



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**TALYSSON SILVA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE  
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE CUMARINA VISANDO  
O DESENVOLVIMENTO DE NANOFÁRMACO**

**FORTALEZA**  
**2016**

TALYSSON SILVA DE ALMEIDA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE CUMARINA VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE NANOFÁRMACO

Monografia apresentada ao Curso de  
Farmácia, da Faculdade de Farmácia,  
Odontologia e Enfermagem da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial para  
a obtenção do Título de Farmacêutico

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne  
Almeida Moreira Leal  
Coorientadora: Ma. Elizama Shirley Silveira

FORTALEZA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A451d Almeida, Talysson Silva de.

Desenvolvimento, caracterização e estabilidade de carreadores lipídicos nanoestruturados de cumarina visando o desenvolvimento de nanofármaco / Talysson Silva de Almeida. – 2016.  
45 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

Coorientação: Profa. Ma. Elizama Shirley Silveira.

1. Carreadores lipídicos. 2. cumarina. 3. caracterização. 4. estabilidade. I. Título

---

CDD 615

TALYSSON SILVA DE ALMEIDA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE CUMARINA VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE NANOFÁRMACO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Farmacêutico.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)

UFC

---

Dra. Bianca Oliveira Louchard

UFC

---

Dr. Diogo dos Santos Miron

UFC

À minha família e amigos que me  
acompanharam nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edleusa e Tarcisio, e meus irmãos, Denise e Thiago, pelo apoio constante em todos os momentos e o apoio a minha educação, de todas as maneiras.

À minha orientadora, Kalyne Leal, pela oportunidade de fazer parte deste grupo de trabalho que me proporcionou crescimento profissional e pessoal, além do apoio constante na vida acadêmica.

À minha coorientadora, Elizama Silveira, que mais do que isto mostrou-se amiga para todos os momentos, me ajudando tanto nas pesquisas quanto em tudo que fosse necessário. ☺

Aos colegas de laboratório, que foram meus companheiros durante muitos anos, compartilhando momentos de dificuldades e também de descontração, sempre fazendo com que tudo fosse mais leve.

Aos meus amigos Larissa Uchôa, Emanuela Diniz, Hojânia Moreira, Danilo Galvão, Ravena Cajado, Luri Sasahara, Ana Virgínia, Laurício Daybson e tantos outros, que durante essa jornada compartilharam todos os momentos mais que especiais da vida acadêmica comigo, e também à Maria Germana, Tamara Rodrigues, Yugo Martins e Vanessa lemos que foram meus companheiros de graduação quando os outros já alçavam novos voos, com vocês foi tudo mais fácil.

Aos amigos que fiz no “velho mundo”, em especial ao *Fox Team* (Ananda Sá, Erika Feltrin, Matheus de Brito e Olivia Viana), Luma Barreto e Annelise Serra (que é torta mas eu amo assim mesmo) por terem compartilhado essa grande aventura comigo.

À Equipe diamante (Emanuel Victor e Bia Lourenço) pelo apoio e descontração nesta reta final e por deixarem claro que Vai Dar Certo.

À Universidade Federal do Ceará e todo o seu corpo docente, que fazem o seu melhor para preparar profissionais competentes e éticos para o mercado de trabalho e para a vida.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“A vida é como andar de bicicleta, para manter o equilíbrio, você deve se manter em movimento.”

Albert Einstein.

## RESUMO

A cumarina (C) é um composto presente em diversas plantas medicinais típicas da região nordeste e possui variadas atividades farmacológicas comprovadas, como a antiinflamatória e antinociceptiva. No entanto, apresenta pronta absorção e rápido metabolismo, características que podem dificultar o desenvolvimento de formulações farmacêuticas a partir dessa molécula. Assim, o encapsulamento da C e uso de formulações com liberação controlada pode constituir uma alternativa para superar os problemas apresentados na utilização da mesma. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e acompanhar a estabilidade de um Carreador Lipídico Nanoestruturado de C (CLNC). Para isso, foram produzidas duas formulações com diferentes concentrações de fase lipídica (5% e 10%) através da técnica de homogeneização em alta pressão a quente utilizando Precirol ATO5® e Miglyol 812® como lipídios formadores da matriz. O CLNC foi caracterizado quanto ao diâmetro (D), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), pH, teor e Eficiência de Encapsulação (EE). As suspensões obtidas tiveram amostras coletadas em diferentes ciclos de homogeneização (1º, 3º e 5º ciclos), para que fosse avaliada a influencia do numero de ciclos na estabilidade, acompanhada por um período de 90 dias. Logo após a produção, todas as amostras apresentaram aspecto homogêneo e sem sinais de instabilidade, no entanto a partir do 15º dia as amostras submetidas a apenas um ciclo (1C) e aquela com maior percentagem de fase lipídica e três ciclos apresentaram precipitados. Apesar de outras formulações também se manterem estáveis, o CLNC-10% 5C foi selecionado para seguir com a caracterização por conter maior concentração de C e apresentou D inicial de  $176,9 \pm 2,0$  nm com aumento para  $189,1 \pm 2,6$ . O PDI manteve-se em estreita faixa de distribuição (menor que 0,2), o pH levemente ácido permaneceu estável (em torno de 4,77), o teor inicialmente de 95,5% sofreu um pequeno decréscimo com o tempo de armazenamento, chegando a 85,8%, e a EE mostrou-se constante durante os dias de estudo (aproximadamente 65%). Diante do exposto foi possível observar que as formulações se mantiveram estáveis ao se empregar um maior numero de ciclos de homogeneização, com reduzida perda de C e EE constante. A CLNC-105C apresentou características tecnológicas de interesse, além de estabilidade, mostrando-se um produto com potencial para formulação de um nanofármaco com características farmacocinéticas favoráveis para uso terapêutico.

Palavras-chave: Cumarina, carreadores, estabilidade.

## ABSTRACT

The coumarin (C) is a compound present in many medicinal plants typical of the northeastern region and has many proven pharmacological activities such as anti-inflammatory and antinociceptive. However, it has ready absorption and fast metabolism, characteristics that can hamper the development of pharmaceutical formulations from this molecule. Thus, encapsulation of C and use of formulations with controlled release can provide an alternative to overcome the problems in using it. Given that, the objective of this study was to develop, characterize and monitor the stability of a nanostructured lipid carrier C (CLNC). To this end, two formulations were made with different concentrations of lipid phase (5% to 10%) by high pressure homogenization in hot-technique using Precirol ATO5® and Miglyol 812® as the matrix forming lipids. The CLNC was characterized by the diameter (D), polydispersity index (PDI), the zeta potential (PZ), pH, content and encapsulation efficiency (EE). The suspensions obtained had samples collected at different homogenization cycles (1, 3 and 5 cycles), to be evaluated the influence of the number of cycles in the stability, accompanied by a period of 90 days. Right after the production, all samples showed homogeneous appearance and no signs of instability, however, from the 15th day, samples submitted for only one cycle (1C) and the one with the highest percentage of lipid phase and three cycles had precipitated. Although other formulations also remain stable, the CLNC-10% 5C was selected to continue with the characterization because of its higher concentrations of C and showed initial D of  $176.9 \pm 2.0$  nm with an increase to  $189.1 \pm 2.6$ . PDI remained in narrow distribution range (less than 0.2), the slightly acidic pH remained stable (around 4.77), the initial content 95.5% experienced a small decrease with storage time, achieving 85.8%, and EE was constant during the study days (approximately 65%). Given the above mentioned it was observed that the formulations were stable when employed a larger number of homogenization cycles, with low loss of C and constant EE. The CLNC-105C presented technological characteristics of interest and stability, being a product with potential for development of a nanomedicine with favorable pharmacokinetic characteristics for therapeutic use.

Key-words: Coumarin, carriers, stability.

