UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de hidroximetilnitrofural: preparação, caracterização físico-química, avaliação da atividade *in vitro* antileishmania

DÉBORA SOARES SOUZA MARINS

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

SÃO PAULO
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de hidroximetilnitrofurais: preparação, caracterização físico-química, avaliação da atividade *in vitro* antileishmania

DÉBORA SOARES SOUZA MARINS

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

SÃO PAULO
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

MM337n Marins, Debora Soares Souza
n Nanocristais de hidroximetilnitrofural:
preparação, caracterização físico-química, avaliação da
atividade in vitro antileishmania / Debora Soares
Souza Marins. - São Paulo, 2018.
126 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Bou-Chacra, Nadia Araci

1. nanocristais. 2. hidroximetilnitrofural. 3.
leishmaniose . 4. moagem por via úmida. I. T. II.
Bou-Chacra, Nadia Araci, orientador.

DÉBORA SOARES SOUZA MARINS

**Nanocristais de hidroximetilnitrofural: preparação, caracterização físico-química,
avaliação da atividade *in vitro* antileishmania**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

Resumo

Marins, D. S. S. **Nanocristais de hidroximetilnitrofural: preparação, caracterização físico-química, avaliação da atividade *in vitro* antileishmania.** 2018. 126f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem atualmente 17 doenças tropicais negligenciadas prevalentes em 149 países, afetando aproximadamente um bilhão de pessoas, a nível global. A leishmaniose, problema de saúde prevalente nos países em desenvolvimento, é endêmica em aproximadamente 98 países e territórios, com 350 milhões de pessoas em risco e 12 milhões de casos de infecção no mundo. A transmissão da doença ocorre pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Essa doença apresenta três formas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV). Enquanto a leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a mais grave e pode ser fatal se não for tratada. Em 2016, o Brasil reportou 3.626 e 12.690 casos de LC e LV, respectivamente. O candidato a fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH) mostrou atividade contra o parasita da doença de chagas e da leishmaniose. Embora o NFOH seja promissor para o tratamento da leishmaniose, esse possui baixa solubilidade em água. A nanotecnologia tem sido empregada como plataforma para o desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras com maior eficácia e segurança. A redução do tamanho de partículas em escala nanométrica permite aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. Os nanocristais apresentam vantagens, tais como, o aumento da solubilidade de saturação e da velocidade de dissolução, decorrentes do aumento da área superficial da partícula. Além disso, esses apresentam maior adesividade às membranas biológicas, membrana celular e superfície do trato gastrointestinal. No presente trabalho utilizou-se a moagem por via úmida em escala reduzida para a obtenção dos nanocristais de NFOH. Diferentes tensoativos foram avaliados empregando o método selecionado, os tensoativos poloxamer 188 e poloxamer 407 foram os que favoreceram a redução do tamanho das partículas. Tal característica foi observada na caracterização físico-química das nanosuspensões de NFOH. A utilização desse método

permitiu a obtenção de nanocristais de NFOH, com diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de $184,8 \pm 0,5$ a $325,9 \pm 2,2$ nm, índice de polidispersão (IP) de $0,21 \pm 0,01$ a $0,57 \pm 0,01$ e DHM de $191,3 \pm 2,1$ a $326,8 \pm 4,6$ nm e IP de $0,21 \pm 0,01$ a $0,50 \pm 0,01$, respectivamente para o poloxamer 188 e 407. O uso de ambos os tensoativos resultaram em distribuição monomodal de tamanho das partículas. As formulações foram obtidas por meio de planejamento fatorial completo e experimentos por superfície de resposta tendo como variáveis independentes as concentrações de NFOH, dos tensoativos e o tempo de moagem. A resposta, DHM, foi determinada utilizando espalhamento de luz dinâmica (DLS). Adicionalmente, as avaliações empregando calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raio X (DRX) revelaram que não houve interação entre o fármaco e os excipientes, assim como, não foi observada alteração na estrutura cristalina do NFOH. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou a morfologia característica do estado cristalino. Além disso, a preparação liofilizada apresentou instabilidade após armazenamento por três meses a temperatura de 25 e 4 °C.

Palavras chave: Nanocristais, NFOH, leishmaniose, moagem por via úmida.

Abstract

Marins, D. S. S. **Hydroxymethylnitrofurazone nanocrystals: optimization, characterization, leishmanicidal activity evaluation.** 2018. 126f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

According to the World Health Organization, there are currently 17 neglected tropical diseases prevalent in 149 countries, affecting approximately one billion people globally. Leishmaniasis, a health problem prevalent in developing countries, is endemic in approximately 98 countries and territories, with 350 million people at risk and 12 million cases of infection worldwide. The transmission of the disease occurs by the bite of infected female sandflies. This disease has three main forms: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and visceral leishmaniasis (VL). While cutaneous leishmaniasis is the most usual form of the disease, visceral leishmaniasis is the most serious and can be fatal if left untreated. In 2016, Brazil reported 3.626 and 12.690 cases of LC and LV, respectively. The drug candidate for hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) showed activity against the parasite of chagas disease and leishmaniasis. Although NFOH is promising for the treatment of leishmaniasis, it has low solubility in water. Nanotechnology has been used as a platform for the development of innovative pharmaceutical forms with greater effectiveness and safety. Particle size reduction on the nanoscale enables the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs to be increased. Nanotechnology has been used as a platform for the development of innovative pharmaceutical forms, improving effectiveness and safety. Particle size reduction on the nanoscale enables the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs to be increased. Nanocrystals have advantages such as increased saturation solubility and dissolution rate due to the increase in the surface area of the particle. In addition, this present greater adhesiveness to the biological membranes, cell membrane and surface of the gastrointestinal tract. In the present work, wet scale milling was used to obtain NFOH nanocrystals. Different surfactants were evaluated using the selected method, poloxamer 188 and poloxamer 407 surfactants favored the reduction of particle size. This characteristic was observed in the physical-chemical characterization of NFOH nanosuspensions. The use of NFOH nanocrystals with a mean

hydrodynamic diameter (DHM) of 184.8 ± 0.5 to 325.9 ± 2.2 nm, polydispersity index (IP) of 0.21 ± 0.01 to 0.57 ± 0.01 for poloxamer 188 and DHM of 191.3 ± 2.1 at 326.8 ± 4.6 nm and IP of 0.21 ± 0.01 at 0.50 ± 0.01 for poloxamer 407, both with monomodal size distribution. The formulations were obtained by means of complete factorial planning and surface response experiments having as independent variables the concentrations of NFOH, surfactants and milling time. The response, DHM, was determined using dynamic light scattering (DLS). In addition, evaluations using differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (DRX) revealed that there was no change in the crystal structure of NFOH and interaction between the drug and the excipients. Scanning electron microscopy demonstrated the characteristic morphology of the crystalline state. In addition, the lyophilized preparation was instable after storage for three months at 25 and 4 ° C.

Keywords: Nanocrystals, NFOH, leishmaniasis, wet milling.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Casos de leishmaniose cutânea no Brasil, 1990 a 2016.....	6
Figura 2 - Densidade de casos de leishmaniose tegumentar relatados no Brasil em 2015. ..	6
Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral no Brasil, de 1990 a 2016.....	7
Figura 4 - Densidade de casos de leishmaniose visceral relatados no Brasil em 2015.	8
Figura 5 - Mosquito vetor dos parasitas Leishmania.....	8
Figura 6 - Ciclo de contágio do parasita.....	9
Figura 7 - Manifestação de leishmaniose visceral em criança.	10
Figura 8 - Manifestação da doença leishmaniose cutânea.....	11
Figura 9 - Manifestação da doença com lesão na mucosa.....	12
Figura 10 - Fórmula molecular dos fármacos disponíveis no tratamento da leishmaniose.	13
Figura 11 - Estrutura molecular do hidroximetilnitrofuril.....	15
Figura 12 - Aumento da pressão de dissolução (p) sobre uma superfície plana (a), uma micropartícula (b) e uma nanopartícula (c).	20
Figura 13 - Comparação da distância de difusão em microcristal (A) e nanocristal (B). ...	21
Figura 14 - Representação do sistema de moagem por via úmida.	23
Figura 15 – Nanossuspensões de NFOH durante o processo de liofilização.	35
Figura 16 – Gráfico de cubo (planejamento fatorial 2^3) para tamanho hidrodinâmico médio	45

Figura 17 – Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio. Comparativo com os pontos centrais.....	46
Figura 18 – Gráfico de resíduos da avaliação do DHM com as variáveis: concentração de NFOH (% m/m), concentração de poloxamer 188 (P188) (% m/m) e tempo de agitação (h).	48
Figura 19 – Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio contendo as variáveis: tempo de agitação (horas), concentração de NFOH (%m/m) e poloxamer 188 (P 188) (%m/m). Comparativo com os pontos centrais.	49
Figura 20 – Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio. Comparativo com os pontos centrais.....	52
Figura 21 – Gráfico de resíduos da avaliação do DHM com as variáveis: concentração de NFOH (% m/m), concentração de poloxamer 188 (P188) (% m/m) e tempo de agitação (h).	55
Figura 22- Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as variáveis: tempo de agitação (horas) e concentração de NFOH (%m/m).....	56
Figura 23 – Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as variáveis: tempo de agitação (horas) e concentração de P188 (%m/m).....	56
Figura 24 – Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as variáveis: concentração de NFOH (%m/m) e concentração de P188 (%m/m).....	57
Figura 25 – Gráficos de contorno relativo à avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de NFOH contendo as seguintes variáveis: tempo de agitação (horas), concentração de P188 (%m/m) e concentração do NFOH(%m/m).	57
Figura 26 – Gráfico de otimização da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as seguintes variáveis: NFOH (% m/m): 3,0 ; P188 (% m/m): 1,0 e Tempo (h): 120. Predição para 167,2 nm.....	58

Figura 27 – Gráfico de cubo (planejamento fatorial 23) para tamanho hidrodinâmico médio (DHM) utilizando poloxamer 407. A resposta aparece nos vértices do cubo.	60
Figura 28 – Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio. Comparativo com os pontos centrais.	61
Figura 29 – Gráfico de resíduos da avaliação do DHM com as variáveis: concentração de NFOH (% m/m), concentração de poloxamer 407 (P407) (% m/m) e tempo de agitação (h).	64
Figura 30 – Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio contendo as variáveis: tempo de agitação (horas), concentração de NFOH (%m/m) e poloxamer 407 (P407) (%m/m). Comparativo com os pontos centrais.	64
Figura 31 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão de NFOH estabilizada com poloxamer 188, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).	66
Figura 32 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão de NFOH estabilizada com poloxamer 407, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).	66
Figura 33 – Representação da dupla camada elétrica de uma partícula imersa em um líquido.	68
Figura 34 – Influência da concentração da nanossuspensão de NFOH na determinação do seu potencial zeta, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).	69
Figura 35 – Variação do potencial zeta em função da condutividade do meio diluente para a nanossuspensão de NFOH.	70
Figura 36 – Captura de tela da análise de vídeo obtido pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 188.	72

Figura 37 – Captura de tela da análise de vídeo obtido pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 407.....	73
Figura 38 – Curvas TG/DTG do NFOH obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.	75
Figura 39 – Curva DSC do NFOH obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.	76
Figura 40 – Curva DSC do NF obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.	77
Figura 41 – Estrutura química dos poloxâmeros.....	77
Figura 42 – Curvas TG/DTG do NFOH, mistura física e poloxamer 407 obtidas a 5°C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.	79
Figura 43 – Curvas DSC do NFOH, poloxamer 407 e sua mistura física, obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.....	80
Figura 44 – Curvas TG/DTG do NFOH, mistura física e poloxamer 188 obtidas a 5°C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.	81
Figura 45 – Curvas DSC do NFOH, poloxamer 188 e sua mistura física, obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.....	82
Figura 46 – Curva DSC obtida da nanosuspensão de NFOH com P407 e manitol 5% (%m/m) a razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N ₂ , a partir de -70°C a -20°C.....	86
Figura 47 – Curva DSC obtida da nanosuspensão de NFOH com P188 e manitol 5% (%m/m) a razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N ₂ , a partir de -70°C a -20°C.....	86
Figura 48 – Microscopia Eletrônica de Varredura da nanosuspensão de NFOH com poloxamer 188, ampliação de 50000x.....	90

Figura 49 – Microscopia Eletrônica de Varredura da nanosuspensão de NFOH com poloxamer 407, ampliação de 40000x.....	90
Figura 50 – Difrátograma (método do pó) do NFOH, manitol, Poloxamer 188 (P188), nanocristais de NFOH com P188 (F1).	92
Figura 51 – Difrátograma (método do pó) do NFOH, manitol, Poloxamer 407 (P407), nanocristais de NFOH com P407 (F2).	93
Figura 52 – Absorbância máxima do hidroximetilnitrofural (10 µg/mL) no intervalo de 200 a 600 nm.	94
Figura 53 – Espectro de varredura do tampão HCl pH 1,2 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	95
Figura 54 – Espectro de varredura do tampão acetato pH 4,5 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.	95
Figura 55 - Espectro de varredura do tampão fosfato pH 6,8 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	96
Figura 56 – Espectro de varredura do tampão fosfato pH 7,5 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	96
Figura 57 – Espectro de varredura do poloxamer 188 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.	97
Figura 58 – Espectro de varredura do poloxamer 407 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.	97
Figura 59 - Reta de regressão $\hat{y} = 0,01957 + 0,06043x$ ajustada aos pontos experimentais relativos às absorbâncias, conforme a concentração do hidroximetilnitrofural.	98
Figura 60 – Gráfico dos resíduos relativos ao ajuste de uma reta de regressão aos dados de absorbância do NFOH.	100

Figura 61 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 188, durante 3 meses a 25°C..... 104

Figura 62 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 188, durante 3 meses a 4°C..... 104

Figura 63 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 407, durante 3 meses a 25°C..... 105

Figura 64 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 407, durante 3 meses a 4°C..... 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações farmacêuticas à base de nanocristais aprovadas pela FDA.	24
Tabela 2 – Pré-seleção das formulações na obtenção dos nanocristais de NFOH.	29
Tabela 3 – Matriz de ensaios para a otimização do processo de preparação de nanocristais de hidroximetilnitrofural empregando os estabilizadores poloxamer 188 e poloxamer 40730	
Tabela 4 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaios por superfície de resposta, empregando o poloxamer 188 como tensoativo.	31
Tabela 5 – Concentração das amostras de hidroximetilnitrofural obtidas a partir de uma solução padrão do candidato a fármaco (50µg/mL) e empregadas para determinação da linearidade.	38
Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaio do planejamento fatorial, empregando o poloxamer 188 (P188) como tensoativo.	44
Tabela 7 – Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).	47
Tabela 8 – Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM contendo as variáveis: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).	47
Tabela 9 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaios por superfície de resposta, empregando o poloxamer 188 (P188) como tensoativo.	51

Tabela 10 – Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).....	53
Tabela 11 – Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM contendo as variáveis: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).53	
Tabela 12 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula e índice de polidispersão (IP) das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de NFOH.	54
Tabela 13 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaios do planejamento fatorial, empregando o poloxamer 407 como tensoativo.	59
Tabela 14 – Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P407(%m/m).....	62
Tabela 15 – Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM contendo as variáveis: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P407(%m/m). 62	
Tabela 16 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula e índice de polidispersão (IP) das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de NFOH.	63
Tabela 17 – Avaliação do tamanho de partícula da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 188, utilizando a técnica NTA.....	71
Tabela 18 – Avaliação do tamanho de partícula da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 407, utilizando a técnica NTA.....	72
Tabela 19 – Comparativo dos resultados de tamanho de partícula (em nanômetros) da nanossuspensão de NFOH utilizando a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) e espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	74

Tabela 20 – Tamanho de partícula (DHM) e índice de polidispersão (IPD) da nanosuspensão de NFOH antes e após a solidificação por liofilização, juntamente com o índice de redispersibilidade calculado.....	88
Tabela 21 – Valores por triplicata da absorbância obtidas na curva analítica do método para a quantificação do hidroximetilnitrofurais.....	98
Tabela 22 - Parâmetros da reta de regressão	99
Tabela 23 – Precisão intra e intercorrida do método analítico para a quantificação do NFOH	101
Tabela 24 – Valores experimentais médios de porcentagem de recuperação obtidos para o teste de exatidão.....	101
Tabela 25 – Valores médios da absorbância do NFOH (10µg/mL) variando o comprimento de onda máximo de absorção.....	102
Tabela 26 – Determinação do IC ₅₀ das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> dos nanocristais de NFOH com poloxamer 188 (F1), nanocristais de NFOH com poloxamer 407 (F2), do sistema nanoestruturado polimérico de NFOH (NFOH–PBCA-NP) e do candidato a fármaco.	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS (DTN)	2
2.2	LEISHMANIOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS	4
2.2.1	<i>Epidemiologia no Brasil.....</i>	5
2.2.2	<i>Ciclo do protozoário Leishmania</i>	8
2.2.3	<i>Leishmaniose Visceral.....</i>	10
2.2.4	<i>Leishmaniose Cutânea.....</i>	11
2.2.5	<i>Leishmaniose Mucocutânea</i>	12
2.2.6	<i>Quimioterapia convencional utilizada no tratamento das leishmanioses.....</i>	13
2.3	HIDROXIMETILNITROFURAL PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	14
2.4	CONSIDERAÇÕES GERAIS RELATIVAS À NANOTECNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS: NANOCRISTAIS	16
2.4.1	<i>Aumento da solubilidade de saturação</i>	18
2.4.2	<i>Aumento da velocidade de dissolução.....</i>	20
2.5	OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS E SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.....	22
3	OBJETIVO	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	MATERIAL	26
4.1.1	<i>Matérias-primas, solvente e reagente</i>	26
4.1.2	<i>Aparelhos, equipamentos e acessórios.....</i>	27
4.2	MÉTODO	28
4.2.1	<i>Ensaios exploratórios para a obtenção de nanossuspensão de hidroximetilnitrofural.....</i>	28

4.2.2	<i>Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ).....</i>	32
4.2.3	<i>Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – Nanoparticle Tracking Analysis).....</i>	32
4.2.4	<i>Análise Térmica.....</i>	33
4.2.5	<i>Liofilização da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural</i>	34
4.2.6	<i>Determinação das características de redispersibilidade da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural liofilizada.....</i>	35
4.2.7	<i>Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	36
4.2.8	<i>Análise da estrutura cristalina dos nanocristais e do hidroximetilnitrofural empregando difração de raios X (DRX).....</i>	36
4.2.9	<i>Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões e no estudo de solubilidade</i>	37
4.2.10	<i>Análise estatística.....</i>	41
4.2.11	<i>Determinação da solubilidade de saturação das nanossuspensões de hidroximetilnitrofural.....</i>	41
4.2.12	<i>Estudo de estabilidade das nanossuspensões de hidroximetilnitrofural</i>	41
4.2.13	<i>Avaliação da atividade in vitro antileishmania.....</i>	41
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
5.1	ENSAIOS EXPLORATÓRIOS PARA A OBTENÇÃO DE NANOSSUSPENSÃO DE HIDROXIMETILNITROFURAL	42
5.1.1	<i>Seleção dos tensoativos para a obtenção de nanocristais de NFOH empregando-se o método de moagem por via úmida em escala reduzida</i>	42
5.2	OBTENÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE HIDROXIMETILNITROFURAL EMPREGANDO-SE O MÉTODO DE MOAGEM POR VIA ÚMIDA EM ESCALA REDUZIDA COM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (2 ^K).....	43
5.2.1	<i>Avaliação do planejamento fatorial completo empregando poloxamer 188 ...</i>	43
5.2.2	<i>Obtenção de nanocristais de NFOH utilizando planejamento de experimentos por superfície de resposta, empregando poloxamer 188.</i>	50

5.3	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO (DHM), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) E POTENCIAL ZETA (PZ)	65
5.3.1	<i>Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersão (IP)</i>	<i>65</i>
5.3.2	<i>Desenvolvimento de método para a determinação do potencial zeta (PZ)</i>	<i>67</i>
5.4	DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DA NANOSSUSPENSÃO DE HIDROXIMETILNITROFURAL POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA – <i>NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS</i>).....	70
5.5	ANÁLISE TÉRMICA	74
5.5.1	<i>Determinação da compatibilidade fármaco e excipientes empregando calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)</i>	<i>74</i>
5.6	LIOFIZAÇÃO DA NANOSSUSPENSÃO DE HIDROXIMETILNITROFURAL.....	82
5.6.1	<i>Determinação da temperatura de transição vítrea, empregando Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), para a liofilização</i>	<i>85</i>
5.7	DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE REDISPERSIBILIDADE DA NANOSSUSPENSÃO DE HIDROXIMETILNITROFURAL LIOFILIZADA	87
5.8	ANÁLISE MORFOLÓGICA E TAMANHO DOS NANOCRISTAIS EMPREGANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	89
5.9	ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALINA DOS NANOCRISTAIS E DO HIDROXIMETILNITROFURAL EMPREGANDO DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)	91
5.10	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIMETILNITROFURAL NAS NANOSSUSPENSÕES E NO ESTUDO DE SOLUBILIDADE	93
5.10.1	<i>Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de hidroximetilnitrofural nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões</i>	<i>93</i>
5.10.2	<i>Validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões</i>	<i>94</i>
5.11	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE SATURAÇÃO DAS NANOSSUSPENSÕES DE HIDROXIMETILNITROFURAL	102

5.12	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOSUSPENSÕES DE HIDROXIMETILNITROFURAL ...	103
5.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> ANTILEISHMANIA	106
6	CONCLUSÕES.....	107
7	REFERÊNCIAS	108
	ANEXO.....	122

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por um protozoário intracelular. Há pelo menos doze milhões de casos de infecções a nível global e trezentos e cinquenta milhões de pessoas em risco em pelo menos 98 países. Os países mais afetados são aqueles em desenvolvimento na África, no Sudeste Asiático e nas Américas. Apenas o Brasil apresentou alta carga para a leishmaniose visceral (LV) e cutânea (LC) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

A quimioterapia é o principal meio de combate a essa infecção. No entanto, apenas alguns medicamentos eficazes estão disponíveis e cada um desses apresenta desvantagem particular. As desvantagens referem-se à toxicidade e aos regimes de longo prazo que abrangem a maioria das opções quimioterápicas, reduzindo a adesão do paciente ao tratamento. Como consequência, o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos tem sido relatado (PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013; SINGH; SUNDAR, 2012).

O candidato a fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH), pró-fármaco recíproco derivado do nitrofural, foi sintetizado em 1996 por Chung. Quimicamente denominado 5-nitro-2-furaldeído N-(hidroximetil) semicarbazona, $C_7H_8N_4O_5$, consiste de pó amarelo-castanho, fotossensível, com massa molecular 228,29 g/mol e faixa de decomposição de 150-154°C. Esse candidato a fármaco mostrou-se mais ativo que o nitrofural, apresentando potencial uso no tratamento de doença de chagas e de leishmaniose.

Embora o NFOH seja promissor para o tratamento da leishmaniose, esse apresenta baixa solubilidade em água (CHUNG, 1996). Recurso promissor visando aumentar a eficácia e a segurança de fármacos com baixa solubilidade em água refere-se às tecnologias para a obtenção de nanocristais.

Os nanocristais são formados exclusivamente do fármaco (MÖSCHWITZER, 2013; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011) preparados em meios de dispersão empregando adição de estabilizadores (tensoativos e/ou polímeros), resultando em sistema coloidal. Assim, nesse meio líquido, esse sistema é denominado nanossuspensão (MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; RABINOW, 2004). Os estabilizadores exercem suas funções por meio de sua adsorção na superfície dos nanocristais. Essa estabilização (estérica, eletrostática ou eletroestérica) tem como função minimizar o risco de aglomeração de nanopartículas (PELTONEN; STRACHAN, 2015; RABINOW, 2004).

A redução do tamanho das partículas aumenta a área superficial, a solubilidade aparente e a velocidade de dissolução da substância pouco solúvel em água, aumentando assim, a sua biodisponibilidade. Além disso, os nanocristais apresentam maior adesividade às membranas biológicas – membrana celular ou superfície do trato gastrointestinal (GI). Como resultado, a absorção do fármaco pode ser aumentada (MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e obtenção de preparações farmacêuticas contendo nanocristais de hidroximetilnitrofurais (NFOH) para o tratamento da leishmaniose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN)

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo diverso de doenças infecciosas que são predominantes nas partes mais pobres do mundo. Essas doenças prevalecem nas zonas tropicais e subtropicais e são disseminadas em função das infraestruturas sanitárias inadequadas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem atualmente 17 DTN prevalentes em 149 países, afetando aproximadamente um bilhão de pessoas em nível global (QIAN; ZHOU, 2016). A lista de DTN inclui úlcera de buruli, doença de chagas, dengue e chikungunya, dracunculose, equinococose, trematodíases alimentares, tripanossomíase africana humana (doença do sono), leishmaniose, hanseníase, filaríase linfática, oncocercose, esquistossomose, helmintíase transmitida pelo solo, taeníase/cisticercose, tracoma e pian (doença de pele Boubu) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

As DTN que são alvo de quimioterapia preventiva em larga escala são causadas por diversos agentes patogênicos, tais como bactérias, vírus, parasitas ou fungos, e são mais frequentemente transmitidas através de transportadores ou vetores, como insetos e nemátodos, com características epidemiológicas muito diferentes (ENGELMAN et al., 2016). O mapeamento da prevalência e da distribuição das doenças é crucial para qualquer esforço de controle. Embora a distribuição geográfica das doenças negligenciadas seja amplamente conhecida, informações com maior detalhamento de mapeamento são

necessárias para permitir o planejamento para a implementação dos programas (BAKER et al., 2010).

