



Ensaio de pré-formulação e desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado visando a terapia antileishmaniose

Samilly Gabrielly dos Santos Sales*; Myla Lôbo de Souza**; Maria Lavinya Arruda da Rocha***; Dante Emanuel de Souza Silva****; Larissa Pereira Alves****; Pedro José Rolim Neto*****

*Graduanda em ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

**Pós-doutoranda do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

***Mestranda em Inovação Terapêutica pela Universidade Federal de Pernambuco.

****Doutoranda Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

*****Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco,

*****Lider do Grupo de Pesquisa Desenvolvimento Farmacotécnico-Industrial de Produtos Farmacêuticos no CNPq

*Autor para correspondência e-mail: samillysales2019@gmail.com

Palavras-chave

Entrega De Fármacos
Glucotime
Nanocarreadores
Planejamento Experimental

Keywords

Drug Delivery
Glucotime
Nanocarriers
Design Of Experiments

Resumo: As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas (DTNs), onde no Brasil o tratamento de primeira escolha é feito com o antimoniatado de meglumina (AM), medicamento com diversos efeitos adversos. O objetivo do trabalho foi desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo AM para o tratamento de leishmaniose. Foi realizado um estudo de pré-formulação, contendo avaliação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), triagem de lipídeos, estudos de compatibilidade e planejamento quali-quantitativo. Os CLN foram preparados pelo método de dupla emulsificação e avaliados quanto ao diâmetro de partícula, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE). O CLN escolhido foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR) e difração de raios-X (DRX). Também foi testado in vitro para avaliar citotoxicidade em macrófagos Raw 264.7. Os resultados do estudo de pré-formulação indicaram a escolha do Miglyol®812 como lipídio líquido e o Alkest® CSO 300 como o melhor tensoativo hidrofílico (EHL= 8,74). O CLN mais promissor do planejamento apresentou diâmetro médio de 29 nm, Pdl 0,251, PZ -6,76 e EE > 90%. Técnicas de caracterização das nanopartículas confirmaram a incorporação do AM no CLN e obtenção de uma matriz menos cristalina. O AM não apresentou citotoxicidade nos macrófagos, enquanto o CLN contendo o fármaco foi citotóxico acima de 19 µg/mL. Portanto, foi possível obter CLN com propriedades físico-químicas adequadas, alta eficiência de encapsulação e potencial para liberação prolongada do AM. Estudos para avaliar citotoxicidade em leishmanias serão conduzidos.

Pre-formulation trial and development of nanostructured lipid carrier during antileishmanial therapy

Abstract: Leishmaniasis is a neglected tropical disease (NTD). In Brazil, the first-choice treatment is meglumine antimoniate (MA), a drug with many adverse effects. The aim of this study was to develop nanostructured lipid carriers (NLC) containing MA for the treatment of leishmaniasis. A pre-formulation study was carried out, including evaluation of the hydrophilic-lipophilic balance (HLB), lipid screening, compatibility studies and qualitative-quantitative planning. The NLC were prepared using the double emulsification method and evaluated for particle diameter, polydispersity index (Pdl), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (EE). The chosen NLC was characterized by transmission electron microscopy (TEM), differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). It was also tested in vitro to assess cytotoxicity in Raw 264.7 macrophages. The results of the pre-formulation study indicated the choice of Miglyol®812 as the liquid lipid and Alkest® CSO 300 as the best hydrophilic surfactant (HLB= 8.74). The most promising NLC from the planning showed an average diameter of 29 nm, Pdl 0.251, PZ -6.76 and EE > 90%. Nanoparticle characterization techniques confirmed the incorporation of MA into the NLC and obtained a less crystalline matrix. MA showed no cytotoxicity in macrophages, while NLC containing the drug was cytotoxic above 19 µg/mL. Therefore, it was possible to obtain NLC with suitable physicochemical properties, high encapsulation efficiency and potential for prolonged release of MA. Studies to evaluate cytotoxicity in leishmania will be carried out.

Recebido em: 10/11/2023

Aprovação final em: 01/01/2024



Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são doenças que prevalecem em populações com considerável índice de pobreza e, por isso, não representam um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas. Entre as DTN, está a leishmaniose. Trata-se de uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida através da picada de insetos vetores do gênero *Lutzomyia*, infectados pelos parasitas. A doença pode se apresentar em diferentes formas clínicas, sendo elas a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), podendo ser cutânea (LC) ou mucocutânea (LMC) (HOMMA; FREIRE; POSSAS, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LV é a forma mais agressiva da doença e pode levar o indivíduo à morte em mais de 95% dos casos se não for tratada (LEISHMANIASIS, 2023). Por outro lado, a LC e a LMC, embora não sejam fatais, deixam cicatrizes ao longo da vida, podendo ser desfigurantes e socialmente estigmatizantes (VASCONCELOS *et al.*, 2018). O Brasil se destaca por ser o terceiro maior país em número de casos anuais nos últimos anos, possuindo também altas taxas de coinfeção *Leishmania*-HIV (LEISHMANIASIS, 2023).

