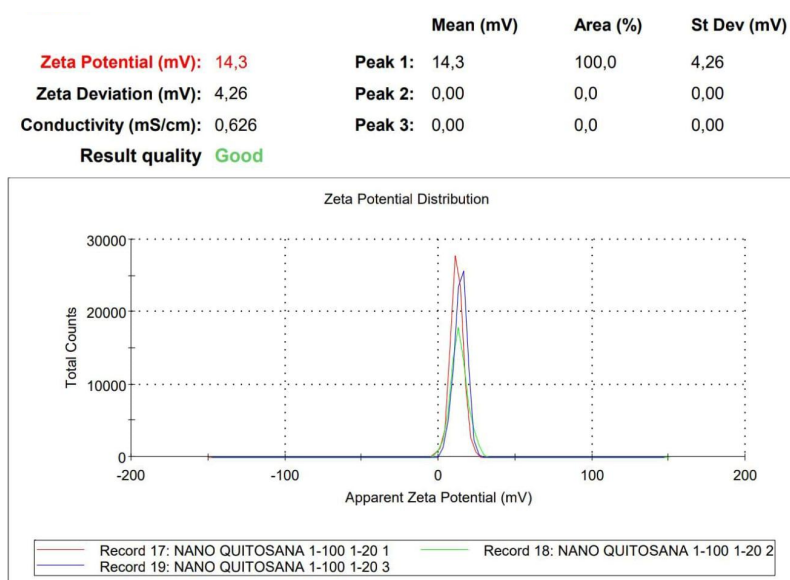
Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 24 – Potencial zeta da nanopartícula carregada com o fármaco (NP1) por análise eletroforética.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 25 – Potencial zeta da nanopartícula carregada com o fármaco (NP2) por análise eletroforética.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Assim, os resultados apresentados confirmam que as nanopartículas incorporadas ao itraconazol possuem tamanho nanométrico adequado e boa homogeneidade, características desejáveis para sistemas destinados a aplicações

farmacêuticas. Embora a estabilidade eletrostática coloidal possa ser considerada baixa a moderada, os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com algumas literaturas referentes a sistemas de quitosana/TPP, em que a protonação do grupo amina da quitosana confere carga superficial positiva ao sistema nanoparticulado, resultando, conseqüentemente, em potenciais zeta acima de zero. Dessa forma, as condições do ensaio, concentrações de sais, pH e reticulação iônica são interferentes neste tipo de resultado, sendo ideal desenvolver novas formulações, visando uma estabilidade a longo prazo para aplicação farmacêutica.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os resultados obtidos comprovam que as nanopartículas poliméricas de quitosana incorporadas ao itraconazol por gelificação iônica podem constituir uma alternativa promissora para o tratamento da esporotricose em felinos. Os ensaios de compatibilidade por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) evidenciaram que o fármaco foi incorporado à matriz polimérica por meio de interações eletrostáticas estáveis, sem evidências de incompatibilidades químicas relevantes. Porém, é necessário confirmar a efetividade da incorporação através de métodos complementares, como o teste de eficiência de encapsulação.

O método analítico desenvolvido para a quantificação do itraconazol foi devidamente validado, atendendo aos critérios estabelecidos pela legislação brasileira. Os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez apresentaram resultados estatisticamente significativos e satisfatórios, demonstrando que o método é confiável, reprodutível e adequado para a análise do princípio ativo em sistemas nanoparticulados.

A caracterização físico-química mostrou que as formulações contendo itraconazol apresentaram tamanho médio hidrodinâmico de 174,4 nm (QTS-ITZ 16:1) e 186,6 nm (QTS-ITZ 20:1), ambos com perfil monomodal e índices de polidispersão de 0,198 e 0,219, respectivamente, indicando distribuição de tamanho homogênea e adequada para aplicações terapêuticas. Em comparação, a nanopartícula branca apresentou maior tamanho médio (253,6 nm) e PDI de 0,306.

Quanto ao potencial zeta, foram obtidos valores de +10,9 mV para a formulação 16:1 e +14,3 mV para a formulação 20:1, caracterizando estabilidade eletrocinética moderada. Esses resultados indicam que, apesar do desempenho satisfatório em termos de tamanho e homogeneidade, ainda são necessários ajustes na formulação, como a otimização da proporção polímero/fármaco, visando melhorar a estabilidade coloidal do sistema.