A Declaração de Londres, de 2012, mostrou que governos, organizações não governamentais (ONG), entidades de filantropia, coalizões internacionais, fundações de doadores privados e empresas farmacêuticas podem se unir para o combate às doenças negligenciadas (BERGQUIST et al., 2015). Recentemente, ações conjuntas desses agentes permitiram disseminar conhecimento técnico, distribuir medicamentos e fomentar pesquisa – além de buscar financiamento e outros recursos para tratar e prevenir as DTN (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016).

Em 2013, a 66ª Assembleia Mundial da Saúde aprovou a resolução WHA 66.12 que definiu estratégias para DTN, com metas e marcos claros para as 17 DTN. Esse documento endossou os objetivos do mapa de estratégia de DTN da OMS, relacionando as DTN à cobertura de saúde universal. A OMS está trabalhando com os Estados-Membros para assegurar a implementação de cinco estratégias: quimioterapia preventiva, gestão intensificada de doenças, controle de vetores, medidas de saúde pública veterinária, para doenças zoonóticas negligenciadas, e melhoria da qualidade da água e do saneamento. (WORLD HEALTH ASSEMBLY WHA 66.12, 2013).

Em 2016, entraram oficialmente em vigor os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da agenda para o desenvolvimento sustentável de 2030 – documento adotado pelos líderes mundiais em setembro de 2015, numa histórica cúpula das Nações Unidas. Ao longo dos próximos quinze anos, esses novos objetivos mobilizarão esforços para acabar com todas as formas de pobreza, combater as desigualdades e as alterações climáticas, assegurando simultaneamente que ninguém seja deixado para trás. As DTN estão incluídas nos ODS, os quais, em seu objetivo 3.3, sinalizam que se pretende eliminar as epidemias de doenças tropicais negligenciadas, de doenças transmitidas pela água e de outras doenças transmissíveis até 2030 (UNITED NATIONS, 2015).

Apesar de receberem cada vez mais atenção dos formuladores de políticas públicas e da comunidade científica, as DTN continuam a ser importantes causas de morbidade e mortalidade em países endêmicos, perpetuando o ciclo vicioso da pobreza. (MARTINS-MELO et al., 2016). Atualmente, US\$ 3 bilhões são gastos anualmente em pesquisa e desenvolvimento voltados para doenças negligenciadas. Essa quantia é relativamente

pequena em comparação com as despesas destinadas à pesquisa e ao desenvolvimento de medicamentos para o combate de doenças não negligenciadas (HORSTICK; RUNGE-RANZINGER, 2018).

Estima-se que 57 milhões de anos de vida (*DALY, disability-adjusted life year*), sejam perdidos em função de morte prematura e/ou de incapacitação, anualmente, como decorrência das doenças tropicais negligenciadas. Entretanto, cálculos recentes da morbidade e da mortalidade causadas por essas doenças sugerem que esse índice pode ser maior do que o relatado. O efeito econômico dessas doenças, aliado os seus efeitos social e psicológico, são extensos e globais (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010).

2.2 Leishmaniose: considerações gerais

A leishmaniose é o nome coletivo de um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários obrigatórios e intracelulares do gênero *Leishmania* (HERWALDT, 1999). A leishmaniose é um problema de saúde prevalente nos países em desenvolvimento, sendo endêmica em aproximadamente 98 países e territórios, com 350 milhões de pessoas em risco e 12 milhões de casos de infecção no mundo (AKHOUNDI et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). Segundo a OMS, cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Mais de 53 espécies de leishmania foram descritas (AKHOUNDI et al., 2016), entre as quais a OMS classifica 20 espécies de leishmania como infecciosas para os seres humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A transmissão ocorre pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (mais de 800 espécies) (AKHOUNDI et al., 2016) do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Hemisfério Oriental, sendo endêmica na Ásia, na África e no sul da Europa) (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015) e do *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Hemisfério Ocidental, estendendo-se do centro-sul do Texas para as Américas Central e do Sul – exceto Chile e Uruguai) (BORGHI et al., 2017). Além disso, a leishmaniose pode ser classificada como antropológica ou zoonótica, dependendo se o reservatório natural do parasita é humano ou animal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c). As modificações ambientais causadas pelo homem acarretaram

alteração na forma de disseminação da doença. Dessa maneira, essa doença pode ser adquirida em vários ambientes ecológicos, incluindo assentamentos estabelecidos junto à floresta primária, cultivo em larga escala de culturas agrícolas e bairros marginais de cidades (ABOU-EL-NAGA, 2015).

Embora suas formas clínicas sejam particularmente diversas, a doença pode ser classificada em três formas principais: leishmaniose cutânea (LC, conhecida como tegumentar), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV, também conhecida como kalazar) (DE CARVALHO et al., 2013). Enquanto a leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a mais grave e pode ser fatal se não for tratada. Em período de aquecimento, o aumento dos vetores leishmanianos conduz à elevada incidência de ambas as formas dessa doença (JEBALI; KAZEMI, 2013).

2.2.1 Epidemiologia no Brasil

A leishmaniose está presente em quase todo o território brasileiro, sendo seu controle desafio tanto para agentes de saúde pública quanto para médicos veterinários em função de seu caráter zoonótico (MARCONDES; ROSSI, 2013).

A Figura 1 apresenta o número de casos de leishmaniose cutânea no Brasil entre 1990 e 2016. Em 2016, 12.690 casos confirmados de LC foram registrados, desses 25,0% na região nordeste, 9,6% na região sudeste, 1,7% na região sul, 15,5% na região centro-oeste, 40,0% na região norte e 8,2% dos casos foram reportados sem informar a unidade federativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

No ano de 2015, foram registrados 19.395 casos de LC, sendo 26,6% na região nordeste, 9,1% na região sudeste, 2,5% na região sul, 15,1% na região centro-oeste, 46,1% na região norte e 0,5% dos casos foram reportados sem informar a unidade federativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

Figura 1 - Casos de leishmaniose cutânea no Brasil, 1990 a 2016.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017a).

A Figura 2 mostra a densidade dos casos da LC demonstrando sua distribuição heterogênea. Algumas regiões são mais endêmicas, como norte e nordeste. Segundo o Ministério da Saúde, em 2015, foram notificados 13 óbitos decorrentes da LC que, associada a outras enfermidades, comprometeu os pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

Figura 2 - Densidade de casos de leishmaniose tegumentar relatados no Brasil em 2015.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016a).

No Brasil, a LV, há algumas décadas, tinha caráter eminentemente rural, porém, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas. Alguns fatores podem ter contribuído para a dispersão geográfica da leishmaniose no Brasil, tais como a migração de cães entre as áreas endêmicas e não endêmicas e as mudanças na ecologia do vetor. Isso significa que a introdução de cães infectados em áreas não endêmicas, onde existam potenciais vetores, pode ter resultado em novo foco da doença (BRASIL, 2014).

A Figura 3 demonstra o histórico do número de casos de LV notificados de 1990 até 2016 no Brasil. Em 2016, 3.200 casos confirmados de LV foram registrados e mais 275 óbitos. Sendo 47,6% na região nordeste, 18,5% na região sudeste, 0,3% na região sul, 4,9% na região centro-oeste, 18,1% na região norte e 10,6% dos casos foram reportados sem informar a unidade federativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

Mesmo com grande parte dos casos de leishmaniose visceral subnotificada, o Brasil reportou 3.289 casos da doença em humanos, no ano de 2015, com incidência da ordem de 1,6 casos/100.000 habitantes e taxa de letalidade de 7,8% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b). Em 2015, a LC apresentou cinco vezes maior prevalência quando comparada à forma visceral, sendo a LV 20 vezes mais letal que a forma cutânea. Tal cenário demonstra que seu controle constitui desafio importante para a saúde pública.

Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral no Brasil, de 1990 a 2016.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017b).

Figura 4 - Densidade de casos de leishmaniose visceral relatados no Brasil em 2015.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016b).

2.2.2 Ciclo do protozoário Leishmania

Os parasitas são transmitidos pela picada do mosquito palha (2-3 mm de comprimento) (Figura 5), inseto vetor. Somente o mosquito fêmea transmite os parasitas, pois as fêmeas necessitam do sangue para que seus ovos se desenvolvam (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Figura 5 - Mosquito vetor dos parasitas Leishmania.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017) .

Durante o ciclo de vida do protozoário *Leishmania* (Figura 6), os parasitas estão na forma amastigota, quando infectam o homem, e na forma promastigota, quando estão infectando o inseto vetor (BORGHI et al., 2017). A transmissão da doença ao homem ocorre quando as fêmeas do vetor regurgitam. Através da regurgitação, os flebotomíneos femininos introduzem parasitas, juntamente com fatores imunomoduladores e outros componentes salivares diferentes, durante a alimentação, nas áreas expostas da pele dos hospedeiros (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As formas promastigotas tendem a infectar as células do sistema fagocítico mononucleares do homem e, quando estão dentro do macrófago, os promastigotas tornam-se amastigotas, que se multiplicam, levando à ruptura dessa célula hospedeira. A lise leva à liberação de grande número de parasitas, que infectam outros macrófagos (BORGHI et al., 2017). A infecção gera lesões, sendo a forma visceral mais grave e fatal dessa protozoose (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Em um ambiente doméstico, cães e roedores são os reservatórios mais importantes que mantêm os focos endêmicos do parasita (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Figura 6 - Ciclo de contágio do parasita.

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2.3 Leishmaniose Visceral

Em 1903, Leishman e Donovan descreveram, separadamente, o protozoário – que posteriormente foi denominado *Leishmania donovani* – no tecido esplênico de pacientes na Índia – atualmente denominada leishmaniose visceral (HERWALDT, 1999). A LV, por sua incidência e elevada letalidade, é a forma mais grave e fatal da doença (GONTIJO; MELO, 2004). É tipicamente causada pelo complexo de *Leishmania donovani*, que inclui as espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

A LV é caracterizada por ataques irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço (Figura 7) e do fígado e anemia. Segundo a OMS, 300.000 novos casos de LV ocorrem anualmente e, se não tratada, é fatal em mais de 95% dos casos em até dois anos após o início da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016d). Nesse mesmo ano, 257 casos de co-infecção por LV / HIV foram registrados no Brasil (HENN et al., 2018; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

É endêmica em mais de 80 países. Cerca de 90% de todos os novos casos são relatados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (SINGH; SUNDAR, 2012).

Figura 7 - Manifestação de leishmaniose visceral em criança.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017).

2.2.4 Leishmaniose Cutânea

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c). Segundo a OMS, 1 milhão de casos foram relatados nos últimos 5 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). Uma importante co-infecção relatada foi o vírus da imunodeficiência humana (HIV), presente em 0,43% dos casos (HENN et al., 2018; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Os focos de LC têm ampla variação ecológica e os flebotomíneos podem ser encontrados em micro-*habitat* úmidos, sombreados e frescos (REITHINGER et al., 2007). Assim, as formas LC e LMC são causadas por várias espécies de *Leishmania*, incluindo *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania amazonensis* (LC) e *Leishmania braziliensis* (LC e LMC) (DE CARVALHO et al., 2013).

O primeiro sinal de infecção é tipicamente um discreto eritema que se desenvolve após período variável no local no qual o mosquito infectado picou o hospedeiro (REITHINGER et al., 2007).

O eritema desenvolve-se em uma pápula, em seguida, em nódulo que úlcera (Figura 8) progressivamente durante o período de 2 semanas a 6 meses, para se tornar a lesão que é característica de LC. Geralmente, produz úlceras nas partes expostas do corpo, como face, braços e pernas. Pode haver muitas lesões, que variam em severidade e que podem causar incapacidade grave (NAIFAL-KAMEL, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). Quando as úlceras se fecham, invariavelmente deixam cicatrizes permanentes que, muitas vezes, são causa de sérios preconceitos sociais (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

Figura 8 - Manifestação da doença leishmaniose cutânea.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017).

2.2.5 Leishmaniose Mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea é uma infecção causada por um parasita celular transmitido por picadas de mosquitos (PALUMBO, 2010). A LMC é uma forma grave e potencialmente fatal da doença, devido ao potencial destrutivo de suas lesões (ITO et al., 2015). As manifestações mucosas podem ser observadas em cerca de 5 a 20% da leishmaniose cutânea. O período de latência entre lesões cutâneas em desenvolvimento e o início tardio do envolvimento da mucosa varia de meses a anos (EKIZ et al., 2017).

A LMC pode manifestar-se por lesões que levam à destruição das mucosas do nariz, das cavidades da boca (Figura 9) e da garganta e dos tecidos circundantes, com obstrução nasal, epistaxe associada à produção de crosta, rinorreia e dor leve (DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011). Na fase inicial, há edema e hiperemia da mucosa septal anterior, presença de nódulos e posterior formação de lesão granulomatosa, evoluindo para perfuração septal, edema nasal com espessamento cutâneo, colapso do septo nasal e pirâmide nasal volumosa (ITO et al., 2015). Infecção secundária é relatada em 54,2% dos casos e é geralmente causada por *Staphylococcus aureus* (EKIZ et al., 2017). Essa forma incapacitante de leishmaniose pode levar à rejeição pela sociedade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c).

Figura 9 - Manifestação da doença com lesão na mucosa.

Fonte: BRASIL, (2010).

2.2.6 Quimioterapia convencional utilizada no tratamento das leishmanioses

O controle da leishmaniose, especialmente a forma zoonótica da doença, nas regiões com recursos limitados, não é economicamente viável (BADIEE et al., 2013). A quimioterapia é o principal meio para tratar essa doença. No entanto, apenas reduzido número de fármacos (Figura 10) eficazes está disponível e cada um desses apresenta inconveniente particular relativo à sua toxicidade (PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013; SINGH; SUNDAR, 2012).

Figura 10 - Fórmula molecular dos fármacos disponíveis no tratamento da leishmaniose.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Historicamente, os antimoniais pentavalentes (20 mg/kg), tais como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, foram administrados via parenteral e intramuscular como quimioterapia de primeira linha contra todas as formas de leishmaniose e ainda desempenham papel principal no tratamento (PHAM et al., 2013). Embora o antimonial pentavalente seja o padrão-ouro para o tratamento da leishmaniose, esse fármaco tem toxicidade para o fígado, coração e os rins (JEBALI; KAZEMI, 2013), além de provocar

dor no local da injeção – o que diminui sua aceitabilidade pelos pacientes (BEHESHTI et al., 2013).

Atualmente, o antimoniato de meglumina é o fármaco de escolha para tratar LC. No entanto, esse fármaco não tem eficácia adequada e a sua utilização em longo prazo pode causar resistência do parasita a outros fármacos (BAFGHI et al., 2015; REITHINGER et al., 2007).

O tratamento recomendado, de segunda linha, inclui anfotericina B (1 mg/kg), anfotericina B lipossomal (10 mg/kg), pentamidina (4 mg/kg), miltefosina (1,5–2,5 mg/dia) e paromomicina (15 mg/kg) – medicamentos que são usados como terapia de combinação. Tais combinações têm como objetivo aumentar a eficácia e a tolerância do tratamento, reduzindo o seu custo e limitando o surgimento da resistência aos fármacos (PHAM et al., 2013; PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013; WHO TECHNICAL REPORT SERIES 949, 2010). No entanto, esses fármacos apresentam efeitos secundários graves (como falha renal). Esses efeitos causam a baixa adesão do paciente ao tratamento e também o aparecimento de cepas resistentes (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; MOSIMANN et al., 2018; PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013).

Consequentemente, há necessidade da busca por compostos antileishmania com elevada potência. Adicionalmente, é necessário desenvolver novos métodos de tratamento para combater essa doença, como no caso de vacinas (BEHESHTI et al., 2013). Porém, os desafios técnicos e a complexidade da imunidade contra os parasitas contribuem claramente para a ausência dessa abordagem terapêutica. Apesar dos desafios, três vacinas são conhecidas, duas desenvolvidas no Brasil e uma na Europa (SINGH; SUNDAR, 2012; WYLIE et al., 2014a). Essas foram licenciadas para a profilaxia contra a leishmaniose visceral canina (JAIN; JAIN, 2015; WYLIE et al., 2014b). Na ausência de vacina aprovada para o tratamento em seres humanos, a terapêutica está fundamentada exclusivamente na quimioterapia (SINGH; SUNDAR, 2012; VIJAYAKUMAR; DAS, 2018).

2.3 Hidroximetilnitrofurais para o tratamento das leishmanioses

O nitrofurais (NF) é um agente antimicrobiano ativo contra microrganismos Gram-positivos e utilizados apenas em infecções tópicas devido aos seus efeitos adversos

(CHUNG et al., 2003). No entanto, apesar das atividades antichagásica e antileishmania, o grupamento nitro, responsável pela ação farmacológica, é responsável por sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Durante o metabolismo do fármaco, são produzidas espécies eletrolíticas reativas que podem danificar o DNA (BOSQUESI et al., 2008).

No intuito de reduzir essa toxicidade, em 1996, Chung sintetizou o pró-fármaco recíproco derivado do nitrofural. O hidroximetilnitrofural (NFOH), quimicamente denominado 5-nitro-2-furaldeído N-(hidroximetil) semicarbazona, $C_7H_8N_4O_5$ (Figura 11), consiste de pó amarelo-castanho, fotossensível, com massa molecular 228,29 g/mol e faixa de decomposição de 150-154°C. Esse candidato a fármaco mostrou-se mais ativo que o nitrofural, apresentando potencial uso no tratamento de doença de chagas e de leishmaniose.

Figura 11 - Estrutura molecular do hidroximetilnitrofural.

Fonte: CHUNG et al. (2003).

O pró-fármaco hidroximetilnitrofural possui coeficiente de partição óleo/água ($\log P = 0,19$) menor do que seu fármaco matriz ($\log P = 0,23$); o NFOH em água (1:10.000 partes) é classificado como muito pouco solúvel, enquanto o nitrofural é insolúvel (CHUNG et al., 2003).

Em estudos pré-clínicos de genotoxicidade (teste de Ames) *in vitro*, realizado empregando duas linhagens de *Salmonella typhimurium*, o NFOH mostrou-se quatro vezes menos tóxico do que o NF (GUIDO et al., 2001). Trabalho realizado por Bosquesi e colaboradores (2008) mostrou que os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, para o NFOH, em camundongos e ratos, sugerem baixa toxicidade desse, obtendo-se dose letal mediana (DL50) maior em relação ao fármaco de partida, NF (556,3 mg/kg). Por via oral, os resultados caracterizaram o NFOH como pouco tóxico, segundo a OMS, com valor

de DL50 acima de 2.000 mg/kg. Serafim e colaboradores (2013) evidenciaram, por meio de ensaios *in vivo*, que a farmacocinética do NFOH demonstrou que esse composto apresenta 20 vezes maior biodistribuição quando comparado ao fármaco original.

Limitações comuns de novas entidades químicas, como o NFOH, a baixa solubilidade em água limita sua biodisponibilidade e, portanto, a sua eficácia. Diferentes estratégias são utilizadas visando aumentar a biodisponibilidade dessas novas entidades, destacando-se a abordagem nanotecnológica.

2.4 Considerações gerais relativas à nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de preparações farmacêuticas: nanocristais

Apesar de alcançar significativa importância no campo farmacêutico e em outras áreas, não há definição única e harmonizada de nanopartículas (NP). Tal fato deve-se à natureza multidisciplinar da nanotecnologia. O termo "nanotecnologia" foi usado pela primeira vez por Norio Taniguchi (1974), na Universidade de Tóquio, no Japão, para qualquer material na faixa de tamanho nanométrico.

A FDA (2014) considera que o produto envolve nanotecnologia quando o processo para a obtenção, o controle, a fabricação e/ou a manipulação intencional de materiais que têm pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm. Além disso, o material deve apresentar propriedades físicas, químicas e/ou biológicas que permitam aplicação inovadora atribuível a sua dimensão nanométrica. Caso o material ou produto final possua propriedades físicas ou químicas ou efeitos biológicos que são atribuíveis à sua dimensão, mesmo que superior a 10 e inferior a 1.000 nm, esses são considerados materiais nanotecnológicos.

Nanocristais são partículas de fármaco com caráter cristalino ou amorfo na faixa submícron ou nanométrica, geralmente entre 100 e 500 nm. Os nanocristais são sólidos formados por rede de átomos, íons ou moléculas, geralmente obtida por cristalização direta (abordagem *bottom-up*) ou moagem (fragmentação) do material (abordagem *top-down*) (MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; SHEGOKAR; MÜLLER, 2010).

De forma diferente das plataformas matriciais, os nanocristais são formados exclusivamente do fármaco (MÖSCHWITZER, 2013; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011) preparados em meios de dispersão empregando adição de estabilizadores (tensoativos e/ou

polímeros), resultando em sistema coloidal. Assim, nesse meio líquido, esse sistema é denominado nanossuspensão (MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; RABINOW, 2004). Os estabilizadores exercem suas funções por meio de sua adsorção na superfície dos nanocristais. Essa estabilização (estérica, eletrostática ou eletroestérica) tem como função minimizar o risco de aglomeração de nanopartículas (PELTONEN; STRACHAN, 2015; RABINOW, 2004).

A redução do tamanho das partículas aumenta a área superficial, a solubilidade aparente e a velocidade de dissolução da substância pouco solúvel em água, aumentando, assim, a sua biodisponibilidade. Além disso, os nanocristais apresentam maior adesividade às membranas biológicas – membrana celular ou superfície do trato gastrointestinal (GI). Como resultado, a absorção do fármaco pode ser aumentada (MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011).

Essa abordagem é útil para melhorar a absorção de fármacos classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), aqueles que apresentam baixa solubilidade aquosa, mas são facilmente permeáveis, uma vez dissolvidos no lúmen intestinal (DIMER et al., 2013). De fato, a formulação de fármacos classe II como nanocristais pode se traduzir em aumento substancial da taxa de absorção (MÖSCHWITZER, 2013; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011). A propriedade de bioadesão das nanopartículas na mucosa GI pode prolongar o tempo de retenção dos fármacos, aumentando os gradientes de concentração e, conseqüentemente, com aumento na absorção no intestino (CHEN et al., 2017; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2015).

Nesse contexto, a redução do tamanho das partículas pode aumentar ainda mais a absorção de fármacos, saturando transportadores de efluxo com o fármaco dissolvido no trato GI (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010). Contudo, a essência da nanonização de compostos pouco solúveis em água recai principalmente nas equações de Noyes-Whitney (NOYES; WHITNEY, 1897) e Prandtl (PRANDTL, 1904). Essas equações descrevem como a redução do tamanho de partícula está relacionada ao aumento da área superficial e à redução da espessura da camada de difusão e, portanto, ao aumento da velocidade de dissolução.

O aumento da solubilidade de saturação de substâncias na escala nanométrica é também descrito pelas equações de Ostwald-Freundlich (VON HELMHOLTZ, 1886) e

Kelvin (SKINNER; SAMBLES, 1972; THOMSON, 1872), que correlacionam o tamanho e a curvatura das partículas com a solubilidade. Assim, substâncias ativas com partículas abaixo de um micron, a solubilidade de saturação depende não apenas da formulação (fármaco e excipientes), do meio de dissolução e da temperatura, mas também do tamanho da partícula (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008).

O desenvolvimento de produtos farmacêuticos à base de nanocristais tem crescido nas últimas décadas. A FDA recebeu mais de 80 submissões de medicamentos, até o ano de 2016, contendo nanocristais a serem administrados por diferentes vias, abrangendo o tratamento de diferentes doenças (CHEN et al., 2017).

Entre as inovações para o combate às DTN destacam-se as patentes referentes à formulação de nanocristal de ácido orótico, diâmetro entre 100 e 200 nm (COMPRI et al., 2016), e de nanocristal de hemozoína (50-1000 nm) (HLEB; LAPOTKO, 2014) – ambas as inovações com aplicação no tratamento da malária. Adicionalmente, Govindarajan e colaboradores (2016) desenvolveram nanocristal de prata (1-30 nm) que permitiu a eliminação da larva do mosquito transmissor do vírus da Zika. Para o tratamento da tuberculose, foi observada a redução da carga microbiana, no pulmão, após tratamento empregando nanocristal de clofazimina (385 nm) (KAUR; SINGH, 2014).

2.4.1 Aumento da solubilidade de saturação

O aumento da solubilidade de saturação em água dos nanocristais é explicado por diferentes teorias. Teoricamente, o comportamento descrito pela equação de Kelvin (SKINNER; SAMBLES, 1972; THOMSON, 1872) é aplicado para explicar o fenômeno observado na interface sólido-líquido de partículas com tamanhos inferiores a 1000 nm. A maior pressão de dissolução deslocaria a solubilidade de equilíbrio para uma solubilidade cinética aumentada. Além disso, a solubilidade de saturação depende do tamanho da partícula (equação de Ostwald-Freundlich) e, portanto, a redução do tamanho da partícula na escala nanométrica resulta em aumento dessa característica.