## **LISTA DE FIGURAS**

|           |                                                              |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Representação esquemática de uma NLS e de um CLN.....</b> | <b>18</b> |
| <b>2.</b> | <b>Estrutura química da cumarina.....</b>                    | <b>19</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

|           |                                                                                                             |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizadas na pesquisa.....</b> | <b>25</b> |
| <b>2.</b> | <b>Caracterização das formulações quanto ao diâmetro.....</b>                                               | <b>33</b> |
| <b>3.</b> | <b>Caracterização das formulações quanto ao PDI. ....</b>                                                   | <b>35</b> |
| <b>4.</b> | <b>Caracterização das formulações quanto ao potencial zeta.....</b>                                         | <b>37</b> |
| <b>5.</b> | <b>Caracterização das formulações quanto ao pH.....</b>                                                     | <b>38</b> |
| <b>6.</b> | <b>Caracterização da formulação CLNC 10% 5C quanto ao teor e eficiência de encapsulação.....</b>            | <b>40</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|      |                                                 |
|------|-------------------------------------------------|
| BV   | Balão volumetrico                               |
| C    | Cumarina                                        |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência        |
| CLN  | Carreador Lipídico Nanoestruturado              |
| CLNB | Carreador Lipídico Nanoestruturado Branco       |
| CLNC | Carreador Lipídico Nanoestruturado com Cumarina |
| D    | Diâmetro                                        |
| DP   | Desvio padrão                                   |
| EE   | Eficiencia de encapsulação                      |
| NLS  | Nanopartícula Lipídica Sólida                   |
| PDI  | Índice de polidispersão                         |
| PE   | Percentual de Encapsulação                      |
| ZP   | Potencial zeta                                  |

## SUMÁRIO

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                            | 14 |
| 1.1 Considerações Gerais                                       | 14 |
| 1.2 Sistemas de liberação de fármacos                          | 14 |
| 1.3 Nanotecnologia e nanomedicina                              | 15 |
| 1.4 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados                     | 17 |
| 1.5 Cumarina                                                   | 18 |
| 1.6 Excipientes                                                | 20 |
| 1.6.1 <i>Precirol® ATO5</i>                                    | 20 |
| 1.6.2 <i>Miglyol® 812</i>                                      | 21 |
| 1.6.3 <i>Poloxamer P188</i>                                    | 21 |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b>                                         | 23 |
| <b>3 OBJETIVOS</b>                                             | 24 |
| 3.1 Objetivo geral                                             | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos                                      | 24 |
| <b>4 MATERIAIS</b>                                             | 25 |
| 4.1 Drogas, reagentes e padrões de trabalho                    | 25 |
| 4.2 Equipamentos                                               | 25 |
| <b>5 MÉTODOS</b>                                               | 26 |
| 5.1 Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado      | 26 |
| 5.2 Caracterização do CLNC                                     | 26 |
| 5.2.1 <i>Avaliação macroscópica</i>                            | 26 |
| 5.2.2 <i>Diâmetro das partículas e Índice de Polidispersão</i> | 26 |
| 5.2.3 <i>Potencial zeta</i>                                    | 27 |
| 5.2.4 <i>pH</i>                                                | 27 |
| 5.2.5 <i>Teor do CLNC</i>                                      | 27 |
| 5.2.6 <i>Eficiência de Encapsulação</i>                        | 28 |
| 5.3 Estudo de Estabilidade dos CLNC                            | 28 |
| 5.4 Análise estatística                                        | 29 |
| <b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                | 30 |
| 6.1 Avaliação macroscópica                                     | 30 |
| 6.2 Diâmetro das partículas                                    | 31 |

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6.3 Índice de polidispersão .....</b>                     | <b>34</b> |
| <b>6.4 Potencial zeta .....</b>                              | <b>36</b> |
| <b>6.6 Teor de C e eficiência de encapsulação (EE) .....</b> | <b>39</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>                                     | <b>41</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

Nos últimos anos o desenvolvimento de novas drogas tem sido insuficiente para garantir o avanço da farmacoterapia de muitas doenças. Várias substâncias promissoras que alcançaram excelentes efeitos *in vitro* acabaram obtendo resultados insatisfatórios em estudos *in vivo* ou etapas clínicas, tendo como principais causas apontadas para esse fenômeno o rápido metabolismo, baixa solubilidade, e alta toxicidade das drogas analisadas. (FANG, 2013). Paralelamente ao desenvolvimento de novos fármacos, a habilidade de vetorizar agentes terapêuticos para sítios de ação específicos também tem se tornado um dos objetivos da medicina moderna (SHAPOSHNIK; TAMANOI, 2013).

Uma abordagem promissora para o controle das dificuldades encontradas e obtenção das características desejadas é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos confiáveis. Sistemas de liberação controlada podem aumentar a eficácia de uma droga através do controle espaço-temporal da distribuição da mesma dentro do organismo (FANG, 2013; FISHER, KHADEMHOSEINI, PEPPAS, 2010).

### 1.2 Sistemas de liberação de fármacos

Historicamente as formulações farmacêuticas eram desenvolvidas da forma mais simples possível na qual pudessem atingir um efeito no tratamento de uma doença alvo. Antes de 1950 todos os medicamentos na forma de cápsulas e comprimidos eram desenvolvidos para liberação imediata do fármaco após contato com a água, o primeiro modelo de liberação controlada veio a surgir em 1952 com o desenvolvimento da tecnologia Spansule® por Smith Beecham, permitindo o controle da cinética da liberação do fármaco em uma razão predeterminada. A partir daí o campo do desenvolvimento dos sistemas de liberação sofreu rápida expansão, resultando na entrada de diversos fármacos novos no mercado. (YUN; LEE; PARK, 2015).

Sistemas de liberação de fármacos se referem a sistemas, tecnologias, abordagens e formulações para o transporte de compostos farmacêuticos através do organismo para atingir seguramente o efeito desejado (JONATHAN; KARIM, 2016). Esses sistemas conseguem corrigir ou melhorar problemas encontrados em sistemas de liberação imediata, tais como: 1) baixa solubilidade, através do fornecimento de ambientes tanto lipofílicos

quanto hidrofílicos, por exemplo; 2) rápido metabolismo *in vivo*, provocando a liberação controlada do fármaco em doses menores e evitando a rápida degradação de todo o fármaco administrado simultaneamente; 3) falta de seletividade para o tecido-alvo, através de vetorização de partículas, e farmacocinética desfavorável, por meio da modificação do tempo de *clearance* da droga no organismo. (ALLEN; CULLIS, 2004).

Os trinta anos subsequentes ao lançamento do Spansule<sup>®</sup> caracterizaram a primeira geração de desenvolvimento de sistemas de liberação, marcada pela produção de inúmeros sistemas orais e transdérmicos que rapidamente atingiram o mercado. A segunda geração teve resultados menos expressivos, por começar a tratar com sistemas mais complexos que sofriam maior interação com as barreiras biológicas e buscavam atingir objetivos como formulações de depósito que sustentassem a liberação de fármacos por até um mês. Já nos últimos anos da segunda geração iniciaram-se os estudos com nanopartículas para o carregamento de fármacos, especialmente para ação direcionada em células tumorais, que apesar de bem sucedidas em testes iniciais, falharam em testes clínicos. A terceira geração de desenvolvimento, período iniciado em 2010 e que se estende até os dias correntes, é marcado pelo desenvolvimento de formulações que possam superar as barreiras biológicas e obter uma maior eficiência que aquelas da segunda geração (PARK, 2015; YUN; LEE; PARK, 2015).

A tecnologia que atualmente tem contribuído o campo dos sistemas de liberação e que melhor atinge o objetivo de contornar os problemas citados é a nanotecnologia, o que se deve especialmente à versatilidade das nanopartículas e sua capacidade de aprimorar o transporte de princípios ativos podendo realiza-lo através da adsorção, encapsulação ou ligação covalente dos ativos com a nanopartícula, caracterizando-os como excelentes sistemas de liberação. (SURI *et al.*, 2015; LOCKMAN *et al.*, 2002),

### 1.3 Nanotecnologia e nanomedicina

A nanotecnologia caracteriza-se como o desenvolvimento e processamento de materiais, dispositivos e sistemas nas quais as estruturas encontram-se em escala nanométrica, permitindo a manipulação de átomos e moléculas individualmente com precisão extraordinária, através da utilização de metodologias de microscopia eletrônica e de tunelamento (CORBETT *et al.*, 2000). Os materiais obtidos com uso de nanotecnologia podem ser empregados em diversas áreas da ciência, desde a produção de corantes até em tecnologias espaciais e desenvolvimento de novos tratamentos médicos que explorem suas características promissoras (KEIPER, 2003).

A utilização de nanotecnologia no campo da medicina pode ser definida como nanomedicina e inclui desde sistemas de vetorização de fármacos a nanopartículas que podem ser ativadas externamente ao atingir o sítio de ação (SURI *et al.*, 2015). Estes podem ser descritos como sistemas de liberação de drogas em escala nanométrica, geralmente menores que 500 nm, embora não haja um consenso e alguns pesquisadores considerem uma faixa mais estreita de 0,1 a 200 nm (LANGER, 1998; DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2006).