Assim, os dados obtidos demonstram que as nanopartículas de quitosana carregadas com itraconazol apresentam propriedades físico-químicas adequadas para uso como sistema de liberação, com destaque para a formulação 16:1, embora melhorias adicionais sejam recomendadas para aumentar sua estabilidade a longo prazo.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar testes de eficiência de encapsulação, a fim de determinar a quantidade de fármaco efetivamente incorporada ao sistema após o processo de preparação;
- Conduzir estudos de estabilidade das nanopartículas poliméricas incorporadas ao itraconazol, garantindo que o sistema seja viável para armazenamento e uso futuro, especialmente para aplicações clínicas;
- Desenvolver ensaios de liberação *in vitro* para compreender o perfil cinético de liberação do fármaco e sua correlação com a matriz polimérica;
- Executar ensaios *in vivo* para avaliar a eficácia terapêutica, a segurança e o comportamento farmacocinético das formulações, especialmente em doenças subagudas ou crônicas, como a esporotricose felina;
- Desenvolver a forma farmacêutica final adequada à via de administração pretendida;
- Publicar artigos científicos para disseminar o conhecimento e contribuir para o avanço das pesquisas com sistemas nanoestruturados no tratamento da esporotricose.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. J. *et al.* Esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) em Campos de Goytacazes, RJ. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, jul. 2018.
- AOUADA, M. R. M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- BANGUN, H.; TANDIONO, S.; ARIANTO, A. Preparation and evaluation of chitosantripolyphosphate nanoparticles suspension as an antibacterial agent. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 12, p. 147-156, 2018.
- BARROS, M. B. L. *et al.* Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.
- BARROS-ALEXANDRINO, T. T.; MARTELLI-TOSI, M.; ASSIS, O. B. G. Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana-TPP como inibidoras do crescimento fúngico. In: **ANAIS...** São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 57, 25 jul. 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_.pdf. Acesso em: 02 jan. 2026.
- BOWMAN, K.; LEONG, K. W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 117-128, 2006.
- BRUM, L. C. *et al.* Principais dermatoses zoonóticas de cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n. 69, p. 29-46, 2007.
- CALVO, C. P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.
- CASTRO, C. M. M. B. *et al.* Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 2, p. 119-123, 2004.
- CHEN, K.; ZENG, S. Fabrication of quaternized chitosan nanoparticles using tripolyphosphate/genipin dual cross-linkers as a protein delivery system. **Polymers**, v. 10, n. 11, p. 1226, 2018.
- CHEN, L. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole. **Drugs**, v. 80, n. 7, p. 671-695, 2020.
- DAMIAN, C. *et al.* Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.
- DE CARVALHO, F. G. *et al.* Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering: C**, p. 109885, 2019.

DWIVEDI, A. *et al.* Ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of itraconazole and hydroxy itraconazole in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 5, p. 316-324, 2014.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

GHADERI, L. *et al.* Effective Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by *Satureja khuzistanica* essential oil nanoemulsion. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, 2021.

GONDIM, A. L. C. L.; LEITE, A. K. A. Aspectos gerais da esporotricose em pequenos animais e sua importância como Zoonose. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 10, n. 2, p. 37-44, 2020.

GONSALES, F. F. *et al.* Feline *Sporothrix* spp. detection using cell blocks from brushings and fine-needle aspirates: Performance and comparisons with culture and histopathology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 48, n. 1, p. 143-147, mar. 2019.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis: Elsevier, 2012.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 107-124, mar. 2021.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 221-223, 2006.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2017.

HASSANEN, E. I. *et al.* Insights overview on the possible protective effect of chitosan nanoparticles encapsulation against neurotoxicity induced by carbendazim in rats. **NeuroToxicology**, v. 91, p. 31-43, jul. 2022.

HOSEINI, B. *et al.* Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 18012, 2023.

JERICÓ, M. M. **Tratado de Medicina Interna de cães e gatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

KAPLAN, M. *et al.* Effects of particle geometry for PLGA-based nanoparticles: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 175, 2023.

KAUFFMAN, C. A.; HAJJEH, R.; CHAPMAN, S. W. **Practice Guidelines for the management of patients with sporotrichosis**. Chicago: Infectious Disease Society of America, 2002.

KOLIMI, P. *et al.* Development and characterization of itraconazole non-aqueous creams for the treatment of topical fungal infections. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 76, p. 103818, 1 out. 2022.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

- LLORET, A. *et al.* Sporotrichosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619-623, 2013.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.
- MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, p. 272376, 2014.
- NAKASU, C. C. T. *et al.* Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant Sporothrix brasiliensis infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 163-171, mar. 2021.
- OLIVEIRA JUNIOR, E. N. **Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- PEREIRA, S. A. *et al.* Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 311-321, 2009.
- PEREIRA, S. A. *et al.* Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290-294, 2010.
- PERNAMBUCO. Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde de Pernambuco (CIEVS-PE). **Boletim Técnico 2023 - Esporotricose**. Pernambuco, 2023. Disponível em: <https://portalcievs.saude.pe.gov.br/docs/BOLETIM%20T%C3%89CNICO%202023%20ESPOROTRICOSE.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2026.
- PIRES, C. Revisão de literatura: esporotricose felina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 16-23, 2017.
- RAMPINO, A. *et al.* Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 257-267, 2013.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROCHA, R. F. D. B. **Tratamento da esporotricose felina refratária com a associação de iodeto de potássio e itraconazol oral**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Rio de Janeiro, 2014.
- RODRIGUES, A. M. *et al.* Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant Sporothrix species. **Emerging Microbes and Infection**, v. 3, n. e32, 2014.
- ROSA, C.; MEINERZ, A.; OSÓRIO, L. *et al.* Terapêutica da esporotricose: revisão. **Science and Animal Health**, v. 5, n. 3, p. 242-262, set./dez. 2017.
- SALES-MACÊDO, P. *et al.* Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, p. 13-19, 2018.

SANTOS, A. F. *et al.* Guia prático para enfrentamento da esporotricose felina em Minas Gerais. **Revista Veterinária & Zootecnia em Minas**, v. 137, n. 38, p. 16-27, 2018.

SANTOS, V. S. *et al.* Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e Cúrcuma longa. **Matéria**, v. 26, n. 1, 2021.

SBMT (Sociedade Brasileira de Medicina Tropical). **Esporotricose: número de casos deve aumentar e há risco de surto no País, alerta infectologista**. 2020. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br>. Acesso em: 16 jan. 2026.

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

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose em gatos e cães: revisão. **Clínica Veterinária**, n. 29, p. 21-24, 2000.

SILVA, M. B. T. *et al.* Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2005.

SREEKUMAR, S. *et al.* Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4695, 2018.

TOSI, M. M. *et al.* Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. *In*: **Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients**. [S. l.]: Academic Press, 2020. p. 191-211.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204-226, 2015.

ZHAO, L-M. *et al.* Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 353-362, 2011.