



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

MARIE CLAIRE CARNEIRO ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO DE MICROEMULSÕES E  
NANOSSUSPENSÕES DE IBUPROFENO PARA O TRATAMENTO LOCAL DA  
DOR**

RECIFE

2024

MARIE CLAIRE CARNEIRO ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO DE MICROEMULSÕES E  
NANOSSUSPENSÕES DE IBUPROFENO PARA O TRATAMENTO LOCAL DA  
DOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador (a): Danielle Cristine Almeida Silva de Santana  
Coorientador (a): Fernando José Malagueño de Santana

RECIFE

2024

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária: Kyria Macedo, CRB4 1693

A345d      Albuquerque, Marie Claire Carneiro  
Desenvolvimento farmacêutico de microemulsões e  
nanossuspensões de Ibuprofeno para o tratamento local da dor / Marie  
Claire Carneiro Albuquerque. – 2024.  
75 f. : il.

Orientadora: Danielle Cristine Almeida Silva de Santana.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em  
Ciências Farmacêuticas. Recife, 2024.  
Inclui referências.

1. Ibuprofeno. 2. Dor. 3. Sistemas de Liberação de Fármacos por  
Nanopartículas. I. Santana, Danielle Cristine Almeida Silva de  
(orientadora). II. Título.

617.6      CDD (23.ed.)      UFPE (CCS 2024 - 124)

MARIE CLAIRE CARNEIRO ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO DE MICROEMULSÕES E  
NANOSSUSPENSÕES DE IBUPROFENO PARA O TRATAMENTO LOCAL DA  
DOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovada em: 05/02/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Cristine Almeida Silva de Santana  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Orientadora – Presidente

---

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Examinador Interno

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Karina Perrelli Randau  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Examinador Interno

---

Prof. Dr. Lucas José de Alencar Danda  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Francisca Sueli Monte Moreira  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE  
Examinador Externo

*A todos que me deram forças pra continuar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho é resultado de anos de dedicação e acima de tudo, muita persistência diante de todas as adversidades que enfrentei durante a execução da pesquisa. Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão aos meus pais, que sempre investiram na minha educação, proporcionando as bases fundamentais para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Agradeço à minha orientadora, Danielle pela sua orientação, apoio, acolhimento, compreensão e empatia ao longo de todo o processo. Agradeço também a Fernando, por compartilhar seus valiosos conhecimentos em cromatografia, o que contribuiu significativamente para a pesquisa.

Ao meu namorado, Gabriel, por todas as vezes em que me buscou no departamento tarde da noite e por sempre me dar forças e apoio quando precisei. Aos amigos Gabi, Héllen, Bruna, Charles, Evandro e Aron, minha imensa gratidão por serem fontes constantes de ânimo e por acompanharem cada passo dessa jornada, do início ao fim.

Sou eternamente grata as pessoas que conheci no laboratório, como Rebeka, Pamina, Lucas, Danilo, Carla e Jamille. Durante o mestrado, enfrentei níveis patológicos de ansiedade, tanto por questões acadêmicas quanto por acontecimentos externos ao universo acadêmico. A vivência no laboratório ficou mais leve com vocês.

Agradeço à Capes pela concessão da bolsa.

Grata aos meus colegas de trabalho da Hemobrás pelo apoio, palavras de incentivo e por tudo que fizeram em um momento em que estava me sentindo extremamente sobrecarregada.

Por fim, grata pelo crescimento profissional que toda essa experiência me proporcionou.

## RESUMO

A dor é um problema de saúde pública, e impacta na qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. O ibuprofeno (IBU), um anti-inflamatório não esteroideal (AINE), é usado na prática clínica para o tratamento de dores leves a moderadas. Apesar de sua eficácia, o uso sistêmico e prolongado de AINEs, como o IBU pode levar ao surgimento de efeitos adversos moderados e severos, principalmente no trato gastrointestinal e nos sistemas hematológico e renal. A aplicação tópica do IBU pode ser uma alternativa para diminuir o aparecimento dos efeitos adversos indesejados, no entanto, o estrato córneo atua como uma eficiente barreira à permeação da pele. O uso de formulações nanoestruturadas, como microemulsões e nanossuspensões, pode aumentar a penetração do fármaco, favorecendo sua absorção na/atraves da pele. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar microemulsões e nanossuspensões de ibuprofeno para administração tópica, como alternativa para minimizar os efeitos adversos do uso oral convencional. Inicialmente, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLAE-DAD para a determinação do IBU, incluindo um estudo de recuperação do fármaco a partir do estrato córneo, através de delineamento experimental com planejamento fatorial. Em seguida, foram elaborados diagramas de fase pseudoternários utilizando álcool benzílico ou carbonato de propileno como fase oleosa e lecitina e isopropanol como tensoativo e co-tensoativo, respectivamente, para determinar as regiões com formação de microemulsões. Formulações selecionadas dos variados diagramas de fase obtidos foram submetidas a um estudo de estabilidade por 30 dias, através da análise de diâmetro médio das gotículas, índice de polidispersão (PdI) e microscopia de luz polarizada. A partir desse estudo, formulações foram selecionadas para a incorporação do fármaco e o preparo das nanossuspensões. Dado que o ibuprofeno apresenta solubilidade pH-dependente, a influência do pH da fase aquosa das microemulsões e na diluição dessas formulações, assim como a proporção de diluição foi investigada para a produção das nanossuspensões, a partir da avaliação do diâmetro médio e PdI obtidos, em estudo com planejamento fatorial. A metodologia analítica desenvolvida foi validada e demonstrou ser adequada aos estudos propostos, com linearidade de 0,5 a 10 $\mu$ g/mL, e valores de precisão, exatidão e recuperação conforme preconizado pela legislação. Os diagramas de fase produzidos com álcool benzílico apresentaram maiores áreas de microemulsões. Formulações estáveis com diâmetro médio de 6nm a 40nm e e PdI variando de 0,067 a 0,274 foram selecionadas (MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10). Dentre as nanossuspensões obtidas, aquelas diluídas em pH 6 exibiram um tamanho de partícula menor. Apesar da evidente influência do pH, as nanossuspensões produzidas sem ajuste de pH demonstraram tamanho médio de partícula inferior, variando de 15 nm a 80 nm com PdI de 0,286 a 0,336, respectivamente. As nanossuspensões produzidas a partir de formulações iniciais com álcool benzílico apresentaram os menores valores de diâmetro médio e PdI. Tais achados abrem perspectivas para a manipulação controlada do tamanho das partículas, e oferecem uma base valiosa para investigações futuras no desenvolvimento de formulações nanoestruturadas de aplicação tópica mais efetivas. Estudos adicionais de performance das formulações desenvolvidas devem ser realizados para tal finalidade.

**Palavras-chave:** ibuprofeno; microemulsões; nanossuspensões; uso tópico; estudo fatorial.

## ABSTRACT

Pain is a public health issue that impacts the quality of life for millions of people worldwide. Ibuprofen (IBU), a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), is commonly used in clinical practice for the treatment of mild to moderate pain. Despite its effectiveness, the systemic and prolonged use of NSAIDs, such as IBU, can lead to the emergence of moderate to severe adverse effects, particularly in the gastrointestinal, hematological, and renal systems. Topical application of IBU may offer an alternative to reduce the occurrence of undesirable side effects; however, the stratum corneum acts as an efficient barrier to skin permeation. The use of nanostructured formulations, such as microemulsions and nanosuspensions, can enhance drug penetration, facilitating absorption into/through the skin. Therefore, the objective of this study was to develop and evaluate microemulsions and nanosuspensions of ibuprofen for topical administration as an alternative to minimize the adverse effects of conventional oral use. Initially, an analytical methodology using HPLC-DAD was developed and validated for IBU determination, including a drug recovery study from the stratum corneum, employing an experimental design with factorial planning. Subsequently, pseudoternary phase diagrams were constructed using benzyl alcohol or propylene carbonate as the oil phase and lecithin and isopropanol as the surfactant and co-surfactant, respectively, to identify regions with microemulsion formation. Selected formulations from various phase diagrams underwent a 30-day stability study, assessing the mean droplet diameter, polydispersity index (PdI), and polarized light microscopy. Based on this study, formulations were chosen for drug incorporation and the preparation of nanosuspensions. Considering the pH-dependent solubility of ibuprofen, the influence of the aqueous phase pH in microemulsions and during the dilution of these formulations, as well as the dilution ratio, was investigated for nanosuspension production. This was achieved by evaluating the obtained mean diameter and PdI in a factorial design study. The developed analytical methodology was validated and deemed suitable for the proposed studies, demonstrating linearity from 0.5 to 10  $\mu\text{g/mL}$ , with precision, accuracy, and recovery values compliant with regulations. Phase diagrams produced with benzyl alcohol showed larger microemulsion areas. Stable formulations with a mean diameter ranging from 6 nm to 40 nm and PdI varying from 0.067 to 0.274 were selected (MAB-3, MAB-4, MCP-5, and MCP-10). Among the obtained nanosuspensions, those diluted at pH 6 exhibited a smaller particle size. Despite the evident pH influence, nanosuspensions produced without pH adjustment demonstrated a lower average particle size, ranging from 15 nm to 80 nm, with PdI of 0.286 to 0.336, respectively. Nanosuspensions produced from initial formulations with benzyl alcohol showed the smallest mean particle size and PdI values. These findings provide perspectives for controlled manipulation of particle size and offer a valuable foundation for future investigations in the development of more effective nanostructured formulations for topical application. Additional studies on the performance of the developed formulations should be conducted for this purpose.

**Keywords:** ibuprofen; microemulsions; nanosuspensions; topical use; factorial study.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular do ibuprofeno.....	21
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da pele e do estrato córneo. ....	22
Figura 3 – Vias de absorção de substâncias através da pele.....	23
Figura 4 – Método para obtenção de nanossuspensões utilizando microemulsões. ....	28
Figura 5 – Sequência de etapas empregadas para o preparo das nanossuspensões utilizando formulações selecionadas. ....	36
Figura 6 – Cromatograma referente ao IBU, empregando coluna Phenomenex HyperClone ODS C <sub>18</sub> (250 x 4,60 nm; 5µm), fase móvel metanol: HCl 0,07% (80:20) (v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µl; detecção a ,223 nm.....	38
Figura 7 – Curva analítica do IBU na faixa de concentração de 0,5 a 10 µg.mL <sup>-1</sup> . Equação da reta: y = Equação da reta: y = 36822x + 1548,6; coeficiente de determinação: R <sup>2</sup> = 0,9988. ....	39
Figura 8 – Gráfico de resíduos e valores ajustados do IBU. ....	40
Figura 9 – Sobreposição dos cromatogramas contendo ibuprofeno (em rosa) e sem o fármaco (de preto).....	40
Figura 10 – Gráfico de Pareto demonstrando que nenhuma das variáveis testadas alcançou significância estatística. ....	44
Figura 11 – Representação gráfica dos diagramas de fase pseudo-ternários obtidos contendo lecitina e isopropanol na proporção 2:1 (A), 1:1 (B) e 1:2 (C) respectivamente e álcool benzílico como fase oleosa. ....	44
Figura 12 – Representação gráfica dos diagramas de fase pseudo-ternários obtidos contendo lecitina e isopropanol na proporção 2:1 (A), 1:1 (B) e 1:2 (C) respectivamente e carbonato de propileno como fase oleosa. ....	45
Figura 13 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -1 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	48
Figura 14 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -2 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente). ....	49
Figura 15 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -3 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente). ....	50

Figura 16 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -4 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	51
Figura 17 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -6 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	52
Figura 18 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -7 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	53
Figura 19 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -1 após 1, 2, 3, 7 e 15 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	54
Figura 20 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -2 após 1, 2, 3, 7 e 15 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	55
Figura 21 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -3 após 1, 2 e 3 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	56
Figura 22 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -5 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	57
Figura 23 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -6 após 1, 2, 3, 7 e 15 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	58
Figura 24 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -7 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	59
Figura 25 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -8 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	60
Figura 26 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -9 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente).....	61

Figura 27 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -10 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente) .....62

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades do ibuprofeno.....	21
Quadro 2 – Diferenças entre emulsões e microemulsões .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência equipado com Detector de Arranjo de Diodos
COX	Ciclooxigenases
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IBU	Ibuprofeno
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
SNC	Sistema Nervoso Central

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
h	Horas
µg	Micrograma
µL	Microlitro
g/mol	Gramas por mol
v/v	Volume de soluto pelo volume da solução
mL/min	Mililitro por minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
µg/mL	Micrograma por mililitro
min	Minuto
°C	Graus Celsius
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS (AINES).....	19
3.2	IBUPROFENO .....	20
3.3	ABSORÇÃO DE FÁRMACOS NA PELE.....	21
3.4	FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS COMO ESTRATÉGIA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE AINES .....	24
<b>3.4.1</b>	<b>Microemulsões</b> .....	24
<b>3.4.2</b>	<b>Caracterização das microemulsões</b> .....	26
<b>3.4.3</b>	<b>Nanosuspensões</b> .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	MATERIAL.....	30
<b>4.1.1</b>	<b>Matérias primas, solventes e reagentes</b> .....	30
<b>4.1.2</b>	<b>Equipamentos e acessórios</b> .....	30
4.2	PELE.....	31
4.3	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	31
4.4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	32
<b>4.4.1</b>	<b>Linearidade</b> .....	32
<b>4.4.2</b>	<b>Seletividade</b> .....	32
<b>4.4.3</b>	<b>Precisão</b> .....	32
<b>4.4.4</b>	<b>Exatidão</b> .....	33
<b>4.4.5</b>	<b>Robustez</b> .....	33
<b>4.4.6</b>	<b>Limite de quantificação</b> .....	33
<b>4.4.7</b>	<b>Estudo de recuperação do IBU a partir do estrato córneo</b> .....	33
4.5	OBTENÇÃO DAS MICROEMULSÕES .....	34
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROEMULSÕES.....	35
<b>4.6.1</b>	<b>Microscopia de luz polarizada</b> .....	35

<b>4.6.2</b>	<b>Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (pDI) e potencial zeta</b>	<b>35</b>
4.7	OBTENÇÃO DAS NANOSUSPENSÕES	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
5.1	METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	38
<b>5.1.1</b>	<b>Linearidade</b>	<b>38</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Seletividade</b>	<b>40</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Precisão</b>	<b>40</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Exatidão</b>	<b>41</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Robustez</b>	<b>41</b>
<b>5.1.6</b>	<b>Limite de quantificação</b>	<b>42</b>
<b>5.1.7</b>	<b>Estudo de recuperação do IBU a partir do estrato córneo</b>	<b>42</b>
5.2	MICROEMULSÕES	44
<b>5.2.1</b>	<b>Caracterização das microemulsões selecionadas</b>	<b>47</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Microscopia de luz polarizada</b>	<b>47</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Diâmetro médio e Índice de polidispersão (PdI)</b>	<b>62</b>
5.3	FORMULAÇÕES SELECIONADAS PARA O PREPARO DAS NANOSUSPENSÕES	64
5.4	NANOSUSPENSÕES	65
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dor representa um grande problema de saúde pública em todo o mundo, sendo um fenômeno multidimensional com componentes sensitivos, emocionais e cognitivos. É definida pela *International Association for the Study of Pain* (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante a uma lesão real ou potencial ao tecido” (Raja *et al.*, 2020).

O tratamento farmacológico da dor é realizado com uma série de fármacos que atuam através de diferentes mecanismos de ação, sendo comumente prescritos os opioides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), antidepressivos, anticonvulsivantes, anti arrítmicos, entre outras classes (Golan, 2009). No manejo da dor leve a moderada e em processos inflamatórios crônicos como artrite reumatoide, osteoartrite e dor musculoesquelética os AINES são bastante utilizados por não causar dependência (Brunton; Chabner; Knollmann, 2018).

Na classe dos AINES, o ibuprofeno é um dos mais antigos no mercado, possuindo baixa toxicidade e boa eficácia (Katzung; Trevor, 2017). Atua diminuindo a síntese das prostaglandinas pela ligação às cicloxigenases (COX-1 e COX-2) promovendo o alívio da dor. Entretanto o uso prolongado pode desencadear principalmente problemas gastrointestinais, cardiovasculares, renais, e hepáticos, mediados especialmente se, pela inibição da COX-1 constitutiva (Atkinson; Fudin, 2020). Além disso, o ibuprofeno pela via oral possui meia-vida de 2 horas, necessitando de repetidas administrações para manter o efeito desejado (Katzung; Trevor, 2017). Uma alternativa que pode ser empregada para minimizar a flutuação dos níveis plasmáticos do ibuprofeno é o uso transdérmico desse fármaco.