No Brasil, o AM é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose (VASCONCELOS *et al.*, 2018). É hidrofílico e possui baixa permeabilidade (sistema de classificação biofarmacêutica classe III); devido a isso, seu uso é exclusivamente parenteral, necessitando da internação do paciente. O AM está relacionado também a eventos adversos graves, como cardiotoxicidade e hepatotoxicidade (HENDRICKX *et al.*, 2019).

Uma estratégia viável para o desenvolvimento de novas terapias é melhorar os fármacos já existentes por meio da nanotecnologia. A nanomedicina é amplamente explorada para melhorar as propriedades farmacológicas e contornar baixa permeabilidade, solubilidade e estabilidade, alta toxicidade, tempo de meia-vida curto e baixa distribuição tecidual (LI *et al.*, 2017). Nesse cenário, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são bastante atrativos. Os CLN possuem matriz lipídica composta por lipídeos sólidos e líquidos à temperatura ambiente e corporal. Sua matriz menos cristalina permite um maior aprisionamento do fármaco ao longo do tempo de armazenamento. Além disso, dispõem de muitos excipientes aceitos para uso humano, baixo custo de produção, maior possibilidade de escalonamento, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis (MÜLLER *et al.*, 2016). Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar CLN contendo o AM para potencial atividade leishmanicida.

Material e Métodos

Materiais e reagentes

Dynasan®116 e Miglyol® 812 doados pela IOI Oleochemical (Hamburgo, Alemanha); ácido oleico e Span® 80 doados pela Croda (São Paulo, Brasil); Alkest® CSO 300 doado pela MCassab (São Paulo, Brasil); Pluronic® F-127 foi comprado da Sigma (St Louis, EUA); AM foi adquirido da Acros organics (Antwerp, Bélgica). Além disso, foram utilizados solventes e reagentes apropriados para a condução dos ensaios.

Métodos

Ensaio de pré-formulação

Triagem lipídica

Foi avaliada a influência dos lipídeos líquidos Miglyol® 812 (triglicerídeo dos ácidos caprílico e cáprico) e ácido oleico (ácido graxo de cadeia longa) na promoção da diminuição do perfil de cristalinidade da matriz lipídica contendo o lipídeo sólido Dynasan®116 (triglicerídeo do ácido palmítico). Foram realizadas análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do lipídeo sólido Dynasan®116 e suas combinações com os dois lipídeos líquidos na proporção 1:1 (m/m).

As análises ocorreram com aproximadamente $2 \pm 0,05$ mg de amostra que foi adicionada à um cadinho de alumínio, hermeticamente selado, que foi submetido à análise sob temperatura de 25 °C a 300 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, no equipamento DSC-60 Shimadzu® (TIMÓTEO, 2019).



Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) da formulação

Foram conduzidos experimentos empregando os lipídios escolhidos, em diversas formulações, variando a proporção de diferentes tensoativos de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) conhecido. O objetivo do ensaio foi definir o tipo de tensoativo e as proporções que seriam utilizadas na produção dos CLN.

A avaliação do EHL foi realizada através da observação macroscópica das emulsões em dois momentos distintos: o primeiro, imediatamente após a preparação da emulsão, e o segundo, após um período de repouso de 24 horas. As análises foram realizadas combinando a proporção entre o Span[®] 80 (EHL=4,3) e o Pluronic[®] F-127 (EHL=22) e entre o Span[®] 80 (EHL=4,3) e o Alkest[®] CSO 300 (EHL=11,7). A composição da emulsão foi de: tensoativos 10% (p/p), lipídeo sólido 7% (p/p), lipídeo líquido 3% (p/p) e água ultrapura 80% (p/p); essas proporções foram estabelecidas utilizando informações de estudos semelhantes previamente conduzidos por outros pesquisadores (COSTA, 2019; SOUZA, 2020).

A proporção entre os tensoativos hidrofílico e lipofílico para alcançar a emulsão mais estável foi calculada com base na equação 1 (GRIFFIN, 1949).

$$EHL_{req} = \frac{(\%TensA \times EHLA) + (\%TensB \times EHLB)}{100} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde EHL_{req} é o EHL da formulação; %TensA, EHLA, %TensB e EHLB são a porcentagem e o EHL do tensoativo A, e a porcentagem e o EHL do tensoativo B, respectivamente.

Ensaio de compatibilidade

O uso combinado de técnicas termoanalíticas com as espectroscópicas permite uma compreensão aprofundada e melhor visualização das interações físicas ou químicas, auxiliando na seleção dos excipientes adequados (CHADHA; BHANDARI, 2014).

Os componentes selecionados para compor os CLN deste estudo foram o lipídeo sólido Dynasan[®]116, o lipídeo líquido Miglyol[®]812 e os tensoativos Span[®]80 (lipofílico) e Alkest[®] CSO 300 (hidrofílico).