A equação de Kelvin (Equação 1) é originalmente usada para descrever a pressão de vapor sobre a superfície curva de uma gota do líquido em gás (aerossol) (THOMSON, 1872). A redução no tamanho da gota contribui para o aumento da curvatura da superfície e

do aumento da pressão do vapor. A transferência de moléculas de uma fase líquida (gota) para uma fase gasosa é idêntica à transferência de moléculas de uma fase sólida (nanocristal) para uma fase líquida (meio de dispersão). A pressão de dissolução pode ser aumentada com curvatura crescente (tamanho de partícula decrescente). Portanto, o equilíbrio é deslocado em direção à dissolução, e assim a solubilidade de saturação aumenta.

Equação 1:

$$\ln \frac{Pr}{P_{\infty}} = \frac{2\gamma Mr}{rRT\rho}$$

Onde Pr é a pressão de dissolução de uma partícula com o raio r , P_{∞} é a pressão de dissolução de uma partícula infinitamente grande, γ é a tensão superficial, R é a constante de gás, T é a temperatura absoluta, r é o raio da partícula, o Mr é o peso molecular, e ρ é a densidade da partícula.

Portanto, a equação de Kelvin também é aplicável para explicar a relação entre a pressão de dissolução e a curvatura das partículas sólidas em líquido. A pressão de dissolução é equivalente à pressão de vapor (JUNYAPRASERT; MORAKUL, 2015).

As partículas na escala nanométrica oferecem enorme curvatura (Figura 12), conseqüentemente, maior pressão de dissolução é alcançada conduzindo ao equilíbrio para a dissolução. A equação de Ostwald-Freundlich (Equação 2) correlaciona a solubilidade da saturação do fármaco e o tamanho de partícula:

Equação 2:

$$\log \frac{Cs}{C\alpha} = \frac{2\sigma V}{2.303RT\rho r}$$

Onde Cs é a solubilidade de saturação, $C\alpha$ é a solubilidade do sólido constituído por partículas grandes, σ é a tensão interfacial da substância, V é o volume molar do material de partículas, R é a constante de gás, T é a temperatura absoluta, ρ é a densidade do sólido, r é o raio.

Figura 12 - Aumento da pressão de dissolução (p) sobre uma superfície plana (a), uma micropartícula (b) e uma nanopartícula (c).

Adaptado: JUNGHANN; MÜLLER (2008).

A partir da equação de Ostwald-Freundlich, observa-se que a solubilidade de saturação do fármaco aumenta com a redução do tamanho de partícula. No entanto, é mais pronunciada em partículas com tamanho médio inferior a 2 μm (BUCKTON; BEEZER, 1992).

2.4.2 Aumento da velocidade de dissolução

O aumento da velocidade de dissolução dos nanocristais pode ser explicado pela equação de Noyes-Whitney (Equação 3) (DRESSMAN et al., 1998; NOYES; WHITNEY, 1897).

Equação 3

$$\frac{dX}{dt} = \frac{DA}{h_D} \times (C_s - C_t)$$

Onde dX / dt é a velocidade de dissolução, D é o coeficiente de difusão, A é a área de superfície, h_D é a distância de difusão, C_s é a solubilidade de saturação, C_t é a concentração em torno das partículas.

De acordo com a equação de Noyes-Whitney, a velocidade de dissolução de nanocristais aumenta devido ao aumento da área superficial. Além disso, a redução de tamanho de nanocristais acarreta em maior solubilidade de saturação, como mencionado anteriormente, que pode oferecer duas vantagens. Em primeiro lugar, a velocidade de

dissolução é ainda melhorada devido ao aumento do gradiente de concentração $(C_s - C_t) / h_D$, de acordo com a equação de Noyes-Whitney. Em segundo lugar, o aumento da solubilidade de saturação contribui para o aumento do gradiente de concentração entre o intestino e o sangue, promovendo a permeação e a absorção por difusão passiva (DRESSMAN et al., 1998).

Fator importante é a distância de difusão h_D , como parte da camada limite hidrodinâmica h_H , que também é fortemente dependente do tamanho de partícula como mostrado pela equação de Prandtl (Equação 4) (PRANDTL, 1904).

Equação 4

$$h_H = \kappa \left(\frac{L^{1/2}}{V^{1/2}} \right)$$

Onde h_H é a espessura da camada limite hidrodinâmica, k indica uma constante, L é o comprimento da superfície da partícula na direção do fluxo, V é a velocidade relativa do líquido que flui em torno da partícula.

De acordo com a equação de Prandtl, a redução de tamanho de partícula tem como consequência a redução da distância de difusão h_D (Figura 13) e, como decorrência, o aumento da velocidade de dissolução, conforme descrito pela equação de Noyes-Whitney. Tanto a solubilidade quanto a velocidade de dissolução são fatores críticos em termos de melhoria da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água.

Figura 13 - Comparação da distância de difusão em microcristal (A) e nanocristal (B).

Adaptado: JUNGHANN; MÜLLER (2008).

2.5 Obtenção de nanocristais e sua aplicação no desenvolvimento de medicamentos

Três abordagens são utilizadas para a obtenção de nanocristais: *top-down*, *bottom-up* e a combinação dessas abordagens. A abordagem *top-down* refere-se aos processos que reduzem as partículas, geralmente em escala micrométrica, para a escala nanométrica por meio de processo mecânico. Esses processos usam frequentemente o atrito e incluem moagem a alta energia (moagem empregando esferas de zircônia estabilizadas), homogeneização a alta pressão (homogeneizador de pistão e homogeneizador de jato corrente), bem como metodologia combinada com pré-tratamento e etapas de alta energia (LOH; SAMANTA; SIA HENG, 2015; MALAMATARI et al., 2018; MÖSCHWITZER, 2013).

Em contraste, a abordagem *bottom-up* refere-se aos métodos em que as moléculas em solução são agregadas por processos de precipitação. Historicamente, a abordagem *bottom-up* é a técnica mais madura para produzir nanocristais, que pode incluir dispersões sólidas desenvolvidas no início da década de 1960 e técnicas de hidrosol, na década de 1980. No entanto, várias tecnologias modernas *bottom-up* surgiram, tais como técnicas de fluidos supercríticos, processos de liofilização, congelamento por pulverização e precipitação evaporativa. As desvantagens dessas abordagens incluem o uso de solventes orgânicos, a dificuldade no controle do tamanho do cristal, a solubilidade limitada do fármaco no solvente e sua decomposição (DE WAARD; FRIJLINK; HINRICHS, 2011; HU; JOHNSTON; WILLIAMS, 2004).

A combinação desses métodos culminou nas tecnologias patenteadas: o *Nanoedge*[®], o *SmartCrystal*[®] e o *Nanopure*[®] XP. Desenvolvidas na década de 1990, as tecnologias *top-down* foram bem estabelecidas ao longo do tempo. Contudo, têm sido mais usadas em comparação com as tecnologias *bottom-up* para a produção de nanocristais na indústria farmacêutica.

Recentemente, a moagem por via úmida em escala reduzida foi descrita por Romero e colaboradores (2016). Sua principal vantagem refere-se à sua simplicidade e à viabilidade econômica. Nesse sistema (Figura 14), atuam as forças de impacto entre as partículas de fármaco, entre essas com as esferas de zircônia e as forças de impacto entre as partículas com a parede de vidro do recipiente de moagem. Essas condições de elevada energia de

impacto e cisalhamento permitem a nanopulverização do material. Essa abordagem resultou em nanocristais de acetato de dexametasona, para uso oftálmico, com tamanho entre 200 e 250 nm (ROMERO et al., 2016).

Figura 14 - Representação do sistema de moagem por via úmida.

Adaptado: ROMERO; KECK; MÜLLER (2016).

Os autores empregaram frascos de vidro de 2 mL (recipiente de moagem), placa de agitação magnética, barras magnéticas cilíndricas e esferas de zircônia 0,05-0,1 mm que, em conjunto, permitiram o aumento da eficiência de moagem e a redução do tamanho das partículas pela geração de forças de cisalhamento entre as partículas do fármaco (ROMERO; KECK; MÜLLER, 2016).

Dos vários métodos para a produção de nanocristais, o método de moagem por via úmida tem se destacado entre os pesquisadores, dessa forma pode-se observar na Tabela 1 as formulações que foram desenvolvidas por esse método e aprovadas pela FDA (MALAMATARI et al., 2018).

Tabela 1 – Formulações farmacêuticas à base de nanocristais aprovadas pela FDA.

Nome Comercial	Substancia Ativa	Via de administração	Empresa
Avinza®	Sulfato da morfina	Oral	King Pharma
Azopt®	Brinzolamida	Ocular	Alcon
Emend®	Aprepitanto	Oral	Merk
Focalin XR®	Cloridrato de dexmetilfenidato	Oral	Novartis
Herbesser®	Diltiazem	Oral	Mitsubishi
Invega Sustenna®	Palmitato de paliperidona	Intramuscular	Johnson & Johnson
Megace ES®	Acetato de megestrol	Oral	Par Pharmaceutical
Naprelan®	Naproxeno sódico	Oral	Wyeth
Rapamune®	Sirolimus (rapamicina)	Oral	Wyeth
Ritalin LA®	Cloridrato metilfenidato	Oral	Novartis
Theodur®	Teofilina	Oral	Mitsubishi Tanabe Pharma
Tricor®	Fenofibrato	Oral	Abbott
Verelan PM®	Cloridrato de Verapamil	Oral	Schwarz Pharma
Zanaflex®	Cloridrato de Tizanidina	Oral	Acorda

Esse método mostrou-se útil na obtenção de nanocristais, porém alguns fatores devem ser observados, como o número de revoluções por minuto, o tempo de moagem, a quantidade de esferas de zircônia, as características físico-químicas do fármaco (densidade do fármaco, dureza, ponto de fusão, peso molecular, etc.) e a seleção adequada do tensoativo (concentração na formulação, tipo do tensoativo). Liu e colaboradores (2017)

empregaram essa metodologia na preparação de nanocristais de compostos de origem natural (quercetina, rutina, resveratrol e hesperidina) obtendo nanocristais entre 200 e 500 nm. Koradia et al. (2018) desenvolveram nanocristais de ziprasidona por moagem por via úmida e obtiveram nanocristais de 300 a 700 nm com diferentes tensoativos (poloxamer 407, polivinilpirrolidona K-30, álcool polivinílico - PVA) e também o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC E5), agente suspensor. Medarević e colaboradores (2018) utilizaram o mesmo método para desenvolver nanocristais de carvedilol, utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca e hipertensão arterial, obtendo-se nanocristais entre 200 e 300 nm.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de nanocristais de hidroximetilnitrofural, sua caracterização físico-química, assim como, a avaliação da sua atividade *in vitro* antileishmania.

3.2 Objetivos específicos

- Estudo exploratório para a obtenção da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural empregando o método de moagem por via úmida em escala reduzida;
- Obtenção e otimização por planejamento fatorial dos nanocristais de hidroximetilnitrofural empregando o método de moagem por via úmida em escala reduzida;
- Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), do índice de polidispersão (IP) e do potencial zeta (PZ) da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural por espalhamento de luz dinâmica (DLS);
- Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*);

- Análise térmica empregando calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG);
- Liofilização da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural;
- Determinação das características de redispersibilidade da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural liofilizada;
- Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Análise da estrutura cristalina dos nanocristais e do hidroximetilnitrofural empregando difração de raios-x (DRX);
- Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões e no estudo de solubilidade, utilizando espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis);
- Determinação da solubilidade de saturação das nanossuspensões de hidroximetilnitrofural empregando técnica Shake-flask, em diferentes meios;
- Avaliação da estabilidade das nanossuspensões e das preparações liofilizadas armazenadas no período de 3 meses a 25 e 4°C;
- Avaliação da atividade *in vitro* antileishmania.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas, solvente e reagente

- Hidroximetilnitrofural (Lapdesf, UNESP – Araraquara);
- Solução saturada do NFOH;
- Macrogol 15 hidroxiestearato (Kolliphor HS®15) (BASF, Alemanha);
- Copolímero de álcool polivinílico (Povacoat®) (DAIDO, Japão);
- Poloxamer 188 micro (BASF, Alemanha);
- Poloxamer 407 micro (BASF, Alemanha);
- Polissorbato 20 (SYNTH, Brasil);

- Polissorbato 80 (SYNTH, Brasil);
- HCl 1N (Sigma-Aldrich, EUA);
- Fosfato de potássio bibásico anidro (Synth, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico anidro (Synth, Brasil);
- Ácido cítrico anidro (Synth, Brasil);
- Dimetilsulfóxido P.A. (Synth, Brasil);
- NaOH 0,1M (Sigma-Aldrich, EUA);
- Solução de cloreto de sódio 0,9% (m/m);
- Água ultrapura Milli-Q®;
- D - manitol (Sigma-Aldrich, EUA);
- Tampão HCl pH 1,2;
- Tampão acetato pH 4,5;
- Tampão fosfato pH 6,8;
- Meio de cultura M199 – (Sigma-Aldrich, EUA);
- Laurilsulfato de sódio – (Synth, Brasil);
- Reagente MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) - (Sigma-Aldrich, EUA).

4.1.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Esferas de zircônia 0,1mm - Retsch®, Alemanha;
- Recipiente de vidro borosilicato 10mL;
- Balança analítica UX620H, Shimadzu®, Japão;
- pHmetro MP 220, Mettler Toledo®, Suíça;
- Condutivímetro digital CG 2000, GEHAKA®, Brasil;
- Calorímetro de varredura DSC TA-2929 - TA Instrument®, EUA;
- Analisador termogravimétrico TG/DTG 2950 - TA Instrument®, EUA;
- Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, Malvern®, Reino Unido;
- Agitador magnético com aquecimento, IKA®, EUA;
- NanoSight NS300, Malvern Instruments, Malvern®, Reino Unido;

- Software NTA v3.1, Malvern Instruments, Malvern®, Reino Unido;
- Liofilizador Christ Alpha 1-4 LSC, Martin Christ®, Alemanha;
- Microscópio eletrônico de varredura ZEISS Sigma 300, Carl Zeiss Microscopy®, Alemanha;
- Difractômetro de raios X Bruker Modelo D8 Advance Da Vinci, Bruker®, EUA;
- Equipamento espectrofotométrico Ultravioleta Visível Evolution series 201, Thermo Scientific®, EUA;
- Cubetas de quartzo modelo 18UV10, Thermo Scientific®, EUA;
- Balança analítica UX620H, Shimadzu®, Japão;
- Banho ultrassônico, Unique®, Brasil;
- Agitador orbital Tecnal TE 4080, Tecnal®, Brasil;
- Centrífuga 5424R, Eppendorf®, Estados Unidos;
- Placas de cultura 96 poços – TPP;
- Filtro Millex® (0,45µm);
- Minitab® 17, EUA.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Ensaios exploratórios para a obtenção de nanossuspensão de hidroximetilnitrofural

4.2.1.1 Obtenção de nanocristais de hidroximetilnitrofural empregando o método de moagem por via úmida em escala reduzida

A partir do método descrito por Romero e colaboradores (2016), foi adaptado o método de moagem por via úmida para o desenvolvimento dos nanocristais de NFOH. Essas adaptações incluíram frascos com ligeira protuberância convexa na sua base, assim como, o uso de barras magnéticas em formato de cruz, contribuindo para a redução da variabilidade do processo de nanonização das partículas.

As fórmulas foram obtidas empregando-se sistema em escala reduzida (laboratorial) constituído de recipiente de moagem de vidro (capacidade de 10 mL), esferas de zircônia de 0,1 mm (2 mL) e três barras magnéticas, em formato de cruz. Diferentes estabilizadores estéricos foram testados com o objetivo de pré-selecionar aqueles que permitiram a

obtenção de preparação com diâmetro hidrodinâmico médio < 300 nm, índice de polidispersão <0,3 e distribuição monomodal, imediatamente após o preparo. Os seguintes tensoativo foram empregados: poloxamer 188, poloxamer 407, polissorbato 80 e polissorbato 20, Kolliphor HS®15 e Povacoat®.

Os parâmetros fixos para essa pré-seleção foram: concentração do NFOH (3,0% m/m), concentração de tensoativo (1,0% m/m), velocidade de agitação de 800 rpm e tempo de moagem (120 horas) conforme a Tabela 2. Foi necessário corrigir o pH das formulações antes da adição do candidato a fármaco, pois, conforme descrito por Chung e colaboradores (2003), o pró-fármaco NFOH é convertido no seu precursor, NF, quando em pH ácido. Dessa maneira, foi ajustado o pH com NaOH 0,1M para medidas de pH na faixa de 7,5–8,5.

Tabela 2– Pré-seleção das formulações na obtenção dos nanocristais de NFOH.

Componentes (%m/m)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
NFOH	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Polissorbato 80	1,0	-	-	-	-	-
Polissorbato 20	-	1,0	-	-	-	-
Poloxamer 188	-	-	1,0	-	-	-
Poloxamer 407	-	-	-	1,0	-	-
Kolliphor HS®15	-	-	-	-	1,0	-
Povacoat®	-	-	-	-	-	1,0
Água Milli-Q q.s.p (g)	10	10	10	10	10	10

4.2.1.2 Obtenção de nanocristais de hidroximetilnitrofural empregando-se o método de moagem por via úmida em escala reduzida empregando planejamento fatorial completo (2^K)

A preparação das nanossuspensões de NFOH pelo método de moagem por via úmida em escala reduzida mostrou ser simples e rápida. Foi utilizada abordagem estatística empregando planejamento fatorial tendo em vista determinar as variáveis importantes do processo de moagem, assim como, obter modelo matemático apropriado para descrever o

fenômeno, utilizando o mínimo possível de experimentos. Foram selecionados, na etapa de pré-seleção, dois estabilizantes: poloxamer 188 (P188) e poloxamer 407 (P407). Assim, foram gerados dois planejamentos experimentais (2³) (Tabela 3), com três pontos centrais, totalizando 11 ensaios empregando software Minitab® 17, para cada estabilizante.

Os fatores foram selecionados a partir de conhecimento adquirido na revisão da literatura e nos ensaios exploratórios. As variáveis independentes selecionadas foram: tempo de agitação (horas), concentração do NFOH (%m/m) e concentração do tensoativo (%m/m). As respostas ou variáveis dependentes foram o DHM, o IP e o PZ. A quantidade de esferas de zircônia e a velocidade de agitação em rpm foram fixas para todas as formulações. Assim como nos ensaios preliminares, foram utilizados 2 mL de esferas de zircônia e 800 rpm de agitação.

Tabela 3 – Matriz de ensaios para a otimização do processo de preparação de nanocristais de hidroximetilnitrofural empregando os estabilizadores poloxamer 188 e poloxamer 407

Formulação	Ordem	Ponto central	Tempo (horas)	NFOH (%m/m)	Tensoativo (%m/m)
1	1	1	48	3,0	1,0
2	2	0	84	2,0	2,0
3	3	1	120	3,0	1,0
4	4	0	84	2,0	2,0
5	5	1	48	3,0	3,0
6	6	1	120	1,0	1,0
7	7	1	120	1,0	3,0
8	8	0	84	2,0	2,0
9	9	1	120	3,0	3,0
10	10	1	48	1,0	1,0
11	11	1	48	1,0	3,0

A análise estatística dos resultados obtidos, no planejamento fatorial, foi efetuada empregando software Minitab® 17. Para modelos não lineares, foi realizada uma segunda etapa do planejamento estatístico, no qual foram adicionados 6 pontos axiais no delineamento fatorial completo e 3 pontos centrais (Tabela 3), totalizando 20 experimentos

(planejamento composto central), conforme Tabela 4. A análise estatística dos resultados obtidos, na segunda etapa do planejamento fatorial, foi efetuada empregando software Minitab® 17.

Tabela 4– Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaios por superfície de resposta, empregando o poloxamer 188 como tensoativo.

Formulação	Ordem	Ponto central	Tempo (horas)	NFOH (%m/m)	Tensoativo (%m/m)
1	1	1	48,0	3,0	1,0
2	2	0	84,0	2,0	2,0
3	3	1	120,0	3,0	1,0
4	4	0	84,0	2,0	2,0
5	5	1	48,0	3,0	3,0
6	6	1	120	1,0	1,0
7	7	1	120	1,0	3,0
8	8	0	84	2,0	2,0
9	9	1	120	3,0	3,0
10	10	1	48	1,0	1,0
11	11	1	48	1,0	3,0
12	12	-1	120	2,0	2,0
13	13	0	84	2,0	2,0
14	14	-1	120	2,0	1,0
15	15	-1	84	3,0	1,0
16	16	0	84	2,0	2,0
17	17	-1	48	2,0	1,0
18	18	-1	84	3,0	2,0
19	19	0	84	2,0	2,0
20	20	-1	84	1,0	1,0

4.2.2 Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ)

4.2.2.1 Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersão (IP)

Visando estabelecer as condições para as leituras de diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (IP) pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS), foram realizadas diluições consecutivas de 1:50 e 1:200 da amostra em solução saturada do NFOH. As medições foram efetuadas em triplicata utilizando ângulo de 90° no equipamento Zetsizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.2.2.2 Desenvolvimento de método para a determinação do potencial zeta (PZ)

As determinações foram realizadas no equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) pelo método de mobilidade eletroforética, a qual é convertida em potencial zeta (ζ) (mV) usando a equação de Henry (Equação 5).

Equação 5

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(ka)$$

Em que η e ε são a viscosidade e a constante dielétrica, respectivamente, do solvente na temperatura de 25°C. U_E , mobilidade eletroforética e ζ potencial zeta. A força do campo aplicado foi de 20 V/cm. As condições para a determinação do potencial zeta foram determinadas por meio de curva de condutividade *versus* potencial zeta. A faixa de condutividade avaliada foi de 10 a 60 $\mu\text{S/cm}$ empregando solução de NaCl 0,9% (m/v).

4.2.3 Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanosuspensão de hidroximetilnitrofural por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*)

As amostras foram diluídas em solução saturada do NFOH na concentração de 10 µL/50 mL. Dessa solução, foi coletada alíquota de 1 mL e diluída novamente em 50 mL de solução saturada do NFOH. Aproximadamente 500 µL foi injetado logo após a diluição no porta-amostra do NanoSight NS300. Por meio do Software NTA v3.1, foram conduzidas medidas em triplicata com duração de 60 segundos a temperatura de 25°C. A média dessas análises foram utilizadas para realizar o comparativo com a média de tamanho de partícula obtido pela técnica DLS.

4.2.4 Análise Térmica

4.2.4.1 Determinação da compatibilidade fármaco e excipientes empregando calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)

A caracterização por DSC foi realizada calibrando-se previamente o calorímetro de varredura TA2920 (TA Instrument®, EUA) com índio metálico (ponto de fusão: 156,4°C/ ΔH fusão: 28,50 J g⁻¹). Usou-se a faixa de temperatura de 25 a 300°C. As amostras foram cuidadosamente pesadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e submetidos à velocidade de aquecimento de 5°C/min, com atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. Foram pesadas as seguintes amostras: hidroximetilnitrofural, poloxamer 188, poloxamer 407 e suas misturas físicas, hidroximetilnitrofural e poloxamer 188, hidroximetilnitrofural e poloxamer 407.

As análises de TG/DTG foram realizadas usando-se cadinhos de platina no analisador termogravimétrico TA-2920 (TA Instrument®, EUA) na faixa de temperatura de 25 a 600°C, com velocidade de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min). A calibração do equipamento foi realizada empregando-se oxalato de cálcio. As massas do hidroximetilnitrofural, poloxamer 188, poloxamer 407 e suas misturas físicas, hidroximetilnitrofural e poloxamer 188, hidroximetilnitrofural e poloxamer 407 foram transferidas para cadinhos de platina. A perda da massa foi registrada em função da temperatura.

4.2.5 Liofilização da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural

4.2.5.1 Determinação da temperatura de transição vítrea da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural, empregando Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), para a liofilização

A secagem das nanossuspensões foi efetuada por meio de liofilização, com o objetivo de aumentar a estabilidade das preparações obtidas em meio aquoso, assim como permitir a realização dos ensaios de difração de raio X, solubilidade de saturação e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por meio da liofilização, foi possível a obtenção de formas farmacêuticas sólidas dos nanocristais.

As curvas de DSC foram obtidas empregando equipamento DSC Q10 - *TA instruments*. Foi adicionado 5% de manitol (usado como agente formador de volume ou *bulking agent*) na nanossuspensão de NFOH. Foi usado cadinho de alumínio contendo aproximadamente 6,6 mg de amostra. A análise foi submetida à etapa de resfriamento de 5°C/min de 25°C até -70°C, isoterma por 10 min, aquecimento de 10°C/min até -15°C, isoterma por 20 min, resfriamento de 5°C/min até -50°C e aquecimento de 10°C/min até 40°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. O equipamento foi previamente calibrado com índio (PF 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J g}^{-1}$).

Foram determinadas a temperatura de transição vítrea (T_g') e Temperatura eutética (T_{eut}) da nanossuspensão de NFOH. Os valores de T_g' e T_{eut} foram considerados como parâmetros críticos durante o evento térmico.