Ainda que a pele seja uma promissora alternativa como via de administração, sua utilização ainda é limitada, havendo hoje no mercado poucos fármacos disponíveis comercialmente em apresentações aplicadas à pele, visto que o estrato córneo atua como barreira significativa para a permeação de fármacos e outras substâncias (Barry, 1983). Algumas estratégias têm sido empregadas com sucesso para transpor essa barreira, incluindo o uso de sistemas de liberação como as microemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas e métodos físicos (Garrison, 2004).

As microemulsões, definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e isotrópicos de dois líquidos imiscíveis e conhecidas por uma alta concentração de um ou mais tensoativos, possuem uma alta aplicabilidade como sistemas de liberação pois aumentam a permeabilidade de fármacos (Callender *et al.*, 2017).

Trotta *et al.* (2003) relataram a possibilidade de obter nanossuspensões através da incorporação do fármaco em solvente pouco miscível como fase dispersa e posterior diluição da microemulsão com água. As nanossuspensões, que são dispersões coloidais do fármaco em escala nanométrica, demonstram aumento da taxa de dissolução do fármaco incorporado, tendo em vista que aumentam sua solubilidade de saturação (Patravale; Abhijit; Kulkarni, 2004).

Dentro deste contexto, esse trabalho se propõe a desenvolver e caracterizar microemulsões e, subsequentemente, nanossuspensões de ibuprofeno, fármaco ácido, de baixa solubilidade em água e de meia-vida curta, bem como validar uma metodologia analítica por CLAE-DAD para a determinação do IBU.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanossuspensões de ibuprofeno a partir de formulações nanoestruturadas com álcool benzílico ou carbonato de propileno como fase oleosa para aplicação tópica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar microemulsões contendo ibuprofeno, com álcool benzílico ou carbonato de propileno como fase oleosa e lecitina e isopropanol como tensoativo e co-tensoativo, respectivamente;
- Produzir nanossuspensões a partir da diluição de formulações nanoestruturadas selecionadas;
- Caracterizar as microemulsões e nanossuspensões quanto ao tamanho médio de partícula, distribuição de tamanho de partícula (PDI), pH e estabilidade;
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE-DAD para determinação do IBU em estudos de performance das formulações desenvolvidas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS (AINES)

Os AINEs são um grupo heterogêneo de medicamentos que na sua generalidade possuem características analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias; a predominância de uma dessas ações terapêuticas varia de um fármaco para outro, e os medicamentos desta classe encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo (Batlouni, 2010; Haroutiunian *et al.*, 2010).

Seu principal mecanismo de ação é a inibição da enzima cicloxigenase (COX) presente em processos inflamatórios e também responsável pela síntese de prostaglandinas envolvidas nos processos fisiológicos (Haroutiunian *et al.*, 2010). A enzima ciclooxigenase apresenta duas principais isoformas, COX-1 e COX-2, sendo a COX-1 considerada constitutiva, encontrada nos vasos sanguíneos, estômago e rins e a COX-2, induzida durante o processo inflamatório, além da recente descoberta da COX-3 no sistema nervoso central (SNC). Os AINEs tradicionais não são seletivos, e assim, inibem COX-1 e COX-2; entretanto, a COX-1 é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas (Batlouni, 2010). Assim, o uso de AINEs não seletivos está relacionado a um alto risco de dano na mucosa gastrointestinal, incluindo úlceras, erosões e, ainda, complicações como sangramento gastrointestinal, perfuração e obstrução e também complicações nos sistemas hematológico e renal (Kummer; Coelho, 2002).

Considerando estes efeitos indesejáveis após uso dos AINEs não seletivos, a ideia de que inibidores específicos da COX-2 impediriam o processo inflamatório evitando os efeitos colaterais indesejáveis advindos do bloqueio inespecífico da COX, impulsionou a indústria farmacêutica na busca de novos fármacos com atividade específica sobre a isoforma COX-2.

Assim, em 1998 o FDA aprovou o uso do Celecoxib e meses depois do Rofecoxib, como AINEs inibidores seletivos da COX-2, com o objetivo de minimizar a toxicidade gastrointestinal dos AINEs não seletivos. Entretanto, o uso crônico desses compostos foi associado a sérios efeitos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou morte vascular, o que culminou na retirada de tais medicamentos do mercado, nos EUA e diversos países da Europa (Hersh *et al.*, 2008).

Considerando que os efeitos adversos dos AINEs são comuns com o seu uso sistêmico, a aplicação tópica, no local de ação requerida, pode levar à alta concentração do fármaco nos tecidos-alvo, com redução dos níveis plasmáticos e tem impulsionado inúmeros estudos relacionados aos AINEs, e seu uso no tratamento tópico de diversas condições crônicas, como osteoartrites e tendinites, e agudas, como lesões decorrentes de práticas esportivas (Haroutiunian *et al.*, 2010). Tais estudos demonstraram que a aplicação tópica dos AINEs pode ser efetiva, levando a alta concentração do fármaco na derme enquanto que a concentração plasmática se mantém consideravelmente abaixo da concentração usualmente obtida após administração oral (Haroutiunian *et al.*, 2010).

### 3.2 IBUPROFENO

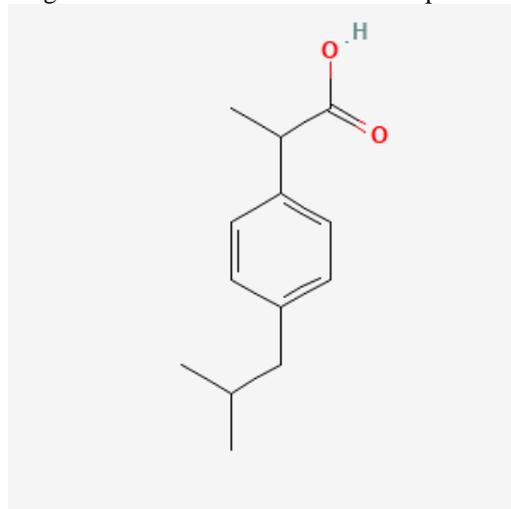
O ibuprofeno é um fármaco derivado do ácido propiônico e faz parte do grupo dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Age inibindo a síntese de prostaglandinas através da inibição das cicloxigenases (COX). Possui ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética (Cajaraville, 2021). É classificado como anti-inflamatório de meia-vida curta, possuindo tempo de meia-vida menor que 6h e rápido início de ação, sendo indicado principalmente no tratamento de dor aguda. Além disso, exibe inibição não-seletiva para as COX, ligando-se às cicloxigenases 1 e 2 de maneira reversível (Bindu; Mazumder; Bandyopadhyay, 2020). É utilizado no tratamento de febre, cólicas menstruais, dores musculares, em pacientes com artrite e osteoartrite para alívio dos sintomas e muitas outras indicações clínicas, sendo um fármaco bem abrangente (MedlinePlus, 2022).

Apesar de suas vantagens no tratamento de diversas enfermidades, seu uso pode desencadear efeitos adversos, sobretudo por conta da inibição da COX-1, sendo o desconforto gastrointestinal o mais comum, mas também pode ocorrer cefaleia, tontura, visão embaçada e trombocitopenia (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012). Adicionalmente, o ibuprofeno possui problemas de solubilidade, influenciando diretamente em seus parâmetros farmacocinéticos como o tempo de meia-vida e a biodisponibilidade.

Sua solubilidade em água é influenciada pelo valor de pH. Em medidas de pH mais ácidas, a molécula apresenta baixa solubilidade, entretanto, à medida que o pH aumenta e se torna mais alcalino, a solubilidade também aumenta, devido a ionização do fármaco (Hadgraft; Valenta, 2000). É classificado pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica como pertencente a classe II, por conta de sua alta permeabilidade e baixa solubilidade. Fármacos com essa classificação/característica apresentam dificuldades de absorção (Potthast *et al.*, 2005). Por

conta disso, tem-se criado novas estratégias para contornar esses efeitos, como o uso da nanotecnologia.

Figura 1 – Estrutura molecular do ibuprofeno



Fonte: Pubchem (2024).

Quadro 1 – Propriedades do ibuprofeno

Propriedade	Valor
Peso molecular	206,26 g/mol
Solubilidade em água	21 mg/L (a 25°C)
LogP	3,97
Pka	4,45

Fonte: Pubchem (2024).

### 3.3 ABSORÇÃO DE FÁRMACOS NA PELE

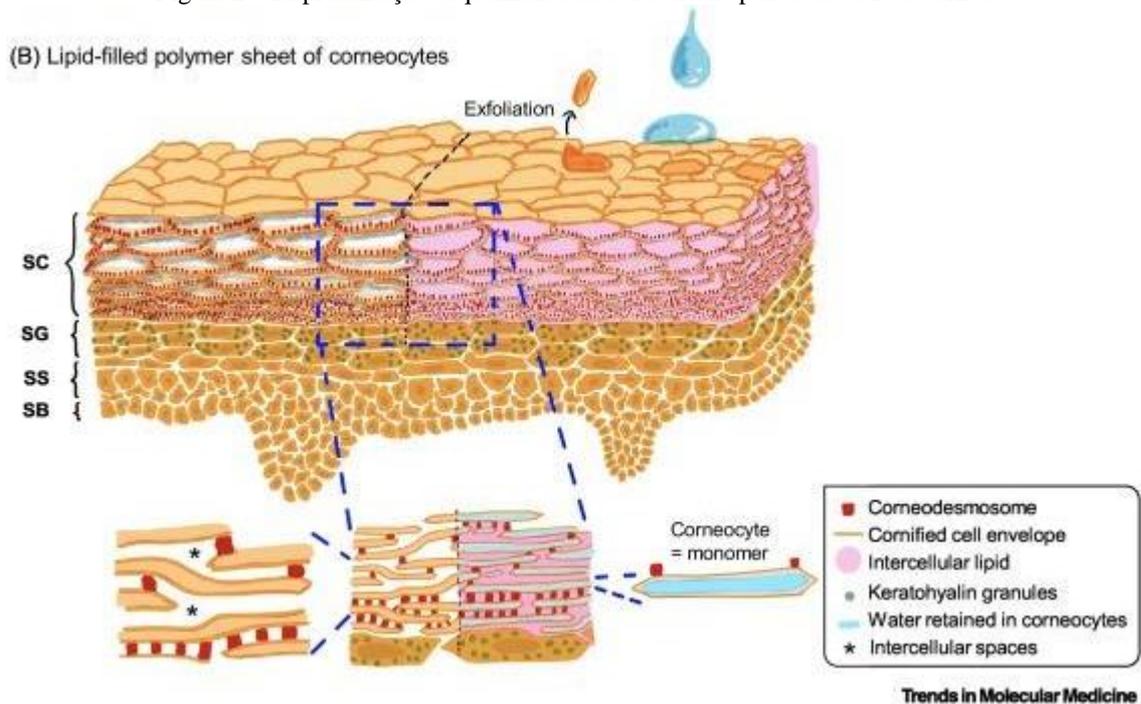
Além de ser o maior órgão do corpo, a pele é de suma importância na proteção contra agentes externos e contra a perda excessiva de água. É dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme, sendo a epiderme a camada mais externa e a hipoderme a mais interna. Diante do seu tamanho, que corresponde a 16% do peso corporal, a pele acaba sendo uma excelente via para administração de medicamentos (Bernardo; Santos; Silva, 2019).

Na pele, é possível administrar medicamentos na forma tópica ou transdérmica. No uso tópico, o fármaco faz efeito local ficando retido na superfície da pele, enquanto no uso transdérmico, o ativo penetra as camadas da pele até a circulação sistêmica (Zhu *et al.*, 2020). Entre os benefícios da via transdérmica, pode-se citar a liberação de maneira gradual do princípio ativo evitando dessa forma a administração repetida do medicamento ao longo do dia,

bem como flutuações na concentração do fármaco na corrente sanguínea, além de evitar o metabolismo hepático de primeira passagem e reduzir os efeitos adversos (Kováčik; Kopečná; Vávrová, 2020).

Apesar das vantagens da administração de fármacos pela via transdérmica, a pele possui limitação na absorção de medicamentos devido ao estrato córneo, camada mais externa presente na epiderme e que serve como impermeabilizante (Shukla *et al.*, 2018). O estrato córneo é formado por células mortas que são chamadas de corneócitos. Durante sua formação, ocorre o processo de cornificação caracterizado pela morte dos queratinócitos, formando estrutura de células mortas e justapostas/agregadas e hidrofílicas que são revestidas com lipídeos que preenchem os espaços intercelulares, criando uma barreira que impede a entrada de substâncias exógenas (Murata *et al.*, 2022).

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da pele e do estrato córneo

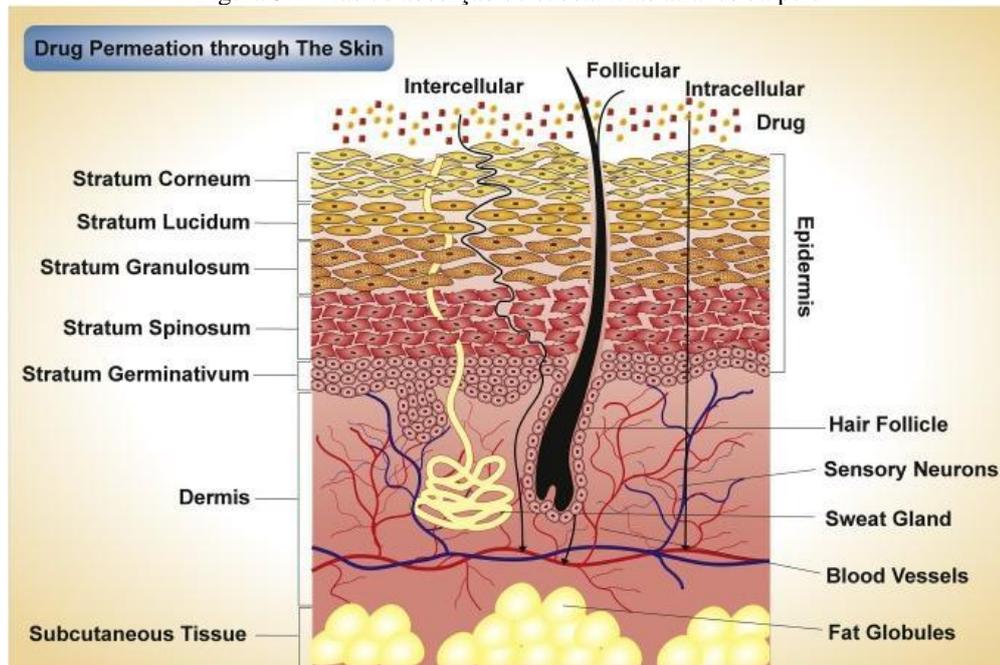


Fonte: Murata *et al.* (2022).

As substâncias administradas pela pele podem ser absorvidas pela via intercelular, transcelular ou intracelular e através dos anexos cutâneos como folículos pilosos e glândulas. A via intercelular é mais comum em compostos lipofílicos, já que a penetração acontece na matriz lipídica que reveste as células do estrato córneo, levando o ativo a percorrer um caminho mais longo até alcançar as camadas mais internas. Na via transcelular as moléculas migram através dos corneócitos, tornando-se mais recorrente em moléculas hidrofílicas, entretanto é

necessário que o ativo passe pelos lipídios intracelulares para migrar de um corneócito para outro o que dificulta a passagem. Os anexos cutâneos correspondem a 0,1-1% da pele, sendo um acesso mais restrito a moléculas grandes e polares (Machado, 2020).

Figura 3 – Vias de absorção de substâncias através da pele



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

Após a administração de medicamentos na pele, ocorrem três fases para que o fármaco exerça seu efeito. São elas as fases farmacêutica, farmacocinética e a farmacodinâmica, conforme afirma Souto *et al.* (2022, p. 2):

A fase farmacêutica é caracterizada pelo momento em que o veículo libera o fármaco na pele. Após sua dissolução, o fármaco sofre um conjunto de reações farmacocinéticas que incluem absorção, distribuição corporal, metabolismo pelos órgãos e eliminação pelos sistemas de excreção. Após a liberação do fármaco, o fármaco fica disponível para interagir com seu alvo (ou seja, receptor e enzimas) a fim de produzir o efeito terapêutico, ou seja, a fase farmacodinâmica. Todos esses processos e etapas mostram que a ação das drogas depende não apenas da natureza da molécula, mas também do próprio carreador e do sítio alvo.

Por conta da complexidade estrutural da pele e da dificuldade de passagem de substâncias, existem estratégias que visam promover um breve comprometimento/alteração do estrato córneo como o uso de métodos químicos utilizando intensificadores de penetração ou com métodos físicos como a iontoforese e o uso de microagulhas (Bolla *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2018).

### 3.4 FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS COMO ESTRATÉGIA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE AINES

#### 3.4.1 Microemulsões

O conceito de microemulsão foi introduzido pela primeira vez na década de 1940 para descrever sistemas monofásicos transparentes gerados pela titulação de uma emulsão leitosa com um álcool de cadeia média (Hoar; Schulman, 1943). Desde sua primeira descrição, as microemulsões têm sido extensivamente estudadas como sistemas de liberação de fármacos, devido às suas múltiplas vantagens, como a capacidade em incrementar a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade do fármaco incorporado, além de protegê-lo de degradação (Baker *et al.*, 1984, Kogan; Garti, 2006).