A produção de nanofármacos auxilia no controle de desvantagens farmacocinéticas através da alteração no perfil de distribuição e liberação de drogas, buscando trazer as melhorias apontadas aos sistemas de liberação controlada, como as relacionadas à solubilidade, permeabilidade através do epitélio, metabolismo enzimático, complexação com metais e características de transporte. Estas vantagens podem resultar na melhora do cuidado ao paciente através de uma maior aceitação ao tratamento, resultante da manutenção de concentrações efetivas de ativo quando comparados aos sistemas de liberação imediata, bem como pela redução de efeitos colaterais e melhoramento do esquema posológico. (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2006; PARK, 2015).

Os nanossistemas carreadores de fármacos amplamente utilizados na produção de nanofármacos são divididos essencialmente em dois grupos, os sistemas poliméricos e lipídicos. Os poliméricos consistem em partículas sólidas coloidais compostas por polímeros sintéticos biodegradáveis e não biodegradáveis, semissintéticos e naturais, enquanto os lipídicos abrangem dentre outros os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados. Dentre as vantagens relacionadas à utilização de partículas lipídicas em detrimento das poliméricas podemos citar a não utilização de solventes orgânicos em sua produção, reduzindo custos e possível presença de solventes residuais; emprego de lipídios biocompatíveis, que podem apresentar menor citotoxicidade quando comparada aos polímeros, e a possibilidade de produção em larga escala empregando fácil escalonamento (FANG, 2013).

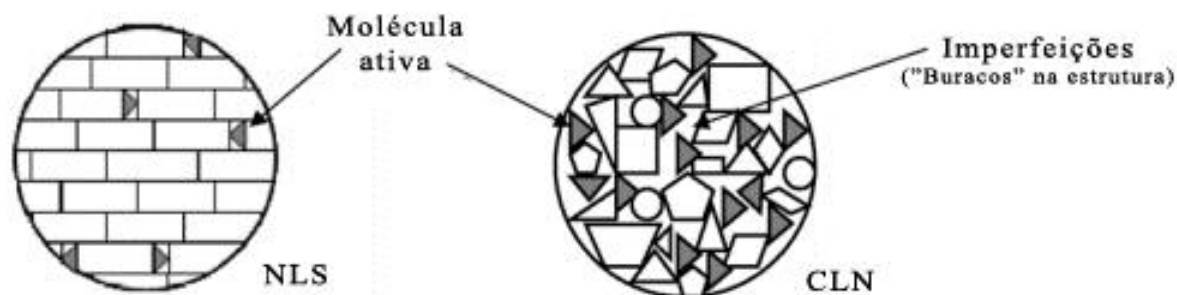
## 1.4 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

No grupo dos nanossistemas lipídicos podem ser citados a nanoemulsão, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). A nanoemulsão consiste no emprego de tensoativos para a formação de micelas de tamanho nanométrico contendo um núcleo lipídico líquido, enquanto que as NLS e os CLN tratam-se de uma evolução da nanoemulsão resultando em partículas que apresentam uma matriz sólida à temperatura ambiente. Cada uma das formas citadas possui vantagens e desvantagens, a nanoemulsão é a que menos oferece proteção ao fármaco quanto a reações de degradação, o que resultou no aumento da utilização dos nanossistemas lipídicos sólidos para o desenvolvimento de novos produtos (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). As NLS apresentam uma matriz lipídica cristalina que consegue acomodar menos fármaco no seu interior, podendo sofrer com fenômenos como a transição polimórfica que resultam na expulsão do ativo da matriz. Devido a isto os CLN estão sendo mais empregados para o desenvolvimento de nanossistemas, graças a sua capacidade de contornar pelo menos em parte estes problemas. (FANG 2013)

As nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados compartilham diversas características: ambos apresentam um núcleo ou matriz constituído de um lipídeo ou combinação de lipídios que se apresentam sólidos em temperatura ambiente ou temperatura corporal no qual o princípio ativo fica aprisionado e são produzidas através das mesmas técnicas de produção. A principal diferença existente entre os dois sistemas baseia-se nos excipientes utilizados para a formação da matriz lipídica, que é formada apenas por lipídios sólidos à temperatura ambiente nas NLS enquanto que a dos CLN é formada por uma combinação de lipídios líquidos e sólidos à temperatura ambiente (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

O emprego de lipídios líquidos na produção dos CLN foi considerado uma evolução em relação às NLS, pois a utilização dos mesmos provoca alterações na matriz inteiramente cristalina encontrada nas NLS em decorrência da utilização de lipídios líquidos, gerando uma matriz com imperfeições e com maior capacidade de incorporação da droga (Figura 1), aumentando a eficiência de encapsulação e o tempo de vida de prateleira do produto, características muito desejadas quando se almeja o desenvolvimento de um novo medicamento para o mercado. (MÜLLER *et al.*, 2007).

Figura 1 - Representação esquemática de uma NLS com sua matriz cristalina quase perfeita formada por moléculas idênticas e de um CLN com uma matriz com várias imperfeições que resultam em uma maior capacidade de carga.



Fonte: Adaptado de Müller *et al.*, 2007

Após a seleção do carreador lipídico nanoestruturado como sistema de liberação a ser trabalhado, especialmente por sua maior biocompatibilidade quando comparado às nanopartículas poliméricas e maior eficiência de encapsulação em relação às nanopartículas lipídicas sólidas, iniciou-se a seleção dos lipídios a serem utilizados na referida formulação, para isso levou-se em conta a solubilidade do princípio ativo nos mesmos. Podem ser utilizados lipídios naturais, como o ácido oleico, ou sintéticos, como os Gelucires® (FANG 2013). A cumarina, sendo um composto orgânico de estrutura aromática, apresenta-se solúvel em óleos e gorduras, tornando-se apta para o carregamento na matriz dos CLN. Foram selecionados então o Precirol ATO5 e o Miglyol 812 para a constituição da formulação.

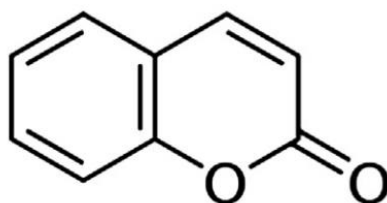
## 1.5 Cumarina

A cumarina é uma das substâncias que tem sido estudadas pelo Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC), nosso grupo em nosso laboratório, em parceria com o Laboratório de Parasitologia (Medicina – UFC) e foi selecionada em decorrência das correntes pesquisas de sua ação leishmanicida. A associação de tecnologia a esta molécula poderá resultar em um aprimoramento dos efeitos obtidos com a sua utilização, tornando-se de grande interesse para o desenvolvimento de uma formulação com características tecnológicas e biológicas favoráveis para uso clínico.

A cumarina (1,2-benzopirona) é um composto orgânico heterocíclico aromático naturalmente encontrado em diversos vegetais utilizados comumente na alimentação, como morango e cenoura (GARRARD, 2014), e em espécies como a *Justicia pectoralis* e *Amburana cearenses*, popularmente conhecidas como Chambá e Cumaru, respectivamente, e

tradicionalmente utilizadas na medicina popular, possuindo comprovada atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e broncodilatadora (LEAL 1995, 2000).

Figura 2: Estrutura química da cumarina



Fonte: Garrard, 2014

Se apresentando como um pó branco cristalino, a maioria da cumarina usada comercialmente é derivada do salicilaldeído, possuindo odor característico semelhante ao de baunilha e com ponto de fusão entre 68 e 70°C, massa molecular de 146,15g/gmol, ponto de ebulição entre 297 °C – 299°C. É volátil e levemente solúvel em água, sendo livremente solúvel em álcool, cloroformio, éter dietílico e em óleos (LAKE, 1999; RODRIGUES, 2005), o que possibilita a sua incorporação na matriz lipídica dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

Com relação ao uso, é frequentemente utilizada em cosméticos e produtos de limpeza por possuir fragrância agradável e capacidade de mascarar odores, nos perfumes assume também a função de estabilizador de fragrância. Do ponto de vista farmacológico, a cumarina possui atividades anti-inflamatória e antinociceptiva e sua classe química apresenta atividades anticoagulante e antiagregante plaquetária. Atualmente é utilizada no tratamento de linfedemas em decorrência da sua capacidade de melhorar a circulação venosa e linfática (LEAL *et al*, 1997; GARRARD, 2014), estando disponível comercialmente em vários produtos, como no Venalot® e no Varicoss®, onde se apresenta em associação com a troxerrutina.