4.2.5.2 Parâmetros de liofilização da nanossuspensão de NFOH

A liofilização foi realizada em liofilizador Christ Alpha 1-4 LSC (Martin Christ®, Alemanha). As formulações de NFOH obtidas foram liofilizadas em volume igual a 1,5 mL. Usou-se o *bulking agent* manitol, na concentração de 5% (m/m); frascos de vidro de 10 mL foram preenchidos manualmente e parcialmente fechados com tampas de borracha (Figura 15). As amostras foram submetidas a congelamento lento (1°C/min) até que a temperatura do produto atingisse -45°C. O tratamento térmico *annealing* foi aplicado, submetendo-se primeiro as amostras ao congelamento lento, seguido de etapa de

aquecimento até -15°C e mantidas a essa temperatura por 1 hora. Finalmente, as amostras foram novamente congeladas a -45°C e submetidas à liofilização. A secagem primária foi conduzida em temperatura de prateleira de -35°C e pressão de 75 mTorr, por 48h. Na etapa da secagem secundária, a temperatura da prateleira foi de $+20^{\circ}\text{C}$, sob a mesma pressão, durante 4h.

Figura 15 – Nanossuspensões de NFOH durante o processo de liofilização.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.6 Determinação das características de redispersibilidade da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural liofilizada

Após a solidificação das nanossuspensões, avaliou-se a capacidade de reformação das nanopartículas de NFOH por contato com a água (redispersibilidade). A redispersibilidade foi medida de acordo com o método relatado por Toziopoulou et al. (2017) e Yue et al. (2013). Aproximadamente 1,5 mg da nanossuspensão liofilizada foi dispersa em 1,5 mL de água purificada e depois agitada vigorosamente durante 30 segundos para produzir suspensão com a mesma concentração que a nanossuspensão antes da secagem por liofilização. O tamanho de partícula da amostra redispersa foi analisada utilizando Zetasizer nano ZS 90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

O índice de redispersibilidade (IRD) foi usado como medida quantitativa da redispersibilidade da amostra, foi calculado de acordo com a Equação 6:

Equação 6

$$IRD(\%) = \left(\frac{D}{D_0} \right) \times 100$$

Onde D_0 representa o tamanho de partícula da nanosuspensão preparada antes da liofilização, enquanto D é o tamanho de partícula da nanossuspensão reconstituída. Valores de IRD próximos a 100% são desejáveis, pois indicam que a nanossuspensão pode ser completamente redispersada ao tamanho original das partículas após a rehidratação.

4.2.7 Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da nanossuspensão de NFOH liofilizada foi realizada por microscópio eletrônico de varredura ZEISS Sigma 300, Carl Zeiss Microscopy®, Alemanha. As amostras foram metalizadas com ouro paládio (AuPd) por não serem amostras condutoras, não interferindo na resolução e na morfologia da análise. As imagens foram adquiridas em modelo de vácuo sob tensão de aceleração de 5.00 kV e detector In Lens.

4.2.8 Análise da estrutura cristalina dos nanocristais e do hidroximetilnitrofural empregando difração de raios X (DRX)

A análise de difração de raios X foi realizada para detectar a cristalinidade do NFOH puro e da nanosuspensão de NFOH liofilizada. O pó foi colocado num suporte de amostra e escaneado entre 10° e 80° (2θ), expostas a radiação CuKα 40 Kv e tempo de passo de 0,01. Foi utilizado o método do pó, nessa técnica usa-se a amostra em pó, para que exista uma orientação aleatória de muitos cristais, assegurando assim que algumas das partículas estão orientadas, em relação ao feixe de raios X (EAQUB ALI; DAS; BEE ABD HAMID, 2014).

4.2.9 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões e no estudo de solubilidade

4.2.9.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões

4.2.9.2 Preparação da solução padrão

Para o preparo da solução-padrão, foi inicialmente preparada uma solução-mãe de concentração de 250 µg/mL. Quantidade exata de 25 mg de hidroximetilnitrofural foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e adicionado 8,3 mg de dimetilsulfóxido (DMSO), agitando-se no ultrassom por 30 minutos até a completa dissolução do fármaco. Melo (2006) mostrou que o NFOH é facilmente solúvel em dimetilsulfóxido (1:3).

Em seguida, o volume foi completado com água ultrapura para se obter concentração de 250 µg/mL. A partir dessa solução-mãe, foi retirada alíquota de 10 mL e transferida para o balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água ultrapura para se obter a solução padrão na concentração de 50 µg/mL. Foram realizadas diluições a partir dessa solução-padrão para a validação do método analítico.

4.2.9.3 Determinação da absorbância máxima

A solução-padrão preparada foi diluída com água ultrapura, para se obter a concentração de 10 µg/mL. Com a varredura no intervalo de 200-600 nm, determinou-se a absorbância máxima do hidroximetilnitrofural – a água ultrapura foi utilizada como branco

4.2.9.4 Validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nos estudos de solubilidade e nas nanossuspensões

- Especificidade

A especificidade é a capacidade do método para distinguir o composto analisado dos outros componentes da formulação (BRASIL, 2017). Foi avaliada pela varredura entre 200 e 600 nm dos seguintes solventes: água ultrapura, tampão HCl pH 1,2; tampão acetato

pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,5; assim como os excipientes correspondentes da nanossuspensões. Esse ensaio tem por finalidade garantir que tanto os solventes quanto os excipientes (P188 e P407) não interferem na quantificação do fármaco empregando o método analítico desenvolvido.

- Linearidade

Refere-se à capacidade do método analítico em demonstrar que os valores obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2017). A partir da solução padrão de hidroximetilnitrofural (50µg/mL), foram transferidas alíquotas para os balões volumétricos de 10 mL; em seguida, o volume foi completado até o menisco, com água ultrapura, resultando nas concentrações apresentadas na Tabela 5. A absorbância das amostras foi medida a 375 nm contra o branco. O branco utilizado foi água ultrapura. Em seguida, a curva analítica foi construída para o hidroximetilnitrofural na faixa de concentração entre 7 e 13 µg/mL e comprimento de onda igual a 375 nm. As curvas analíticas foram preparadas em triplicatas nos sete níveis de concentração. As absorbâncias médias, correspondentes as três determinações para cada diluição, foram plotadas no eixo das ordenadas – e as concentrações (µg/mL), no eixo das abscissas.

Tabela 5 – Concentração das amostras de hidroximetilnitrofural obtidas a partir de uma solução padrão do candidato a fármaco (50µg/mL) e empregadas para determinação da linearidade.

Amostra	Alíquota da solução padrão (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	1,40	10,0	7,0
2	1,60	10,0	8,0
3	1,80	10,0	9,0
4	2,00	10,0	10,0
5	2,20	10,0	11,0
6	2,40	10,0	12,0
7	2,60	10,0	13,0

- Limite de quantificação

Definido como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017). O limite de quantificação (LQ) foi calculado considerando o desvio padrão da resposta (DPa) e o coeficiente angular ou a inclinação da curva (IC) obtidos a partir da reta de regressão, conforme Equação 7.

Equação 7

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

- Intervalo

O intervalo representa a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico (BRASIL, 2017), sendo derivado e confirmado pelo estudo de linearidade, precisão e exatidão da amostra.

- Precisão

A precisão do método foi avaliada conforme a norma vigente (RDC 166/2017) (BRASIL, 2017), por meio da repetibilidade (intracorrída) e da precisão intermediária (intercorrída). As precisões nessas condições foram expressas em termos de coeficiente de variação calculados, conforme a Equação 8, sendo o critério mínimo de aceitação menor ou igual a 5% (BRASIL, 2017).

Equação 8

$$CV\% = \frac{DP}{AMD} \times 100$$

CV % = coeficiente de variação

DP = desvio padrão

AMD = absorbância média determinada.

- Repetibilidade (intracorrída)

Representa a concordância entre os resultados dentro de curto período de tempo. Foram preparadas soluções padrão em triplicata nas seguintes concentrações: 8 µg/mL, 10 µg/mL e 12 µg/mL de hidroximetilnitrofural. Foram avaliadas 3 réplicas para cada concentração no mesmo dia, em períodos alternados (manhã, tarde e noite), com o mesmo analista e a mesma instrumentação, verificando se os resultados se encontram dentro da máxima diferença aceitável (5%).

- Precisão intermediária (precisão intercorrída)

A precisão intermediária representa a concordância do mesmo laboratório, mas obtida em dias diferentes. Foram preparadas soluções padrão em triplicata nas seguintes concentrações: 8 µg/mL, 10 µg/mL e 12 µg/mL de hidroximetilnitrofural. Foram avaliadas 3 réplicas para cada concentração em dias diferentes (intervalo de 3 dias), com analistas diferentes, verificando se os resultados se encontram dentro da máxima diferença aceitável (5%).

- Exatidão

Representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico estabelecido em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2017). Para determinar a exatidão do método proposto, realizou-se o teste de recuperação. Foram adicionadas concentrações conhecidas do padrão (8, 10 e 12 µg) à solução amostra (10 µg/mL). Analisou-se o total de seis leituras para cada nível de concentração. A exatidão do método foi expressa como porcentagem de recuperação, à qual foi determinada a partir das absorbâncias obtidas das soluções finais em função da quantidade teórica de padrão adicionado.

- Robustez

A robustez mede a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiança que o método tem durante o uso diário (BRASIL, 2017). A robustez do método foi determinada do total de 9 medições para o nível de concentração (10 µg/mL), variando-se os comprimentos de onda (373, 375, 377 nm).

4.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas empregando software Minitab, versão 17.

4.2.11 Determinação da solubilidade de saturação das nanosuspensões de hidroximetilnitrofural

A solubilidade da saturação foi realizada pelo método do equilíbrio, conhecido como *Shake Flask*, . O NFOH e a nanosuspensão de NFOH liofilizada foram dispersadas em frascos âmbar contendo 10 mL de diferentes meios dentro da faixa do pH fisiológico (tampão HCl pH 1,2; tampão acetato 4,5 e tampão fosfato pH 6,8) e da água (BRASIL, 2013).

Os frascos foram constantemente agitados a 150 rpm durante 24 horas a 37°C +/- 1°C, em agitador orbital. Após atingir a saturação, alíquotas foram retiradas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos seguido da filtração do sobrenadante.

A concentração do fármaco foi determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido e validado no presente trabalho. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo efetuado o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação.

4.2.12 Estudo de estabilidade das nanosuspensões de hidroximetilnitrofural

As nanosuspensões de NFOH liofilizadas foram armazenadas em vidro de borosilicato, por período de 3 meses, à temperatura 25°C e 4°C. Para avaliar a estabilidade física, foram determinados o DHM, o IP e o PZ – além da aparência visual durante o período de armazenamento.

4.2.13 Avaliação da atividade *in vitro* antileishmania

As formulações foram avaliadas para a determinação da potência de inibição *in vitro* e IC₅₀ (concentração de composto que inviabiliza 50% dos parasitas) em formas promastigotas de *L. amazonensis*. O ensaio foi padronizado e validado de acordo com

protocolos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e segue o procedimento descrito por Pereira e colaboradores (2010).

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram mantidas em meio LIT, suplementado com 10% de SFB em estufa a 25 °C. Para a realização dos testes foram transferidas à razão de 1×10^6 células/mL para placas de 48 poços, onde então foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas nas concentrações 40; 10; 5 e 0,1 µg/mL. Após 72 horas de incubação a 25°C, foram adicionados 50 µL de resazurina de sódio em cada poço. Após 6 horas de incubação, as células foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm e 600 nm para a determinação do IC₅₀, tendo como controle protozoário em meio de cultura sem a adição de compostos ou fármacos. O IC₅₀ foi comparado com o IC₅₀ do candidato a fármaco.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios exploratórios para a obtenção de nanossuspensão de hidroximetilnitrofural

5.1.1 Seleção dos tensoativos para a obtenção de nanocristais de NFOH empregando-se o método de moagem por via úmida em escala reduzida

A partir da adaptação do método descrito por Romero e colaboradores (2016), moagem por via úmida, foi realizada pré-seleção dos tensoativos que foram inicialmente testados com parâmetros fixos (Tabela 2). Foram selecionados tensoativos não iônicos tendo em vista a estabilização estérica das formulações e a via oral de administração.

Na estabilização estérica ocorre a adsorção de moléculas sobre a superfície das partículas, formando capa protetora ao redor delas. Assim, as partículas são mecanicamente impedidas de se aproximarem (forças de atração de Van der Waals), evitando, dessa maneira, a agregação. Caso a proteção não seja efetiva, as nanopartículas tendem a agregar-se, podendo formar precipitados (DALTIM, 2011; FANGUEIRO et al., 2012). Entre as vantagens da estabilização estérica destacam-se: quando em presença de eletrólitos não provocam alterações sensíveis em sua estabilidade, pouca sensibilidade a variação do pH e

pode ser utilizado em meio aquoso como não aquoso (suspensão liofilizada) (DALTIM, 2011).

Assim, para manter as nanopartículas suspensas, formando uma solução coloidal estável, é necessário controlar as forças que atuam na superfície e são influenciadas por cargas, força iônica, pH e efeitos repulsivos (ELBASUNEY, 2017; TOMA, 2016).

Após o preparo foram retiradas alíquotas para avaliação das características das formulações, sendo essas: tamanho das partículas, índice de polidispersão e distribuição do tamanho. Apenas as formulações F3 e F4 apresentaram distribuição monomodal com partículas de tamanho $108,2 \pm 0,8$ nm e $132,4 \pm 2,3$ nm, respectivamente. Observando-se o índice de polidispersão de $0,281 \pm 0,015$ e $0,270 \pm 0,002$, respectivamente para F3 e F4. Ambas as preparações apresentaram distribuição monomodal.

Pode-se rejeitar, assim, as formulações F1, F2, F5 e F6 pela ausência de distribuição monomodal e presença de precipitados, características que indicam instabilidade física da nanossuspensão. Considerando esses resultados, foram selecionados os tensoativos poloxamer 188 e poloxamer 407 para serem empregados na obtenção dos nanocristais de NFOH.

5.2 Obtenção e otimização de nanocristais de hidroximetilnitrofural empregando-se o método de moagem por via úmida em escala reduzida com planejamento fatorial completo (2^K)

Foi utilizada abordagem estatística empregando planejamento fatorial tendo em vista determinar as variáveis importantes do processo de moagem, assim como, obter modelo matemático apropriado para descrever o fenômeno, utilizando o mínimo possível de experimentos.

5.2.1 Avaliação do planejamento fatorial completo empregando poloxamer 188

Foram efetuados 11 experimentos (incluindo 3 pontos centrais) correspondentes ao planejamento fatorial empregando três fatores com dois níveis (2^3), para a avaliação da influência das variáveis independentes. A Tabela 6 e a Figura 15 apresentam os resultados de DHM, IP e PZ obtidos para os 11 experimentos empregando o poloxamer 188. O DHM

variou de $184,8 \pm 0,5$ a $311,8 \pm 2,2$ nm e IP de $0,21 \pm 0,01$ a $0,57 \pm 0,01$. O PZ variou de $-31,7 \pm 1,1$ a $-40,3 \pm 0,6$ mV.

Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaio do planejamento fatorial, empregando o poloxamer 188 (P188) como tensoativo.

Formulação	Ordem	Ponto central	Tempo (horas)	NFOH (%m/m)	P188 (%m/m)	DHM	IP	PZ
1	1	1	48	3,0	1,0	$285,9 \pm 3,3$	$0,43 \pm 0,02$	$-33,2 \pm 0,5$
2	2	0	84	2,0	2,0	$304,0 \pm 2,1$	$0,29 \pm 0,03$	$-33,4 \pm 0,7$
3	3	1	120	3,0	1,0	$184,8 \pm 0,5$	$0,34 \pm 0,04$	$-33,3 \pm 1,1$
4	4	0	84	2,0	2,0	$298,3 \pm 2,1$	$0,21 \pm 0,01$	$-40,3 \pm 0,6$
5	5	1	48	3,0	3,0	$274,8 \pm 3,1$	$0,57 \pm 0,01$	$-34,6 \pm 1,1$
6	6	1	120	1,0	1,0	$193,5 \pm 3,2$	$0,23 \pm 0,01$	$-34,5 \pm 1,1$
7	7	1	120	1,0	3,0	$203,0 \pm 0,1$	$0,26 \pm 0,01$	$-34,8 \pm 1,5$
8	8	0	84	2,0	2,0	$310,1 \pm 3,3$	$0,24 \pm 0,02$	$-36,6 \pm 0,7$
9	9	1	120	3,0	3,0	$194,3 \pm 2,1$	$0,31 \pm 0,03$	$-31,7 \pm 1,1$
10	10	1	48	1,0	1,0	$296,5 \pm 2,5$	$0,22 \pm 0,01$	$-38,7 \pm 0,6$
11	11	1	48	1,0	3,0	$311,8 \pm 2,2$	$0,39 \pm 0,02$	$-38,2 \pm 1,2$

Os pontos centrais foram adicionados com a finalidade de detectar possível curvatura no modelo e testar a hipóteses de linearidade dos efeitos dos fatores. Com as reproduções desse ponto pode-se obter estimativa independente do erro experimental. Foram observados valores de diâmetro hidrodinâmico médio entre $298,3 \pm 2,1$ e $310,1 \pm 3,3$ nm para os pontos centrais, cuja média foi $304,1 \pm 5,9$ nm (Figura 16).

Figura 16 – Gráfico de cubo (planejamento fatorial 2^3) para tamanho hidrodinâmico médio.

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

A análise de variância (ANOVA) tem como objetivo avaliar a adequação do modelo matemático, comparando a variação do tratamento (níveis variáveis) com a variação dos erros aleatórios relacionados às medidas das respostas geradas (DHM). Essa avaliação tem como objetivo verificar se existe falta de ajuste, obter estimativa adequada para a variância do modelo de regressão e estimar o grau de ajuste e a significância do modelo (MYERS, MONTGOMERY, 2009).

Na análise de variância foram considerados significativos os fatores com valor-p menor que 0,05 ($\alpha=0,05$). A Tabela 7 revelou que a curvatura para o modelo e o tempo de agitação foram significativas (valor-p <0,001; $\alpha=0,05$). A concentração de NFOH (valor-p=0,002) e a interação entre a concentração de NFOH e o tempo de agitação também foram significativas (valor-p=0,007). Na Figura 16 foi possível observar as respostas de DHM referente aos pontos centrais posicionadas na parte superior do gráfico. Dessa maneira, supõe-se que o modelo linear não representa adequadamente esses dados.

A ANOVA (Tabela 7) revelou ausência da falta de ajuste do modelo (valor-p=0,273). Apenas tal característica não satisfaz a significância do modelo proposto. Assim, deve se avaliar os coeficientes de determinação do modelo: R^2 , R^2 ajustado, para os graus de liberdade.

O coeficiente de determinação (R^2) refere-se à medida descritiva da qualidade do ajuste obtido. Assim, esse coeficiente mede a porcentagem da variação (0 a 1) da variável

de resposta explicada pelo modelo de regressão. Normalmente, quanto maior R^2 , melhor o ajuste dos dados ao modelo. O R^2 ajustado (coeficiente de determinação ajustado) é a porcentagem da variação da variável de resposta explicada pela relação com uma ou mais variáveis preditoras, ajustada para o número de preditores no modelo. O R^2 de previsão do modelo ajustado (R^2 prev) é usado para determinar a qualidade da predição das respostas para novas observações pelo modelo (TRINH; KANG, 2011).

Os coeficientes (Tabela 8) revelaram valores similares: 98,75%, 97,51% e 92,29%, respectivamente para o coeficiente de determinação, coeficiente de determinação ajustado e coeficiente de previsão do modelo ajustado.

A falta de ajuste de determinado modelo indica falha nesse em descrever adequadamente a relação funcional entre os fatores experimentais e a variável de resposta. A falta de ajuste pode ocorrer no caso de termos importantes do modelo, como interações ou termos quadráticos, não forem incluídos. Adicionalmente, a falta de ajuste pode ocorrer quando resíduos atipicamente com valores elevados resultarem do ajuste do modelo (MYERS, MONTGOMERY, ANDERSON-COOK, 2009).

Figura 17 – Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio. Comparativo com os pontos centrais

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Tabela 7 – Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).

Fonte	GL	SQ (aj)	MQ (aj)	Teste F	Valor-p
Modelo	5	28850,5	5770,1	79,17	0,000
Linear	3	17731,0	5910,3	81,09	0,000
NFOH % m/m	1	2432,5	2432,5	33,38	0,002
P188% m/m	1	238,7	238,7	3,28	0,130
Tempo de agitação (h)	1	15059,8	15059,8	206,63	0,000
Interações de 2 fatores	1	1370,3	1370,3	18,80	0,007
NFOH %m/m*Tempo agitação (h)	1	1370,3	1370,3	18,80	0,007
Curvatura	1	9749,2	9749,2	133,77	0,000
Erro	5	364,4	72,9		
Falta de ajuste	3	294,8	98,3	2,82	0,273
Erro puro	2	69,6	34,8		
Total	10	29214,9			

GL: graus de liberdade; SQ aj: soma dos quadrados ajustados; Teste F: estatística F; MQ (aj): média quadrática ajustada. Valor-p: nível de significância. Adaptado: Software Minitab 17®.

Tabela 8 – Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM contendo as variáveis: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).

Termos	Coeficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
Constante	237,29	3,02	78,62	0,000	
NFOH (m/m%)	-17,44	3,02	-5,78	0,002	1
P188 (m/m%)	5,46	3,02	1,81	0,130	1
Tempo de agitação (h)	-43,39	3,02	-14,37	0,000	1
NFOH %m/m*Tempo agitação (h)	13,09	3,02	4,34	0,007	1
DP= 8,53710		R²= 98,75%	R² (aj) = 97,51%	R² (prev) = 92,29%	

Índices de ajuste do modelo: R²: coeficiente de determinação; R² (aj): coeficiente de determinação ajustado; R² (prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; DP = desvio-padrão; Valor-p: nível de significância; C-DP: coeficientes de desvio padrão; VIF: fator de inflação de variância. Adaptado: Software Minitab 17®.

A adequação do ajuste e as suposições do modelo podem ser verificadas por meio da análise dos resíduos (diferença entre o valor observado e o valor estimado). Na análise de regressão assume-se que os resíduos seguem distribuição normal, apresentam média próxima a zero, variância constante (homocedasticidade) e são independentes. Assim, a análise dos resíduos refere-se ao conjunto de técnicas para investigar a adequação de modelo de regressão com base nesse parâmetro (MYERS, MONTGOMERY, ANDERSON -COOK, 2009).

Com relação aos resíduos, a suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal, gráfico de resíduo versus ajuste e pelo histograma (Figura 17). No gráfico de probabilidade pode ser observada distribuição normal (resíduos próximos a reta). No gráfico de resíduo versus ajuste é observado aleatoriedade na distribuição. Considerando os dados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, o gráfico de resíduo versus ajuste e o histograma, é possível inferir que a suposição de normalidade é válida. O gráfico das observações individuais demonstrou o comportamento aleatório dos resíduos.

Figura 18 – Gráfico de resíduos da avaliação do DHM com as variáveis: concentração de NFOH (% m/m), concentração de poloxamer 188 (P188) (% m/m) e tempo de agitação (h).

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

O gráfico de efeitos principais é usado em conjunto com a análise de variância para examinar as diferenças entre médias de nível para um ou mais fatores. O efeito principal está presente quando diferentes níveis de um fator afetam a resposta de maneira diferente. Um gráfico de efeitos principais gera a média de resposta para cada nível de fator conectado por uma linha (QASIM et al., 2015).

Quando a linha não é horizontal, há um efeito principal presente. Níveis diferentes do fator afetam a resposta de maneira diferente. Quanto mais brusca a inclinação da linha, maior a magnitude do efeito principal (DONG; ZHAO, 2005). A Figura 18 apresenta o

gráfico de efeitos principais para a resposta, o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas. Esses efeitos revelaram que principalmente o tempo de agitação e a concentração de NFOH contribuíram significativamente para a redução do tamanho de partícula.

A Figura 18, assim como, a Tabela 7 revelaram que a curvatura para o modelo foi significativa (valor-p <0,001; $\alpha=0,05$). Adicionalmente foi apresentado na Figura 17, as respostas de DHM referentes aos pontos centrais posicionadas na parte superior do gráfico. Dessa maneira, o modelo linear não representou adequadamente esses dados. Contudo, a diferença entre o maior e o menor valor de DHM para esses pontos comprovou a estabilidade do ensaio. Considerando esses resultados, fez-se necessário realizar outro planejamento estatístico, no sentido de buscar modelo matemático adequado para avaliar os dados experimentais. Nesse caso, o novo planejamento considerou apenas os fatores significativos: a concentração de NFOH e o tempo de agitação. A concentração do P188, na faixa entre 1 e 3% (m/m), não foi significativa para o DHM.

Figura 19 – Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio contendo as variáveis: tempo de agitação (horas), concentração de NFOH (%m/m) e poloxamer 188 (P 188) (%m/m). Comparativo com os pontos centrais.

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

5.2.2 Obtenção de nanocristais de NFOH utilizando planejamento de experimentos por superfície de resposta, empregando poloxamer 188.