Microemulsões são definidas como sistemas isotrópicos e transparentes constituídos por fase aquosa, fase oleosa, tensoativo e cotensoativo (Attwood, 1994). As microemulsões são termodinamicamente estáveis e sua formação é facilitada pela capacidade dos tensoativos de promoverem a redução na tensão interfacial desses sistemas, o que leva à formação de gotículas extremamente pequenas em fase dispersa (Ho *et al.*, 1996). Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o tamanho de gotículas das microemulsões está na escala nanométrica, entre 10 e 100 nanômetros (Borzenkov; Hevus, 2014).

As microemulsões são sistemas coloidais formados pela mistura entre dois líquidos imiscíveis e estabilizadas por tensoativos e comumente com cotensoativos que atuam na diminuição da tensão interfacial entre as duas fases. Diferem-se das emulsões convencionais por possuírem tamanho médio de partícula entre 10-100 nm (Callender *et al.*, 2017). São caracterizadas por serem transparentes, isotrópicas e requerem baixa energia para sua formação, diferentemente das emulsões convencionais que são leitosas e opacas (Damasceno *et al.*, 2011; Karasulu, 2007).

Quadro 2 – Diferenças entre emulsões e microemulsões

	<b>Emulsão</b>	<b>Microemulsão</b>
Tamanho das partículas	1000 – 10.000 nm	10-100 nm
Aparência	Turva e leitosa	Transparente e translúcida
Estabilidade	Termodinamicamente instável	Termodinamicamente estável
Tensão interfacial	Alta	Muito baixa
Quantidade de tensoativo	Baixa	Alta

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

Diante de suas características, as microemulsões apresentam diversas vantagens como a capacidade de incorporar ativos hidrofílicos e lipofílicos, estabilidade termodinâmica devido a adição de tensoativos que diminuem a tensão interfacial garantindo a durabilidade da formulação e versatilidade para ser utilizada em diferentes vias de administração. Além disso, sua composição rica em tensoativos pode desestabilizar o estrato córneo facilitando a absorção de substâncias (Egito *et al.*, 2020).

Entre suas limitações, destaca-se a necessidade da alta concentração de tensoativos que devem ser atóxicos, visto que serão utilizados em preparações farmacêuticas (Agrawal; Agrawal, 2012). A possibilidade de formação de microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas da mistura de tensoativo e cotensoativo, determinada não somente pelas suas estruturas químicas, mas também por outros fatores como temperatura e força iônica. A mistura de tensoativo e cotensoativo com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) adequado proporciona a condição máxima de redução da tensão interfacial entre a fase oleosa e a fase aquosa (Mittal, 1999).

De acordo com a orientação dos sistemas, que é dependente das proporções água/óleo, das proporções dos tensoativos e de suas propriedades físico-químicas, traduzidas principalmente pelo seu EHL, as microemulsões podem ser classificadas em três tipos, óleo em água (O/A), em que gotículas de óleo são dispersas em água; água em óleo (A/O), na qual as gotas de água são dispersas em óleo; e sistemas bicontínuos, nos quais as fases aquosa e oleosa estão entrelaçadas e estabilizadas por surfactantes nas interfaces entre as fases distintas (Rushforth *et al.*, 1986).

As microemulsões podem ser preparadas pela adição da água em uma mistura de fase oleosa, tensoativo e cotensoativo até o volume máximo que não apresenta turvação da amostra ou pela adição de cotensoativo em uma mistura de fase oleosa, água e tensoativo até a amostra ficar límpida (Szumala; Macierzanka, 2022). Nas duas formas, é necessário o uso de diagramas pseudoternários.

Adicionalmente, as microemulsões também podem ser utilizadas como ponto de partida para produção de nanosuspensões (Trotta *et al.*, 2003). O fármaco pode ser incorporado na fase interna e, ao diluir as microemulsões, se dá origem à nanossuspensão pela extração do solvente parcialmente miscível, utilizado como fase oleosa da microemulsão. A quantidade e a proporção de tensoativos e cotensoativos na formação da fase interna e no tamanho de glóbulos da microemulsão devem ser otimizados para atingir a concentração e o tamanho desejados do fármaco (Shah; Imran; Ullah, 2017).

### 3.4.2 Caracterização das microemulsões

- **Inspecção visual**

Utilizando a observação macroscópica, pode-se determinar se houve separação de fases e se a microemulsão é transparente. Deve ser realizada em conjunto com outras técnicas de caracterização (Mahboob *et al.*, 2022).

- **Tamanho de partícula e PDI**

Através do espalhamento de luz dinâmico ou *dynamic light scattering* (DLS), é possível determinar o tamanho das partículas em uma microemulsão. Essa técnica é baseada no princípio de que partículas em suspensão causam flutuações na intensidade da luz quando são atingidas por um feixe de luz a laser. Seu tamanho não deve ser superior a 100 nm, já que partículas maiores não apresentam boa transparência e nem as propriedades desejadas para uma microemulsão (Mahboob *et al.*, 2022).

O PDI fornece informações sobre a variação do tamanho entre as partículas. Uma distribuição de tamanho de partículas mais uniforme está relacionada a uma maior estabilidade das microemulsões, já que diminui a formação de partículas maiores que podem sedimentar e causar instabilidade ao sistema (Zhi *et al.*, 2020).

- **Microscopia de luz polarizada**

Permite a visualização microscópica das microemulsões através da luz polarizada. Também dá para observar as estruturas cristalinas que se formam a partir das micelas (Mahboob *et al.*, 2022). A partir da microscopia, é possível classificar as amostras de acordo com a isotropia do sistema. Amostras isotrópicas conseguem desviar do plano de luz incidente enquanto as anisotrópicas por não conseguirem desviar o plano de luz, são perfeitamente visualizadas durante as análises (Formariz *et al.*, 2005).

Na presença de grandes quantidades de tensoativos, estruturas cristalinas podem ser formadas pelo arranjo entre as micelas. Essas estruturas são classificadas como anisotrópicas quando assumem a organização de cristais lamelares e hexagonais, e de isotrópicas quando formam sistemas micelares e fases cúbicas (Formariz *et al.*, 2005).

Nos cristais anisotrópicos lamelares, os tensoativos se organizam em camadas paralelas, enquanto na fase hexagonal, ocorre a formação de estruturas cilíndricas com o formato hexagonal característico. Através da microscopia, ambas são visualizadas na forma da Cruz de

Malta. Já a fase cúbica é formada por uma bicamada de tensoativos em formato tridimensional (Formariz *et al.*, 2005).

### 3.4.3 Nanosuspensões

Nanosuspensões são dispersões coloidais de partículas em escala nanométrica dispersas em meio aquoso estabilizadas por surfactantes. Elas representam uma ferramenta promissora em diversas áreas, incluindo farmacêutica, cosmética, e agroquímica, devido à sua capacidade de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em meio aquoso (Rabinow, 2004). As mesmas podem também ser definidas como um sistema bifásico que consiste em partículas dispersas em um veículo aquoso no qual o diâmetro das partículas suspensas é menor que 1  $\mu\text{m}$ , o que equivale a 1000 nm, sendo maiores que as microemulsões (Patravale, 2004).

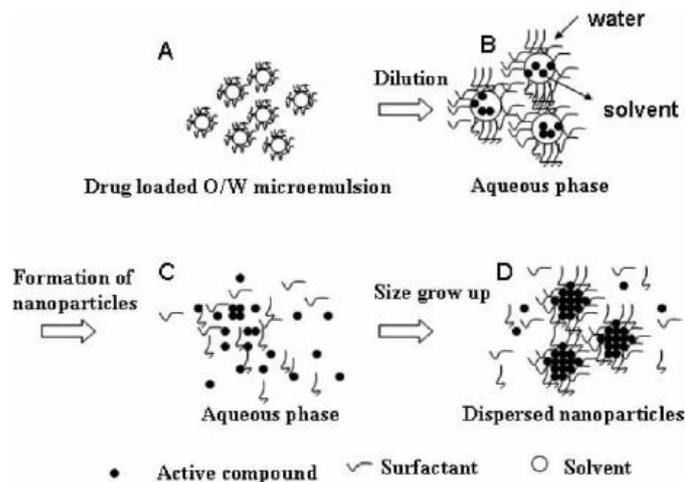
Na área farmacêutica, as nanossuspensões podem ser empregadas com a finalidade de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em meio aquoso (Rabinow, 2004). A redução das partículas do fármaco na faixa nanométrica também promove um aumento da taxa de dissolução e da biodisponibilidade de compostos insolúveis, pertencentes às classes II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Kesisoglou; Panmai; Wu, 2007). Outras vantagens adicionais, são o aumento da estabilidade físico-química dos medicamentos e a possibilidade de redução na dose administrada, o que pode levar a uma diminuição dos efeitos adversos nos pacientes (Liversidge; Cundy, 1995).

São produzidas através de vários processos, destacando-se os métodos *top down* e *bottom up*. Com a produção *top down*, as partículas têm seu tamanho reduzido para escala nanométrica a partir do processo de desintegração. No *bottom up*, as nanopartículas se formam a partir de moléculas através de agregados, como na precipitação (Arora *et al.*, 2018). Exemplos de métodos *top-down* incluem a homogeneização de alta pressão e a moagem de mídia, enquanto exemplos de métodos *bottom-up* incluem a microprecipitação, o uso de microemulsões e o método de emulsificação, entre outros (Prabhakar; Krishna, 2011).

No método *bottom-up*, existe uma forma de preparo que merece destaque, que consiste na produção de nanosuspensões a partir de microemulsões. Nesse método, o fármaco deve estar disposto preferencialmente na fase interna da microemulsão A/O e em alguns casos a formulação deve estar saturada. É utilizada uma fase oleosa parcialmente miscível em água ou outro solvente orgânico adequado (Zhang *et al.*, 2017).

A adição de água faz com que grande parte da fase interna que é parcialmente miscível em meio aquoso, se desloque em direção a água, liberando o fármaco que estava aprisionado em forma de precipitado, já que as gotículas não serão mais capazes de solubilizar o ativo por conta da migração da fase oleosa. O precipitado se solidifica instantaneamente, formando partículas sólidas de fármaco dispersas envolvidas pelos tensoativos (Trotta *et al.*, 2003.; Zeng *et al.*, 2008). É um método rápido, fácil e através dele, é possível controlar o tamanho da partícula, entretanto, deve-se escolher com cautela o solvente orgânico para evitar intoxicação (Zhang *et al.*, 2017).

Figura 4 – Método para obtenção de nanossuspensões utilizando microemulsões



Fonte: Zeng *et al.* (2008).

Apesar de seus benefícios, as nanossuspensões podem apresentar desafios, especialmente relacionados a sua estabilidade, ocorrendo fenômenos como agregação e sedimentação. A agregação acontece principalmente por conta da diferença do tamanho de partículas em uma formulação, fazendo com que as partículas menores e mais solúveis tenham sua massa transferida e dissolvidas nas partículas maiores, formando agregados. Já a sedimentação é um indicativo de extrema instabilidade no sistema sendo um problema irreversível de interação entre as partículas (Wang *et al.*, 2013).

Um elevado número de fármacos utilizados atualmente apresenta uma baixa biodisponibilidade devido à escassa solubilidade em água e/ou baixa taxa de dissolução (Chen *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2009). A solubilidade representa um elemento essencial para a eficácia do fármaco, independente da via de administração (Kocbek *et al.*, 2006). Portanto, o desenvolvimento de estratégias para aumentar a solubilidade desses compostos em sistemas aquosos é de grande importância na tecnologia farmacêutica.

Outra característica relevante das nanossuspensões é o aumento da solubilidade de saturação e, em consequência, o aumento da taxa de dissolução do composto, a qual se apresenta como um fator adicional causado pelo aumento da superfície de contato. Em geral, a solubilidade de saturação é uma constante específica do composto, a qual é dependente da temperatura (Kocbek *et al.*, 2006). As nanossuspensões mostram um aumento da adesividade em tecidos, similar a outras nanopartículas (Ponchel *et al.*, 1997). Características adicionais dessas formulações possibilitam-nas de induzir alterações na estrutura cristalina do composto, proporcionar aumento da fração amorfa na partícula e, até mesmo, criar partículas completamente amórficas (Kocbek *et al.*, 2006). Para caracterizar adequadamente as nanossuspensões, técnicas como análise do tamanho de partícula e potencial zeta, comumente aplicadas para microemulsões, também são utilizadas (Prabhakar; Krishna, 2011).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Matérias primas, solventes e reagentes

- Ibuprofeno, adquirido da Florien Fitoativos, com lote 110353 e data de validade 01/09/2025.
- Lecitina (Lipoid S 100), adquirida da Lipoid®.
- Álcool isopropílico, adquirido da Dinâmica®.
- Álcool benzílico, adquirido pela Dinâmica®.
- Carbonato de propileno, adquirido da Sigma-Aldrich®.
- Ácido clorídrico, adquirido pela Alphatec®.
- Ácido o-fosfórico, adquirido pela Synth®.
- Fosfato de sódio monobásico anidro 98%, adquirido pela Neon®.
- Metanol, adquirido da Merck®.

#### 4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Balança Analítica (Marca: DEMOR INSTRUMENT; Modelo: APX-200).
- Ultrapurificador Direct-Pure (Purelab clássico DI, Elga, UK).
- pHmetro (Marca: PHTEK; Modelo: pH S-3B).
- Micropipetas 0,5-10 µL, 10-100µL e 100-1000µL (Marca: EPPENDORF).
- Cubeta de Quartzo.
- Agitador Magnético (Marca: LOGEN SCIENTIFIC; Modelo: LS59110P).
- Vortex (Marca: BIOMIXER; Modelo: QL-901).
- Zetasizer Nano Essentials (MALVERN®).
- Cromatógrafo Shimadzu, equipado com detector DAD.
- Coluna C18 fase reversa HyperClone® Phenomenex 250 x 4,6 mm.

## 4.2 PELE

A pele utilizada nos experimentos de extração e recuperação foi proveniente da região dorsal de orelha de porco, e adquirida no abatedouro de Paulista – PE. As orelhas foram obtidas logo após o abate do animal. Em seguida, foram lavadas e a pele da região dorsal externa foi dissecada. A pele dissecada foi congelada para ser utilizada até o prazo máximo de 30 dias.

## 4.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas para determinação do ibuprofeno (IBU) foram efetuadas em cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com detector DAD (detector de arranjo de diodos), operando a 223 nm com bomba LC-20 AD e software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa (HyperClone®, Phenomenex) 250 x 4,6 mm (5 µm). A fase móvel foi constituída por metanol e solução aquosa de ácido clorídrico (0,07%, v/v) (pH 2,15) na proporção 8:2 v/v, com vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 223nm. As amostras foram acidificadas previamente com ácido clorídrico 1M na proporção de 60 µL de ácido para 1mL de amostra para melhor resolução dos picos. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 8 minutos e o tempo de retenção do ibuprofeno foi de cerca de 5,7 minutos. As condições descritas estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições empregadas para a determinação analítica de ibuprofeno (IBU) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo (CLAE-DAD)

<b>Condições cromatográficas</b>	
Fase móvel	Metanol/ HCl 0,07% 8:2 (v/v)
Fase estacionária	Coluna C18 250 x 4,6 mm (5 µm) (HyperClone®, Phenomenex)
Volume de injeção	20 µL
$\lambda$	223 nm
Fluxo	1 mL/min
Tempo de retenção	5,7 min

#### 4.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

##### 4.4.1 Linearidade

A linearidade da metodologia analítica proposta foi avaliada a partir da análise de soluções com concentrações conhecidas de ibuprofeno, preparadas em triplicata de forma independente, a partir de uma solução inicial do fármaco em metanol na concentração de 1mg/mL. Alíquotas da solução inicial (mãe) foram diluídas em solução tampão fosfato (pH 7,4) para obter concentrações correspondentes a 0,5µg/mL, 1µg/mL, 1,5µg/mL, 2µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL. As soluções foram analisadas por CLAE-UV, conforme condições descritas no item 4.4 e os resultados obtidos expressos graficamente através da relação da concentração das soluções em função da área sob pico. A linearidade foi avaliada por meio do modelo de regressão linear simples, com avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), com o auxílio do software Statistica 10.0.

##### 4.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise de possíveis interferentes experimentais. Dessa forma, foram analisadas amostras com todos os componentes usados no desenvolvimento das formulações, contendo ou não fármaco. A ausência de picos interferentes nos tempos de retenção do ibuprofeno ( $5,7 \pm 0,30$  minutos) foi considerada para avaliação da seletividade.