A cumarina passa por rápida absorção pela pele e pelo intestino, porém, sua farmacocinética sofre alterações de acordo com a via de exposição. A cumarina absorvida por via tópica evita o metabolismo de primeira passagem hepático, enquanto por via oral tem uma

absorção vinte vezes maior quando administrada em bolus em relação à mesma quantidade administrada juntamente com a dieta (GARRARD, 2014).

Depois que atinge a circulação sanguínea, passa primeiro pelos pulmões onde grande parte é exalada e o restante sofre metabolismo por hidroxilação, gerando metabolitos hidroxilados, majoritariamente a 7-hidroxicumarina, e este processo é dependente da capacidade metabólica do órgão alvo e das concentrações da substância no mesmo (LAKE, 1999; GARRARD, 2014).

A 1,2-benzopirona não apresenta evidências de acumulação nos tecidos e o metabolito majoritário é rapidamente eliminado pela urina nos humanos, diferentemente do que ocorre em ratos e coelhos, onde há uma maior excreção biliar. A metabolização da cumarina é altamente modificada de acordo com a espécie, em ratos por exemplo sofre metabolização hepática, sendo convertida em 3,4-epóxido cumarina, sofrendo rápido rearranjo para o composto tóxico *o*-hidroxiacetaldeído (GARRARD, 2014).

A volatilidade da cumarina, sua rápida absorção e metabolismo se tornam obstáculos no desenvolvimento de formulações estáveis, dessa maneira, a sua incorporação em um sistema que possa reduzir sua volatilidade, aumentando sua estabilidade física e que possa controlar sua liberação, evitando que toda a cumarina seja metabolizada rapidamente torna-se um ponto chave para o desenvolvimento de produtos estáveis com farmacocinética melhorada.

## 1.6 Excipientes

### 1.6.1 *Precirol*<sup>®</sup> ATO5

O *Precirol*<sup>®</sup> ATO5 é um lipídio sólido à temperatura ambiente, caracterizado como um pó branco fino com odor característico leve, que também é conhecido como *Gelucire*<sup>®</sup> 54/02. *Gelucires* são compostos por misturas de glicerídeos e ésteres de ácidos graxos e polietilenoglicol e são representados por dois números, onde o primeiro representa a temperatura de fusão e o segundo o seu valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) (HAMDANI; MOËS; AMIGHI, 2003; AL-DHALLI, 2007).

Sendo utilizado amplamente em formulações orais como lubrificante e mascarador de sabor em comprimidos, o *Precirol*<sup>®</sup> é considerado uma substância

essencialmente não tóxica e não irritante. (ROWE 2009). Muito bem tolerado, o Precirol ATO5 não produz irritação na pele ou nos olhos e possui DL50 >6g/Kg, avaliada em ratos (GATTEFOSSÉ, 2012)

### **1.6.2 Miglyol® 812**

Trata-se de uma mistura de triglicerídeos de cadeia média, principalmente de ácidos cáprico e caprílico, apresentando-se líquido à temperatura ambiente. Apresenta coloração levemente amarelada e praticamente não possui odor ou sabor.

Os triglicerídeos são os excipientes mais utilizados em formulações de base oleosa e muito interesse tem sido demonstrado na sua utilização como veículo para drogas pouco solúveis em água. (LE BARS et al, 2015).

Largamente utilizados em preparações orais e parenterais, tanto como agente emulsionante quanto como agente nutricional em indivíduos com má absorção de gorduras, os triglicerídeos de cadeia média são considerados materiais essencialmente não tóxicos e não irritantes. (ROWE 2009) Estudos mostraram que ele é bem tolerado e não causa efeitos tóxicos, porém a administração prolongada pode provocar a elevação de triglicerídeos e de colesterol (SELLERS *et al.*, 2008).

### **1.6.3 Poloxamer P188**

Os poloxamers são copolímeros sintéticos formados por três blocos, um bloco central formado por uma cadeia hidrofóbica de polioxipropileno ladeado por dois blocos hidrofílicos de polioxietileno, adquirindo característica anfifílica, sendo solúvel tanto em água quanto em solventes orgânicos. (TANG et al, 2013)

O Poloxamer P188 especificamente possui peso molecular de 8400 Daltons com 80% de polioxietileno, tem seu uso aprovado pelo FDA como agente redutor de viscosidade no sangue antes de transfusões. É bem tolerado mesmo em exposições repetidas e suas propriedades surfactantes são muito empregadas em aplicações farmacêuticas e cosméticas,

apresentando toxicidade mínima quando aplicado em curtos períodos.(MOLOUGHNEY; WEISLEDER, 2012). Estudo duplo cego avaliando a utilização do P188 na redução da dor aguda em portadores de anemia falciforme mostrou que o mesmo é bem tolerado e não apresenta diferenças em relação ao placebo no que se trata de reações adversas. (ADAM-GRAVES *et al*, 1997)

## 2 JUSTIFICATIVA

Os avanços na descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças de impacto social, como câncer e doenças negligenciadas, tem sido um grande foco de pesquisa mundial, no entanto novas substancias esbarram em problemas como toxicidade, baixa biodisponibilidade rápido metabolismo e farmacocinética inadequada. Estes e outros aspectos podem ser superados ou minimizados por meio da nanotecnologia, com o emprego de nanossistemas que possam controlar a liberação dos ativos e protege-los da degradação (FANG, 2013). Estas melhorias também podem ser aplicadas a novos fármacos ou naqueles já utilizados na clínica, onde podem ter sua atividade melhorada e, dependendo das características alteradas, serem empregados em novas funções;

A cumarina, por tratar-se de uma molécula bioativa, encontrada em várias espécies de plantas medicinais e utilizada clinicamente no tratamento de problemas vasculares e da circulação sanguínea tornou-se objeto do presente trabalho, isso por apresentar absorção imediata e extensa metabolização no organismo, sendo rapidamente excretada. (LEAL, 1995; GARRARD, 2014). A estratégia do estudo é que essas características da cumarina podem ser atenuadas ou contornadas através da sua incorporação em CLN, uma tecnologia de sistema de liberação de fármacos inovadora e que tem sido alvo de muitos estudos para o desenvolvimento de novos medicamentos mostrando-se promissora.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e caracterizar carreador lipídico nanoestruturado de Cumarina (C), assim como avaliar sua estabilidade, contribuindo para o desenvolvimento de um nanofármaco.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver carreador lipídico nanoestruturado contendo C (CLNC) pela técnica de homogeneização em alta pressão a quente;
- Caracterizar carreador lipídico nanoestruturado contendo C (CLNC) quanto ao diâmetro (D), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), pH, teor e Eficiência de Encapsulação (EE);
- Avaliar estabilidade do CLNC por um período de 90 dias.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Drogas, reagentes e padrões de trabalho

A cumarina, molécula de estudo, foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (EUA), pureza  $\geq 99,0\%$ . Os adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizados no desenvolvimento da pesquisa estão listados na tabela 1 com respectivo fornecedor. A água foi purificada por uma sequência de destilação (Destilador Quimis<sup>®</sup>, Q341-25, Brasil) e deionização (millipore, simplicity 185, Brasil).

Tabela 1 - Adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizadas na pesquisa.

| Adjuvantes farmacêuticos e reagentes | Fornecedor                       |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Acetonitrila                         | JT Baker <sup>®</sup> , EUA      |
| Etanol (PA)                          | Vetec <sup>®</sup> , Brasil      |
| Metanol (HPLC)                       | JT Baker <sup>®</sup> , EUA      |
| Miglyol <sup>®</sup> 812             | DEG <sup>®</sup> , Brasil        |
| Poloxamer <sup>®</sup> P188          | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , EUA |
| Precirol <sup>®</sup> ATO5           | Gattefossé <sup>®</sup> , França |

### 4.2 Equipamentos

No preparo, caracterização e estudo de estabilidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados foram utilizados os seguintes equipamentos: banho-maria (modelo ALB 250C, ALBRAS<sup>®</sup>, Brasil); homogeneizador de alta pressão (modelo Nano DeBee, Bee international<sup>®</sup>, EUA); deionizador (modelo simplicity 185, MILLIPORE<sup>®</sup>, Brasil); Zetasizer Nano- ZS (Malvern Instruments<sup>®</sup>, UK); cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo Alliance 2695, Waters<sup>®</sup>, Alemanha); pipetas automáticas (Gilson<sup>®</sup>, França); agitador magnético (modelo Mag-multi, Marte<sup>®</sup>, Brasil), balança (modelo HR200, A&D, japão), pHmetro (modelo HI 221, HANNA instruments, Brasil) e centrífuga (modelo Universal 320R, Hettich, Alemanha).