Myers e Montgomery (2002) estudaram o experimento composto central (CCD) na metodologia da superfície de resposta, discutindo a eficiência dos projetos experimentais e compararam a CCD com outros projetos sob o critério de otimização. A metodologia de superfície de resposta é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que são úteis para a modelagem e análise de problemas nos quais uma resposta de interesse é influenciada por várias variáveis e o objetivo é otimizar a resposta (HICKS; TURNER JR., 1999; MYER; MONTGOMERY, 2002).

O CCD contém um esquema fatorial incorporado com pontos centrais que é aumentado com um grupo de pontos axiais que permitem a estimativa de curvatura. Se a distância do centro do espaço do experimento para um ponto fatorial é de ± 1 unidade para cada fator, a distância do centro do espaço do experimento para um ponto axial é $\alpha > 1$. O valor preciso depende de determinadas propriedades desejadas para o planejamento e do número de fatores envolvidos. O CCD é um projeto amplamente utilizado para estimar superfícies de resposta de segunda ordem (PEASURA, 2015).

Na segunda etapa do planejamento estatístico, foi realizado o estudo por superfície de resposta no qual foram adicionados 6 pontos axiais e 3 pontos centrais no delineamento fatorial completo (Tabela 3) para um total de 20 experimentos (planejamento composto central), conforme Tabela 4. Tal procedimento teve por objetivo a avaliação da influência da concentração do NFOH (%m/m) e tempo de agitação (horas), na resposta de tamanho hidrodinâmico médio.

A Tabela 9 e a Figura 19 apresentam os resultados de DHM, IP e PZ obtidos para os 20 experimentos empregando o poloxamer 188. O DHM variou de $184,8 \pm 0,5$ a $325,9 \pm 2,2$ nm e IP de $0,21 \pm 0,01$ a $0,57 \pm 0,01$. O PZ variou de $-31,7 \pm 1,1$ a $-40,3 \pm 0,6$ mV.

Tabela 9 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaios por superfície de resposta, empregando o poloxamer 188 (P188) como tensoativo.

Formulação	Ordem	Ponto central	Tempo (horas)	NFOH (%m/m)	P188 (%m/m)	DHM	IP	PZ
1	1	1	48	3,0	1,0	285,9±3,3	0,43±0,02	-33,2±0,5
2	2	0	84	2,0	2,0	304,0±2,1	0,29±0,03	-33,4±0,7
3	3	1	120	3,0	1,0	184,8±0,5	0,34±0,04	-33,3±1,1
4	4	0	84	2,0	2,0	298,3±2,1	0,21±0,01	-40,3±0,6
5	5	1	48	3,0	3,0	274,8±3,1	0,57±0,01	-34,6±1,1
6	6	1	120	1,0	1,0	193,5±3,2	0,23±0,01	-34,5±1,1
7	7	1	120	1,0	3,0	203,0±0,1	0,26±0,01	-34,8±1,5
8	8	0	84	2,0	2,0	310,1±3,3	0,24±0,02	-36,6±0,7
9	9	1	120	3,0	3,0	194,3±2,1	0,31±0,03	-31,7±1,1
10	10	1	48	1,0	1,0	296,5±2,5	0,22±0,01	-38,7±0,6
11	11	1	48	1,0	3,0	311,8±2,2	0,39±0,02	-38,2±1,2
12	12	-1	120	2,0	2,0	198,5±1,4	0,24±0,04	-34,5±1,4
13	13	0	84	2,0	2,0	298,3±2,1	0,37±0,07	-34,5±0,6
14	14	-1	120	2,0	1,0	171,0±0,7	0,22±0,01	-36,3±0,7
15	15	-1	84	3,0	1,0	194,4±1,6	0,25±0,01	-36,1±0,6
16	16	0	84	2,0	2,0	299,3±1,9	0,28±0,02	-39,2±0,9
17	17	-1	48	2,0	1,0	256,1±1,4	0,22±0,03	-32,5±0,2
18	18	-1	84	3,0	2,0	261,9±2,1	0,29±0,01	-31,7±1,3
19	19	0	84	2,0	2,0	301,2±2,7	0,32±0,01	-38,1±1,2
20	20	-1	84	1,0	1,0	217,9±3,3	0,21±0,02	-31,5±1,8

Figura 20 – Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio. Comparativo com os pontos centrais.

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Na Figura 19 foi possível observar a posição das respostas de DHM com relação aos pontos centrais. Os pontos centrais apresentaram valores iguais a 301, 298 e 299 nm. A replicação desses pontos centrais permite obter estimativa do erro experimental independente. Nesse caso, a diferença entre o maior e o menor valor foi de 3 nm. Esse resultado revelou reduzida variabilidade para esse ensaio.

De forma similar ao fatorial completo, o modelo será considerado bem ajustado aos dados experimentais se esse apresentar regressão significativa e falta de ajuste não significativa (MYERS, MONTGOMERY, 2009). Quanto à análise de variância, são considerados estatisticamente significativos sempre que os valores-p forem menores do que 0,05 ($\alpha=0,05$).

A Tabela 10 apresenta os resultados da ANOVA para a resposta DHM. O modelo quadrático apresentou valor-p menor que 0,05 ($\alpha=0,05$). Desse modo pode-se observar significância desse termo. Os coeficientes (Tabela 11) revelaram valores similares: 98,00%, 97,29% e 95,30%, respectivamente para o coeficiente de determinação, coeficiente de determinação ajustado e coeficiente de previsão do modelo ajustado. Além disso, a falta de

ajuste do modelo foi não significativa (0,051; $\alpha=0,05$). O modelo obtido, portanto, foi considerado como estatisticamente significativo.

Tabela 10 – Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).

Fonte	GL	SQ (aj)	MQ (aj)	Teste F	Valor-p
Modelo	5	48894,5	9778,9	137,46	0,000
Blocos	1	4318,6	4318,6	60,70	0,000
Linear	3	26702,8	8900,9	125,12	0,000
NFOH % m/m	1	746,1	746,1	10,49	0,006
P188 % m/m	1	19,1	19,1	0,27	0,612
Tempo de agitação (h)	1	26149,6	26149,6	367,57	0,000
Quadrado	1	14030,0	14030,0	197,21	0,000
P188 % m/m*P188 % m/m	1	14030,0	14030,0	197,21	0,000
Erro	14	996,0	71,1		
Falta de ajuste	9	891,2	99,0	4,72	0,051
Erro puro	5	104,8	21,0	*	*
Total	19	49890,5			

GL: graus de liberdade; SQ aj: soma dos quadrados ajustados; Teste F: estatística F; MQ (aj): média quadrática ajustada. Valor-p: nível de significância. Adaptado: Software Minitab 17®.

Tabela 11 – Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM contendo as variáveis: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P188 (%m/m).

Termos	Coeficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
Constante	282,25	3,26	86,70	0,000	
Bloco 1	17,83	2,29	7,79	0,000	1,24
NFOH %m/m	-5,11	1,58	-3,24	0,006	1,02
P188 %m/m	0,90	1,73	0,52	0,612	1,26
Tempo de agitação (h)	-30,26	1,58	-19,17	0,000	1,02
P188 %m/m*P188 %m/m	-20,92	1,49	-14,04	0,000	1,06
DP= 8,43456		R²= 98,00%	R² (aj) = 97,29%	R² (prev) = 95,30%	

Índices de ajuste do modelo: R²: coeficiente de determinação; R² (aj): coeficiente de determinação ajustado; R² (prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; DP = desvio-padrão; Valor-p: nível de significância; C-DP: coeficientes de desvio padrão; VIF: fator de inflação de variância.. Adaptado: Software Minitab 17®.

O modelo foi descrito por meio da Equação 9 que relaciona a influência de cada fator, assim como, das suas interações com a resposta (DHM). Observa-se na Tabela 11 que o coeficiente para o termo tempo de agitação (h) (coeficiente: -30,26) contribuiu de maneira mais eficiente para a redução do DHM se comparado a concentração de NFOH

%m/m (coeficiente: -5,11), sendo comprovado pela interação de dois fatores (P188 %m/m*P188 %m/m) com coeficientes negativos.

Para verificar a adequação da equação 9 do modelo foram conduzidos dois experimentos, desafiando diferentes concentrações: NFOH (2,5 %m/m) e P188 (2,5 %m/m) para o experimento 1 e NFOH (1,5 %m/m) e P188 (1,5 %m/m) para o experimento 2, ambos com 120 horas de agitação.

Equação 9

$$DHM = 188,2 - 8,35 NFOH + 224,6 P188 - 1,3728 TEMPO - 55,78 P188 * P188$$

Nessas condições, os valores de DHM observados na Tabela 12 estão dentro da faixa de valor previsto, calculado com $\alpha=0,05$. Assim o resultado corrobora a validade do modelo matemático para o DHM.

Tabela 12 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula e índice de polidispersão (IP) das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de NFOH.

Experimento	DHM teórico (nm)	DHM prático (nm)	IP
1	215,46	213,6 ± 2,0	0,34±0,01
2	222,33	219,1± 2,3	0,28±0,03

Com relação aos resíduos, a suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal, gráfico de resíduo versus ajuste e pelo histograma (Figura 20). No gráfico de probabilidade pode ser observada distribuição normal (resíduos próximos a reta). No gráfico de resíduo versus ajuste é observado aleatoriedade na distribuição. Considerando os dados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, o gráfico de resíduo versus ajuste e o histograma, é possível inferir que a suposição de normalidade é válida. O gráfico das observações individuais demonstrou o comportamento aleatório dos resíduos.

Figura 21 – Gráfico de resíduos da avaliação do DHM com as variáveis: concentração de NFOH (% m/m), concentração de poloxamer 188 (P188) (% m/m) e tempo de agitação (h).

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

O gráfico de superfície de resposta é utilizado para um único par de variáveis, mostrando como a resposta ajustada se relaciona com duas variáveis contínuas. Esse gráfico demonstra a relação com as variáveis nas escalas x e y e a variável de resposta (DHM) representada por uma superfície suave (GRANATO; DE ARAÚJO CALADO, 2013).

As Figuras 21–24 apresentam os gráficos de superfície e de contorno para a resposta em função das variáveis independentes. A avaliação desses gráficos mostrou a melhor região para a maximização da resposta em função dos níveis de cada variável. Os gráficos de contorno são usados para explorar a possível relação entre três variáveis.

Para o P188, observou-se que a concentração (%m/m) tem dependência com a resposta, as concentrações na faixa de 1,0 e 3,0% e tempo de agitação de 100 a 120 horas contribuem para a redução do tamanho das partículas. Para o NFOH, observou-se que a resposta é maximizada na concentração de 3,0 % (m/m). De tal modo, foi obtido partículas com tamanho <250 nm. Percebe-se o impacto da seleção das faixas para cada variável na

resposta de DHM uma vez que valores fora dessas faixas estabelecidas originam-se partículas de tamanho superior a 250 nm.

Figura 22- Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as variáveis: tempo de agitação (horas) e concentração de NFOH (%m/m).

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Figura 23 – Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as variáveis: tempo de agitação

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Figura 24 – Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as variáveis: concentração de NFOH (%m/m) e concentração de P188 (%m/m).

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Figura 25 – Gráficos de contorno relativo à avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de NFOH contendo as seguintes variáveis: tempo de agitação (horas), concentração de P188 (%m/m) e concentração do NFOH(%m/m).

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Conforme observado na Tabela 10 e na Figura 24, a concentração do P188, na faixa de 1,0 a 3,0%, não influenciou na redução de tamanho. Porém a concentração do NFOH e

P188 avaliada com a variação do tempo de agitação, a partir de 48 até 120 horas, demonstrou que o tempo de agitação ideal para reduzir o DHM está localizado na faixa de 100 a 120 horas.

Considerando os resultados obtidos, foi possível determinar a influência da concentração de NFOH e do tempo de agitação no DHM das partículas, assim como, obter modelo matemático de segunda ordem para a previsão dessa resposta.

Visando a otimização da formulação, buscou-se por meio da aplicação da função *desirability*, proposta por Derringer and Suich (1980), a otimização das variáveis na resposta. A abordagem geral consiste em converter inicialmente cada resposta Y_i em uma função *desirability* individual d_i e que varia entre 0 e 1 ($0 \leq d_i \leq 1$). A resposta esperada é representada por $d(Y_i) = 1$ e $d(Y_i) = 0$ representa um valor fora da região aceitável. As variáveis independentes são combinadas utilizando média geométrica para dar origem a função *desirability* D geral (NATARAJAN; PERIYANAN; YANG, 2011).

A Figura 25 apresenta os gráficos de otimização para as formulações de nanocristais de NFOH. Para a previsão de DHM: 167,2 nm com D: 1,00, os valores das variáveis são: NFOH (% m/m): 3,0; P188 (% m/m): 1,0 e Tempo (h): 120.

Figura 26 – Gráfico de otimização da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de NFOH contendo as seguintes variáveis: NFOH (% m/m): 3,0 ; P188 (% m/m): 1,0 e Tempo (h): 120. Predição para 167,2 nm.

Adaptado: Software Minitab 17®.

Para validar a adequação da equação do modelo, o experimento de verificação foi realizado sob condições ideais mencionados acima. Nessas condições, o DHM prático foi

de $250,1 \pm 2,3$ nm, valor que não está dentro da faixa de valor predito calculado (167,2 nm) com $\alpha=0,05$.

Dessa maneira, a fórmula 14 descrita na Tabela 9 foi selecionada por possui o menor DHM e o modelo matemático ter sido validado para o DHM.

1.1.2. Avaliação do planejamento fatorial completo empregando poloxamer 407

Foram efetuados 11 experimentos (incluindo 3 pontos centrais) correspondentes ao planejamento fatorial empregando três fatores com dois níveis (2^3), para a avaliação da influência das variáveis independentes. A Tabela 13 e a Figura 26 apresentam os resultados de DHM, IP e PZ obtidos para os 11 experimentos empregando o poloxamer 407. Foi observado DHM e IP de $191,3 \pm 2,1$ a $326,8 \pm 4,6$ nm e $0,21 \pm 0,01$ a $0,50 \pm 0,01$, respectivamente. O PZ variou entre $-23,9 \pm 0,7$ e $-30,8 \pm 2,2$ mV.

Tabela 13 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de NFOH da matriz de ensaios do planejamento fatorial, empregando o poloxamer 407 como tensoativo.

Formulação	Ordem	Ponto central	Tempo (horas)	NFOH (%m/m)	Tensoativo (%m/m)	DHM	IP	PZ
1	1	1	48	3,0	1,0	$248,2 \pm 1,2$	$0,39 \pm 0,01$	$-26,2 \pm 0,5$
2	2	0	84	2,0	2,0	$271,0 \pm 1,8$	$0,28 \pm 0,02$	$-27,4 \pm 0,2$
3	3	1	120	3,0	1,0	$191,3 \pm 2,1$	$0,32 \pm 0,04$	$-28,1 \pm 1,4$
4	4	0	84	2,0	2,0	$278,3 \pm 2,4$	$0,24 \pm 0,01$	$-32,1 \pm 2,3$
5	5	1	48	3,0	3,0	$254,1 \pm 6,7$	$0,41 \pm 0,06$	$-25,5 \pm 1,5$
6	6	1	120	1,0	1,0	$197,2 \pm 0,5$	$0,25 \pm 0,01$	$-30,8 \pm 2,2$
7	7	1	120	1,0	3,0	$214,4 \pm 1,4$	$0,24 \pm 0,02$	$-23,9 \pm 0,7$
8	8	0	84	2,0	2,0	$264,0 \pm 1,1$	$0,28 \pm 0,01$	$-27,7 \pm 0,2$
9	9	1	120	3,0	3,0	$284,6 \pm 1,9$	$0,21 \pm 0,01$	$-28,0 \pm 1,2$
10	10	1	48	1,0	1,0	$326,8 \pm 4,3$	$0,21 \pm 0,01$	$-29,1 \pm 0,9$
11	11	1	48	1,0	3,0	$258,6 \pm 2,8$	$0,50 \pm 0,01$	$-27,2 \pm 0,8$

Os pontos centrais foram adicionados com a finalidade de detectar possível curvatura no modelo e testar a hipótese de linearidade dos efeitos dos fatores. Com as reproduções desses pontos pode-se obter estimativa independente do erro experimental. Foram observados valores de diâmetro hidrodinâmico médio entre $191,3 \pm 2,1$ e $326,8 \pm 4,3$ nm para os pontos centrais, cuja média foi $271,1 \pm 0,5$ nm (Figura 26).

Figura 27 – Gráfico de cubo (planejamento fatorial 23) para tamanho hidrodinâmico médio (DHM) utilizando poloxamer 407. A resposta aparece nos vértices do cubo.

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

Na análise de variância realizada foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 0,05 ($\alpha=0,05$). A Tabela 14 revelou que a curvatura para o modelo é significativa (valor-p=0,009; $\alpha=0,05$), assim como, o modelo linear (valor-p=0,004; $\alpha=0,05$). Entre os fatores principais, apenas o tempo de agitação apresentou significância (valor-p=0,001; $\alpha=0,05$). Quanto às interações, essas mostraram significância: NFOH*P407; NFOH*Tempo de agitação e P407*Tempo de agitação (valor-p <0,05, $\alpha=0,05$).

Na Figura 27 foi possível observar a posição das respostas de DHM com relação aos pontos centrais. A diferença entre o maior e o menor valor de DHM revelou a similaridade desses valores comprovando a estabilidade do ensaio.

A ANOVA (Tabela 14) revelou ausência da falta de ajuste (valor-p=0,930; $\alpha=0,05$). Porém apenas tal característica não satisfaz a significância do modelo proposto, sendo

necessário a avaliação do coeficiente indicado por R^2 , R^2 ajustado, para os graus de liberdade. Os coeficientes (Tabela 15) revelaram valores similares: 99,36%, 97,86% e 98,36%, respectivamente para os coeficientes de determinação, coeficiente de determinação ajustado e coeficiente de previsão do modelo ajustado. A falta de ajuste de determinado modelo indica falha nesse em descrever adequadamente a relação funcional entre os fatores experimentais e a variável de resposta. A falta de ajuste pode ocorrer no caso de termos importantes do modelo, como interações ou termos quadráticos, não forem incluídos. Adicionalmente, a falta de ajuste pode ocorrer quando resíduos atipicamente com valores elevados resultarem do ajuste do modelo (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

Figura 28 – Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio. Comparativo com os pontos centrais.

Adaptado: Software Minitab 17®.

Tabela 14 – Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P407(%m/m).

Fonte	GL	SQ (aj)	MQ (aj)	Teste F	Valor-p
Modelo	7	15890,7	2270,10	66,27	0,003
Linear	3	5344,6	1781,53	52,01	0,004
NFOH %m/m	1	44,2	44,18	1,29	0,330
P407 %m/m	1	290,4	290,41	8,48	0,062
Tempo de agitação (h)	1	5010,0	5010,00	146,26	0,001
Interações de 2 fatores	3	92268,3	3089,44	90,19	0,002
NFOH %m/m* P407 %m/m	1	2820,0	2820,00	82,33	0,003
NFOH %m/m* Tempo de agitação (h)	1	2715,8	2715,85	79,29	0,003
P407 %m/m* Tempo de agitação (h)	1	3732,5	3732,48	108,97	0,002
Curvatura	1	1277,8	1277,76	37,30	0,009
Erro	3	102,8	4,25		
Falta de ajuste	1	0,5	0,50	0,01	0,930
Erro puro	2	102,3	51,13		
Total	10	15993,4			

GL: graus de liberdade; SQ aj: soma dos quadrados ajustados; Teste F: estatística F; MQ (aj): média quadrática ajustada. Valor-p: nível de significância. Adaptado: Software Minitab 17®.

Tabela 15 – Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM contendo as variáveis: tempo de agitação (h), concentração de NFOH (%m/m) e concentração do P407(%m/m).

Termos	Coeficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
Constante	246,90	2,07	119,32	0,000	
NFOH %m/m	-2,35	2,07	-1,14	0,339	1
P407 %m/m	6,03	2,07	2,91	0,062	1
Tempo de agitação (h)	-25,02	2,07	-12,09	0,001	1
NFOH %m/m* P407 %m/m	18,77	2,07	9,07	0,003	1
NFOH %m/m* Tempo agitação (h)	18,43	2,07	8,90	0,003	1
P407 %m/m* Tempo de agitação (h)	21,60	2,07	10,44	0,002	1
DP= 5,85263 R²= 99,36% R² (aj) = 97,86% R² (prev) = 98,36%					

Índices de ajuste do modelo: R²: coeficiente de determinação; R² (aj): coeficiente de determinação ajustado; R² (prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; DP = desvio-padrão; Valor-p: nível de significância; C-DP: coeficientes de desvio padrão. Adaptado: Software Minitab 17®.

Observou-se, na Tabela 15, que o coeficiente para o tempo de agitação (coeficiente: -25,02) contribui de maneira mais eficiente para a redução do DHM se comparado ao termo concentração de NFOH %m/m (coeficiente: -2,35). Adicionalmente, foi observado que a concentração do P407 %m/m e as interações entre dois fatores resultaram em aumento do DHM (coeficientes positivos).

O modelo foi descrito por meio da Equação 10 que relaciona a influência de cada fator, assim como, das suas interações com a resposta (DHM). Para verificar a adequação da equação do modelo foram conduzidos dois experimentos, desafiando diferentes concentrações: NFOH (2,5 %m/m) e P407 (2,5 %m/m) para o experimento 1 e NFOH (1,5 %m/m) e P188 (1,5 %m/m) para o experimento 2.

Equação 10

$$DHM = 559,8 - 82,89 NFOH - 81,93 P407 - 2,919 Tempo + 18,78 NFOH * P407 + 0,5118 NFOH * Tempo + 0,6000 P407 * Tempo$$

Nessas condições, os valores de DHM observados na Tabela 16 estão dentro da faixa de valor previsto, calculado com $\alpha=0,05$. Assim o resultado corrobora a validade do modelo matemático para o DHM.

Tabela 16 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula e índice de polidispersão (IP) das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de NFOH.

Experimento	DHM teórico (nm)	DHM prático (nm)	IP
1	248,39	245,2 ± 1,4	0,29 ± 0,01
2	204,67	199, 4 ± 2,3	0,26 ± 0,03

Com relação aos resíduos, a suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal, gráfico de resíduo versus ajuste e pelo histograma (Figura 28). No gráfico de probabilidade observa-se os resíduos posicionados na parte central da reta. No gráfico de resíduo versus ajuste é observado aleatoriedade na distribuição. O histograma mostra claramente a elevada frequência de valores de resíduos igual a zero e simetria.

Figura 29 – Gráfico de resíduos da avaliação do DHM com as variáveis: concentração de NFOH (% m/m), concentração de poloxamer 407 (P407) (% m/m) e tempo de agitação (h).

Adaptado: *Software Minitab 17®*.

A Figura 29 apresenta o gráfico de efeitos principais para a resposta, o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas. Esses efeitos revelaram que o tempo de agitação contribuiu significativamente para a redução do tamanho de partícula.

Figura 30 – Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio contendo as variáveis: tempo de agitação (horas), concentração de NFOH (%m/m) e poloxamer 407 (P407) (%m/m). Comparativo com os pontos centrais.

Adaptado: *Software Minitab 17®*

Contudo, o resultado desse planejamento revelou que para a obtenção de valores de DHM menores, a concentração ideal de NFOH foi de 1,0 a 3,0 % m/m e P407 de 1,0% m/m, com tempo de agitação a partir de 120 horas. Dessa forma foi selecionada a fórmula 3, descrita na Tabela 13.

De maneira diferente do primeiro ensaio empregando o P188, o planejamento empregando o P407 resultou em modelo linear para a previsão do DHM em função das variáveis independentes.

5.3 Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ)

5.3.1 Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersão (IP)

Keck e colaboradores (2010) relataram alterações no DHM devido à dissolução dos nanocristais. Afim de ser evitado essas alterações do DHM durante as medições, foi utilizado o meio saturado do candidato a fármaco em substituição a água purificada nas análises.

As Figuras 30 e 31 apresentam os resultados de DHM das nanossuspensões de NFOH em diferentes diluições do meio de dispersão. Para investigar a diferença no DHM, a quantidade da nanossuspensão de NFOH foi mantida constante (10µL) sendo que essa amostra foi analisada em 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, e 4 mL de meio saturado da matéria-prima.

Nesse caso, o uso de meio de dispersão saturado com NFOH pode ser considerado adequado por não influenciar significativamente na medição do diâmetro hidrodinâmico médio. O DHM e o IP se mantiveram constantes independentemente do volume do meio de dispersão usado. A nanossuspensão de NFOH estabilizada com poloxamer 188 apresentou valores de DHM para volumes de 1mL, 1,5mL, 2mL, e 4mL iguais a 167,8±1,4 nm, 167,2±1,8 nm, 166,1±1,7 nm e 164,9±1,1 nm com índices de polidispersão de 0,356, 0,325, 0,339 e 0,386, respectivamente e distribuição monomodal de tamanho.

A nanossuspensão de NFOH estabilizada com poloxamer 407 apresentou valores de DHM para volumes de 1mL, 1,5mL, 2mL, e 4mL iguais a 188,7±2,1 nm, 188,1±2,1 nm,

186,4±2,7 nm e 184,1±2,3 nm com índices de polidispersão de 0,281, 0,212, 0,252 e 0,204, respectivamente e distribuição monomodal de tamanho.