##### 4.4.3 Precisão

A precisão do método analítico foi expressa através da dispersão dos resultados, calculada através do desvio padrão relativo (DPR), definido como a razão do desvio padrão pela média, e foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por meio do DPR, calculado para análises em triplicata para três diferentes concentrações de IBU, incluídas no intervalo linear (1, 2 e 5 µg/mL) realizadas em um mesmo dia, preparadas de maneira independente, sob as mesmas condições de operação, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Já a precisão intermediária foi determinada a partir da análise da proximidade entre os resultados obtidos de determinações em triplicata de

amostras com as mesmas concentrações avaliadas na repetibilidade, em dois dias não consecutivos, preparadas de maneira independente, mas realizadas por operadores distintos, sob as mesmas condições operacionais empregadas anteriormente.

#### **4.4.4 Exatidão**

Para determinação da exatidão, foram utilizadas as mesmas concentrações do estudo de precisão, 1µg/mL, 2µg/mL e 5µg/mL em triplicata. Os resultados foram expressos em função da relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, conforme a seguinte fórmula: [(concentração média experimental - concentração teórica) x 100].

#### **4.4.5 Robustez**

A robustez do método foi avaliada a partir da variação do fluxo para testar a alteração da condição experimental. As amostras foram analisadas sob essas condições alteradas, e as variações nos resultados foram avaliadas estatisticamente.

#### **4.4.6 Limite de quantificação**

O Limite de quantificação foi determinado a partir da análise de soluções com concentração baixa de ibuprofeno, preparadas em quintuplicata de forma independente, a partir de uma solução inicial do fármaco em metanol na concentração de 1mg/mL, diluídas em solução tampão fosfato (pH 7,4).

#### **4.4.7 Estudo de recuperação do IBU a partir do estrato córneo**

Tendo em vista a futura avaliação do desempenho das formulações desenvolvidas em estudos in vitro de permeação cutânea, foi realizado um estudo para análise da recuperação do IBU em estudos de extração a partir do estrato córneo.

Inicialmente, o estrato córneo foi removido da pele de orelha de porco através da técnica de *tape stripping*, que consiste no uso de fitas adesivas para remoção dessa camada da pele. De forma geral, foram utilizados 15 pedaços de fitas cortados uniformemente para remoção sequencial do estrato córneo das orelhas de porco. As fitas foram manuseadas com uma pinça

para evitar contato das mesmas com outros materiais que pudessem interferir na análise. Após a retirada do estrato córneo, as fitas contendo o estrato córneo foram adicionadas em um tubo de fundo cônico, e acrescidas de IBU. Em seguida, o solvente extrator, constituído de HCl 0,1M e metanol na proporção 90:10 (pH ~ 1,8 – 2,0) foi adicionado e o conjunto submetido a agitação constante, sob aquecimento a 60°C durante tempo pré-estabelecido. Em seguida, as amostras foram transferidas para agitação em sonicador, durante tempo pré-estabelecido, e por fim, submetidas a filtração (0,45 mm) para posterior análise por CLAE (item 4.3).

Para otimizar a extração do IBU, foi realizado um estudo de planejamento fatorial completo para avaliar a influência de quatro fatores: (i) o volume de solvente extrator empregado, (ii) a temperatura e (iii) o tempo empregados para agitação magnética e (iv) o tempo empregado para agitação em sonicador. Cada fator foi avaliado em dois níveis, além de um ponto central. Os níveis superior e inferior são representados como “+” e “-”, respectivamente, enquanto o ponto central é representado por “0” (Tabela 2). Esse procedimento resultou em um planejamento fatorial  $2^k$ , onde o número "2" representa os dois níveis testados e k é igual ao número de fatores. Como foram 4 fatores, isso corresponde a um planejamento  $2^4$ , totalizando 16 experimentos que foram realizados aleatoriamente. O software Statistica versão 10.0 foi utilizado para o delineamento experimental e análise dos resultados.

Tabela 2 – Condições experimentais empregadas para extração do IBU a partir do estrato córneo em estudo de planejamento fatorial com ponto central

Fatores	Níveis		
	-	0	+
Volume (mL)	10	15	25
Temperatura (°C)	40	60	80
Tempo de agitação (min)	10	20	30
Tempo de Sonicação (min)	30	45	60

#### 4.5 OBTENÇÃO DAS MICROEMULSÕES

Para o preparo das microemulsões, foi utilizado álcool benzílico ou carbonato de propileno como fase oleosa. Lecitina contendo 98% de fosfatidilcolina e isopropanol foram empregados como tensoativo e cotensoativo, respectivamente. Água destilada foi utilizada como fase aquosa para a obtenção das formulações. Com a finalidade de identificar as regiões de microemulsões, foram construídos três diagramas de fase pseudo-ternários para cada fase oleosa testada, através da titulação lenta de uma série de misturas de fase oleosa/tensoativos,

variando de 9:1 a 1:9 m/m com alíquotas de 50µL de água destilada, à temperatura ambiente, sob agitação magnética contínua. Os diferentes diagramas foram construídos variando-se a proporção de tensoativo/cotensoativo de 1:2, 1:1 e 2:1.

Alíquotas de água foram adicionadas até turvação da mistura e após a adição de cada alíquota de água, as amostras foram visualmente inspecionadas para a classificação dos sistemas formados em translúcido e monofásico, com baixa viscosidade, translúcido e monofásico de maior viscosidade e sistemas bifásicos. Amostras translúcidas, isotrópicas e de baixa viscosidade, foram classificadas como microemulsões.

Para a construção gráfica dos diagramas pseudo-ternários, as proporções dos componentes foram plotados com o auxílio do programa OriginPro® 9. Dentre os diagramas de fase obtidos que resultaram em áreas de microemulsões com ampla variação no conteúdo de água, foram selecionadas formulações para serem utilizadas na obtenção de nanosuspensões de ibuprofeno, de maneira semelhante à técnica proposta por Trotta *et al.* (2003).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROEMULSÕES

Após a construção dos diagramas pseudo-ternários, formulações selecionadas dos diferentes diagramas foram avaliadas quanto à isotropia do sistema formado, diâmetro médio das gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. As análises foram realizadas após diferentes períodos de tempo de preparo das formulações: 1, 2, 3, 5, 15 e 30 dias.

##### 4.6.1 Microscopia de luz polarizada

Alíquotas de cada amostra foram analisadas em lâminas sob microscópio óptico de polarização (Leica DM750M), acoplado com câmera digital (Leica ICC50W), através da qual foram obtidas imagens processadas em software (LAS EZ).

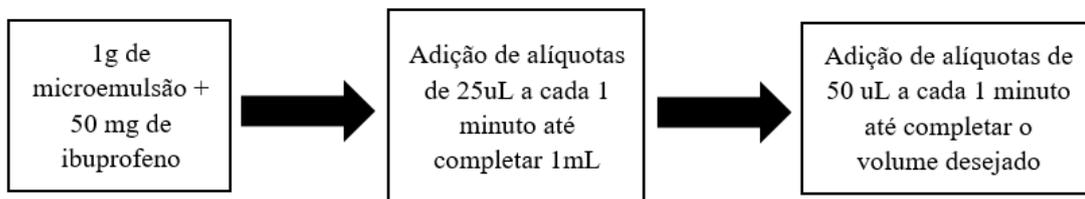
##### 4.6.2 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (pDI) e potencial zeta

O diâmetro médio das gotículas e índice de polidispersão das microemulsões selecionadas foi determinado através de técnica de espalhamento dinâmico de luz, utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), em triplicata e à temperatura controlada de 25° C e ângulo de 90°, sem diluição

#### 4.7 OBTENÇÃO DAS NANOSUSPENSÕES

As nanosuspensões foram preparadas, de forma geral, a partir da diluição de formulações selecionadas dos diferentes diagramas pseudo-ternários, previamente caracterizadas, acrescidas de ibuprofeno a 5% (m/m), sob contínua agitação em agitador magnético, a partir de adaptações à metodologia proposta por Trotta *et al.* (2003), conforme descrito no fluxograma apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Sequência de etapas empregadas para o preparo das nanosuspensões utilizando formulações selecionadas



Para otimizar o preparo das nanossuspensões com características desejadas, foi realizado um estudo com planejamento fatorial, para a análise da influência de três fatores: (i) proporção de diluição das microemulsões, (ii) pH da fase aquosa da microemulsão e (iii) pH da água de diluição. O delineamento foi realizado com dois níveis e um ponto central, conforme descrito a seguir, na Tabela 3, resultando em um planejamento  $2^3$ . Para uma compreensão mais aprofundada sobre a elaboração do estudo fatorial, recomenda-se consultar o tópico 4.4.7.

Tabela 3 – Condições experimentais empregadas para obtenção de nanossuspensões, através de diluição das ME selecionadas, em estudo de planejamento fatorial com ponto central

Fatores	Níveis		
	-	0	+
Proporção de diluição da ME	1:2	1:3	1:4
pH da fase aquosa da ME	2	Sem ajuste*	6
pH usado na diluição da ME	2	Sem ajuste*	6

\* = aproximadamente 7 na formulação final.

Para controle do pH (na fase aquosa das microemulsões ou na diluição das formulações nanoestruturadas para obtenção das nanossuspensões), foram empregadas soluções tamponadas (tampão fosfato 0,1M com pH 2 ou 6) ou o ajuste com solução de HCl 0,1M, para avaliar a influência do pH nas características das nanopartículas formadas, uma vez que a solubilidade

do ibuprofeno é pH-dependente (Potthast *et al.*, 2005). As nanossuspensões foram produzidas 24h após o preparo das microemulsões, que ficaram mantidas sob agitação durante esse período, até a etapa de diluição.

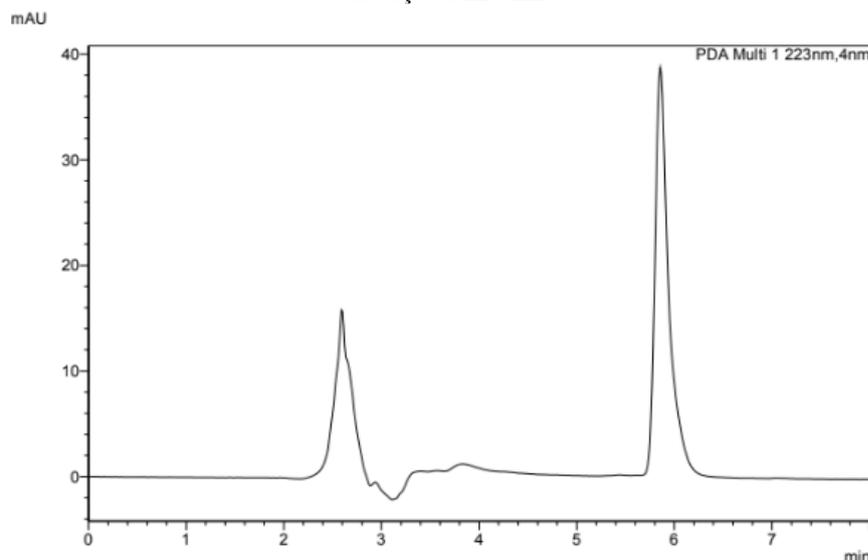
As diferentes nanossuspensões obtidas a partir do delineamento experimental proposto, derivadas de formulações oriundas dos variados diagramas pseudo-ternários foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão conforme previamente descrito no item 4.6.2, 24h após o preparo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O cromatograma típico obtido a partir das condições de análise de quantificação do IBU está representado na Figura 6. O tempo de retenção foi de aproximadamente 6 minutos. Na literatura, a faixa de tempo de retenção do IBU para os diferentes métodos validados é variado, sendo mencionados tempos de 3,5 a 9 minutos (Gómez; Martínez; Martínez, 2010; Jahan *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2008).

Figura 6 – Cromatograma referente ao IBU, empregando coluna Phenomenex HyperClone ODS C<sub>18</sub> (250 x 4,60 nm; 5µm), fase móvel metanol: HCl 0,07% (80:20) (v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µl; detecção a 223 nm



#### 5.1.1 Linearidade

Para avaliação do parâmetro de linearidade foram utilizadas amostras na faixa de concentração de 0,5 a 10 µg/mL para construção de curva de calibração com ajuste de regressão linear. Os dados da curva analítica estão representados na Tabela 4.

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculado a partir da curva de calibração realizada em triplicata foi de 0,9963, indicando comportamento linear entre as concentrações do IBU e os sinais analíticos obtidos. Segundo a ANVISA (Brasil, 2017), o coeficiente de determinação do modelo estatístico linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o

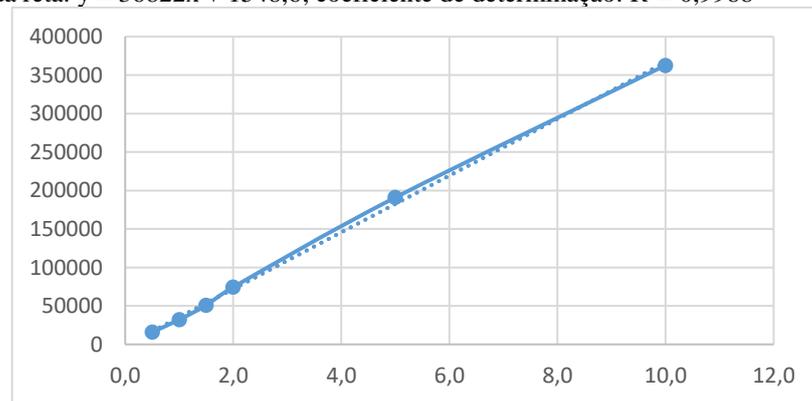
valor de  $R^2$  calculado na análise do IBU pelo método desenvolvido obedece aos limites estabelecidos. A curva analítica obtida para quantificação do IBU está apresentada na Figura 7.

Tabela 4 – Curva analítica do IBU na faixa de concentração de 0,5 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Equação da reta:  $y = 36822x + 1548,6$ ; coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,9988$

Concentração de IBU ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Área dos picos
0,5	15906 ( $\pm 1349,913084$ )
1	32190 ( $\pm 2647,407789$ )
1,5	50798 ( $\pm 2890,652521$ )
2	74498 ( $\pm 542,76000$ )
5	190995 ( $\pm 218,495995$ )
10	362767 ( $\pm 352,7707$ )

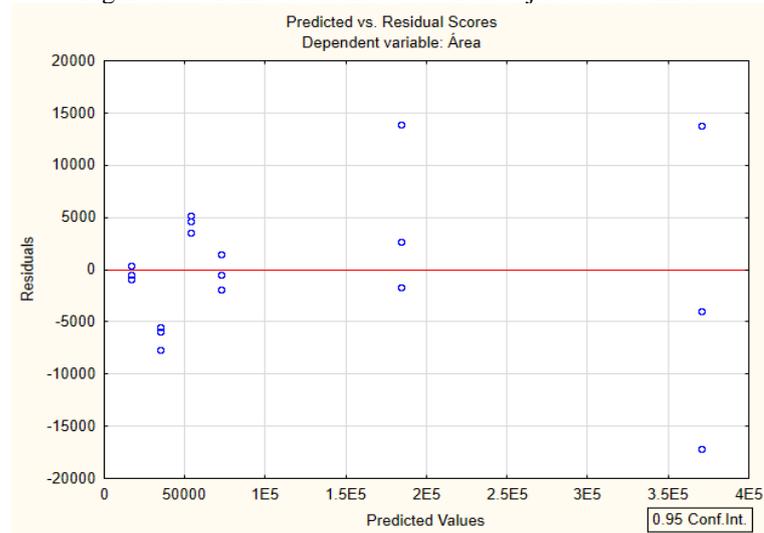
\* Os valores entre parênteses representam o desvio padrão de 3 determinações.

Figura 7 – Curva analítica do IBU na faixa de concentração de 0,5 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Equação da reta:  $y = 36822x + 1548,6$ ; coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,9988$



As amostras utilizadas para avaliação da linearidade tiveram concentração variando de 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 3  $\mu\text{g}$  e 10  $\mu\text{g}$ . O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,996, indicando uma correlação linear robusta, visto que esse valor se aproximou significativamente de 1. A partir do gráfico de resíduos e valores ajustados, é possível identificar que os resíduos se distribuem normalmente (Figura 8).