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado

Os CLN foram preparados por meio da técnica de homogeneização em alta pressão a quente, uma das mais utilizadas na produção destes carreadores (FANG, 2013). Seguindo a técnica, a fase lipídica contendo o lipídio sólido (Precirol ATO5), o lipídio líquido (Miglyol® 812) e o fármaco (Cumarina) foram aquecidos a uma temperatura superior em 15°C à temperatura de fusão da cumarina (85°C), sob agitação constante até a completa dissolução, pois esta era o componente com mais alta temperatura de fusão. Em seguida, a fase aquosa constituída de água ultrapura e tensoativo (Poloxamer 188) foi aquecida à mesma temperatura (85°C) e vertida sobre a fase oleosa, ainda sob aquecimento e agitação. A suspensão obtida foi então levada ao homogeneizador de alta pressão no qual foi submetida a cinco ciclos de homogeneização e então acondicionada em frasco vedado em geladeira. Em relação à concentração da fase lipídica, foram preparadas duas suspensões (5 e 10% de fase lipídica). Ainda uma formulação branca (CLNB) foi preparada de modo semelhante sem a adição do fármaco para fins de comparação. Uma alíquota de amostra foi coletada nos ciclos 1, 3 e 5 de cada formulação para análise posterior.

### 5.2 Caracterização do CLNC

#### 5.2.1 Avaliação macroscópica

Para análise macroscópica, os principais sinais de instabilidade como cremeação, precipitação e separação de fase foram observados juntamente com outras características, como coloração e aparência geral.

#### 5.2.2 Diâmetro das partículas e Índice de Polidispersão

Os parâmetros de diâmetro das partículas (D) e o índice de polidispersão (PDI) das amostras foram obtidos utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz, também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, UK). Esse equipamento usa um feixe de luz sobre a amostra e a intensidade da luz espalhada oscila a um ritmo dependente do diâmetro das

partículas que constituem o sistema fluido tornando possível a determinação do mesmo (PATTY e FRISKEN, 2006). Já o índice de polidispersão, calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no diâmetro das partículas da amostra, já que uma polidispersividade alta indica que as partículas não estão homogêneas (ÜNER, 2006)

Para caracterização desses parâmetros, foi feita a diluição da formulação em 1 mL de água ultrapura na proporção de 1:10000. As medidas foram efetuadas a uma temperatura de 25°C. Os valores obtidos foram calculados como à média  $\pm$  desvio padrão de três medidas de cada ciclo do CLN.

### **5.2.3 Potencial zeta**

O potencial zeta das amostras foi determinado por microeletroforese doppler a laser, utilizando o equipamento Zetasizer Nano- ZS (Malvern Instruments<sup>®</sup>, UK), que aplica um campo elétrico provocando o movimento das partículas de acordo com o seu potencial zeta (MALVERN, 2013). O espalhamento de luz em fases é então utilizado para determinar este potencial, já que a variação na frequência da luz espalhada é proporcional à mobilidade eletroforética (PATTY e FRISKEN, 2006).

Para a referida determinação, foi feita a diluição da formulação em 1 mL de solução salina na proporção de 1:10000, mantendo sempre a condutividade das amostra de 70 – 90  $\mu$ Scm. As medidas foram efetuadas a uma temperatura de 25°C e os valores obtidos foram calculados como à média  $\pm$  desvio padrão de três medidas de cada ciclo do CLN.

### **5.2.4 pH**

O potencial hidrogeniônico foi determinado utilizando potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão padrão em pH 7,0 e 4,0, de acordo com instruções do fabricante. A avaliação foi realizada diretamente na suspensão.

### **5.2.5 Teor do CLNC**

O doseamento da C foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), através de método previamente desenvolvido e validado em nosso laboratório (FONSECA, 2009), na formulação com 10% de fase lipídica e submetida a 5 ciclos de

homogeneização (CLNC 10% 5C). Foram transferidos 100 µl da suspensão de CLNC para BV 25 mL, adicionados 5 mL de Etanol e completado o volume com água ultrapura. Os resultados foram expressos como percentual da concentração de C adicionada à suspensão no início da preparação.

### 5.2.6 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação visa determinar a concentração do fármaco associado intimamente ao carreador lipídico nanoestruturado em relação ao total de fármaco adicionado à preparação. A técnica utilizada para a separação do fármaco livre daquele encapsulado foi a ultrafiltração-centrifugação (MARCHAL-HEUSSLER *et al.*, 1990). Novamente foi escolhido o CLNC 10% 5C. Alíquotas de 3 mL da suspensão de CLNC foram adicionadas ao sistema de ultrafiltração da Microcon (10.000 Da, Millipore) e submetido à centrifugação (3.000 rpm) por 30 min à 25 °C. Os nanocarreadores ficaram retidos no filtro enquanto a C livre na suspensão passou para o ultrafiltrado. 100 µl deste ultrafiltrado foram retirados e diluídos em 300 µl de acetonitrila e 600 µl de água ultrapura e a quantidade do fármaco foi determinada por CLAE. Para a determinação do fármaco total, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item anterior. O percentual de encapsulação (PE) foi determinado a partir da razão entre a diferença da concentração total de C na amostra (CT) e a concentração de C livre (CL) e a concentração total, multiplicada por 100 (Equação 1).

$$PE = \frac{CT-CL}{CT} \times 100$$

(Equação 1)

### 5.3 Estudo de Estabilidade dos CLNC

Foi realizado estudo de estabilidade do CLNC. Os carreadores foram acondicionados em frascos de vidro incolor e armazenados em geladeira (até 10°C). Foi realizada a avaliação macroscópica das suspensões observando aspectos como coloração e presença de sinais de instabilidade como cremeação, precipitação ou separação de fases. Foram avaliadas as características físico-químicas, como Diâmetro, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e pH nos tempos inicial (1º dia), 15, 30, 60 e 90 dias após a preparação do

CLNC. O teor e a eficiência de encapsulação foram realizados nos tempos 30 e 60 dias após a preparação do nanosistema na formulação CLNC 10% 5C.

#### **5.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo desenvolveu e caracterizou de maneira inédita um sistema nanoparticulado de cumarina, com auxílio de um carreador lipídico nanoestruturado e foi avaliado ainda a sua estabilidade. Nesse sentido os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de Cumarina (CLNC) foram caracterizados quanto ao seu diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), pH, teor de ativo e eficiência de encapsulação. No estudo, os resultados da avaliação de estabilidade serão apresentados simultaneamente com a caracterização.

Durante o processo de desenvolvimento, foram preparados sistemas obtidos por diferentes concentrações de lipídios e número de ciclos de homogeneização. A utilização de diferentes concentrações de fase lipídica no desenvolvimento dos CLN objetivava obter uma formulação estável que comportasse uma maior concentração de ativo, pois se sabe que este estará aprisionado dentro da matriz lipídica, logo, quanto maior a concentração de lipídios formando a matriz, maior teor de ativo poderá ser encapsulado. Já a avaliação do número de ciclos buscava determinar a quantidade mínima de ciclos necessária para que a formulação se apresentasse estável, tendo em vista que um maior número de ciclos resulta em um maior tempo e custo de produção, especialmente quando se considera uma produção em larga escala. Para isso, as amostras de todos os diversos ciclos foram caracterizadas para que se pudesse observar se haveria alguma alteração entre os ciclos e se estas se manteriam estáveis.

### 6.1 Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica pôde ser observado que todas as formulações de CLNB (sem o fármaco) e CLNC (com cumarina) mostraram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso com reflexo azulado quando produzidas, independente do ciclo (1C, 3C e 5C) ou da concentração da fase lipídica (5 e 10%). Esse aspecto é decorrente do efeito Tyndall ou movimento browniano das partículas, que resulta da dispersão da luz incidente através do meio, gerando um reflexo azulado característico que ocorre em suspensões coloidais com partículas em tamanho nanométrico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002)

No decorrer do estudo de estabilidade do CLN (armazenado em geladeira até 10°C) o que se observou foi que, a partir do 15º dia, as formulações com 5% de fase lipídica submetidas a 1C de homogeneização e as com 10% submetidas a 1C e 3C apresentaram sinais

de instabilidade, caracterizada pela formação de precipitados, o que nos mostra que apenas um ciclo de homogeneização não foi suficiente para a estabilização das formulações, assim como três ciclos também não foram suficientes para as formulações com maior porcentagem lipídica. Sabendo-se que o número de ciclos representa um parâmetro importante para a estabilidade da formulação e que algumas delas exigem uma grande quantidade de ciclos, como visto em Tang *et al.* (2013) que empregou até 15 ciclos no desenvolvimento de sua formulação, logo a obtenção de formulações estáveis com cinco ciclos é um resultado bastante favorável.