Figura 31 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão de NFOH estabilizada com poloxamer 188, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão de NFOH estabilizada com poloxamer 407, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O diâmetro das partículas é uma das características mais importantes em sistemas nanoparticulados. O tamanho da partícula pode influenciar propriedades importantes do material, tais como reatividade, velocidade de dissolução, estabilidade da dispersão coloidal (RAMOS, 2017).

O índice de polidispersão indica a largura da distribuição geral, assumindo uma única média, é sem dimensão e dimensionado, de modo que os valores superiores a 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho muito ampla e provavelmente não é adequada para a técnica DLS. Porém amostras com valores inferiores a 0,3 demonstram que são monidispersas. Esses parâmetros estão definidos no documento padrão ISO 22412: 2008 (*Particle Size analysis – Dynamic light scattering*) e ASTM E2490-09 (*Measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by photon correlation spectroscopy*).

5.3.2 Desenvolvimento de método para a determinação do potencial zeta (PZ)

Em solução, quase todos os materiais macroscópicos ou particulados adquirem carga elétrica superficial. O potencial zeta é o indicador dessa carga, sendo usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais (DALTIM, 2011; RETAMAL MARÍN; BABICK; HILLEMANN, 2017).

O PZ, também denominado potencial eletrocinético, é o potencial no plano de cisalhamento (entre a camada de Stern e camada difusa) (Figura 32) quando uma partícula se movimenta no líquido (BHATTACHARJEE, 2016). Experimentos baseado na mobilidade eletroforética das partículas são capazes de medir o potencial elétrico desse plano de cisalhamento, conhecido como PZ (DALTIM, 2011).

Figura 33 – Representação da dupla camada elétrica de uma partícula imersa em um líquido.

Fonte: Daltin, 2011.

A adsorção de tensoativos na superfície da partícula altera a espessura da camada de Stern. Caso o tensoativo consiga aumentar a densidade de carga ou o diâmetro efetivo da partícula, seu potencial zeta aumenta e, conseqüentemente, sua estabilidade (DALTIM, 2011; TOMA, 2016). Assim, valores de potencial zeta igual ou maior a $|30\text{mV}|$ são considerados sistemas estáveis. O equipamento empregado nesse estudo para as medições do PZ mede a mobilidade eletrofrética das partículas, utilizando o princípio de espalhamento da luz.

Os resultados do estudo da influência da concentração de nanocristais de NFOH na determinação do potencial zeta estão apresentados na Figura 33. A determinação do potencial zeta foi realizada com o meio saturado de NFOH ($\text{pH}=5,1$; condutividade= $0,22\mu\text{S}/\text{cm}$) em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).

A Figura 33 revelou que as diluições de 1:100 e 1:200 proporcionaram resultados semelhantes, $-38,7\pm 2,98$ e $-42,8\pm 1,56\text{mV}$ respectivamente para a nanossuspensão estabilizada com poloxamer 188, e $-30,3\pm 2,83$ e $-37,8\pm 1,65\text{mV}$ para a nanossuspensão

estabilizada com poloxamer 407. O potencial zeta para todas as diluições foram negativos com valor máximo na diluição de 1:200.

Figura 34 – Influência da concentração da nanossuspensão de NFOH na determinação do seu potencial zeta, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As medidas de potencial zeta proporcionam desafios práticos que devem ser levados em consideração ao caracterizar as propriedades interfaciais das nanopartículas com morfologia irregular, como partículas coloidais não esféricas (RETAMAL MARÍN; BABICK; HILLEMANN, 2017).

O estudo mostra que o potencial zeta não é uma propriedade constante, mas depende da morfologia do sistema de dispersão, das propriedades físico-químicas das partículas (pH e condutividade) e das propriedades da solução eletrolítica em que as partículas estão suspensas.

Os resultados obtidos relativos à influência da condutividade do meio diluente no potencial zeta dos nanocristais de NFOH, encontram-se na Figura 34. Nessas análises observou-se que quando a diluição da amostra foi ajustada para a faixa de condutividade de 20 a 30,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (pH de 7,5 a 8,5), os valores do potencial zeta não sofreram alterações

significativas. Assim, assumiu-se essa condutividade como referência para as determinações.

Figura 35 – Variação do potencial zeta em função da condutividade do meio diluente para a nanossuspensão de NFOH.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O estudo concentra-se na comparação dos valores do potencial zeta após consideração de adequada preparação da amostra e da influência das propriedades físico-químicas sobre as partículas.

5.4 Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*)

Análise de rastreamento de nanopartículas é uma técnica para a visualização e análise direta em tempo real de nanopartículas em líquidos. É relacionada à taxa de movimento browniano com o tamanho da nanopartícula. Nesse sistema, as nanopartículas são visualizadas e analisadas em tempo real por um microscópio de luz (DRAGOVIC et al., 2011). Um vídeo é gravado, e o *Software* NTA v3.1 rastreia separadamente o movimento browniano de cada nanopartícula e calcula seu tamanho e concentração total. A velocidade

do movimento das partículas é usada para calcular o tamanho das partículas, aplicando a equação bidimensional de Stokes-Einstein (Equação 11):

Equação 11

$$\langle x, y \rangle^2 = \frac{K_B T t_s}{3\pi\eta d_h}$$

onde $\langle x, y \rangle^2$ é o deslocamento quadrático médio, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura do solvente em Kelvin, t_s é o tempo de amostragem (ou seja, $1/30$ fps = 33 ms), η é a viscosidade, e d_h é o diâmetro hidrodinâmico.

A Tabela 17 e a Figura 35 apresentam os resultados do tamanho das partículas obtidas da nanossuspensão estabilizada com poloxamer 188.

Tabela 17 – Avaliação do tamanho de partícula da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 188, utilizando a técnica NTA.

Determinações de tamanho de partícula	Resultados (nm)
Média	141,9 ± 0,6
Moda	118,0 ± 12,8
d (0,1)	91,3 ± 3,9
d (0,5)	136,7 ± 2,7
d (0,9)	188,2 ± 6,5

nm: nanômetro; n=3

Figura 36 – Captura de tela da análise de vídeo obtido pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 188.

Adaptado: Software NTA v3.1.

A Tabela 18 e a Figura 36 apresentam os resultados de tamanho das partículas obtidas da nanossuspensão estabilizada com poloxamer 407.

Tabela 18 – Avaliação do tamanho de partícula da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 407, utilizando a técnica NTA.

Determinações de tamanho de partícula	Resultados (nm)
Média	$138,2 \pm 1,7$
Moda	$122,5 \pm 21,2$
d (0,1)	$89,2 \pm 0,1$
d (0,5)	$132,6 \pm 6,4$
d (0,9)	$188,7 \pm 4,5$

nm: nanômetro; n=3

Figura 37 – Captura de tela da análise de vídeo obtido pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) da nanossuspensão de NFOH com poloxamer 407.

Adaptado: Software NTA v3.1.

Essa metodologia resulta em distribuição de tamanho mais detalhada e com maior resolução quando comparada com a técnica DLS (FILIPPE; HAWE; JISKOOT, 2010). O DHM só pode ser comparado com o tamanho medido por outras técnicas se tiver algumas condições especiais.

Para comparar essas duas técnicas, as seguintes condições devem ser mantidas: a densidade de partículas dentro da amostra necessária para a análise DLS (10^8 - 10^{12} /mL) é geralmente maior que o NTA (10^7 - 10^9 /mL); O NTA é mais eficaz do que DLS na análise de amostras polidispersas. Como resultado, o NTA oferece melhor resolução sendo menos vulnerável do que o DLS a ser influenciado pela dispersão de alta intensidade das partículas maiores (BHATTACHARJEE, 2016).

O NTA pode ser utilizado em conjunto com a técnica de espalhamento de luz dinâmica, porém foi observado diferenças no tamanho hidrodinâmico médio entre as técnicas. Essa tendência pode ser explicada devido a contribuição de algumas partículas grandes ou agregados de amostras polidispersas (MEHRABI et al., 2017).

A Tabela 19 apresenta o comparativo dos resultados de tamanho de partícula obtidos por ambas as técnicas.

Tabela 19 – Comparativo dos resultados de tamanho de partícula (em nanômetros) da nanossuspensão de NFOH utilizando a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) e espalhamento de luz dinâmica (DLS).

Técnica utilizada	(nm)			
	Poloxamer 188		Poloxamer 407	
Rastreamento de nanopartículas (NTA)	Média	141,9 ± 0,6	Média	138,2 ± 1,7
	d (0,1)	91,3 ± 3,9	d (0,1)	89,2 ± 0,1
	d (0,5)	136,7 ± 2,7	d (0,5)	132,6 ± 6,4
	d (0,9)	188,2 ± 6,5	d (0,9)	188,7 ± 4,5
Espalhamento de luz dinâmica (DLS)	DHM	193,5±3,2	DHM	197,2±0,5

Foi possível observar o deslocamento do resultado do tamanho médio das partículas para valores maiores por DLS quando comparado com os resultados obtidos pela técnica NTA. Segundo MEHRABI et al. (2017) o DLS tende a deslocar os resultados de DHM para valores mais altos.

Pela determinação do tamanho de partícula empregando a técnica NTA obtivemos com maior precisão o tamanho de cada partícula obtida, confirmando a expressiva redução do tamanho das partículas.

5.5 Análise térmica

5.5.1 Determinação da compatibilidade fármaco e excipientes empregando calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)

5.5.1.1 Comportamento térmico do NFOH

A literatura relata a aplicação da TG e DSC na caracterização, na avaliação de pureza, no estudo da compatibilidade de formulação farmacêutica, na identificação de polimorfismo, na estabilidade e na decomposição térmica de fármacos e medicamentos (Oliveira, 2011). Alterações relacionada ao desaparecimento, aparecimento ou mudança de

eventos endotérmicos e exotérmicos, assim como, em variações nos valores de entalpia referentes a esses eventos térmicos podem caracterizar interação de incompatibilidade fármaco-excipientes.

Os excipientes (poloxamer 188 e poloxamer 407), o NF, o candidato a fármaco (NFOH), as misturas binárias 1:1 (massa/massa) do NFOH com cada excipiente, foram submetidos a ensaios por DSC e TG para se avaliar o comportamento térmico dos fármacos e a compatibilidade das formulações farmacêuticas.

As análises do comportamento térmico do NFOH no presente estudo permitiram o conhecimento das suas características termolábeis. A termogravimetria foi usada para conhecer a estabilidade térmica do NFOH medindo a perda de massa de amostra NFOH em função do aumento da temperatura. As Figuras 37 e 38 apresentam o perfil termogravimétrico do NFOH, mostrando a perda de massa desse em função do aumento da temperatura, empregando razão de aquecimento constante de 5°C/min.

Figura 38 – Curvas TG/DTG do NFOH obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

Adaptado: Software Origin®

Figura 39 – Curva DSC do NFOH obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

Adaptado: Software Origin®

As curvas TG/DTG evidenciaram que a partir de 25 até 150°C ocorreu a perda do solvente orgânico oriundo do processo de recristalização do NFOH. A partir da temperatura de 150°C observaram-se dois eventos de decomposição: o primeiro, entre 150 e 180°C, com pequena perda de massa ($\Delta m = 2,2\%$, $T_{\text{pico DTG}} = 176^\circ\text{C}$) e o segunda, decompondo-se de 180 a 300°C, com acentuada perda de massa ($\Delta m = 45,1\%$, $T_{\text{pico DTG}} = 185^\circ\text{C}$). Santos e colaboradores (2009) evidenciaram que essa etapa da perda lenta de massa é devida à eliminação do material carbonáceo oriundo da etapa anterior.

A curva de DSC revelou a ocorrência de um pico endotérmico $T_{\text{pico DSC}} = 165^\circ\text{C}$ decorrente da fusão do NFOH, que coincidiu com a primeira perda de massa. A segunda etapa de perda de massa evidenciada nas curvas TG/DTG corresponde na curva DSC aos eventos exotérmicos com $T_{\text{pico DSC}} = 183^\circ\text{C}$ e $T_{\text{pico DSC}} = 208^\circ\text{C}$ relacionados com a decomposição do NFOH. A decomposição térmica do NFOH teve comportamento distinto do seu protótipo, NF, que se decompõe em uma única etapa exotérmica ($T_{\text{pico DSC}} = 246^\circ\text{C}$, $\Delta H = 730 \text{ J.g}^{-1}$) conforme Figura 39.

Figura 40 – Curva DSC do NF obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

Adaptado: Software Origin®

5.5.1.2 Comportamento térmico dos poloxâmeros

Os poloxâmeros (Figura 40) são um grupo de tensoativos não iônicos de copolímero de blocos; consistem em unidades de óxido de polietileno (PEO) e óxido polipropileno (PPO), sendo conhecidos por exibir o fenômeno de gelificação térmica inversa dependente da concentração e da temperatura (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). São disponíveis em diferentes graus, diferindo na quantidade relativa de propileno e óxido de etileno adicionado durante a sua obtenção (COLLET, 2009).

Figura 41 – Estrutura química dos poloxâmeros

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses polímeros são amplamente utilizados como emulsionantes, agentes solubilizantes e estabilizadores de suspensão em formas de dosagem líquidas, orais, tópicas e parentéricas e também atuam como agentes molhantes e plastificantes. Foram descritos para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (SHAH et al., 2007).

Possui a capacidade de autoagregar, formando assim micelas e fases cristalinas líquidas e hidrofilicidade. Assim, apresentam vantagem para a solubilização de fármacos pouco solúveis em água. Para fins de administração de fármaco, fármacos hidrofóbicos podem ser solubilizados no núcleo da micela ou conjugados com o polímero formador de micelas. Esses copolímeros anfífilicos estão disponíveis em diferentes graus como poloxamer 188 e poloxamer 407 (EI-BADRY et al., 2013; S MANAGOLI RAGHAVENDRA; RAMARAO; MUCHANDI, 2012).

Nove graus de poloxâmeros foram avaliados por Saettone e colaboradores (SAETONE et al., 1988) como solubilizantes para a tropicamida, um fármaco pouco solúvel em água. Verificou-se que a solubilidade aumenta à medida que o teor de oxietileno aumenta. O poloxamer 188 (102,133 g/mol) é um copolímero em bloco composto de 2 cadeias hidrofílicas de PEO e conectado por uma cadeia hidrofóbica de PPO e tem sido usado por pesquisadores para aumentar a solubilidade aquosa de fármacos fracamente solúveis em água (KWON, 2003; PASSERINI et al., 2002; SHAH et al., 2007; YONG et al., 2004).

O poloxamer 407 é um copolímero que consiste em um bloco de cadeia hidrofóbica de PPO e dois blocos de cadeia hidrofílica de PEO, com peso molecular de aproximadamente 12600 g/mol (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017). A literatura demonstra que o poloxamer 407 foi utilizado para melhorar a taxa de dissolução de vários fármacos, tais como atenolol (MONTI et al., 2010), piroxicam (SHIN; CHO, 1997) e ibuprofeno (NEWA et al., 2008).

A Figura 41 apresenta as curvas TG/DTG para o NFOH, poloxamer 407 e sua mistura física. Observou-se que a amostra de poloxamer 407 apresentou decomposição térmica na faixa 290-438°C ($\Delta m = 99,0\%$, com $T_{pico\ DTG} = 386^\circ C$).

A curva TG/DTG para a mistura física 1:1 (massa/massa) apresentou perda de massa em três etapas. A primeira faixa de 25 a 150°C relacionado a degradação do solvente

do processo de recristalização do NFOH, a segunda etapa observou-se a decomposição do NFOH de 150 a 310°C ($\Delta m = 58,2\%$, $T_{\text{pico DTG}} = 176^\circ\text{C}$), e a segunda perda de massa de 310 a 438°C ($\Delta m = 40,8\%$, $T_{\text{pico DTG}} = 389^\circ\text{C}$) referente à decomposição do poloxamer 407.

Foi possível observar que o poloxamer 407 não alterou a temperatura de decomposição térmica do NFOH e, ainda, não houve interação química que comprometesse a estabilidade da mistura física (poloxamer 407:NFOH). Concluindo-se que essa mistura é termicamente estável até a temperatura de 150°C.

Figura 42 – Curvas TG/DTG do NFOH, mistura física e poloxamer 407 obtidas a 5°C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

Adaptado: Software Origin®

A Figura 42 apresenta as curvas DSC do NFOH, do poloxamer 407 e sua mistura física. Na curva DSC do P407 pode-se observar pico endotérmico a 45°C correspondente à temperatura de fusão.

A curva de DSC para mistura física apresentou evento endotérmico com $T_{\text{pico DSC}} = 46^\circ\text{C}$ relacionada com a fusão do P407. Adicionalmente, foram observado evento

endotérmicos com $T_{\text{pico DSC}} = 163^{\circ}\text{C}$ associado à fusão do NFOH, seguido de dois eventos exotérmicos, com $T_{\text{pico DSC}} = 168$ e 210°C associado a decomposição da amostra.

O perfil das curvas DSC e TG/DTG da mistura física não apresentaram mudanças significativas quando comparado aos perfis dos componentes observados individualmente. Corroborando-se com os resultados da termogravimetria, não houve incompatibilidade entre a mistura física que compromettesse a estabilidade da formulação.

Figura 43 – Curvas DSC do NFOH, poloxamer 407 e sua mistura física, obtidas a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50 \text{ mL}/\text{min}$.

Adaptado: Software Origin®

Em relação ao poloxamer 188, as Figuras 43 e 44 mostram as curvas de TG/DTG e DSC do P188, NFOH e sua mistura física respectivamente. A curva TG/DTG mostrou que a amostra de poloxamer 188 apresentou decomposição térmica indicada pela faixa $300\text{--}429^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 99\%$, com $T_{\text{pico DTG}} = 393^{\circ}\text{C}$),

A curva TG/DTG para a mistura física 1:1 (massa/massa) apresentou perda de massa em dois eventos principais. O primeiro evento ocorre na faixa de 160 a 250°C ($\Delta m =$

40,5%, $T_{\text{pico DTG}} = 176^{\circ}\text{C}$) observando-se eventos sobrepostos de decomposição do NFOH. O segundo evento está relacionado com a perda de massa de 310 a 429°C ($\Delta m = 59,5\%$, $T_{\text{pico DTG}} = 389^{\circ}\text{C}$) referente à decomposição do poloxamer 188.

Na curva DSC do poloxamer 188 observou-se um pico endotérmico a $41,7^{\circ}\text{C}$ correspondente à temperatura de fusão. A curva de DSC para mistura física apresentou um evento endotérmico com $T_{\text{pico DSC}} = 44,3^{\circ}\text{C}$, relacionada com a fusão do poloxamer 188. Adicionalmente, um evento endotérmico com $T_{\text{pico DSC}} = 165^{\circ}\text{C}$ associado à fusão do NFOH, e dois eventos exotérmicos com $T_{\text{pico DSC}} = 172,5$ e 213°C associado à decomposição da amostra.

As curvas de DSC e TG/DTG da mistura física revelaram que não houve alterações significativas nos perfis termoanalíticos.

Figura 44 – Curvas TG/DTG do NFOH, mistura física e poloxamer 188 obtidas a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a $100 \text{ mL}/\text{min}$.

Adaptado: Software Origin®

Figura 45 – Curvas DSC do NFOH, poloxamer 188 e sua mistura física, obtidas a 5°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

Adaptado: Software Origin®

Os tensoativos poloxamer 188 e poloxamer 407 foram selecionados com base na seleção inicial dos tensoativo. As análises térmicas revelaram a ausência de incompatibilidade com o fármaco. Tal fato demonstrou que ambos os tensoativos mantém a característica do fármaco, permitindo concluir que são candidatos adequados para preparação de nanossuspensões de NFOH.

5.6 Liofilização da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural

A liofilização é um processo amplamente utilizado para secar e melhorar a estabilidade de vários produtos farmacêuticos, incluindo: vírus, vacinas, proteínas, péptidos ou veículos coloidais: lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões. Esse processo é relativamente lento e caro, é especialmente aplicável apenas para produtos com alto valor agregado. O ciclo de liofilização é dividido em três etapas: congelamento (solidificação), secagem primária (sublimação de gelo) e secagem secundária (dessorção de água não congelada) (ABDELWAHED et al., 2006; LEE; CHENG, 2006).

As nanopartículas liofilizadas devem manter certas características como: a preservação das características físicas e químicas primárias do produto (tempo de reconstituição curto, suspensão aceitável e distribuição de tamanho de partícula baixa e monomodal, atividade inalterada do fármaco encapsulado), umidade relativa aceitável e estabilidade a longo prazo. Pode-se dizer que para obter produtos com alta qualidade, é importante controlar: a formulação, o processo de liofilização e as condições de armazenamento (LIU, 2006).

Para a liofilização das nanossuspensões, os componentes da formulação de nanopartículas têm efeito crucial na resistência das nanopartículas às diferentes tensões durante a liofilização, como o tipo e a concentração do crioprotetor, a natureza do tensoativo ou os grupos químicos ligados à superfície das nanopartículas. Por essa razão, a seleção de todos os componentes da formulação de nanopartículas deve ser realizada antes de iniciar o estudo da liofilização (FRANK; BOECK, 2016).

A liofilização pode gerar muitas tensões que podem desestabilizar a suspensão coloidal de nanopartículas, especialmente o estresse de congelamento e desidratação. É bem conhecido que durante o congelamento da amostra há separação de fases em gelo e solução crioconcentrada. No caso da suspensão de nanopartículas, a fase crioconcentrada é composta de nanopartículas e os outros componentes da formulação como tensoativos livres, tampões e fármacos sem carga (forma ionizada) (CHUNG; LEE; LEE, 2012).

Caso haja alta concentração do sistema particulado, pode ocorrer a agregação e em alguns casos, a fusão irreversível de nanopartículas. Além disso, a cristalização do gelo pode exercer estresse mecânico sobre as nanopartículas, levando à sua desestabilização. Por essas razões, excipientes especiais devem ser adicionados à suspensão de nanopartículas antes do congelamento para proteger esses sistemas frágeis (LIU, 2006).

Esses excipientes são geralmente adicionados para proteger o produto do estresse de congelamento (crioprotetor) ou estresse de secagem (lioproteção) e também para aumentar sua estabilidade após o armazenamento. Os crioprotetores convencionais encontrados na literatura para nanopartículas são os açúcares: trealose, sacarose, glicose e manitol (CAVATUR et al., 2002).

Wang et al. (2011) pesquisaram vários crioprotetores poliméricos (β – ciclodextrina, trehalose, dextran e manitol) com o objetivo de melhorar a estabilidade da nanossuspensão

durante o processo de liofilização. Os autores observaram que o manitol (5% m/m) foi o crioprotetor mais efetivo em termos de formação de cristal, impedindo a agregação de nanopartículas. O manitol pode substituir a função da água e manter o estado de dispersão da nanossuspensão aquosa durante o processo de liofilização. Esse fenômeno poderia ser explicado uma vez que o manitol, como um agente altamente solúvel em água, possui a capacidade de criar um ambiente altamente hidrofílico ao redor do nanocristal (CAVATUR et al., 2002).

Esses açúcares são conhecidos por vitrificar a uma temperatura específica designada por T_g' . A imobilização de nanopartículas dentro de matriz de crioprotetor pode prevenir sua agregação e protegê-las contra o estresse mecânico dos cristais de gelo. Geralmente, o congelamento deve ser realizado abaixo de T_g' de uma amostra amorfa congelada ou abaixo de T_{eut} (temperatura de cristalização eutética) que é a temperatura de cristalização do componente solúvel como uma mistura com gelo, se estiver em estado cristalino para assegurar a total solidificação da amostra (ABDELWAHED et al., 2006; TANG; PIKAL, 2004).

No entanto, deve-se considerar que a temperatura da secagem primária deve ser menor que a temperatura crítica do processo. Essa temperatura é a T_{eut} para substâncias cristalinas e T_g' para substâncias amorfas, com o intuito de garantir a integridade e a estabilidade do produto final. A secagem acima dessas temperaturas pode levar à fusão eutética para componentes cristalinos ou colapso para componentes amorfos (GAIDHANI et al., 2015; NIREESHA et al., 2013).

O *annealing* é um processo no qual as amostras são mantidas a uma temperatura de subcongelamento acima da temperatura de transição vítrea por um período de tempo. O *annealing* tem efeitos dramáticos na distribuição do tamanho das partículas dos cristais de gelo. Esse tratamento térmico pode levar ao crescimento de cristais de gelo (GAIDHANI et al., 2015; SEARLES; CARPENTER; RANDOLPH, 2001). Searles et al. (2001) descobriram que um aumento no tamanho dos cristais de gelo causado pelo *annealing* deveria acelerar a secagem primária, aumentando o diâmetro dos poros na estrutura que era ocupada por cristais de gelo. Esse tratamento térmico também pode reduzir a heterogeneidade da taxa de secagem entre as amostras para fornecer estrutura mais homogênea.

O tratamento térmico *annealing* também é útil para eliminar a fina camada formada na superfície superior do produto liofilizado (GAIDHANI et al., 2015; NEMATI; CAVÉ; COUVREUR, 1992). Essa camada é formada pela migração de crioprotetores e nanopartículas durante a cristalização do gelo e pode impedir a transferência de vapor de água durante a sublimação e retardar a taxa de sublimação, resultando no aquecimento do produto e sua fusão. Para cancelar esse efeito da camada, o tratamento térmico *annealing* tem sido aplicado durante o congelamento de nanopartículas (FONTE et al., 2016; NEMATI; CAVÉ; COUVREUR, 1992).