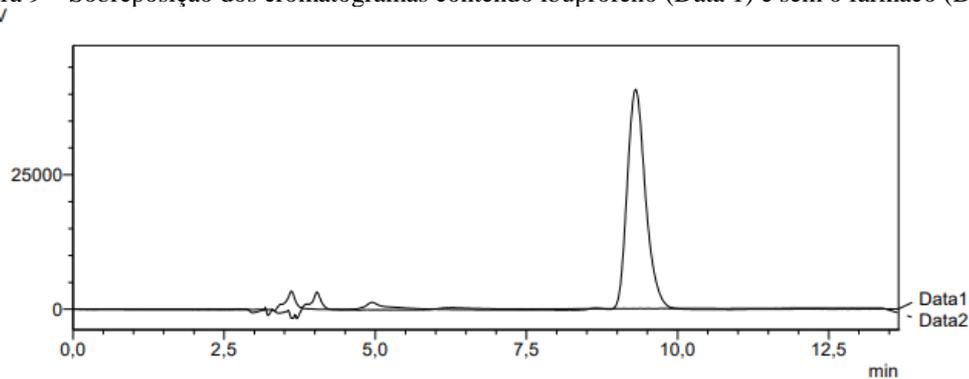
Figura 8 – Gráfico de resíduos e valores ajustados do IBU



### 5.1.2 Seletividade

Com relação à seletividade do método, não foram observados interferentes no tempo de retenção do analito da nanosuspensão analisada em comparação à amostra contendo todos os constituintes da formulação sem o fármaco (Figura 9). Diante dos resultados, é possível inferir que o método se demonstrou seletivo para a quantificação do ibuprofeno.

Figura 9 – Sobreposição dos cromatogramas contendo ibuprofeno (Data 1) e sem o fármaco (Data 2)



### 5.1.3 Precisão

A repetibilidade foi avaliada através do DPR calculado para análises em triplicata de três diferentes concentrações de IBU (1, 2 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ). O valor máximo de desvio padrão relativo obtido para essas análises em triplicata foi de 5,15%, conforme visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros analíticos para análise de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão do IBU empregando coluna Phenomenex HyperClone ODS C<sub>18</sub> (250 x 4,60 nm; 5µm), fase móvel metanol: HCl 0,07% (80:20) (v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µl; detecção a 223 nm

Concentração	Repetibilidade (DPR)	Reprodutibilidade (DPR)	Exatidão
1 µg/mL	4,37	5,24	26,05
2 µg/mL	5,15	6,83	3,78
5 µg/mL	1,59	3,72	11,43

A precisão intermediária foi determinada pela proximidade obtidos em triplicata das amostras, utilizando as mesmas concentrações utilizadas na repetibilidade. O desvio padrão relativo dessas determinações foi um pouco superior. A dispersão dos resultados em valores adequados reforça a confiabilidade do método analítico para a determinação de concentrações de IBU, e proporciona resultados consistentes e reprodutíveis.

#### 5.1.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico indica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2017), e pode ser calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.

#### 5.1.5 Robustez

Os resultados dos testes de robustez do método analítico para a concentração de 5 µg/mL de IBU são os seguintes:

Tabela 6 – Dados analíticos obtidos para a avaliação de robustez

	Fluxo 1mL/min	Fluxo 1,03 mL/min
Área do pico	189.685	187.918
Tempo de retenção	5,637	5,454

Esses resultados indicam que o método analítico é robusto em relação a variações no fluxo, uma vez que as diferenças observadas na área do pico e no tempo de retenção são relativamente pequenas. A consistência dos resultados mesmo com uma variação de 1,03 no fluxo sugere que o método é capaz de fornecer medidas confiáveis sob diferentes condições de fluxo.

### 5.1.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação refere-se a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). Através da análise de soluções contendo baixas concentrações de Ibuprofeno, o limite de quantificação foi estabelecido. Na Tabela 7 pode-se observar os valores de precisão e exatidão obtidos de análise de soluções contendo baixa concentração de IBU por CLAE-DAD conforme condições especificadas no item 4.3.

Tabela 7 – Precisão e exatidão da análise por CLAE-DAD de baixas concentrações de IBU para determinação do limite de quantificação

Concentração Teórica ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentração Analisada ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Exatidão <sup>a</sup>	Precisão <sup>b</sup>
0,5	0,4952 ( $\pm 0,0181$ )	-0,46	3,66

Os valores entre parênteses representam o desvio padrão de 5 determinações.

<sup>a</sup> expressa como  $E\% = ([ ] \text{ obtida} - [ ] \text{ teórica}) \times 100$ .

<sup>b</sup> expressa como desvio padrão relativo ( $\text{DPR} = \text{desv pad} / [ ] \text{ média} \times 100$ ).

De acordo com os dados obtidos, é possível observar que a concentração de  $0,5\mu\text{g/mL}$  apresenta valores de precisão e exatidão adequados e, ao ser colocada na curva de calibração proporcionou o coeficiente de correlação linear de 0,99, sendo, portanto, essa a concentração empregada como limite de quantificação do método.

### 5.1.7 Estudo de recuperação do IBU a partir do estrato córneo

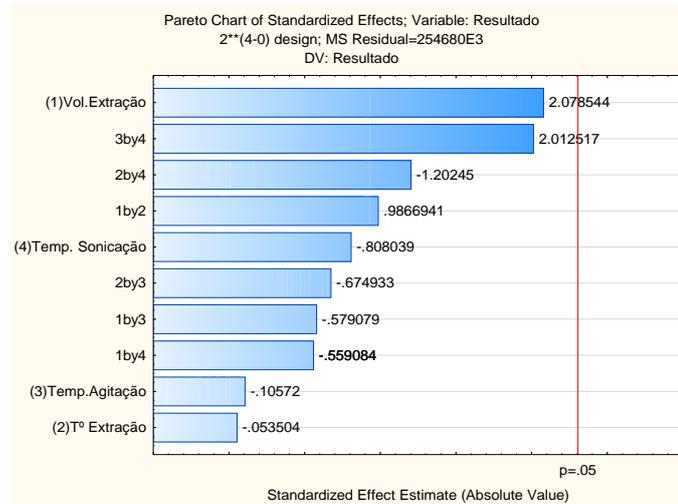
O estudo fatorial teve como objetivo identificar a condição ideal para extração do ibuprofeno das peles de orelha de porco. No decorrer da análise, ficou evidente que nenhuma das variáveis testadas apresentou significância estatística. Portanto, foi adotada uma metodologia de extração mais eficiente em termos de tempo, considerando que não haveria alterações significativas nos resultados.

Tabela 8 – Análise combinatória utilizada no delineamento experimental para a extração do IBU a partir do estrato córneo, e os respectivos valores ajustados de área do pico cromatográfico, empregando coluna Phenomenex HyperClone ODS C<sub>18</sub> (250 x 4,60 nm; 5µm), fase móvel metanol: HCl 0,07% (80:20) (v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µl; detecção a 223 nm

Experimento	Volume (mL)	Temperatura (°C)	Tempo Agitação	Tempo Sonicação	Área do IBU
1	10	40	10	30	344207.2
2	25	40	10	30	376874
3	10	80	10	30	357820
4	25	80	10	30	380119
5	10	40	30	30	342492
6	25	40	30	30	343307
7	10	80	30	30	338603.6
8	25	80	30	30	367009
9	10	40	10	60	340020.4
10	25	40	10	60	342989
11	10	80	10	60	329548
12	25	80	10	60	356438
13	10	40	30	60	369030.4
14	25	40	30	60	367429
15	10	80	30	60	336578
16	25	80	30	60	356818
17	15	60	20	45	373762651
18	15	60	20	45	368063253
19	15	60	20	45	388528.313

Ao examinar de perto cada ponto de dados e sua influência no resultado final, observa-se que nenhum deles atingiu um nível de significância estatística que justificasse sua inclusão na extração do ibuprofeno no gráfico de Pareto (Figura 10), que destaca a relevância de cada variável em relação ao todo. É possível presumir que a adoção de condições mais extremas no estudo fatorial poderia ter exercido uma influência mais marcante nos resultados da extração do ibuprofeno. A variação intensificada das condições experimentais poderia potencialmente amplificar os efeitos das variáveis em jogo, possivelmente conduzindo a uma extração mais eficiente e, conseqüentemente, a resultados mais notáveis e distintos.

Figura 10 – Gráfico de Pareto demonstrando que nenhuma das variáveis testadas alcançou significância estatística



Com base nos dados apresentados, a metodologia de extração com um volume de 15 mL, temperatura de 60°C, tempo de agitação de 20 minutos e tempo de sonicação de 45 minutos foi escolhida.

## 5.2 MICROEMULSÕES

Os diagramas de fases construídos para identificação das áreas de microemulsão utilizando álcool benzílico ou carbonato de propileno como fase oleosa, lecitina como tensoativo e isopropanol como cotensoativo, estão representados nas Figuras 10, 11 e 12, variando nas proporções de lecitina e isopropanol em 2:1, 1:1 e 1:2, respectivamente.

Figura 11 – Representação gráfica dos diagramas de fase pseudo-ternários obtidos contendo lecitina e isopropanol na proporção 2:1 (A), 1:1 (B) e 1:2 (C) respectivamente e álcool benzílico como fase oleosa

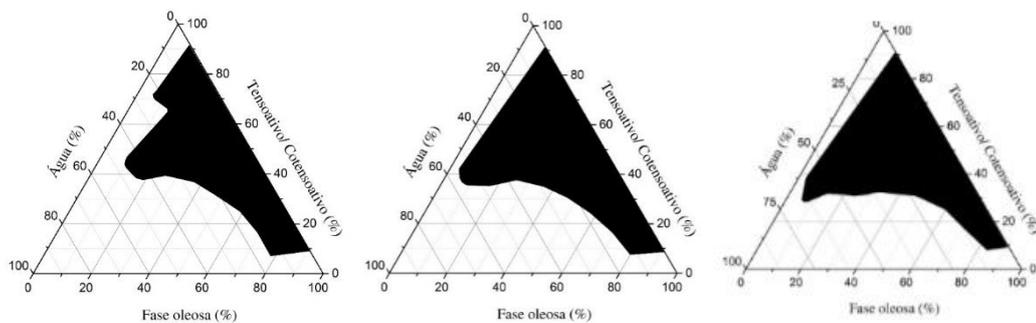
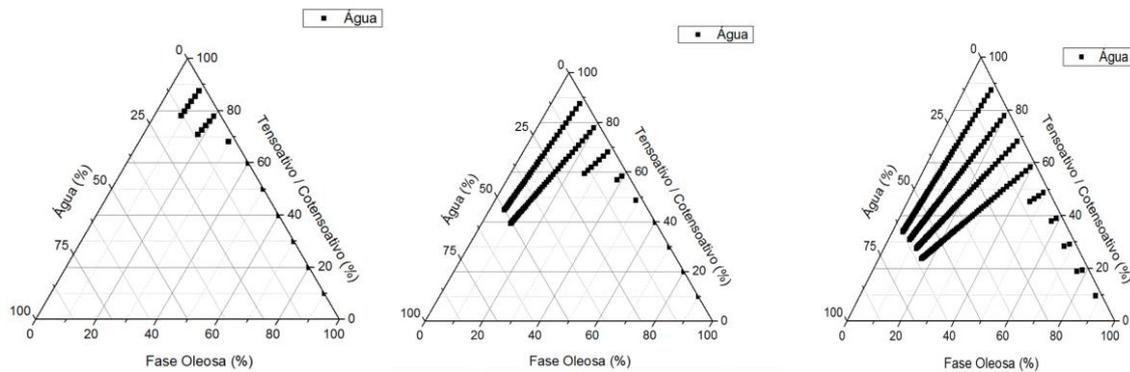


Figura 12 – Representação gráfica dos diagramas de fase pseudo-ternários obtidos contendo lecitina e isopropanol na proporção 2:1 (A), 1:1 (B) e 1:2 (C) respectivamente e carbonato de propileno como fase oleosa



Através da construção de diagramas pseudoternários, é possível identificar a formação de diferentes sistemas com características macroscópicas distintas, como microemulsões e cristais líquidos, assim como sistemas emulsionados ou bifásicos.

Como tensoativo, foi escolhida a lecitina de soja. A mesma é classificada como tensoativo anfótero, visto que sua estrutura é formada por uma bicamada lipídica possuindo duas longas cadeias de hidrocarbonetos. Também apresenta tendência a formar cristais líquidos a depender da concentração micelar crítica do sistema (Shinoda; Kaneko, 1988). É bastante versátil, sendo usada não somente para preparar microemulsões, como também outros sistemas como por exemplo, lipossomas (Paolino *et al.*, 2002).

O co-tensoativo atua aumentando a fluidez do sistema e diminuindo ainda mais a tensão interfacial. Como cotensoativo, foi selecionado o álcool isopropílico, por se tratar de um álcool de cadeia curta. Nas concentrações desejáveis, possuem a capacidade de aumentar a disponibilidade do medicamento na pele (Ande *et al.*, 2022).

As áreas delimitadas correspondem às amostras translúcidas obtidas após a adição de água, o que indica a probabilidade de formação de microemulsões. A presença dessas regiões, variando a proporção de tensoativo/cotensoativo, foi consideravelmente extensa e de comportamento semelhante para as duas fases oleosas testadas (álcool benzílico e carbonato de propileno). É possível verificar o aumento da área de sistemas translúcidos formados com o aumento da concentração do cotensoativo (isopropanol), o que pode ser atribuído à capacidade do cotensoativo de se acumular na camada interfacial, reduzindo ainda mais a tensão entre as duas fases e aumentando a estabilidade química da formulação (Sisak; Daik; Ramli, 2017).

Dentre as formulações dos diagramas obtidos com a utilização do álcool benzílico como fase oleosa, no diagrama A, o máximo de água comportado foi de 45%, enquanto que dentre as formulações do diagrama B, foi possível adicionar até 54% de água em uma das formulações

sem a ocorrência de turvação. Já para o diagrama C, o máximo de água adicionado sem turvação foi de 63%, enquanto que para as formulações translúcidas obtidas com o carbonato de propileno como fase oleosa, os percentuais máximos de água suportados foram equivalentes a 13%, 50% e 62% para os diagramas A, B e C (Figuras 12 e 13), respectivamente.

A partir dos diagramas obtidos, foram selecionadas para posterior caracterização formulações de baixa viscosidade que, através de inspeção visual, não apresentaram turvação e mantiveram-se translúcidas após a adição sequencial de água ao sistema. As amostras selecionadas, com suas respectivas proporções de tensoativos, fase oleosa e água, estão destacadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição das formulações selecionadas a partir dos diagramas de fase pseudo-ternários obtidos com álcool benzílico ou carbonato de propileno, lecitina/isopropanol e água, como fase oleosa, tensoativo/co-tensoativo e fase aquosa, respectivamente

Formulação	Fase oleosa (%)		Tensoativos (%)	Água (%)
	Álcool benzílico	Carbonato de propileno		
<b>MAB-1</b>	48	–	32 <sup>a</sup>	20
<b>MAB-2</b>	48	–	32 <sup>c</sup>	20
<b>MAB-3</b>	32	–	48 <sup>c</sup>	20
<b>MAB-4</b>	25	–	37,5 <sup>c</sup>	37,5
<b>MAB-5</b>	21,33	–	32 <sup>c</sup>	46,66
<b>MAB-6</b>	15	–	35 <sup>c</sup>	50
<b>MAB-7</b>	08	–	32 <sup>c</sup>	60
<b>MCP-1</b>	–	12,5	50 <sup>b</sup>	37,5
<b>MCP-2</b>	–	10	40 <sup>b</sup>	50
<b>MCP-3</b>	–	08	72 <sup>b</sup>	20
<b>MCP-4</b>	–	32	48 <sup>c</sup>	20
<b>MCP-5</b>	–	25	37,5 <sup>c</sup>	37,5
<b>MCP-6</b>	–	20	30 <sup>c</sup>	50
<b>MCP-7</b>	–	16	64 <sup>c</sup>	20
<b>MCP-8</b>	–	12,5	50 <sup>c</sup>	37,5
<b>MCP-9</b>	–	10	40 <sup>c</sup>	50
<b>MCP-10</b>	–	05	45 <sup>c</sup>	50

<sup>a</sup>: lecitina/isopropanol 2:1

<sup>b</sup>: lecitina/isopropanol 1:1

<sup>c</sup>: lecitina/isopropanol 1:2

Entre as formulações selecionadas com álcool benzílico na sua composição (MAB-1 a MAB-7), à exceção de MAB-1, as demais foram selecionadas do diagrama C, com maior proporção de isopropanol em relação à lecitina, já que foi o diagrama em que as formulações apresentaram maior capacidade em comportar água quando comparadas às formulações dos diagramas A e B. As formulações foram selecionadas com aumento gradual na proporção de água da formulação, afim de verificar a influência desse parâmetro nas características da formulação. A formulação MAB1 foi selecionada do diagrama A com a finalidade de averiguar se uma mudança na proporção tensoativo/cotensoativo teria algum efeito significativo nas características da microemulsão em relação a uma formulação de mesma proporção de fase oleosa, tensoativo e fase aquosa.

Entre formulações selecionadas com carbonato de propileno na sua composição (MCP-1 a MCP-10), além da influência da variação na proporção tensoativo/cotensoativo (MCP-1 e MCP-2 *versus* MCP-8 e MCP-9), outros critérios foram também considerados, como quantidades variadas de fase oleosa e tensoativos para a mesma proporção de água, por exemplo.