Perante a instabilidade macroscópica das amostras que sofreram precipitação, as mesmas não prosseguiram para o estudo de estabilidade. As demais amostras permaneceram com aspecto leitoso com reflexo azulado assim como observado inicialmente durante os 90 dias em que se decorreu o estudo, atestando mais uma vez sua estabilidade.

## 6.2 Diâmetro das partículas

A análise do diâmetro das nanopartículas é considerada uma das mais importantes para a caracterização e acompanhamento da estabilidade das mesmas, levando em consideração que a definição de nanopartículas baseia-se essencialmente no seu tamanho. O diâmetro das partículas pode ser afetado por diversos parâmetros, como método de produção, surfactante utilizado, características químicas dos lipídios, números de ciclos de homogeneização e outros. A alteração destes parâmetros pode ser realizada de modo a obter partículas com maior ou menor diâmetro (ÜNER, 2006; HAN *et al.*, 2008).

A partir dos valores de diâmetro encontrados na **Tabela 2** podemos observar que as partículas de todas as amostras se apresentaram inicialmente na faixa de  $164,5 \pm 0,0$  a  $180,9 \pm 1,3$  nm, uma variação de cerca de 10% entre a amostra com maior e menor diâmetro, mostrando que um aumento no número de ciclos de homogeneização não provoca grandes alterações no tamanho das partículas, assim como descrito por Tang *et al.* (2013), que observou mudanças negligenciáveis no tamanho de nanopartículas de uma droga antitumoral ainda em testes, a Q39, no decorrer de 15 ciclos de homogeneização. Ainda com estes dados podemos concluir que a presença da cumarina não provocou mudanças consideráveis no diâmetro médio das partículas.

Ademais, pode-se concluir através dos dados que a maior porcentagem de fase lipídica não resultou em um maior tamanho de partícula, pois as formulações com 10% de fase lipídica apresentaram pequena diferença comparadas as formulações com 5%, sendo esta variação de tamanho menor do que 10% tanto na CLNB quanto na CLNC, esta ultima apresentando mudança de apenas 1,2 nm no diâmetro médio quando comparadas as formulações com 5% e 10% de lipídios e mesmo numero de ciclos, indo de encontro ao demonstrado por Hany e El Gazayerly (2011), que explica que um aumento na fase lipídica dispersada pode resultar numa redução da eficiência de homogeneização e consequente aumento do tamanho.

O crescimento do tamanho das partículas, analisado através da variação do diâmetro, deve ser acompanhado durante o tempo de estocagem para a avaliação da estabilidade da formulação, onde o crescimento das partículas ao decorrer do tempo é um indicativo de instabilidade. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Quanto à estabilidade, as formulações sofreram pouca variação no diâmetro das partículas no decorrer do estudo, pois apesar de algumas delas terem apresentado uma variação estatisticamente significativa durante o decorrer dos 90 dias, esta significância é resultante do reduzido desvio padrão obtido e as variações encontradas foram menores que 10% do diâmetro médio inicial, com exceção do CLNC5% 5C que apresentou um aumento médio de 43,9 nm no 90° dia quando comparado ao primeiro, sendo este um indicativo de instabilidade.

Nos nanocarreadores sem ativo, a maior variação de tamanho foi encontrada na formulação com 10% de fase lipídica e submetida a 5 ciclos de homogeneização (CLNB10% 5C), estando no intervalo de  $174,7 \pm 2,5$  (90° dia) a  $192,3 \pm 2,1$  (60° dia). Já nas com cumarina, maiores alterações foram notadas na formulação com 5% de fase lipídica e submetida a 5 ciclos de homogeneização (CLNC5% 5C) estando na faixa de  $170,1 \pm 0,5$  (60° dia) a  $222,0 \pm 15,6$  (90° dia).

Tabela 2. Caracterização das formulações quanto ao diâmetro.

| Nanosistema | 1° dia      | 15° dia      | 30° dia      | 60° dia      | 90° dia       |
|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| CLNB5% 3C   | 173,1 ± 2,5 | 170,1 ± 2,0  | 165,6 ± 0,5* | 165,3 ± 0,0* | 167,8 ± 1,6   |
| CLNB5% 5C   | 164,5 ± 0,0 | 174,4 ± 0,5* | 166,5 ± 0,0* | 171,7 ± 1,2* | 168,9 ± 0,7*  |
| CLNB10% 5C  | 180,9 ± 1,3 | 184,9 ± 1,3  | 184,1 ± 1,5  | 192,3 ± 0,2* | 174,7 ± 2,5*  |
| CLNC5% 3C   | 177,8 ± 0,3 | 170,8 ± 2,3  | 167,8 ± 0,3  | 170,8 ± 2,7  | 169,7 ± 1,9   |
| CLNC5% 5C   | 178,1 ± 2,2 | 173,1 ± 2,2  | 174,1 ± 0,4  | 170,1 ± 0,5  | 222,0 ± 15,3* |
| CLNC10% 5C  | 176,9 ± 2,0 | 175,9 ± 2,0  | 174,5 ± 0,6  | 176,5 ± 0,5  | 189,1 ± 2,6*  |

Os resultados representam a média ± DP (n=3); \* vs 1° dia (p < 0,05 – ANOVA e Teste de Tukey);

CLNB 5 e 10% 3 e 5C: Carreador lipídico nanoestruturado branco, 5 e 10% de lipídio, 3 e 5 ciclos

CLNC 5 e 10% 3 e 5C: Carreador lipídico nanoestruturado de cumarina, 5 e 10% de lipídio, 3 e 5 ciclos

### 6.3 Índice de polidispersão

O índice de polidispersão das amostras, contido na **Tabela 3**, apresentou-se abaixo de 0,2 em todas as formulações quando da sua produção, sendo o menor valor o de  $0,115 \pm 0,015$  apresentado pela CLNB 10% 5C e o maior valor o de  $0,181 \pm 0,015$  referente a CLNC 10% 5C, mostrando que as formulações apresentaram boa homogeneidade e estreita faixa de distribuição de tamanhos. Corroborando com nossos estudos, Alves *et al* (2007) também obteve estreita faixa de distribuição de tamanhos em sua formulação de nanocarreadores de nimesulida, que apresentaram valores de PDI abaixo de 0,25.

Ainda a partir destes resultados pode-se assegurar que os dados de diâmetro obtidos conjuntamente com o PDI estão válidos, pois estes se apresentaram abaixo de 0,2 e em medidas com polidispersividade maior que 0,5 não se é prudente confiar no tamanho obtido pelo espalhamento dinâmico de luz, tornando-se então necessária uma análise de distribuição para a determinação do pico de tamanho da amostra. (MALVERN, 2013).

Durante a avaliação da estabilidade dos CLNB e CLNC do 1° ao 90° dia, observou-se que algumas amostras apresentaram variações estatisticamente significativas em comparação ao valor obtido inicialmente, no entanto, esta variação deve-se principalmente ao reduzido desvio padrão, assim como ocorrido na determinação do diâmetro médio. A amostra CLNC5% 5C apresentou a maior variação, saindo de  $0,132 \pm 0,023$  no 1° dia para  $0,304 \pm 0,049$  no 90° dia, um PDI maior que o dobro das médias anteriores. Já a amostra CLNC10% 5C praticamente não sofreu variação, tendo um valor de  $0,181 \pm 0,015$  no 1° dia e de  $0,189 \pm 0,014$  no 90° dia.

O aumento do PDI da amostra CLNC5% 5C juntamente com o aumento no seu diâmetro médio nos mostra uma possível instabilidade da mesma, pois mudanças na distribuição de tamanho de partículas podem indicar uma tendência à agregação e sedimentação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Um maior período de estudo seria necessário para a confirmação da tendência supracitada.