5.6.1 Determinação da temperatura de transição vítrea, empregando Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), para a liofilização

Embora o manitol seja material relativamente inerte e cristalino, pode ocorrer sua amorfização durante a etapa de congelamento, sendo necessário a determinação da sua temperatura de transição vítrea (T_g'). Uma vez conhecida a T_g' é possível estimar a temperatura máxima utilizada durante a secagem primária a fim de evitar recristalizações e colapsos no processo de liofilização que prejudiquem a qualidade do líofilo obtido.

Inicialmente, a nanossuspensão de NFOH foi congelada a partir da temperatura ambiente até -70°C a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguido de aquecimento até -15°C a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A curva DSC de aquecimento revelou algumas transições térmicas (Figuras 45 e 46). Observou-se a temperatura de transição vítrea aproximada de $T_g' = -31,69^{\circ}\text{C}$ e $T_g' = -31,80^{\circ}\text{C}$ da fração amorfa do manitol respectivamente para as figuras 45 e 46, sendo evidenciada com início na região de -35°C . Em seguida, foi observada uma segunda temperatura de transição térmica referente ao evento exotérmico ($T_{eut} = -24,19^{\circ}\text{C}$ e $T_{eut} = -24,22^{\circ}\text{C}$, respectivamente para as Figuras 45 e 46) com início em aproximadamente -27°C que é atribuído a cristalização de hidrato de manitol, assim como, da água não congelada associada a fase amorfa do manitol (CAVATUR et al., 2002).

Figura 46 – Curva DSC obtida da nanosuspensão de NFOH com P407 e manitol 5% (%m/m) a razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂, a partir de -70°C a -20°C.

Adaptado: Software Origin®

Figura 47 – Curva DSC obtida da nanosuspensão de NFOH com P188 e manitol 5% (%m/m) a razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂, a partir de -70°C a -20°C.

Adaptado: Software Origin®

O *annealing* da nanossuspensão de NFOH empregando manitol 5% (m/m) foi realizado com razão de aquecimento de 10°C/min. A amostra foi aquecida à temperatura de -15°C, logo resfriada até -50°C seguido do aquecimento até 25°C. Observou-se que a maior parte do manitol foi cristalizada usando o tratamento térmico *annealing*. Portanto, confirmou-se que o poloxamer 188 e 407 não possui estrutura amorfa influenciando a temperatura de transição vítrea, sendo considerado a $T_g' = -31,69^\circ\text{C}$ e $T_g' = -31,80^\circ\text{C}$ como verdadeira das formulações, sem o tratamento.

A técnica de calorimetria exploratória diferencial permitiu determinar a temperatura de transição vítrea apresentada na matriz cristalina da nanossuspensão de NFOH, evidenciando a necessidade de incorporar etapa de tratamento térmico na liofilização. A temperatura e a pressão, em cada etapa, foram as seguintes: congelamento até -45°C; tratamento *annealing* com aquecimento até -15°C e mantida a essa temperatura por 1 hora; secagem primária a temperatura de prateleira de -30°C e pressão de 75mTorr por 48h; e etapa da secagem secundária, temperatura da prateleira de +25°C, sob a mesma pressão durante 4h.

5.7 Determinação das características de redispersibilidade da nanossuspensão de hidroximetilnitrofural liofilizada

A redispersibilidade consiste de atributo importante da qualidade de nanossuspensão solidificada, indicando a reconstituição de nanopartículas por contato com um meio aquoso. Devido à aglomeração excessiva de nanopartículas durante a etapa de solidificação, a reconstituição das nanopartículas originais às vezes se torna impossível, o que anula todos os benefícios das nanossuspensões (BHAKAY et al., 2014a, 2014b; MEDAREVIĆ et al., 2018). De modo a evitar a aglomeração das nanopartículas e assegurar uma rápida redispersão, adicionou-se manitol às nanossuspensões antes da liofilização.

Yue et al. (2015) mostraram que a redispersibilidade de nanossuspensões de harmina liofilizadas também é marcadamente influenciada pelas condições de congelamento, sendo que amostras congeladas sob condições agressivas de congelamento (-196 °C, 2h), com a maior taxa de congelamento mostraram redispersibilidade superior em comparação com amostras congeladas usando condições suaves (-20 °C, 12 h).

Medarević et al. (2018) compararam a redispersibilidade de nanossuspensões de carvedilol após a secagem por pulverização e liofilização. Portanto, o uso da secagem por pulverização como técnica de solidificação mostrou-se benéfica em relação a liofilização, uma vez que é obtida uma boa redispersibilidade com quantidade relativamente baixa de manitol como estabilizante, o que permite elevada concentração de fármaco na formulação final. O manitol nesse caso foi insuficiente para proporcionar estabilidade contra a aglomeração de nanopartículas de carvedilol liofilizadas.

Em outro estudo, Bhakay e colaboradores, (2014a, 2014b) mostraram que os resultados do teste de redispersibilidade para um sistema de hidroxipropilcelulose e lauril sulfato de sódio proporcionaram redispersibilidade eficiente da nanossuspensão de griseofulvina solidificada por secagem por pulverização.

O teste de redispersibilidade (Tabela 19) provou que as nanossuspensões liofilizadas foram capazes de serem novamente dispersas em contato com o meio aquoso. A análise por espalhamento de luz dinâmica foi usada para estimar o tamanho médio das nanopartículas após a redispersão da nanossuspensão liofilizada. A diferença entre o índice de redispersibilidade das diferentes nanossuspensões pode ser explicada pelo uso dos diferentes tensoativos. Diante disso, a análise de microscopia foi realizada para a visualização da estrutura contínua da matriz dos nanocristais e para verificar a presença ou ausência de aglomeração das nanopartículas no estado sólido após a liofilização.

Tabela 20 – Tamanho de partícula (DHM) e índice de polidispersão (IPD) da nanossuspensão de NFOH antes e após a solidificação por liofilização, juntamente com o índice de redispersibilidade calculado.

Nanossuspensão	Tamanho da partícula antes da liofilização (nm)	Tamanho da partícula depois da liofilização (nm)	Redispersibilidade (%)
P188	180,7±1,7 IPD = 0,234±0,011	211,3±1,7 IPD = 0,252±0,004	116,93
P407	186,8±1,1 IPD = 0,254±0,010	193,9±4,7 IPD = 0,273±0,011	103,80

5.8 Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica dos nanocristais realizada por MEV mostrou a estrutura característica da matriz cristalina nas Figuras 47 e 48 (forma de filetes/bastonetes), Koradia et al. (2018) observaram a mesma estrutura nos nanocristais de ziprasidona liofilizados.

A quantidade de crioprotetor necessária para estabilizar nanosuspensões liofilizadas é comumente relatada entre 100 e 400% (relativa à quantidade do fármaco) (HOU et al., 2017; YUE et al., 2015). No presente caso, foi utilizado 5% do manitol em relação a formulação total, equivalendo a 250% e 166% em relação da quantidade do NFOH, respectivamente nas formulações com o poloxamer 188 e 407. Essa quantidade se mostrou insuficiente para proporcionar estabilidade contra a aglomeração de nanopartículas de NFOH liofilizadas.

Embora as partículas da nanossuspensão inicialmente tenham sido observadas embebidas na matriz de manitol, seu tamanho foi significativamente maior quando comparadas ao tamanho determinado por DLS e NTA, devido à aglomeração de partículas e fusão durante o processo de liofilização. Porém, tal comportamento não influenciou na reconstituição da amostra liofilizada. Esse fenômeno é justificado pela remoção lenta de água durante 48h (secagem primária), tempo suficiente para que as nanopartículas de NFOH se aproximassem conectando-se através de pontes de cristal e formando aglomerados estáveis (MEDAREVIĆ et al., 2018). Em condições brandas de congelamento, há tempo suficiente para que as moléculas de água movimentem as partículas e as conduzam a se aproximarem e se aglomerar. Nesse caso, os estabilizadores e os crioprotetores poliméricos adicionados não conseguem evitar esse fenômeno de aglomeração (LEE, 2003).

Contudo, faz-se necessário realizar outro estudo para comparar a influência da concentração do manitol no processo de secagem das nanossuspensões.

Figura 48 – Microscopia Eletrônica de Varredura da nanosuspensão de NFOH com poloxamer 188, ampliação de 50000x.

Adaptado: Software SmartSEM®

Figura 49 – Microscopia Eletrônica de Varredura da nanosuspensão de NFOH com poloxamer 407, ampliação de 40000x.

Adaptado: Software SmartSEM®

5.9 Análise da estrutura cristalina dos nanocristais e do hidroximetilnitrofural empregando difração de raios X (DRX)

A difração de raios X foi usada como ferramenta para determinar a estrutura cristalina do fármaco antes e após o processo de nanonização.

A técnica de difração de raios X mais frequentemente usada é o método dos pó. Nessa técnica, usa-se amostra em pó, para que exista orientação aleatória de muitos cristais, assegurando assim que algumas das partículas estão orientadas, em relação ao feixe de raios X, de modo a satisfazer as condições de difração da lei de Bragg (permite a determinar a difração da onda eletromagnética por um cristal). As técnicas modernas de determinação de estruturas cristalinas por difração de raios X utilizam apresenta um contador de radiação para detectar o ângulo e a intensidade do feixe difratado (EAQUB ALI; DAS; BEE ABD HAMID, 2014; SPEAKMAN, 1900; WILL, 2006).

A DRX é uma ferramenta analítica de muito utilizada na indústria farmacêutica para a análise de formulações de medicamentos. É um método não destrutivo conhecido popularmente usado para medir a forma final de ingredientes farmacêuticos ativos, identificar a impureza e monitorar as mudanças estruturais que podem ocorrer durante a formulação de preparações farmacêuticas. Frequentemente, produz nova banda para novos compostos que podem ser analisados mais adiante por procedimento sólido de triagem e seleção (EAQUB ALI; DAS; BEE ABD HAMID, 2014; GIORDANO, 2001; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004). A DRX caracteriza partículas de fármacos polimórficos que geralmente ocorrem durante a interconversão da fase sólida. As moléculas de fármacos polimórficos são problemáticas devido à sua diferente propriedade físico-química quando comparada a sua forma cristalina (EAQUB ALI; DAS; BEE ABD HAMID, 2014; GIORDANO, 2001).

A DRX tem sido relatada por alguns autores na caracterização de novas formulações farmacêuticas. Zhang et al. (2014) sintetizaram nanocristais de lovastatina (5% m/m) por homogeneização a alta pressão, seguido por secagem sem o uso de crioprotetor. Como mostrado pelos resultados da análise de DRX, a natureza cristalina da lovastatina não foi alterada nas nanossuspensões secas por pulverização.

Outro grupo, Medarevic e colaboradores (2018) obtiveram nanocristais de carvedilol (7% m/m) pelo método de moagem por via úmida, a DRX foi realizada para detectar possíveis transições polimórficas durante o processo de moagem, assim como durante a liofilização. Embora o carvedilol exiba polimorfismo, com numerosas formas cristalinas distintas (BEYER; REINHOLZ, 2004; CHEN; GALOP; OH, 2004; KOR; WIZEL, 2004; LIFSHITZ; WIZEL, 2007), observou-se que o processo de moagem por via úmida e a liofilização utilizados não induziram transições polimórficas na nanossuspensão.

A DRX do NFOH e de suas nanossuspensões (Figuras 49 e 50) apresentam picos a 9.5° , 21.2° e 28.1° 2θ , característicos. A posição de todos os picos característicos do NFOH permaneceram inalteradas nos difratogramas das nanossuspensões liofilizadas com diminuição na altura do pico. É relatado que a altura do pico é afetada pelo tamanho do cristal e cristalinidade (VARSHOSAZ et al., 2008). Os resultados indicaram que não houve diferença significativa no padrão de difração entre os espectros de DRX dos nanocristais de NFOH, indicando a possibilidade de ausência de formas amorfas durante o processo de obtenção e de liofilização da nanossuspensão de NFOH. Esses resultados indicam a adequação da aplicação da técnica de liofilização para a solidificação da nanossuspensão de NFOH.

Figura 50 – Difratograma (método do pó) do NFOH, manitol, Poloxamer 188 (P188), nanocristais de NFOH com P188 (F1).

Adaptado: Software Origin®

Figura 51 – Difratoograma (método do pó) do NFOH, manitol, Poloxamer 407 (P407), nanocristais de NFOH com P407 (F2).

Adaptado: Software Origin®

5.10 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões e no estudo de solubilidade

5.10.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de hidroximetilnitrofural nos estudos de solubilidade e nas nanossuspensões

5.10.1.1 Determinação da absorbância máxima

Para a determinação da absorbância máxima, utilizou-se o *software* insight no modo Scan do espectrofotômetro UV-Visible Evolution 201. Esse ensaio foi realizado por meio de uma varredura no comprimento de onda de 200 a 600nm, resultando o comprimento de onda de absorbância máxima do hidroximetilnitrofural (10 µg/mL) de 375 nm, com um pico máximo de absorbância de 0,570, como observado na Figura 51.

Figura 52 – Absorbância máxima do hidroximetilnitrofural (10 µg/mL) no intervalo de 200 a 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.10.2 Validação da metodologia analítica para a quantificação de hidroximetilnitrofural nas nanossuspensões

5.10.2.1 Especificidade

Na avaliação da especificidade, foi demonstrado que os solventes utilizados para o desenvolvimento do método analítico, assim como, os excipientes que compõem a formulação, não têm interferência na longitude de onda no qual o fármaco tem absorbância máxima (375 nm), conforme Figuras 52-57. Assim, foi comprovada a especificidade do método em água ultrapura e no meio tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8; pH 7,5. Igualmente nos excipientes poloxamer 188, poloxamer 407 e na mistura do hidroximetilnitrofural com os excipientes.

Figura 53 – Espectro de varredura do tampão HCl pH 1,2 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 54 – Espectro de varredura do tampão acetato pH 4,5 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 55 - Espectro de varredura do tampão fosfato pH 6,8 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 56 – Espectro de varredura do tampão fosfato pH 7,5 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 57 – Espectro de varredura do poloxamer 188 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 58 – Espectro de varredura do poloxamer 407 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.10.2.2 Linearidade

Com a finalidade de avaliar a linearidade do método e a significância do modelo, se construiu um gráfico de concentração ($\mu\text{g/mL}$) *versus* absorbância, conforme Figura 58. Usando o método dos mínimos quadrados, se obteve a equação da reta com sua respectiva

curva analítica. Também foram obtidos o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (r²). Foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) das absorbâncias por triplicata para cada nível de concentração em água, conforme Tabela 20. O CV é aceitável quando estiver abaixo do 5%, conforme a norma vigente (RDC166/2017) (BRASIL, 2017).

Tabela 21 – Valores por triplicata da absorbância obtidas na curva analítica do método para a quantificação do hidroximetilnitrofurural.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1	2	3			
7	0,398	0,376	0,407	0,394	0,016	4,05
8	0,460	0,463	0,467	0,463	0,004	0,76
9	0,542	0,526	0,536	0,535	0,008	1,51
10	0,589	0,590	0,588	0,589	0,001	0,17
11	0,653	0,643	0,655	0,650	0,006	0,99
12	0,690	0,707	0,705	0,701	0,009	1,33
13	0,762	0,762	0,758	0,761	0,002	0,30

DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de Variação (n=3)

Figura 59 - Reta de regressão $\hat{y} = 0,01957 + 0,06043x$ ajustada aos pontos experimentais relativos às absorbâncias, conforme a concentração do hidroximetilnitrofurural.

Adaptado: Software Minitab® 17.

O resultado do LQ, apresentado na Tabela 21, demonstra que o método espectrofotométrico possui limite de quantificação satisfatório uma vez que os valores foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva de linearidade (7,00 µg/mL).

Tabela 22 - Parâmetros da reta de regressão

Parâmetro	Valor
Coeficiente de correlação (r)	0,958
Coeficiente angular	0,06043
Intercepto	$0,01957 \pm 0,00764$
LQ (µg/mL)	1,264

LQ= limite de quantificação

A análise de resíduos é um conjunto de técnicas utilizadas para investigar a adequabilidade de um modelo de regressão com base nos resíduos. Na Figura 59 pode-se observar o gráfico de probabilidade normal de resíduos que os pontos são distribuídos normalmente, formando uma linha reta. No gráfico de resíduos versus ajustes, pode-se pressupor que os resíduos são aleatoriamente distribuídos e têm variância constante. Os pontos estão aleatoriamente em ambos os lados de 0, sem padrões reconhecíveis. O histograma dos resíduos é utilizado para determinar se os dados são assimétricos ou se incluem outliers. Porém o histograma é mais eficaz quando se tem aproximadamente 20 pontos de dados ou mais. Se a amostra for pequena demais, cada barra no histograma não conterá pontos de dados suficientes para mostrar de forma confiável a assimetria ou os outliers. O gráfico de resíduos versus ordem demonstra que os resíduos são independentes um do outro. Resíduos independentes não mostram tendências nem padrões quando exibidos em ordem temporal. Os padrões nos pontos podem indicar que os resíduos próximos uns dos outros podem ser correlacionados e, portanto, não são independentes.

Figura 60 – Gráfico dos resíduos relativos ao ajuste de uma reta de regressão aos dados de absorbância do NFOH.

Adaptado: *Software Minitab® 17*.

O modelo de quantificação para o NFOH utilizando o espectrofotômetro UV-VIS em intervalos de concentração do fármaco entre 7 µg/mL e 13 µg/mL, demonstrou a linearidade e forte correlação ($r > 0,99$) do método entre a concentração do NFOH (µg/mL) e a absorbância, atendendo ao critério estabelecido pela norma RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

5.10.2.3 Precisão

Os resultados de precisão intra e intercorrida demonstraram que o método espectrofotométrico possui precisão para a quantificação do NFOH. O maior valor encontrado para coeficiente de variação foi de 0,959%, para precisão intracorrida, e 2,438%, para precisão intercorrida, conforme Tabela 22. Pode se observar que os valores obtidos são inferiores ao valor de 5%, conforme a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

Tabela 23 – Precisão intra e intercorrida do método analítico para a quantificação do NFOH

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão (CV%)	
	Intra corrida	Inter corrida
8	0,959	1,517
10	0,169	1,565
12	0,814	2,438

5.10.2.4 Exatidão

A exatidão do método analítico representa o grau de proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2017). Os resultados apresentados na Tabela 23 mostraram recuperação próximo de 100%. Indicando que o método é capaz de proporcionar resultados próximos do valor real.

Tabela 24 – Valores experimentais médios de porcentagem de recuperação obtidos para o teste de exatidão.

Concentração teórica (µg)	Concentração experimental (µg)	Recuperação (%)	Média da recuperação (%)
18,00	18,87	104,83	100,66 ± 3,67
20,00	19,58	97,90	
22,00	21,84	99,27	

5.10.2.5 Robustez

A avaliação da robustez foi determinada pela variação dos comprimentos de onda (373, 375, 377 nm). A absorbância média e o desvio padrão obtidos, para a análise do coeficiente de variação (CV%), estão apresentados na Tabela 24. O parâmetro analítico modificado não apresentou mudanças significativas no valor médio da concentração

(10µg/mL) do hidroximetilnitrofurais. Observa-se que os resultados experimentais do coeficiente de variação foram menores do que 5%, conforme exigência regulat3ria (RDC 166/2017) (BRASIL, 2017), demonstrando que o m3todo 3 robusto.

Tabela 25 – Valores m3dios da absorbância do NFOH (10µg/mL) variando o comprimento de onda máximo de absorção.

Parâmetro	Absorbância da solução amostra ± DP		CV%
Comprimento de onda	373 nm	0,559 ± 0,001	0,17
	375 nm	0,606 ± 0,001	0,16
	377 nm	0,718 ± 0,002	0,27

5.11 Determinação da solubilidade de saturação das nanossuspens3es de hidroximetilnitrofurais

A solubilidade da saturação do NFOH e seus nanocristais, estabilizados com P188 e P407, foi realizado para estudar o efeito da redução do tamanho das part3culas na solubilidade do NFOH. Chung e colaboradores (2003) observaram que a solubilidade de saturação do NFOH (0,992 mg/mL) foi 1,5 vezes maior que a nitrofurazona (0,657 mg/mL).

Em 2018, Koradia e colaboradores comparam a solubilidade da saturação do fármaco ziprasidona pura (4,5 mg/mL), com a nanossuspens3o de ziprasidona (45 mg/mL), nanossuspens3o seca por pulverização (43 mg/mL) e nanossuspens3o liofilizada (40 mg/mL). Observou-se um aumento de cerca de 8 vezes na solubilidade da saturação na nanossuspens3o de ziprasidona, nanossuspens3o seca por pulverização e nanossuspens3o liofilizada.

Em outro estudo, Koradia e colaboradores (2018) desenvolveram nanocristais de albendazol. A solubilidade da saturação de nanocristais de albendazol e do fármaco puro foi

de 44,27 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente. Os nanocristais mostraram uma melhoria de cerca de 9 vezes na solubilidade da saturação em comparação com o albendazol puro.

Sharma e colaboradores (2016) desenvolveram nanocristais de febuxostato (FEB) utilizando a técnica de moagem. A partir deste estudo, os autores observaram que a diminuição do tamanho das partículas de FEB em 100 vezes resultou em 26,085 e 1,67 vezes no aumento da solubilidade em pH 1,2 e tampão fosfato (pH 6,0), respectivamente.

O aumento na solubilidade pode ser explicado com base na equação de Ostwald-Freundlich, que afirma que, ao reduzir o tamanho das partículas, a área superficial exposta aos meios aumentará, resultando em maior pressão de dissolução e ajudando a aumentar a solubilidade da saturação (JIANG et al., 2012).

5.12 Estudo de estabilidade das nanosuspensões de hidroximetilnitrofurais

A estabilidade das formulações liofilizadas com poloxamer 188 e 407, por período de 3 meses, a 25°C e 4°C, foi apresentada nas Figuras 60 - 63. Os resultados, refletem a estabilidade dessas preparações (uniformidade e ausência de formação de agregados).

Observou-se que para as formulações com o poloxamer 188, os valores de DHM e PZ apresentaram alterações no decorrer do tempo (DHM < 310 nm e PZ de -24,3 a - 34,5 mV). O mesmo ocorreu para as formulações com o poloxamer 407 variando o DHM de 187,4 a 274,5 nm e PZ de -24,6 a - 37,6 mV).

Essas alterações podem estar relacionadas com a seleção dos tensoativos e/ou concentração do manitol. Por isso faz-se necessário realizar outro estudo em que seja utilizado outro tipo de estabilizante e que seja conhecido a concentração ideal do crioprotetor para auxiliar no processo de liofilização.

Figura 61 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 188, durante 3 meses a 25°C.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 62 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 188, durante 3 meses a 4°C.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 63 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 407, durante 3 meses a 25°C

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 64 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e potencial zeta (mV) dos nanocristais de NFOH com poloxamer 407, durante 3 meses a 4°C

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.13 Avaliação da atividade *in vitro* antileishmania

Os resultados do teste de atividade leishmanicida de NFOH contra formas promastigotas foram apresentados na Tabela 25. Os resultados foram comparados com o candidato a fármaco livre e o sistema nanoestruturado polimérico de NFOH (NFOH–PBCA-NP) descrito por Monteiro e colaboradores (2017).

Tabela 26 – Determinação do IC₅₀ das formas promastigotas de *L. amazonensis* dos nanocristais de NFOH com poloxamer 188 (F1), nanocristais de NFOH com poloxamer 407 (F2), do sistema nanoestruturado polimérico de NFOH (NFOH–PBCA-NP) e do candidato a fármaco.

Tratamento	IC ₅₀ µg/mL
F1	23,26±0,55
F2	22,45±1,65
NFOH livre	3,31±0,34
NFOH–PBCA-NP	0,49±0,28

As duas nanossuspensões de NFOH apresentaram resultados de IC₅₀ semelhantes entre si, sendo 23,26 e 22,45 µg/mL, respectivamente para F1 e F2. Embora ambas as nanossuspensões de NFOH tenham apresentado excelente índice de inibição de (93,4 e 68,2%, respectivamente para F1 e F2) contra a forma promastigotas de *L. amazonenses*, ambas são menos potentes quando comparadas com o NFOH–PBCA-NP (IC₅₀: 0,49 µg/mL).

No entanto, destacasse a potência de inibição *in vitro* do candidato a fármaco puro, onde o mesmo é 7 vezes mais potente que as nanossuspensões.

Os resultados expressos demonstraram uma boa atividade para esses compostos, entretanto, outros ensaios devem ser realizados, como citotoxicidade (CC₅₀) e avaliação em amastigotas de *L. amazonenses* (IC₅₀), para que possam ser calculados os índices de seletividade e assim avaliar a atividade das nanossuspensões de NFOH.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu a obtenção da nanossuspensão de NFOH. O método de obtenção da nanossuspensão de NFOH se mostrou adequado para a obtenção dos nanocristais de NFOH com diferentes estabilizadores. A caracterização físico-química revelou tamanho médio de 193,5 nm, polidispersividade de 0,23, potencial zeta de -34,5 mV, para a formulação com poloxamer 188. Em relação a formulação com o poloxamer 407, a caracterização físico-química revelou tamanho médio de 197,2 nm, polidispersividade de 0,25, potencial zeta de -30,8 mV. Ambas as formulações possuem morfologia característica de cristais.