### **5.2.1 Caracterização das microemulsões selecionadas**

As formulações selecionadas, indicadas na Tabela 12, foram avaliadas quanto a isotropia do sistema formado, por microscopia de luz polarizada, assim como submetidas as análises mais usuais para caracterização de microemulsões, incluindo o diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Para avaliar a estabilidade dos sistemas formados, todas as análises foram realizadas nos intervalos de 1, 2, 3, 5, 15 e 30 dias após o preparo.

### **5.2.2 Microscopia de luz polarizada**

Para verificar a isotropia do sistema, todas as formulações selecionadas foram submetidas à análise por microscopia de luz polarizada, com a finalidade de verificar a isotropia do sistema. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz, sendo possível de ser visualizado como uma área completamente escura (Fanun, 2008). De acordo com Damasceno *et al.* (2011) as microemulsões não são visualizadas na microscopia de luz polarizada porque suas partículas representam apenas  $\frac{1}{4}$  do comprimento de onda de luz incidente.

As Figuras 13 a 27 ilustram as fotomicrografias obtidas das formulações estudadas, a partir de 24h após seu preparo, e nos demais períodos destacados (2, 3, 7, 15 e 30 dias), e demonstram o comportamento das formulações ao longo do período avaliado.

Figura 13 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -1 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 14 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -2 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 15 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -3 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 16 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -4 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)

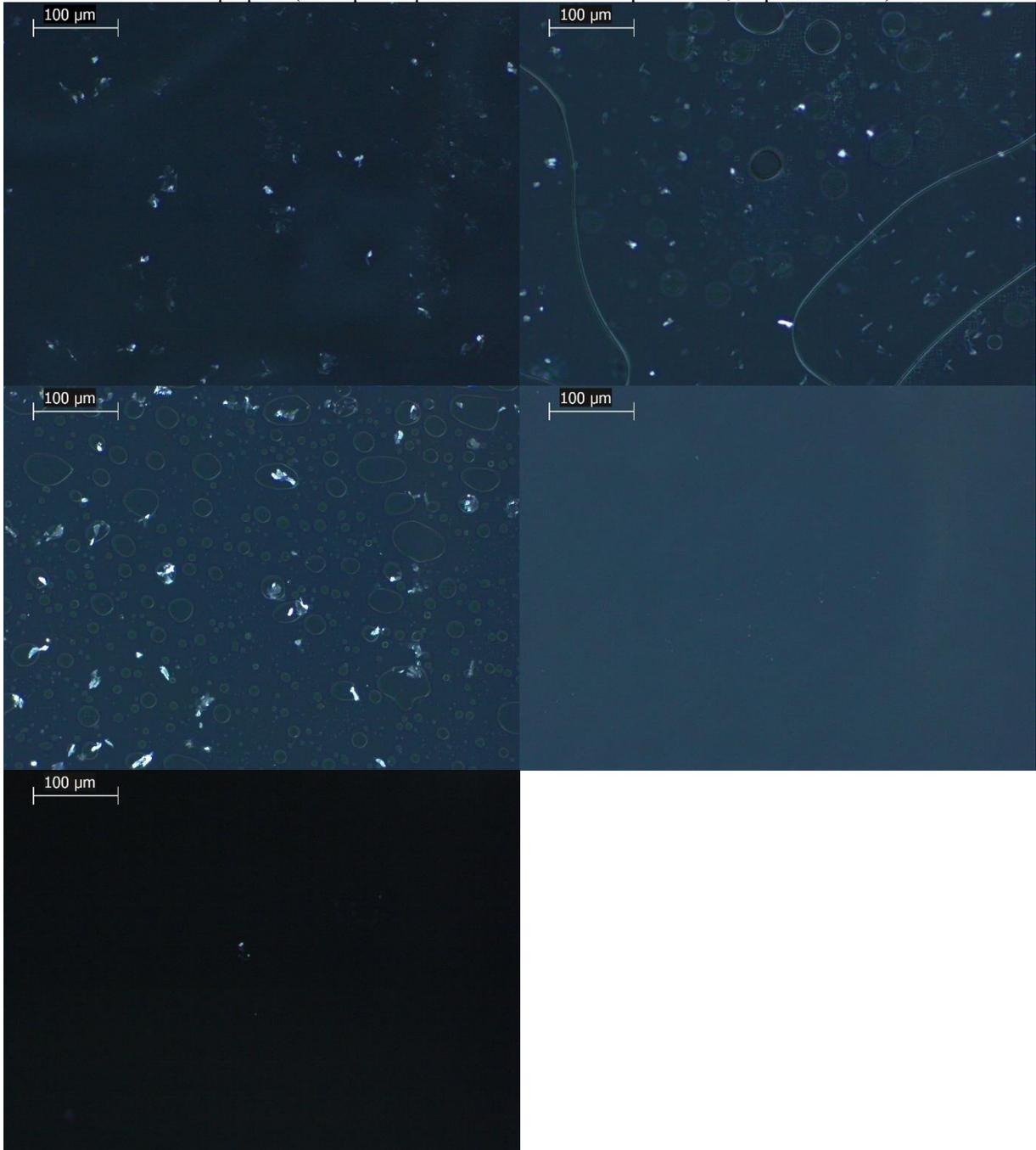


Fonte: Dados da pesquisa (2024).

A análise microscópica criteriosa das formulações MAB-1, MAB-2, MAB-3 e MAB-4 evidenciou a presença de alguns pequenos cristais, principalmente nos dias iniciais após o preparo das formulações. No entanto, é possível observar também a mudança gradativa nas formulações, com a reorganização dos sistemas formados. Decorridos 15 dias, basicamente não são mais encontradas estruturas cristalinas para as formulações citadas.

A formulação MAB-5, após 24h, com a interrupção da agitação magnética apresentou-se turva, e dessa forma, não foi considerada para essa análise. Já MAB-6 e MAB-7 apresentaram turvação ao completarem 30 dias. As Figuras 17 e 18 ilustram as fotomicrografias obtidas para essas duas formulações, respectivamente.

Figura 17 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -6 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 18 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MAB -7 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)

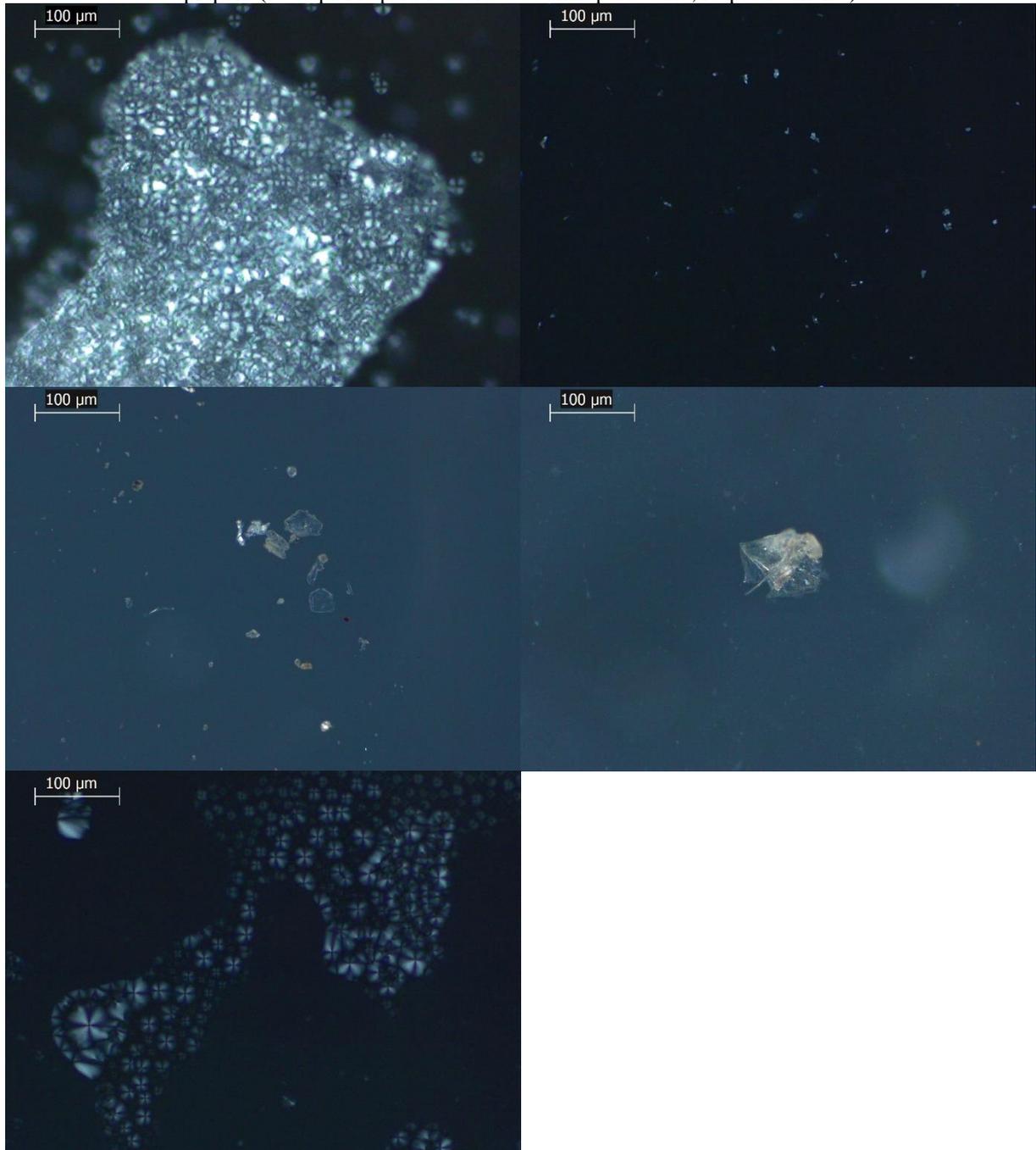


Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Para a maioria das amostras estudadas, houve a formação de estruturas cristalinas. Conforme afirma Formariz *et al.* (2005) tensoativos da classe dos lipídios são propícios a formarem estruturas cristalinas. Sendo assim, a lecitina utilizada no presente estudo, por se tratar de tensoativo formado de uma cadeia lipídica, favoreceu a formação dessas estruturas. O predomínio das estruturas cristalinas é observado sobretudo para as formulações com carbonato

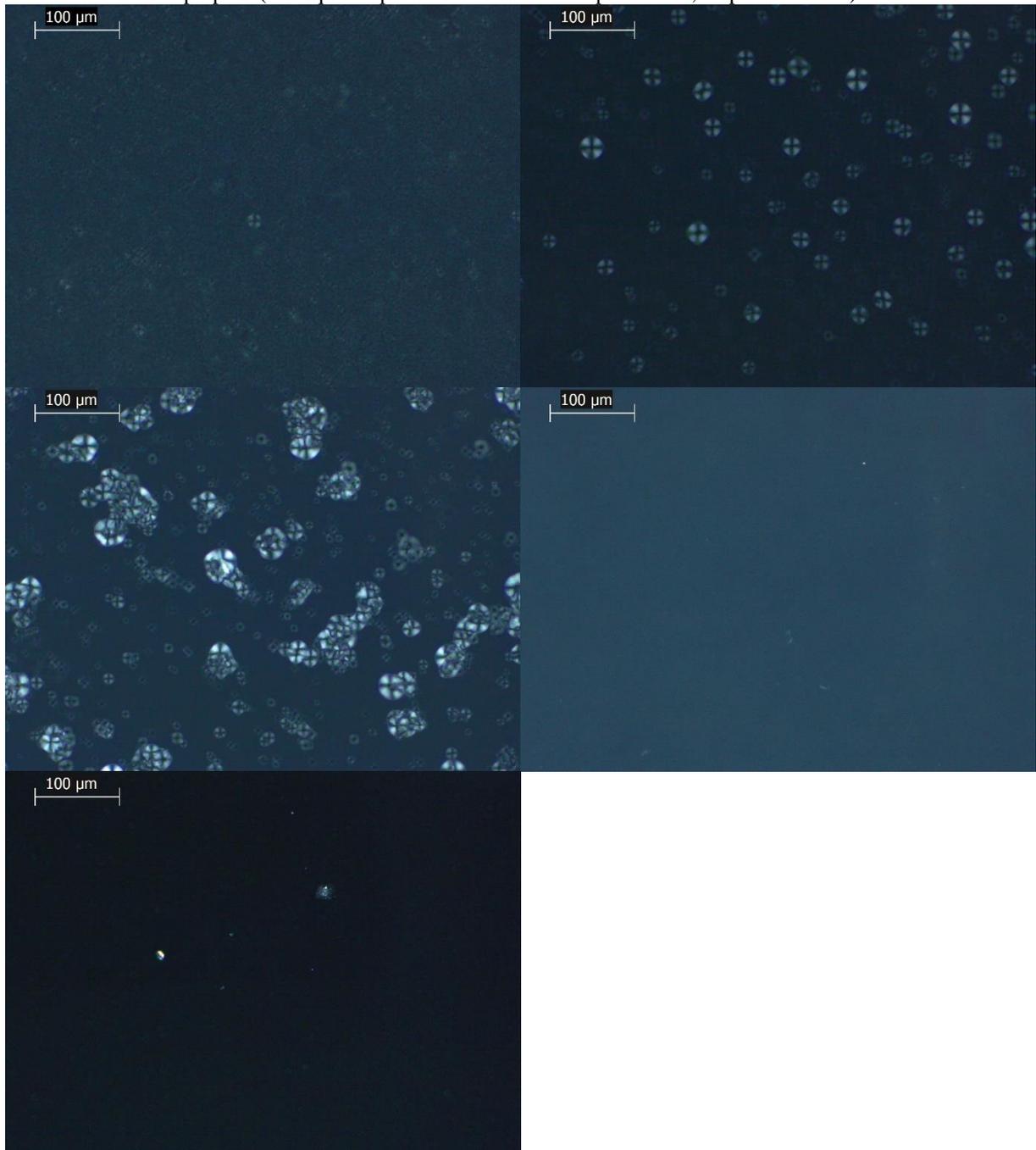
de propileno na composição, conforme pode ser observado nas Figuras 19 a 21 a seguir, que ilustram as formulações MCP.

Figura 19 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -1 após 1, 2, 3, 7 e 15 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



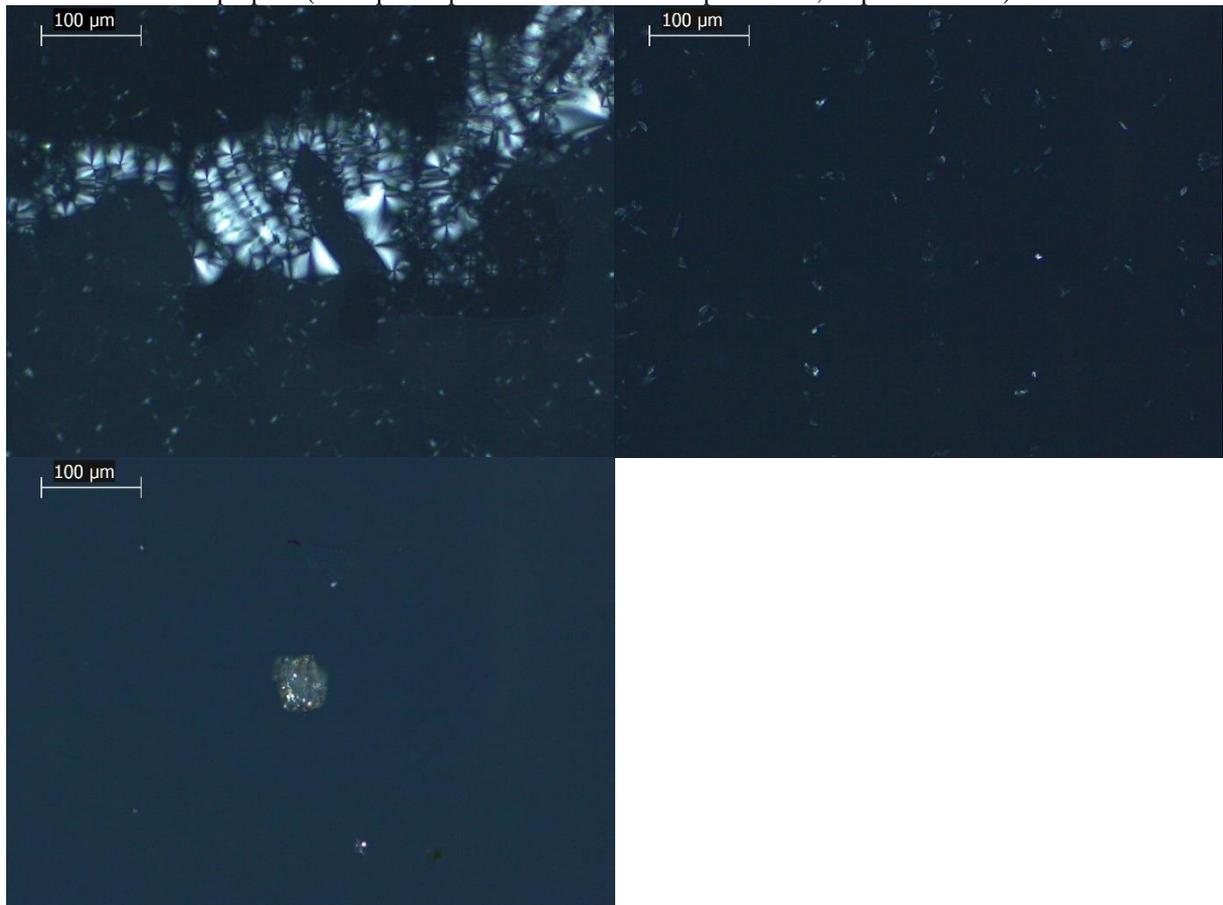
Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 20 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -2 após 1, 2, 3, 7 e 15 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 21 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -3 após 1, 2 e 3 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Conforme pode ser observado nas fotomicrografias ilustradas nas Figuras 19 a 21, estruturas bem organizadas, características de cristais líquidos, estão presentes para as formulações MCP-1, MCP-2 e MCP-3, com destaque para a presença de cruces de malta, características de cristais líquidos lamelares. No caso da formulação MCP-1, percebe-se a presença dessas estruturas nas análises realizadas logo no primeiro dia, e novamente após decorridos 15 dias, e para MCP-2, até o terceiro dia de análise. Ambas as formulações se apresentaram turvas previamente à análise do dia 30. Já a formulação MCP-3 também apresentou estruturas organizadas, características de cristais líquidos, mas do tipo hexagonais, sem a presença das cruces de malta. Essa formulação apresentou-se turva previamente à análise do dia 7. A formulação MCP-4, após 24h, com a interrupção da agitação magnética apresentou-se turva, e dessa forma, assim como MAB-5, também não foi considerada para essa análise.