Tabela 3. Caracterização das formulações quanto ao PDI ( $PDI \pm DP$ ).

| Nanosistema | 1° dia            | 15° dia             | 30° dia             | 60° dia           | 90° dia             |
|-------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| CLNB5% 3C   | $0,121 \pm 0,009$ | $0,171 \pm 0,004^*$ | $0,128 \pm 0,009$   | $0,123 \pm 0,002$ | $0,121 \pm 0,013$   |
| CLNB5% 5C   | $0,138 \pm 0,027$ | $0,178 \pm 0,007^*$ | $0,121 \pm 0,017$   | $0,135 \pm 0,021$ | $0,146 \pm 0,008$   |
| CLNB10% 5C  | $0,115 \pm 0,015$ | $0,125 \pm 0,013$   | $0,114 \pm 0,015$   | $0,114 \pm 0,025$ | $0,141 \pm 0,017$   |
| CLNC5% 3C   | $0,144 \pm 0,018$ | $0,164 \pm 0,011$   | $0,144 \pm 0,008$   | $0,163 \pm 0,013$ | $0,136 \pm 0,017$   |
| CLNC5% 5C   | $0,132 \pm 0,023$ | $0,152 \pm 0,022$   | $0,146 \pm 0,008$   | $0,148 \pm 0,008$ | $0,304 \pm 0,049^*$ |
| CLNC10% 5C  | $0,181 \pm 0,015$ | $0,141 \pm 0,016$   | $0,131 \pm 0,028^*$ | $0,135 \pm 0,015$ | $0,189 \pm 0,014$   |

Os resultados representam a média  $\pm$  DP (n=3); \* vs 1° dia ( $p < 0,05$  – ANOVA e Teste de Tukey);

CLNB 5 e 10% 3 e 5C: Carreador lipídico nanoestruturado branco, 5 e 10% de lipídio, 3 e 5 ciclos

CLNC 5 e 10% 3 e 5C: Carreador lipídico nanoestruturado de cumarina, 5 e 10% de lipídio, 3 e 5 ciclos

## 6.4 Potencial zeta

Outro importante parâmetro de caracterização das dispersões coloidais é o potencial zeta, que pode ser definido como uma medida da carga da partícula (HAN *et al.* 2008). Além de sua importância na estabilidade, o potencial zeta também exerce grande influência na interação das partículas com o organismo, provocando alterações na farmacocinética. Nanopartículas negativamente carregadas, por exemplo, tendem a manter-se por mais tempo na corrente sanguínea e apresentar menos citotoxicidade, enquanto as carregadas positivamente podem ser utilizadas como um sistema mucoadesivo graças a sua capacidade de interação com a mucosa que é normalmente negativa (HONARY e ZAHIR, 2013a, 2013b).

Todas as formulações analisadas apresentaram PZ inicial maior que  $|30|$  mv, como visto na **Tabela 4**, o que lhes confere maior estabilidade e menor possibilidade de agregação das partículas devido a existência de uma grande repulsão elétrica entre as mesmas. (HAN *et al.* 2008; HONARY e ZAHIR, 2013b).

Surfactantes não iônicos como o Tween 80 e o Poloxamer 188 são capazes de estabilizar a suspensão de nanopartículas através de estabilização estérica e quando em conjunto com a estabilização eletrostática, atua sinergicamente necessitando de um potencial zeta de apenas  $|20|$  mv para sua estabilização (HAN *et al.* 2008; HONARY e ZAHIR, 2013b). Conhecendo-se então a natureza do surfactante empregado e o potencial obtido pelas partículas, espera-se que a formulação apresente-se estável por longo período de tempo, assim como visto em estudo de HAN (2008) que obteve partículas estáveis por mais de um ano ao combinar a estabilização do tween-80 e do Poloxamer 188 com um potencial zeta de -16mv.

Alterações no Potencial Zeta são atribuídas a mudanças na interface com o meio dispersante, o que o torna um parâmetro importante para a avaliação da estabilidade. A variação dessa característica em relação ao tempo de armazenamento pode ser consequência da adsorção de estruturas iônicas da suspensão (MAGENHEIM; BENITA, 1991) e por isso os seus valores foram acompanhados durante todo o estudo.

Durante os 90 dias de acompanhamento, as amostras mantiveram-se com potencial zeta menor que -30 mv, valor desejável para estabilização eletrostática. Embora algumas amostras tenham apresentado variação significativa em relação ao 1º dia, todas se mantiveram no valor de interesse. As maiores variações foram identificadas nas formulações com 10% de fase lipídica, que passaram de  $-34,6 \pm 3,2$  (15º dia) para  $-47,0 \pm 2,2$  (90º dia) na CLNB 10%5C e de  $-34,7 \pm 2,0$  (15º dia) para  $-44,4 \pm 1,4$  (90º dia) na CLNC 10%5C, sugerindo que uma maior porcentagem lipídica pode resultar em alterações no potencial zeta após longos períodos de estocagem.

Tabela 4. Caracterização das formulações quanto ao potencial zeta (PZ  $\pm$  DP).

| Nanosistema | 1° dia          | 15° dia          | 30° dia          | 60° dia          | 90° dia          |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| CLNB5% 3C   | -43,1 $\pm$ 2,4 | -40,1 $\pm$ 2,2* | -44,5 $\pm$ 1,5  | -39,6 $\pm$ 0,0* | -45,2 $\pm$ 0,5  |
| CLNB5% 5C   | -35,7 $\pm$ 1,0 | -34,5 $\pm$ 1,9  | -38,8 $\pm$ 0,0  | -35,5 $\pm$ 2,3  | -39,9 $\pm$ 1,1* |
| CLNB10% 5C  | -38,6 $\pm$ 3,5 | -34,6 $\pm$ 3,2  | -35,7 $\pm$ 2,7  | -37,8 $\pm$ 1,7  | -47,0 $\pm$ 2,2* |
| CLNC5% 3C   | -37,9 $\pm$ 0,9 | -39,7 $\pm$ 0,7  | -36,9 $\pm$ 2,4  | -35,2 $\pm$ 1,6  | -35,2 $\pm$ 1,6  |
| CLNC5% 5C   | -40,7 $\pm$ 1,7 | -37,7 $\pm$ 0,3  | -45,2 $\pm$ 0,6* | -41,6 $\pm$ 2,5  | -42,2 $\pm$ 3,5  |
| CLNC10% 5C  | -39,7 $\pm$ 1,8 | -34,7 $\pm$ 2,0* | -37,6 $\pm$ 0,5  | -35,1 $\pm$ 1,4  | -44,4 $\pm$ 1,4* |

Os resultados representam a média  $\pm$  DP (n=3); \* vs 1° dia (p < 0,05 – ANOVA e Teste de Tukey);

CLNB 5 e 10% 3 e 5C: Carreador lipídico nanoestruturado branco, 5 e 10% de lipídio, 3 e 5 ciclos

CLNC 5 e 10% 3 e 5C: Carreador lipídico nanoestruturado de cumarina, 5 e 10% de lipídio, 3 e 5 ciclos

## 6.5 pH

Na avaliação do pH nas CLNB e CLNC, todas as amostras apresentaram pH ácido no primeiro dia, estando na faixa de 4,62 a 4,87, mostrando que a concentração de fase lipídica e a presença de cumarina produziram pouca influência no pH da formulação. (**Tabela 5**). Em relação ao número de ciclos nas formulações, estudos adicionais são necessários.

Durante os dias em que foram acompanhadas as formulações com diferentes concentrações lipídicas (5% e 10%), não foram observadas variações significativas. As amostras não sofreram grandes variações nos valores de pH, apresentando um valor máximo de 4,91, o que é um bom sinal de estabilidade pois variações neste parâmetro podem ser indicativos da degradação dos constituintes do nanossistema por processos como hidrólise dos constituintes da nanopartícula. (GUTERRES *et al.*, 1994; SCHAFZICK *et al.*, 2003).

Tabela 5. Caracterização das formulações quanto ao pH.

| Nanosistema | 1º dia | 15º dia | 30º dia | 60º dia | 90º dia |
|-------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| CLNB5% 5C   | 4,87   | 4,80    | 4,89    | 4,83    | 4,76    |
| CLNB10% 5C  | 4,62   | 4,72    | 4,67    | 4,39    | 4,65    |
| CLNC5% 5C   | 4,76   | 4,81    | 4,88    | 4,91    | 4,81    |
| CLNC10% 5C  | 4,81   | 4,77    | 4,84    | 4,62    | 4,72    |

CLNB 5 e 10% 5C: Carreador lipídico nanoestruturado branco, 5 e 10% de lipídio e 5 ciclos

CLNC 5 e 10% 5C: Carreador lipídico nanoestruturado de cumarina, 5 e 10% de lipídio e 5 ciclos

## 6.6 Teor de C e eficiência de encapsulação (EE)

Até o momento as características físico-químicas apresentadas pelo CLNC 10%5C, mostraram-se com pequenas variações (<10%) e dentro do intervalo das especificações para um nanossistema com características tecnológicas desejáveis, isso durante o período investigado. Assim, prosseguimos o estudo com a CLNC 10%5C, considerando a maior concentração de lipídios dessa formulação em relação ao CLNC 5%5C, o que contribui para a incorporação de um maior teor de ativos orgânicos como a cumarina, avaliando o teor de cumarina e a eficiência de encapsulação desse sistema em dois instantes, no 30° e 60° dia.