A abordagem empregando planejamento estatístico de experimentos, permitiu entender as variáveis significativas para o processo de obtenção dos nanocristais de NFOH. A análise térmica consistiu de ferramenta essencial no estudo da compatibilidade da formulação entre os tensoativos e o candidato a fármaco, não sendo observado incompatibilidade dos excipientes com o NFOH.

O desenvolvimento e validação do método analítico por UV-visível, revelou características de linearidade, especificidade, exatidão, precisão e robustez adequadas de acordo com a regulamentação vigente. No que se refere à precisão foi obtido desvio padrão relativo de 0,5%.

As alterações observadas no DHM, IP e PZ das formulações de nanocristais de NFOH liofilizadas, foram relacionadas com a seleção dos tensoativos e a concentração do manitol utilizado no processo de liofilização. Portanto, concluiu-se que a seleção ideal do estabilizante e o processo de liofilização são fundamentais para a estabilidade das formulações farmacêuticas.

A atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* revelou que os nanocristais de NFOH apresentaram atividade inferior ao fármaco livre.

7 REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. **Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006.
- ABOU-EL-NAGA, I. F. Demographic, socioeconomic and environmental changes affecting circulation of neglected tropical diseases in Egypt. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 881–888, 2015.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. **Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis**. [s.l: s.n.]. v. 61
- BADIEE, A. et al. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: Present and future trends. **Vaccine**, v. 31, n. 5, p. 735–749, jan. 2013.
- BAFGHI, A. F. et al. Magnesium oxide nanoparticles coated with glucose can silence important genes of Leishmania major at sub-toxic concentrations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 300–304, dez. 2015.
- BAKER, M. et al. Mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 231–238, 2010.
- BEHESHTI, N. et al. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against Leishmania major: In vitro and in vivo studies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 3, p. 203–207, jul. 2013.
- BERGQUIST, R. et al. Surveillance and response: Tools and approaches for the elimination stage of neglected tropical diseases. **Acta Tropica**, v. 141, n. Part B, p. 229–234, 2015.
- BEYER, P.; REINHOLZ, E. **Thermodynamically stable modification of 1-(4-carbazolyloxy-3[2-(2-methoxyphenoxy)-ethylamino]-2-propanol process for its preparation and pharmaceutical compositions containing it** United States, 2004.
- BHAKAY, A. et al. Redispersible fast dissolving nanocomposite microparticles of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1–2, p. 367–379, 2014a.
- BHAKAY, A. et al. Enhanced recovery and dissolution of griseofulvin nanoparticles from surfactant-free nanocomposite microparticles incorporating wet-milled swellable dispersants. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 11,

p. 1509–1522, 28 nov. 2014b.

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

BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 465–475, 9 fev. 2017.

BOSQUESI, P. L. et al. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 231–238, 2008.

BRASIL. **Manual de vigilancia da Leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, Anvisa-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº. 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA**, 2013.

BRASIL, Anvisa-Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Brasil, 2017.

BUCKTON, G.; BEEZER, A. E. The relationship between particle size and solubility. **Int J Pharm**, v. 82, p. 7–10, 1992.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas Bio (Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades , Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203–213, 2014.

CAVATUR, R. K. et al. Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Aqueous Solutions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 894–900, 2002.

CHEN, M.-L. et al. Development Considerations for Nanocrystal Drug Products. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 3, p. 642–651, 9 maio 2017.

CHEN, W.; GALOP, M.; OH, C. K. **Carvedilol polymorph** United States, 2004.

CHUNG, M. C. **Planejamento e sínteses de pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–4783, nov. 2003.

CHUNG, N. O.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1–2, p. 42–50, 2012.

COMPRI, J. Z. **Formulação farmacêutica e uso da mesma. Patente nº BR 10 2016 020243-4**, 2016.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

DE CARVALHO, R. F. et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 217–222, out. 2013.

DE WAARD, H.; FRIJLINK, H. W.; HINRICHS, W. L. J. Bottom-Up Preparation Techniques for Nanocrystals of Lipophilic Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 1220–1223, 18 maio 2011.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous-Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

DINIZ, J. L. C. P.; COSTA, M. O. DA R.; GONÇALVES, D. U. Mucocutaneous leishmaniasis: Clinical markers in presumptive diagnosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 3, p. 380–384, maio 2011.

DONG, Y.; ZHAO, N.-Q. Discussion of main effect in repeated measures ANOVA. **Fudan University Journal of Medical Sciences**, v. 32, n. 6, p. 682–686, 2005.

DRAGOVIC, R. A. et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 780–788, dez. 2011.

DRESSMAN, J. B. et al. **Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms** **Pharmaceutical Research**, 1998.

EAQUB ALI, M.; DAS, R.; BEE ABD HAMID, S. Current Applications of X-Ray Powder Diffraction- a Review. **Rev. Adv. Mater. Sci**, v. 38, p. 95–109, 2014.

EI-BADRY, M. et al. PERFORMANCE OF POLOXAMER 407 AS HYDROPHILIC CARRIER ON THE BINARY MIXTURES WITH NIMESULIDE. **Farmacia**, v. 61, n. 6, p. 1137–1150, 2013.

EKIZ, O. et al. Mucocutaneous leishmaniasis with marked facial disfigurement. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 83, n. 1, p. 91–93, 2017.

ELBASUNEY, S. Sustainable steric stabilization of colloidal titania nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 409, p. 438–447, 2017.

ENGELMAN, D. et al. Opportunities for Integrated Control of Neglected Tropical Diseases That Affect the Skin. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 843–854, 2016.

FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, n. 8, 2017.

FANGUEIRO, J. F. et al. DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE FÁRMACOS POUCO SOLÚVEIS. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1848–1853, 2012.

FDA. Food and Drug Administration - Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. **Biotechnology Law Report**, 2014.

FILIPPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FONTE, P. et al. Annealing as a tool for the optimization of lyophilization and ensuring of the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 503, n. 1–2, p. 163–173, abr. 2016.

FRANK, K. J.; BOECK, G. Development of a nanosuspension for iv administration: From miniscale screening to a freeze dried formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 112–117, 2016.

GAIDHANI, K. A. et al. LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. In: **World Journal of Pharmaceutical Research World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor**. [s.l.: s.n.]. v. 4990p. 516–543.

GIORDANO, F. Polymorphism in pharmaceutical solids. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 3, p. 354–355, 2001.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. **Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis** *Infectious Disease Clinics of North America*, jun. 2012.

GOVINDARAJAN, M. et al. One-step synthesis of polydispersed silver nanocrystals using *Malva sylvestris*: an eco-friendly mosquito larvicide with negligible impact on non-target aquatic organisms. **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2685–2695, 2016.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M. The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. In: **Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–18.

GUIDO, R. V. C. et al. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofurazona. **Revista de Ciencias Farmaceuticas**, v. 22, n. 2, p. 319–333, 2001.

HENN, G. D. L. A. et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected adults? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, p. 1–7, 2018.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, out. 1999.

HICKS, C. R.; TURNER JR., K. V. **Fundamental Concepts in the Design of Experiments**. 5. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1999.

HLEB, E. Y. L.-; LAPOTKO, D. O. Malaria Theranostics using Hemozoin-Generated Vapor Nanobubbles. **Theranostics**, v. 4, n. 7, p. 761–769, 2014.

HORSTICK, O.; RUNGE-RANZINGER, S. Protection of the house against Chagas disease, dengue, leishmaniasis, and lymphatic filariasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. e147–e158, maio 2018.

HOU, Y. et al. Spray-dried nanocrystals for a highly hydrophobic drug: Increased drug loading, enhanced redispersity, and improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 372–379, 2017.

HU, J.; JOHNSTON, K. P.; WILLIAMS, R. O. I. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 30, p. 233–245, 2004.

ITO, M. M. et al. Correlation between presence of *Leishmania* RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 5, p. 533–540, set. 2015.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, jul. 2015.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896–1904, set. 2013.

JIANG, T. et al. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of simvastatin nanocrystal prepared by sonoprecipitation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 10, p. 1230–1239, 2012.

JUNGHANNS, J. U. A. H.; MÜLLER, R. H. **Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications** International Journal of Nanomedicine, 2008.

JUNYAPRASERT, V. B.; MORAKUL, B. **Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015.

KAUR, I. P.; SINGH, H. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. **Journal of Controlled Release**, v. 184, n. 1, p. 36–50, 2014.

KECK, C. M. Particle size analysis of nanocrystals: Improved analysis method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 3–12, 2010.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KOR, I.; WIZEL, S. **Crystalline solids of carvedilol and processes for their preparation** United States, 2004.

KORADIA, K. D. et al. Ziprasidone nanocrystals by wet media milling followed by spray drying and lyophilization: Formulation and process parameter optimization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, p. 73–84, 2018.

KORADIA, K. D.; PARIKH, R. H.; KORADIA, H. D. Albendazole nanocrystals: Optimization, spectroscopic, thermal and anthelmintic studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, p. 369–378, 2018.

KWON, G. S. Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Water-Soluble Compounds. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 20, n. 5, p. 357–403, 2003.

LEE, J. Drug nano- and microparticles processed into solid dosage forms: Physical properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 10, p. 2057–2068, 2003.

LEE, J.; CHENG, Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1–2, p. 185–192, 2006.

LIFSHITZ, I.; WIZEL, S. **Crystalline forms of carvedilol and processes for their preparation** United States, 2007.

LIU, J. **Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: Techniques and applications in freeze-drying development** Pharmaceutical Development and Technology, 2006.

LIU, L.; JIANG, C. Drug Delivery Strategies Based on Nanotechnology for Cancer Immunotherapy. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 34–44, 2017.

LOH, Z. H.; SAMANTA, A. K.; SIA HENG, P. W. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 255–274, jul. 2015.

MALAMATARI, M. et al. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 534–547, 2018.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341–352, 2013.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Trends and spatial patterns of mortality related to neglected tropical diseases in Brazil. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 2, p. 56–65, jun. 2016.

MEDAREVIĆ, D. et al. Optimization of formulation and process parameters for the production of carvedilol nanosuspension by wet media milling. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 540, n. 1–2, p. 150–161, 2018.

MEHRABI, K. et al. Improvements in Nanoparticle Tracking Analysis To Measure Particle Aggregation and Mass Distribution: A Case Study on Engineered Nanomaterial Stability in Incineration Landfill Leachates. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 10, p. 5611–5621, 16 maio 2017.

MELO, M. F. F. DE. **PREPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA DO PRÓ-FÁRMACO HIDROXIMETILNITROFURAL, POTENCIALMENTE ANTICHAGÁSICO**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - JULIO DE MESQUITA FILHO, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica - Dados**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 1 jun. 2017a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica - Dados**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 1 jun. 2017b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>>.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 6736, n. 16, p. 14, 2016.

MONTEIRO, L. M. et al. Targeting Leishmania amazonensis amastigotes through macrophage internalisation of a hydroxymethylnitrofurazone nanostructured polymeric system. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 1, p. 88–92, jul. 2017.

MONTI, D. et al. Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part II: In vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1–2, p. 32–36, nov. 2010.

MÖSCHWITZER, J. P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 142–156, 2013.

MOSIMANN, V. et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta Tropica**, v. 182, p. 246–250, 2018.

MÜLLER, R. H.; GOHLA, S.; KECK, C. M. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, p. 1–9, 2011.

MYER, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 2. ed. New York: [s.n.].

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3. ed. New Jersey: Wiley, 2009.

NAIFAL-KAMEL, M. A. Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. **clinical skin cancer**, v. 2, n. 1, p. 54–58, 2017.

NATARAJAN, U.; PERIYANAN, P. R.; YANG, S. H. Multiple-response optimization for micro-endmilling process using response surface methodology. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 56, n. 1, p. 177–185, 2011.

NEMATI, F.; CAVÉ, G. N.; COUVREUR, P. Lyophilization of substances with low water permeability by a modification of crystallized structures during freezing. **Assoc. Pharm. Galenique Ind.**, v. 3, p. 487–493, 1992.

NEWA, M. et al. Enhanced dissolution of ibuprofen using solid dispersion with poloxamer 407. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 11, p. 1497–1507, 2008.

NIREESHA, G. et al. Lyophilization/Freeze Drying -An Review. **Ijntps**, v. 3, n. 4, p. 87–98, 2013.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. The Rate of Solution of Solid Substances in their Own Solutions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 19, n. 12, p. 930–934, 1897.

PALUMBO, E. Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 147–150, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.paho.org/leishmaniasis>.

PASSERINI, N. et al. Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 71–78, 2002.

PEASURA, P. Application of Response Surface Methodology for Modeling of Postweld Heat Treatment Process in a Pressure Vessel Steel ASTM A516 Grade 70. **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

PELTONEN, L.; STRACHAN, C. Understanding critical quality attributes for nanocrystals from preparation to delivery. **Molecules**, v. 20, p. 22286–22300, 2015.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339–345, 2010.

PHAM, T. T. H. et al. Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B–miltefosine-loaded nanocochleates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 224–233, jun. 2013.

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

PRANDTL, L. Über Flüssigkeitsbewegungen Bei Sehr Kleiner Reibung. **Verhandlungen des dritten internationalen Mathematiker Kongresses**, v. Heidelberg, p. 484–491, 1904.

QASIM, A. et al. Optimization of process parameters for machining of AISI-1045 steel using Taguchi design and ANOVA. **Simulation Modelling Practice and Theory**, v. 59, p. 36–51, 2015.

QIAN, M.-B.; ZHOU, X.-N. Global burden on neglected tropical diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1113–1114, 2016.

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

RAMOS, A. P. Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. In: LAMAS, D. G. et al. (Eds.). . **Nanocharacterization Techniques**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 337.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

RETAMAL MARÍN, R. R.; BABICK, F.; HILLEMANN, L. Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 516–521, nov. 2017.

RODRÍGUEZ-SPONG, B. et al. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241–274, 2004.

ROMERO, G. B. et al. Development of cationic nanocrystals for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 215–222, out. 2016.

ROMERO, G. B.; KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. **International journal of pharmaceutics**, v. 501, n. 1–2, p. 236–44, 30 mar. 2016.

SAETTONE, M. F. et al. Solubilization of tropicamide by poloxamers: physicochemical data and activity data in rabbits and humans. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43, n. 1–2, p. 67–76, 1988.

S MANAGOLI RAGHAVENDRA, V. K. N.; RAMARAO, N.; MUCHANDI, I. S. Crosslinked chitosan hydrogel matrix tablets for controlled release of gabapentin. **Farmacia**, v. 60, n. 2, p. 272–286, 2012.

SANTOS, K. S. C. R. DOS; MATOS, J. R.; FERREIRA, E. I. **DESENVOLVIMENTO DE FILMES À BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO TÓPICA PROLONGADA DE NITROFURAL: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**. Congresso Brasileiro de Polímeros, v.10, 2009, Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. 2009. Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/1445.pdf>>

SEARLES, J. A.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine Tg' pharmaceutical lyophilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 7, p. 872–887, 2001.

SERAFIM, E. O. P. et al. Pharmacokinetics of hydroxymethylnitrofurazone, a promising new prodrug for chagas' disease treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013.

SHAH, T. J. et al. Process optimization and characterization of poloxamer solid dispersions of a poorly water-soluble drug. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E1–E7, 2007.

SHARMA, O. P.; PATEL, V.; MEHTA, T. Design of experiment approach in development of febuxostat nanocrystal: Application of Soluplus® as stabilizer. **Powder Technology**, v. 302, p. 396–405, 2016.

SHEGOKAR, R.; MÜLLER, R. H. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1–2, p. 129–139, 2010.

SHIN, S.; CHO, C. Physico chemical characterization of piroxicam-poloxamer solid dispersions. **Pharm Dev Technol.**, v. 2, n. 4, p. 403–407, 1997.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, 2012.

SKINNER, L. M.; SAMBLES, J. R. The Kelvin Equation - A Review. **Journal of Aerosol Science**, v. 3, n. 3, p. 199–210, 1972.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.

SPEAKMAN, S. A. Basics of X-Ray Powder Diffraction. **Basics of X-Ray Powder Diffraction**, n. 617, p. 1–97, 1900.

TANG, X.; PIKAL, M. J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 191–200, 2004.

TANIGUCHI, N.; OTHERS. On the basic concept of nanotechnology. **Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering**, p. 18–23, 1974.

THOMSON, W. On the Equilibrium of Vapour at a Curved Surface of Liquid. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, v. 7, p. 63–68, 1872.

TOMA, H. E. **Nanotecnologia molecular - materiais e dispositivos**. v. 6 ed. São Paulo: Blucher, 2016.

TOZIOPOULOU, F. et al. Production of aprepitant nanocrystals by wet media milling and subsequent solidification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, n. 2, p. 324–334, 2017.

TRINH, T. K.; KANG, L. S. Response surface methodological approach to optimize the coagulation-flocculation process in drinking water treatment. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 7, p. 1126–1135, 2011.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, F. AND D. A. **Draft guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/%0AGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/%0AUUCM070246.pdf>>.

UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**, 2015.

VARSHOSAZ, J. et al. Dissolution enhancement of gliclazide using in situ micronization by solvent change method. **Powder Technology**, v. 187, n. 3, p. 222–230, 2008.

VIJAYAKUMAR, S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 181, p. 95–104, maio 2018.

VON HELMHOLTZ, R. Untersuchungen über Dämpfe und Nebel, besonders über solche von Lösungen. **Annalen der Physik und Chemie**, v. 263, n. 4, p. 508–543, 1886.

WANG, Y. et al. Development and in vitro evaluation of deacety mycoepoxydiene nanosuspension. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 2, p. 189–197, 2011.

WHO TECHNICAL REPORT SERIES 949. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

WILL, G. **Powder diffraction: The rietveld method and the two stage method to determine and refine crystal structures from powder diffraction data**. [s.l.: s.n.].

WORLD HEALTH ASSEMBLY WHA 66.12. **Neglected tropical diseases Prevention, control, elimination and eradication**, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Clinical forms of the leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/index1.html>. Acesso em: 10 dez. 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 18 nov. 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, v. 91, n. 22, p. 287–96, 2016c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Visceral leishmaniasis: WHO publishes validation document as countries approach elimination**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/Visceral_leishmaniasis_WHO_publication_validation_document/en/>. Acesso em: 10 dez. 2016d.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

WYLIE, C. E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: Topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 1, p. 19–27, nov. 2014a.

WYLIE, C. E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 1, p. 7–18, nov. 2014b.

YONG, C. S. et al. Enhanced rectal bioavailability of ibuprofen in rats by poloxamer 188 and menthol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 169–176, 2004.

YUE, P. et al. The importance of solidification stress on the redispersibility of solid nanocrystals loaded with harmine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, n. 1–2, p. 107–115, mar. 2015.

YUE, P. F. et al. Study on formability of solid nanosuspensions during nanodispersion and solidification: I. Novel role of stabilizer/drug property. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 269–277, 2013.

ZHANG, X. et al. Preparation and solidification of redispersible nanosuspensions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2166–2176, 2014.

ANEXO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 9381916/1 - Debora Soares Souza Marins

Email:	debora_marins@usp.br
Data de Nascimento:	20/04/1990
Cédula de Identidade:	RG - 2630276-4 - AM
Local de Nascimento:	Estado do Rio de Janeiro
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2016

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	25/07/2016
Início da Contagem de Prazo:	25/07/2016
Data Limite para o Depósito:	25/01/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Nádia Araci Bou Chacra - 25/07/2016 até o presente. Email: chacra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 25/07/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 09/08/2017
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 25/07/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 01/05/2018 19:59:57

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 9381916/1 - Debora Soares Souza Marins

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMF5866-4/2	Tópicos Avançados em Farmacologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/08/2016	15/11/2016	30	2	88	A	N	Concluída
FBF5805-2/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	11/08/2016	19/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/7	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	11/08/2016	23/11/2016	45	3	80	A	N	Concluída
FBF5807-1/2	Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Aplicações no Desenvolvimento de Formulações Farmacêuticas	05/10/2016	26/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5820-1/2	Segurança do Paciente no Uso de Medicamentos	06/03/2017	19/03/2017	60	4	89	C	N	Concluída
FBF5704-6/5	Análise Espectrométrica de Fármacos	06/03/2017	18/06/2017	150	10	75	B	N	Concluída
FLM5577-1/1	Redação Científica em Inglês com Foco na Publicação Internacional: do Texto ao Contexto (Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas - Universidade de São Paulo)	16/03/2017	17/05/2017	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25
Estágios:		27
Total:	0	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 01/05/2018 19:59:57

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 9381916/1 - Debora Soares Souza Marins

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
1231705	Nádia Araci Bou Chacra	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 01/05/2018 19:59:57

Débora Soares Souza Marins Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8297705492890411>

Última atualização do currículo em 29/12/2017

Resumo informado pelo autor

Farmacêutica, formada pela Universidade Paulista (2016). Atualmente sou aluna do mestrado de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Débora Soares Souza Marins

Dados pessoais

Filiação Marcio Antonio Souza Marins e Claudia Soares Souza Marins

Nascimento 20/04/1990 - Rio de Janeiro/RJ - Brasil

Carteira de
Identidade 26302764 SSP - AM - 10/07/2009

CPF 111.164.017-38

Passaporte 142035

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Nanocristais de Hidroximetilnitrofurais: preparação, caracterização físico-química e avaliação da atividade "in vitro" anti-leishmania.
Orientador: Nádia Araci Bou Chacra
- 2012 - 2016** Graduação em Farmácia.
Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil
Título: Panorama da regulamentação de radiofármacos: Brasil e Europa
Orientador: Vinicius Martins Dias Batista
- 2009 - 2011** Graduação em Processos Químicos.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, IFAM, Manaus, Brasil
- 2008 - 2009** Ensino Profissional de nível técnico em Química.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, IFAM, Manaus, Brasil
- 2005 - 2007** Ensino Médio (2o grau).
Escola Estadual Professor Waldo Fricke de Lyra, WALDOCKE, Brasil

Formação complementar

- 2016 - 2017** Assuntos Regulatórios em Vigilância Sanitária de Produtos para Saúde. . (Carga horária: 60h).
Instituto Racine, IR, Brasil
- 2016 - 2017** Farmacologia Aplicada ao Processo de Uso de Medicamentos. . (Carga horária: 80h).
Instituto Racine, IR, Brasil
- 2016 - 2016** Gestão de Projetos e Inovação para a Indústria Farmacêutica e Cosmética. . (Carga horária: 48h).
Instituto Racine, IR, Brasil
- 2016 - 2016** Boas Práticas de Fabricação na Indústria Farmacêutica. . (Carga horária: 32h).
Instituto Racine, IR, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Cálculo de Medicação. (Carga horária: 6h).
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, São Paulo, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Farmacovigilância. (Carga horária: 3h).
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, São Paulo, Brasil
- 2015 - 2015** Extensão universitária em Pesquisa e Inovação em Fármacos e Medicamentos. (Carga horária: 30h).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Proteção Solar e Fotoprotetores e suas bases cosméticas. (Carga horária: 30h).
Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Treinamento em Radioproteção. (Carga horária: 8h).
Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo, CTMSP, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Paulista - UNIP

Vínculo institucional

- 2014 - 2015** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
A monitoria na disciplina de Química Analítica com carga horária de 224 horas, possibilitou a experiência da vida acadêmica promovendo a integração, a participação e desenvolvimento da disciplina do curso, além de treinamento em atividades didáticas e o desenvolvimento acadêmico, entre outros benefícios profissionais.
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
A Monitoria na disciplina de Química Orgânica com carga horária de 91 horas, possibilitou a experiência da vida acadêmica promovendo a integração, a participação e desenvolvimento da disciplina do curso, além de treinamento em atividades didáticas e o desenvolvimento acadêmico, entre outros benefícios profissionais.
- 2013 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
A Monitoria na disciplina de Física Aplicada com carga horária de 64 horas, possibilitou a experiência da vida acadêmica promovendo a integração, a participação e desenvolvimento da disciplina do curso, além de treinamento em atividades didáticas e o desenvolvimento acadêmico, entre outros benefícios profissionais.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação

1. DARIO, MICHELLI F.; OLIVEIRA, FERNANDA F.; **MARINS, DEBORA S.S.**; BABY, ANDRÉ R.; VELASCO, MARIA V.R.; LOBENBERG, RAIMAR; BOU-CHACRA, NADIA A. Synergistic photoprotective activity of nanocarrier containing oil of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex. Martius ζ Arecaceae. INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS. **8**, 2018.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **2017 AAPS Annual Meeting and Exposition**, 2017. (Congresso)
Hydroxymethylnitrofurazone Nanocrystals (NFOH): A Promising Therapeutic Approach in the Treatment of Leishmaniasis.
2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP**, 2017. (Simpósio)
HYDROXYMETHYLNITROFURAL NANOCRYSTALS (NFOH): TOWARDS AN EFFECTIVE AND INNOVATIVE THERAPY FOR THE TREATMENT OF LEISHMANIASIS.

Organização de evento

1. **MARINS, D. S. S.**
XIII Encontro científico de Farmácia, 2013. (Feira, Organização de evento)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 01/05/2018 às 08:55:06.