As formulações, a partir da MCP-5 até MCP-10 apresentaram comportamento semelhante às formulações com álcool benzílico, também com a presença de alguns pequenos cristais, principalmente nos dias iniciais após o preparo das formulações, que gradativamente

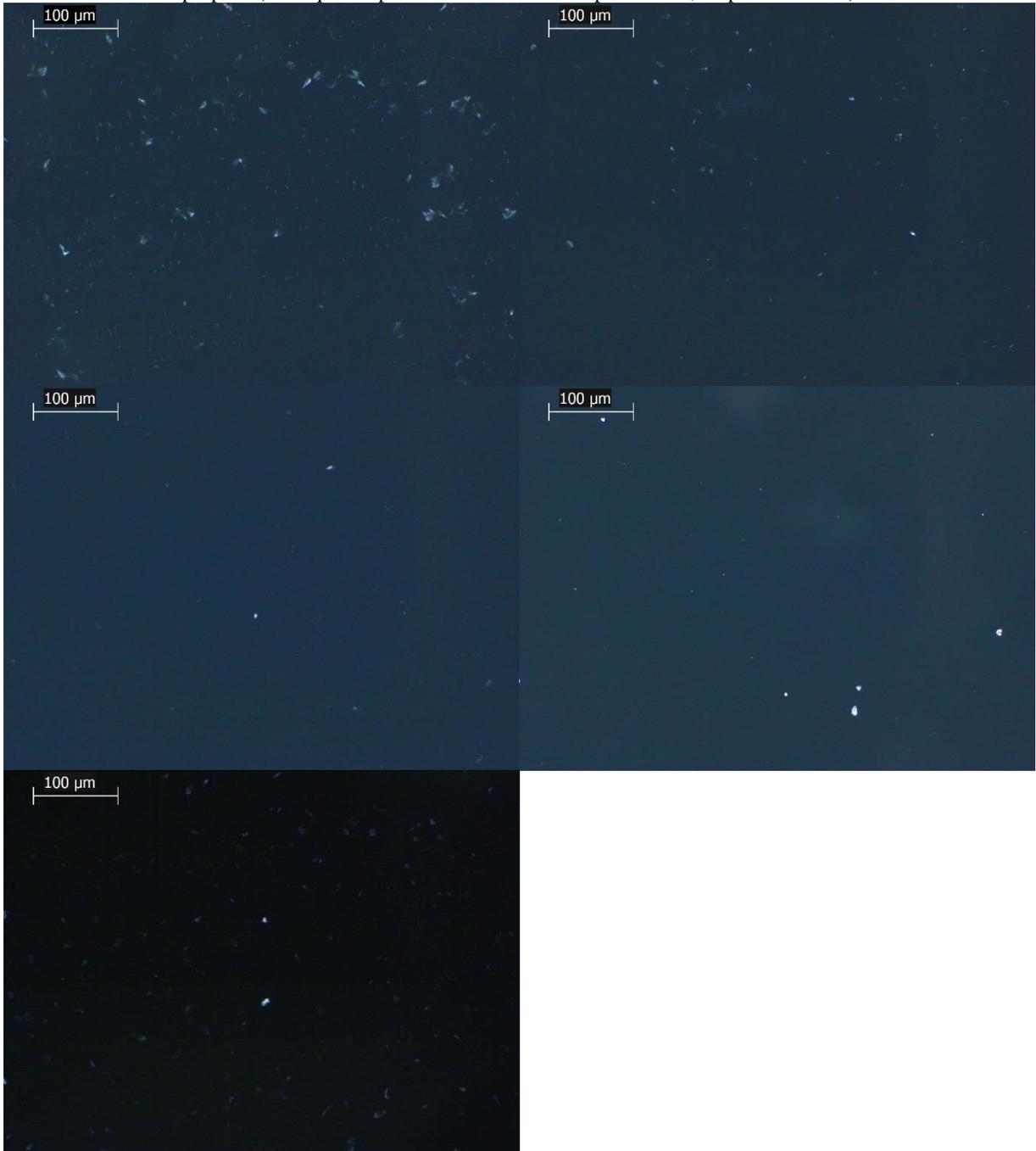
se reorganizam durante o período do estudo. Apenas na primeira análise da MCP-5 percebe-se a formação das cruces de malta. E, dentre essas formulações, apenas MCP-6 apresentou-se turva previamente à análise do dia 30, todas as demais mantiveram-se translúcidas. As Figuras 22 a 27 ilustram as fotomicrografias obtidas para as formulações MCP-5, MCP-6, MCP-7, MCP-8, MCP-9 e MCP-10, respectivamente.

Figura 22 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -5 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 23 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -6 após 1, 2, 3, 7 e 15 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 24 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -7 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 25 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -8 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 26 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -9 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 27 – Fotomicrografias (com aumento de 20x) referentes a formulação MCP -10 após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias do preparo (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respectivamente)



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

### 5.2.3 Diâmetro médio e Índice de polidispersão (PDI)

A Tabela 10 mostra os valores de diâmetro médio obtido e índice de polidispersão após 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias após o preparo das formulações selecionadas.

Tabela 10 – Valores de diâmetro médio e PdI para as formulações selecionadas a partir dos diagramas de fase pseudo-ternários obtidos com álcool benzílico ou carbonato de propileno, lecitina/isopropanol e água, como fase oleosa, tensoativo/co-tensoativo e fase aquosa, respectivamente, determinados por espalhamento dinâmico de luz após 1, 2, 3, 5, 15 e 30 dias do preparo

Formulação	Diâmetro médio (nm) ( $\pm$ PdI)					
	1d	2d	3d	7d	15d	30d
<b>MAB-1</b>	17,18 ( $\pm$ 0,342)	15,74 ( $\pm$ 0,345)	13,04 ( $\pm$ 0,364)	161,2 ( $\pm$ 1,000)	9,515 ( $\pm$ 0,438)	10,26 ( $\pm$ 0,355)
<b>MAB-2</b>	4,49 ( $\pm$ 0,197)	3,729 ( $\pm$ 0,236)	4,1 ( $\pm$ 0,152)	22,62 ( $\pm$ 0,119)	34,3 ( $\pm$ 0,152)	348,3 ( $\pm$ 0,497)
<b>MAB-3</b>	13,29 ( $\pm$ 0,175)	6,778 ( $\pm$ 0,147)	7,633 ( $\pm$ 0,111)	31,02 ( $\pm$ 0,179)	5,039 ( $\pm$ 0,207)	6,105 ( $\pm$ 0,150)
<b>MAB-4</b>	8,823 ( $\pm$ 0,088)	9,627 ( $\pm$ 0,067)	9,922 ( $\pm$ 0,073)	10,12 ( $\pm$ 0,070)	11,32 ( $\pm$ 0,067)	15,94 ( $\pm$ 0,124)
<b>MAB-5</b>	*					
<b>MAB-6</b>	14,62 ( $\pm$ 0,076)	14,37 ( $\pm$ 0,043)	14,91 ( $\pm$ 0,081)	16,05 ( $\pm$ 0,080)	21,24 ( $\pm$ 0,127)	*
<b>MAB-7</b>	24,07 ( $\pm$ 0,059)	24,38 ( $\pm$ 0,060)	25,29 ( $\pm$ 0,072)	32,23 ( $\pm$ 0,249)	30,97 ( $\pm$ 0,097)	*
<b>MCP-1</b>	16,03 ( $\pm$ 0,210)	15,82 ( $\pm$ 0,210)	15,99 ( $\pm$ 0,234)	22,44 ( $\pm$ 0,187)	144,0 ( $\pm$ 0,386)	*
<b>MCP-2</b>	20,57 ( $\pm$ 0,109)	20,78 ( $\pm$ 0,076)	22,91 ( $\pm$ 0,084)	1016 ( $\pm$ 0,558)	1,589e4 nm ( $\pm$ 0,406)	*
<b>MCP-3</b>	33,49 ( $\pm$ 0,211)	36,13 ( $\pm$ 0,190)	30,04 ( $\pm$ 0,178)	*		
<b>MCP-4</b>	*					
<b>MCP-5</b>	28,62 ( $\pm$ 0,130)	31,18 ( $\pm$ 0,126)	31,26 ( $\pm$ 0,274)	37,06 ( $\pm$ 0,153)	41,55 ( $\pm$ 0,156)	34,98 ( $\pm$ 0,195)
<b>MCP-6</b>	27,10 ( $\pm$ 0,142)	27,54 ( $\pm$ 0,140)	29,16 ( $\pm$ 0,183)	30,59 ( $\pm$ 0,173)	35,45 ( $\pm$ 0,202)	*
<b>MCP-7</b>	15,73 ( $\pm$ 0,217)	16,85 ( $\pm$ 0,238)	17,77 ( $\pm$ 0,261)	32,23 ( $\pm$ 0,249)	76,53 ( $\pm$ 0,675)	21,41 ( $\pm$ 0,142)
<b>MCP-8</b>	17,6 ( $\pm$ 0,242)	17,52 ( $\pm$ 0,247)	18,49 ( $\pm$ 0,220)	21,06 ( $\pm$ 0,205)	21,17 ( $\pm$ 0,255)	45,2 ( $\pm$ 0,255)
<b>MCP-9</b>	19,73 ( $\pm$ 0,098)	20,18 ( $\pm$ 0,939)	20,66 ( $\pm$ 0,098)	19,07 ( $\pm$ 0,173)	49,1 ( $\pm$ 0,281)	71,38 ( $\pm$ 0,272)
<b>MCP-10</b>	18,84 ( $\pm$ 0,104)	18,69 ( $\pm$ 0,080)	18,83 ( $\pm$ 0,106)	20,6 ( $\pm$ 0,172)	23,9 ( $\pm$ 0,185)	32,14 ( $\pm$ 0,134)

\* = precipitou

Conforme mencionado por Callender *et al.* (2017) o tamanho médio das gotículas em uma microemulsão deve situar-se na faixa de 10-100 nm, desempenhando um papel crucial em diversas áreas. Esse tamanho adequado assegura a estabilidade do sistema, evitando a

sedimentação causada por partículas muito grandes. Além disso, o tamanho das partículas também afeta a capacidade de encapsulação de substâncias ativas e influencia as propriedades reológicas, como a viscosidade.

Durante os primeiros dias de análise, todas as amostras exibiram um tamanho médio de gotículas abaixo de 100 nm. No entanto, ao longo do estudo, algumas amostras experimentaram um aumento abrupto de tamanho, chegando ao ponto de precipitar no 30º dia, tornando-se inviáveis para estudos posteriores, e, dessa forma, foram descartadas. Além disso, as formulações MAB-5 e MCP-4 precipitaram após cessação da agitação ainda no primeiro dia de análise e assim, também foram descartadas.

As amostras preparadas com álcool benzílico que apresentaram valores de diâmetro médio compatíveis, conforme o esperado para microemulsões durante os 30 dias de análise foram MAB-1, MAB-3 e MAB-4. Com carbonato de propileno como fase oleosa foram as MCP-5, MCP-7, MCP-8, MCP-9 e MCP-10. Entretanto, apenas MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10 demonstraram valores de PDI desejáveis. O PDI fornece dados sobre o grau de uniformidade das gotículas em uma microemulsão. Partículas com tamanhos semelhantes tendem a permanecer dispersas uniformemente, evitando aglomeração ou separação de fases (Zhi *et al.*, 2020).

Dessa forma, as microemulsões com melhores características em relação ao tamanho de partícula e PDI, foram a MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10, com composição indicada na Tabela 9.

### 5.3 FORMULAÇÕES SELECIONADAS PARA O PREPARO DAS NANOSUSPENSÕES

A partir dos dados obtidos das análises macroscópicas, microscópicas e de espalhamento dinâmico de luz (DLS), foi possível selecionar as formulações a serem utilizadas para o preparo das nanosuspensões: MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10, com composição indicada na Tabela 12. As amostras selecionadas tiveram como característica comum, o fato de pertencerem aos diagramas C, portanto, com maior proporção de cotensoativo (isopropanol) em relação ao tensoativo (lecitina), sendo vantajoso devido ao custo elevado da lecitina por conta de sua alta pureza. E, à exceção da formulação MAB – 3, as demais apresentam maior proporção de água em relação à fase oleosa, o que sugere a classificação o/a, já que a fase contínua é geralmente formada pelo componente presente em maior quantidade.

## 5.4 NANOSUSPENSÕES

As formulações selecionadas (MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10) foram acrescidas de 50 mg de ibuprofeno e utilizadas como base para o preparo das nanossuspensões, conforme a metodologia proposta por Trotta *et al.* (2002). Uma vez que o ibuprofeno apresenta solubilidade pH-dependente, a influência do pH no preparo das formulações iniciais e no preparo das nanossuspensões em relação às características finais das partículas em nanossuspensão foi avaliada.

Estudos preliminares com planejamento fatorial foram realizados com a formulação MAB – 4, com o ajuste do pH através do preparo das formulações iniciais com solução aquosa tamponada, assim como a obtenção das nanossuspensões com solução aquosa tamponada na etapa de diluição. Nesses estudos iniciais, a proporção utilizada da diluição das microemulsões também foi variada entre 1:2, 1:3 e 1:4. Os resultados iniciais obtidos de diâmetro médio e PDI para as nanossuspensões originadas a partir de MAB – 4 estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Análise combinatória utilizada no delineamento experimental para a produção de nanossuspensões a partir da formulação MAB-4 e os respectivos valores de diâmetro médio e PDI obtidos

Formulação	pH Fase aquosa ME	pH de diluição NP	Proporção de diluição	Diâmetro Médio (nm) ( $\pm$ PDI)
<b>NAB 4.1</b>	pH 2	pH 2	<b>1:2</b>	1089 ( $\pm$ 0,958)
<b>NAB 4.2</b>	pH 2	pH 2	<b>1:4</b>	1617 ( $\pm$ 0,447)
<b>NAB 4.3</b>	pH 6	pH 2	<b>1:2</b>	1033 ( $\pm$ 0,915)
<b>NAB 4.4</b>	pH 6	pH 2	<b>1:4</b>	2081 ( $\pm$ 0,524)
<b>NAB 4.5</b>	pH 2	pH 6	<b>1:2</b>	1283 ( $\pm$ 0,510)
<b>NAB 4.6</b>	pH 2	pH 6	<b>1:4</b>	1694 ( $\pm$ 0,292)
<b>NAB 4.7</b>	pH 6	pH 6	<b>1:2</b>	1215 ( $\pm$ 0,888)
<b>NAB 4.8</b>	pH 6	pH 6	<b>1:4</b>	1273 ( $\pm$ 0,188)
<b>NAB 4.9</b>	Sem ajuste*	Sem ajuste*	<b>1:3</b>	47,5 ( $\pm$ 0,292) 157,4 ( $\pm$ 0,255) 131,6 ( $\pm$ 0,421)

\* = aproximadamente 7 na formulação final.