Os dados sobre o teor contidos na **Tabela 6** nos permitem afirmar que não houve grande variação da concentração de cumarina durante o processo de produção dos carreadores. Esse resultado foi interessante considerando que a cumarina é uma substância volátil e mesmo exposta a uma alta temperatura (85°C) durante o processo de produção das nanopartículas, ainda apresentou um teor de 95,3% de cumarina após 30 dias, um resultado considerado excelente.

Na avaliação do teor do CLNC 10%5C no 60° após sua produção, foi observado um teor de 85,8% de cumarina no nanossistema, dessa forma ocorreu uma redução de apenas 10% de cumarina na formulação, porém esta não foi muito acentuada, sendo um ótimo resultado, considerando que até o 60° dia de estudo, o teor de cumarina sofreu pequena alteração.

A eficiência de encapsulação sofre direta interferência da capacidade de interação entre o ativo e a matriz lipídica, a baixa solubilidade do ativo na fase lipídica pode resultar em baixa eficiência de encapsulação, pois esta solubilidade pode ser diminuída quando a preparação passa pelo resfriamento da fase lipídica fundida (FANG, 2013).

A eficiência apresentada pela formulação após os primeiros 30 dias foi de cerca de 65%, valor muito próximo ao encontrado em outros estudos, como o realizado por Iemsan-Arng (2015) que produziu carreadores lipídicos nanoestruturados do corante *coumarin 6* com o intuito de investigar o controle de liberação do mesmo e obteve uma eficiência de encapsulação de 60,2%. É importante observar que é de interesse que uma parte do ativo apresente-se externamente à formulação, para que este possa apresentar ação imediata assim

que administrado, enquanto os nanocarreadores permitam a manutenção das concentrações de ativo. (MEI *et al.*, 2013)

No presente estudo, a Eficiência de Encapsulação do CLNC 10%5C esteve em torno de 65% (**Tabela 6**), mostrando pouca variação nos períodos investigados, ou seja, no 30° (64,9%) e 60° dia (66,7%) após a preparação.

Tabela 6. Caracterização da formulação CLNC 10% 5C quanto ao teor e eficiência de encapsulação.

|                  | <b>30° dia</b> | <b>60° dia</b> |
|------------------|----------------|----------------|
| <b>Teor de C</b> | 95,3 %         | 85,8%          |
| <b>EE</b>        | 64,9 %         | 66,7 %         |

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que dentre as formulações desenvolvidas, o CLNC 10%5C possui composição e características físico-químicas de interesse para um nanofármaco, além da estabilidade durante o período avaliado, do teor e da eficiência de encapsulação satisfatórios. Contudo, estudos adicionais são necessários para a melhor caracterização do produto e avaliação biológica.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS-GRAVES, Patricia et al. RheothRx (poloxamer 188) injection for the acute painful episode of sickle cell disease: a pilot study. **Blood**, v. 90, n. 5, p. 2041-2046, 1997.
- AL-DHALLI, S. **Preparation and evaluation of fenofibrate-gelucire 44/14 solid dispersions**. 2007. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – School of Pharmacy, Universiti Sains Malaysia. 2007.
- ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.
- ALVES, Marta P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International journal of pharmaceutics**, v. 341, n. 1, p. 215-220, 2007.
- BILIA, Anna Rita et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- CORBETT, J. et al. Nanotechnology: international developments and emerging products. **CIRP Annals-Manufacturing Technology**, v. 49, n. 2, p. 523-545, 2000.
- DEVALAPALLY, Harikrishna; CHAKILAM, Ananthsrinivas; AMIJI, Mansoor M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, 2007.
- FANG, Chia-Lang; A AL-SUWAYEH, Saleh; FANG, Jia-You. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. **Recent patents on nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2013.
- FISHER, O.Z.; KHADEMHOSEINI, A; PEPPAS, N.A. Drug Delivery: Nanoscale Devices. **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**, 1-9, 2010.
- FONSECA, Francisco Noé. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de Justicia pectoralis - chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica**. 2009. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- GARRARD, A. Coumarins. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1052–1054.
- GATTEFOSSÉ SAS. Precirol ATO5. **Material Safety Data**, Saint Priest, 2012. rev. atual.
- GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.
- HAMDANI, Jamila; MOËS, André J.; AMIGHI, Karim. Physical and thermal characterisation of Precirol® and Compritol® as lipophilic glycerides used for the preparation

of controlled-release matrix pellets. **International journal of pharmaceutics**, v. 260, n. 1, p. 47-57, 2003.

HAN, Fei et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1, p. 210-216, 2008.

HANY, M. H., EL GAZAYERLY, O. N. Rice bran solid lipid nanoparticles: Preparation and characterization. **International Journal of Research in Drug Delivery**, 2011.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013a

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013b.

IEMSAM-ARNG, Jayanant et al. Modified NLC-loaded coumarin for pharmaceutical applications: the improvement of physical stability and controlled release profile. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1-8, 2015.

JONATHAN, Goole; KARIM, Amighi. 3D printing in pharmaceutics: A new tool for designing customized drug delivery systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 499, n. 1, p. 376-394, 2016.

KEIPER, Adam. The nanotechnology revolution. **The New Atlantis**, n. 2, p. 17-34, 2003.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, p. 5-10, 1998.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423-453, 1999.

LE BARS, G. et al. Oral toxicity of Miglyol 812® in the Göttingen® minipig. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 930-937, 2015.

LEAL, L. K. A. M. **Estudo Farmacológico Do Extrato Hidroalcoólico E Constituintes Químicos De *Amburana cearensis* A. C. Smith (Cumaru)**. 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – School of Pharmacy, Universiti Sains Malaysia. 2007.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v. 4, n. 3, p. 221-227, 1997.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 151-159, 2000.

LOCKMAN, P. R. et al. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2002.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v. 4, p. 221-241, 1991.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zeta sizer nano series**. Manual do usuário. V1.1. Worcestershire, 2013. 250p. 2013.

MARCHAL-HEUSSLER, L. *et al.* Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto duferent isobutylcyanoacrylate nanoparticle preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.58, p. 115. 1990.

MEI, Lin *et al.* Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 6, p. 880-890, 2013.

MOLOUGHNEY, Joseph G.; WEISLEDER, Noah. Poloxamer 188 (p188) as a membrane resealing reagent in biomedical applications. **Recent patents on biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 200-211, 2012.

MÜLLER, Rainer H.; RADTKE, Magdalene; WISSING, Sylvia A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MÜLLER, R. H. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

PARK, Kinam. Drug delivery of the future: Chasing the invisible gorilla. **Journal of Controlled Release**, 2015.

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data, **Applied Optics**, v. 45, p. 2209-2216, 2006.

RODRIGUES, Rafaela da Fonseca. **Extração da cumarina a partir das sementes daemburana (torresea cearensis) utilizando dióxido de Carbono supercrítico**. 2005lem. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ROWE, Raymond C. *et al.* (Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6ª Edição. Londred: Pharmaceutical press, 2009.

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

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SELLERS, Rani S. *et al.* Effects of Miglyol 812 on rats after 4 weeks of gavage as compared with methylcellulose/Tween 80. **Drug and chemical toxicology**, v. 28, n. 4, p. 423-432, 2005.

SHAPOSHNIK, Z., TAMANOI, F. Smart-Drug Delivery and Target-Specific Therapy. **Comprehensive Biomedical Physics**, p. 369-377, 2013.

SURI, Krishna et al. Advances in nanotechnologybased drug delivery platforms and novel drug delivery systems. **Novel Approaches And Strategies For Biologics, Vaccines And Cancer Therapies**, p. 41, 2015.

TANG, Xin-Jiang et al. Evaluation of pluronic nanosuspensions loading a novel insoluble anticancer drug both in vitro and in vivo. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 243-250, 2013.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

YUN, Yeon Hee; LEE, Byung Kook; PARK, Kinam. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 2-7, 2015.