A partir dos resultados iniciais obtidos para o desenvolvimento das nanossuspensões, indicados na Tabela 11, pode-se perceber a influência direta do uso de soluções tamponadas no diâmetro médio e PDI das partículas, visto que a formulação NAB-4.9, obtida sem ajuste de pH, apresenta os menores valores de diâmetro médio, enquanto todas as demais apresentam valores superiores a 1000nm.

Entre os fatores avaliados com planejamento fatorial, pode-se observar que, de maneira geral, quanto maior a proporção de diluição, maior o diâmetro médio das partículas obtidas, para todas as condições de variação de pH testadas - as formulações obtidas por diluição na proporção 1:4 apresentaram valores mínimo e máximo de diâmetro médio de partícula de 1273 nm e 1694 nm respectivamente, enquanto as formulações obtidas com diluição na proporção 1:2 apresentaram valores mínimo e máximo de 1033 nm e 1283 nm respectivamente.

Os resultados preliminares obtidos indicam que o uso do tampão fosfato e a proporção de diluição desempenham papéis significativos no tamanho final das partículas nas nanossuspensões. A adição dos sais de fosfato, para ajuste do pH, parece afetar a interação entre os componentes da microemulsão e/ou a agregação das partículas nas nanossuspensões. Da mesma forma, a proporção de diluição parece ter uma influência direta, onde proporções maiores, logo com maior quantidade de partículas de sais de fosfato, levam a partículas maiores em nanossuspensão. Essas observações são cruciais para o desenvolvimento de formulações otimizadas para a administração tópica de ibuprofeno.

Os valores de PDI das amostras preparadas nessas condições também não são compatíveis com os valores de referência esperados em uma nanossuspensão, e assim, indicam a instabilidade das formulações obtidas. Sendo assim, o delineamento experimental foi reajustado, e os mesmos fatores de influência reavaliados para as formulações inicialmente selecionadas, mas com o ajuste dos valores de pH na fase aquosa da formulação inicial e na etapa de diluição para obtenção das nanossuspensões efetuado com a adição de HCl 0,1 M até atingir o pH desejado (2 ou 6). A Tabela 12 indica os valores de diâmetro médio e PDI para as nanossuspensões originadas a partir de MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10.

Tabela 12 – Análise combinatória utilizada no delineamento experimental para a produção de nanossuspensões a partir das formulações MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10 e os respectivos valores de diâmetro médio e PDI obtidos

Código	pH fase aquosa ME	pH de diluição NP	Proporção de diluição	Formulação inicial			
				MAB-3	MAB-4	MCP-5	MCP-10
				Diâmetro médio (nm) ( $\pm$ PDI)			
N.1	pH 2	pH 2	1:2	823 ( $\pm$ 1,00)	1072 ( $\pm$ 0,520)	4941 ( $\pm$ 0,767)	792 ( $\pm$ 0,259)
N.2	pH 2	pH 2	1:4	1833 ( $\pm$ 0,496)	1025 ( $\pm$ 0,319)	1493 ( $\pm$ 0,352)	2397 ( $\pm$ 0,740)
N.3	pH 6	pH 2	1:2	2698 ( $\pm$ 0,434)	1002 ( $\pm$ 0,160)	4677 ( $\pm$ 0,494)	1606 ( $\pm$ 0,385)
N.4	pH 6	pH 2	1:4	749 ( $\pm$ 0,406)	683,7 ( $\pm$ 0,426)	590,7 ( $\pm$ 0,235)	766,3 ( $\pm$ 0,453)
N.5	pH 2	pH 6	1:2	584 ( $\pm$ 0,277)	1048 ( $\pm$ 0,212)	4066 ( $\pm$ 1,00)	584 ( $\pm$ 0,483)
N.6	pH 2	pH 6	1:4	68,9 ( $\pm$ 0,248)	759,4 ( $\pm$ 0,260)	510,9 ( $\pm$ 0,235)	510 ( $\pm$ 0,235)
N.7	pH 6	pH 6	1:2	35,55 ( $\pm$ 0,405)	33,86 ( $\pm$ 0,344)	1128 ( $\pm$ 0,294)	162,6 ( $\pm$ 0,870)
N.8	pH 6	pH 6	1:4	332,2 ( $\pm$ 0,496)	43,37 ( $\pm$ 0,272)	830 ( $\pm$ 0,586)	273,5 ( $\pm$ 0,729)
N.9	Sem ajuste*	Sem ajuste*	1:3	25,17 ( $\pm$ 0,389)	80,95 ( $\pm$ 0,336)	397,6 ( $\pm$ 0,716)	258,2 ( $\pm$ 0,737)
				23,17 ( $\pm$ 0,371)	18,74 ( $\pm$ 0,269)	465,3 ( $\pm$ 0,552)	245,6 ( $\pm$ 0,730)
				35,23 ( $\pm$ 0,358)	15,06 ( $\pm$ 0,286)	355,2 ( $\pm$ 0,659)	236,2 ( $\pm$ 0,962)

\* = aproximadamente 7 na formulação final.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 12 evidencia que a alteração do valor de pH (de 2 para 6 ou de 6 para 2) nas duas etapas (formação da ME e diluição para formação das NPs) leva à diminuição do diâmetro das partículas, quando a proporção de diluição é maior (1:4), embora nenhum padrão seja identificado quando o pH é mantido entre as etapas (2 ou 6).

A partir do conjunto de experimentos pode-se também destacar que, comparativamente, quando a etapa de diluição ocorre em pH 6, os diâmetros médios das partículas em nanossuspensão são menores, conforme observado para as formulações NAB-3.6, NAB-4.7 e NAB-4.8, com valores médios de 35,55nm, 33,86nm e 43,37nm, respectivamente. Em pH 6 a solubilidade do IBU é maior (Potthast *et al.*, 2005), o que sugere uma maior concentração do

fármaco na fase externa, e uma menor quantidade de partículas em nanossuspensão, em comparação com as formulações obtidas por diluição em pH 2.

Apesar dos resultados apresentados demonstrarem claramente a influência do pH nas características de formação das nanossuspensões, os menores valores de diâmetro médio de partículas foram observados para as nanossuspensões N.9, sem ajuste no pH da fase aquosa da formulação original, e sem ajuste de pH na etapa final de diluição para obtenção das nanossuspensões, para todas as formulações iniciais testadas (MAB-3, MAB-4, MCP-5 e MCP-10).

Por fim, pode-se também avaliar a influência da composição das formulações iniciais nas características das nanossuspensões obtidas. De forma geral, para os fatores de influência testados, as nanossuspensões derivadas das formulações com álcool benzílico (MAB-3 e MAB-4) apresentam valores inferiores de diâmetro médio, em relação às obtidas com carbonato de propileno (MCP-5 e MCP-10). Isso pode ser atribuído à diferença na solubilidade intrínseca dos dois compostos. O carbonato de propileno demonstra uma maior solubilidade em água, com um valor de logP de -0,4, enquanto o álcool benzílico possui um logP de 1,1. Assim, o carbonato de propileno é aproximadamente três vezes mais solúvel em água do que o álcool benzílico. Essa característica aumenta a capacidade do álcool benzílico em dissolver o ibuprofeno, o que tem um impacto direto no tamanho das partículas dessas formulações (Pubchem, 2024).

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível padronizar a metodologia para determinação do ibuprofeno, bem como as condições otimizadas para extração, apropriado para estudos posteriores. A análise fatorial realizada oferece uma visão abrangente sobre a preparação de nanossuspensões por meio da diluição de microemulsões, preenchendo uma lacuna de pesquisa na área, onde há escassez de estudos utilizando essa abordagem metodológica. Além disso, foi explorada a característica de solubilidade pH-dependente do ibuprofeno, otimizando as condições que favorecem a solubilidade e permeação. A atenção criteriosa ao pH durante o processo de preparação das nanossuspensões, aliada à metodologia proposta, estabelece uma base sólida para avanços significativos na administração tópica de fármacos anti-inflamatórios. Entretanto, ressalta-se a necessidade de estudos complementares para validar a segurança e eficácia clínica.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, O. P.; AGRAWAL, S. An overview of new drug delivery system: microemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 2, n. 1, p. 5–12, 2012.
- AJARAVILLE, J. P. Ibuprofen arginate for rapid-onset pain relief in daily practice: a review of its use in different pain conditions. **Journal of Pain Research**, v. 14, n. 1, p. 117–126, 2021.
- ARORA, D.; KHURANA, B.; RATH, G.; NANDA, S.; GOYAL, A. K. Recent advances in nanosuspension technology for drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 21, p. 2403–2415, 2018.
- ATKINSON, T. J.; FUDIN, J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs for acute and chronic pain. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 31, n. 2, p. 219–231, 2020.
- ATTWOOD, D. **Colloidal drug delivery systems: drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Kreuter, 1994.
- BAKER R. C.; FLORENCE, A. T.; TADROS, T. F.; WOOD, R. M. Investigations into the formation and characterization of microemulsions. 1. Phase-diagrams of the ternary-system water sodium alkyl benzene sulfonate hexanol and the quaternary system water xylene sodium alkyl benzene sulfonate hexanol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 100, n. 2, p. 311–331, 1984.
- BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York, Basel: M. Dekker, 1983.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556–563, 2010.
- BERNARDO, A. F. C.; SANTOS, K.; SILVA, D. P. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, n. 1, p. 1221–1233, 2019.
- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.
- BOLLA, P. K.; CLARK, B. A.; JULURI, A.; CHERUVU, H. S.; RENUKUNTLA, J. Evaluation of formulation parameters on permeation of ibuprofen from topical formulations using Strat-M® membrane. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 151, 2020.
- BORZENKOV, M.; HEVUS, O. **Surface active monomers**. Amsterdam: Springer, 2014. 67 p.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 141, 2017.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CALLENDER, S. P.; MATHEWS, J. A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S. D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1-2, p. 425–442, 2017.

CAJARAVILLE, J. P. Ibuprofen arginate for rapid-onset pain relief in daily practice: a review of its use in different pain conditions. **Journal of Pain Research**, v. 14, p. 117–126, 2021.

CHEN, Y.; LIU, J.; YANG, X.; ZHAO, X.; XU, H. Oleonic acid nanosuspensions: Preparation, in vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 259–264, 2005.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.

DAMASCENO, B. P. G.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9–18, 2011.

EGITO, E. S. T.; AMARAL-MACHADO, L.; ALENCAR, E. N.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsion systems: from the design and architecture to the building of a new delivery system for multiple-route drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 5, 2108–2133, 2020.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005.

GOEL, S.; SACHDEVA, M.; AGARWAL, V. Nanosuspension technology: recent patents on drug delivery and their characterizations. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 13, n. 2, p. 91–104, 2019.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia**: a base fisiopatológica da farmacoterapia. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HADGRAFT, J.; VALENTA, C. pH, pKa and dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, n. 2, p. 243–247, 2000.

HAROUTIUNIAN, S.; DRENNAN, D. A.; LIPMAN, A. G. Topical NSAID therapy for musculoskeletal pain. **Pain Medicine**, v. 11, n. 4, p. 535–549, 2010.

HELMY, A. M. Overview of recent advancements in the iontophoretic drug delivery to various tissues and organs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102332, 2021.

HERSH, E. V.; BALASUBRAMANIAM, R.; PINTO, A. Pharmacologic management of temporomandibular disorders. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, n. 2, p. 197–210, 2008.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: The oleophatic hydromicelle. **Nature**, v. 152, p.102–103, 1943.

KARASULU, H. Y. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 1, p. 119–135, 2007.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017. 1202 p.

KESISOGLU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing—oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 631–644, 2007.

KOCBEK, P.; BAUMGARTNER, S.; KRISTL, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, n. 1–2, p. 179–186, 2006.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science** v. 123–126, p. 369–385, 2006.

KOVÁČIK, A.; KOPEČNÁ, M.; VÁVROVÁ, K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 17, n. 2, p. 145–155, 2020.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498–512, 2002.

LI, G.; FAN, Y.; LI, X.; WANG, X.; LI, Y.; LIU, Y.; LI, M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 425, n. 1-2, p. 53–61, 2012.

LIVERSIDGE, G. G.; CUNDY, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, n. 1, p. 91–97, 1995.

MACHADO, J, G, P. **Nanoemulsão contendo dipropionato de betametasona: avaliação da permeação cutânea para o tratamento de psoríase**. 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

MAHBOOB, A.; KALAM, S.; KAMAL, M.; HUSSAIN, S. M. S.; SOLLING, T. EOR perspective of microemulsions: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 208, p. 109312, 2022.

MEDLINEPLUS. **Ibuprofen**: MedlinePlus drug information. Disponível em: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682159.html>. Acesso em: 20 jan. 2024.

MITTAL, K. L.; KUMAR, P. **Handbook of microemulsion science and technology**. Oxford: Routledge, 2018.

MONIZ, T.; LIMA, S. A. C.; REIS, S. Protocol for the isolation of stratum corneum from pig ear skin: evaluation of the trypsin digestion conditions. **Methods and Protocols**, v. 4, n. 4, p. 80, 2021.

MURATA, T.; HONDA, T.; MOSTAFA, A.; KABASHIMA, K. Stratum corneum as polymer sheet: concept and cornification processes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 28, n. 5, p. 350–359, 2022.

PRABHAKAR, C.; KRISHNA, K. A review on nanosuspensions in drug delivery. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p. 549–558, 2011.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827–840, 2004.

PETRILLI, R.; LOPEZ, R. F. V Physical methods for topical skin drug delivery: concepts and applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. spe, p. 1–19, 2018.

PONCHEL, G.; MONTISCI, M. J.; DEMBRI, A.; DURRER, C.; DUCHÊNE, D. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 44, n. 1, p. 25–31, 1997.

POTTHAST, H.; DRESSMAN, J. B.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; OESER, H.; SHAH, V. P.; VOGELPOEL, H.; BARENDIS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage form: ibuprofen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 10, p. 2121–2131, 2005.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 785–796, 2004.

RAJA, S. N.; *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

ROMAINE, A.; LOUREIRO, F.; SILVA, F. Reações adversas no uso de Anti-inflamatório não esteroidais (AINES) no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 7, n. 6, p. 54653–54661, 2021.

RUSHFORTH, D. S.; SANCHEZ-RUBIO, M.; SANTOS-VIDALS, L. M.; WORMUTH, K. R.; KALER, E. W.; CUEVAS, R.; PUIG, J. E Structural study of one-phase microemulsions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 90, n. 25, p. 6668–6673, 1986.

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. **Nanocarriers for organ-specific and localized drug delivery (micro and nano technologies)**. London: Elsevier, 2017.

SHUKLA, T.; UPMANYU, N.; AGRAWAL, M.; SARAF, S.; SARAF, S.; ALEXANDER, A. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, n. 1, p. 1477–1494, 2018.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P.; MEDEIROS, A. C. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 2010.

SIMON, A.; AMARO, M. I.; HEALY, A.; CABAL, L. M.; SOUSA, V. P. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 234–241, 2016.

SINGH, P.; MAIBACH, H. I. Iontophoresis: an alternative to the use of carriers in cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 3, p. 379–394, 1996.

SISAK, M.; DAIK, R.; RAMLI, S. Study on the effect of oil phase and co-surfactant on microemulsion systems. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1409–1416, 2017.

SOUTO, E. B.; CANO, A.; MARTINS-GOMES, C.; COUTINHO, T. E.; ZIELINSKA, A.; SILVA, A. M. Microemulsions and nanoemulsions in skin drug delivery. **Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 158, 2022.

SUPE, S.; TAKUDAGE, P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. **Skin Research and Technology**, v. 27, n. 1, p. 299–308, 2020.

SZUMAŁA, P.; MACIERZANKA, A. Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 615, p. 121488, 2022.

TROTTA, M.; GALARATTI, M.; CARLOTTI, M. E.; MOREL, S. Preparation of griseofulvin nanoparticles from water-dilutable microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 2, p. 235–242, 2003.

WANG, Y.; ZENG, L.; SONG, W.; LIU, J. Influencing factors and drug application of iontophoresis in transdermal drug delivery: an overview of recent progress. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 1, p. 15–26, 2021.

WANG, Y.; ZHENG, Y.; ZHANG, L.; WANG, Q.; ZHANG, D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1126–1141, 2013.

ZENG, H.; LI, X.; ZHANG, G.; DONG, J. Preparation and characterization of beta cypermethrin nanosuspensions by diluting O/W microemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 358–361, 2008.

ZHANG, J.; XIE, Z.; ZHANG, N.; ZHONG, J. Nanosuspension drug delivery system: preparation, characterization, postproduction processing, dosage form, and application. **Nanostructures for Drug Delivery**, p. 413–443, 2017.

ZHI, Y.; *et al.* Polydispersity index: importance and applications in microemulsion systems. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 23, n. 6, p. 1045–1054, 2020.

ZHU, J.; TANG, X.; JIA, Y.; HO, C. T.; HUANG, Q. Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery – A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 578, p. 119–127, 2020.