Análises dos componentes isolados, bem como suas misturas físicas binárias, ternárias e totais na proporção 1:1 (m/m), foram realizadas por DSC e espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com o objetivo de identificar possíveis incompatibilidades entre os insumos que seriam utilizados na formulação do CLN. A análise das amostras por DSC foi realizada conforme procedimento já descrito.

O FTIR foi realizado conforme método de Aminu (2021), as amostras foram misturadas com o KBr, na proporção de 1:100; posteriormente, pulverizadas e comprimidas utilizando uma prensa hidráulica Shimadzu[®] por aproximadamente 10 minutos. A pastilha resultante foi colocada no suporte de amostras do espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu[®]) para avaliação dos espectros na região do infravermelho, os quais foram adquiridos através de uma varredura abrangendo a faixa de 4000 a 500 cm⁻¹, com 45 scans e resolução de 8 cm⁻¹.

Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Nesse planejamento, os parâmetros selecionados como variáveis de produto foram a quantidade total de lipídeos na formulação e a proporção de lipídeos sólidos e líquidos; enquanto as variáveis de processo foram o tempo e a potência de sonicação. Com base em estudos de planejamentos experimentais anteriores (COSTA, 2019; SOUZA, 2020), a faixa definida para o ensaio foi de 7 a 10% para porcentagem de lipídeos totais, entre 65/35 e 85/15 para a proporção de lipídeo sólido/líquido (m/m), entre 50 e 70% de amplitude para a potência do equipamento de ultrassom e tempo de sonicação entre 5 e 10 minutos com tempo de resfriamento de 10 minutos.

Os parâmetros quali-quantitativos de resposta das formulações considerados foram o índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), diâmetro médio (Diam.) e eficiência de encapsulação (EE%)



das nanopartículas. Foram desenvolvidas 16 formulações com as variáveis desse planejamento.

Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados

O método utilizado foi a dupla emulsificação por sonicação a quente (PERES *et al.*, 2016). Os CLN contendo o fármaco (CLN16) possuíam a fase aquosa interna (A_1) com uma solução do fármaco a 300 mg/mL, e a quantidade empregada correspondia a 29% da quantidade de lipídios da formulação.

A fase A_1 foi gotejada na fase oleosa fundida a 70 ± 5 °C, sob agitação magnética por 1 minuto para a formação da emulsão primária (O/A_1). A fase aquosa externa (A_2), contendo o tensoativo hidrofílico também a 70 ± 5 °C, foi vertida na emulsão primária e, então, submetida ao processo de ultrasonicação por meio de um sonicador de sonda (Ecosonics® QR 800, São Paulo), utilizando os tempos e potências pré-determinados. A emulsão formada ($A_1/O/A_2$) foi resfriada em banho de gelo, por 10 minutos, até a formação do CLN por recristalização da fase lipídica (BECKER *et al.*, 2016). A potência, o tempo de sonicação e a quantidade de lipídeos e tensoativos hidrofílico/lipofílico foram definidas pelo ensaio de pré-formulação. Os CLN brancos (CLNBr) foram obtidos pelo mesmo método sem o fármaco.

Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e o Pdl das nanopartículas foram analisados a 25°C, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com um ângulo de incidência de luz fixo de 90° no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). O PZ foi avaliado por meio da mobilidade eletroforética no mesmo instrumento. Para as medições, todas as amostras foram diluídas numa proporção de 1:10 (v/v) com água ultrapura. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os CLN obtidos foram caracterizados quanto ao comportamento térmico por DSC, obtendo-se a entalpia e a temperatura de fusão. Pelo termograma, foi possível calcular o índice de cristalinidade (IC), determinado com base na equação 2.

$$IC (\%) = \frac{\Delta H_{Np}}{\Delta H_{LS} \times \text{fase lipídica}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde ΔH_{Np} é a entalpia de fusão dos CLN, ΔH_{LS} é a entalpia de fusão do lipídeo sólido, e a fase lipídica é a quantidade de lipídeo sólido presente na nanopartícula (MADUREIRA *et al.*, 2015).

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR é crucial, pois mudanças nos espectros FTIR podem indicar degradação dos componentes, reações indesejadas ou alterações estruturais que podem comprometer a qualidade e a eficácia dos CLN (KAMNEV *et al.*, 2021). Os espectros na região do infravermelho dos CLNBr e CLN16 foram obtidos por FTIR, conforme descrito no tópico da técnica.

Difração de Raios-X (DRX)

A análise por DRX foi conduzida com o propósito de examinar a cristalinidade das substâncias quando isoladas e as mudanças ocasionadas na formação do CLN (DOROFEEV *et al.*, 2012). Os ensaios de difração de raios-X (DRX) dos CLN ocorreram utilizando um difratômetro Smartlab® (Rigaku, Japão), equipado com ânodo de cobre, comprimento de onda 1,5443 Å, taxa de varredura de 5 °/min e passo de 0,03 °/s, com análises nos ângulos de difração 2θ na faixa de 5 a 60° (AMINU *et al.*, 2021).

Determinação da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento (EE%) foi determinada pelo método indireto e a fração total no



encapsulamento foi quantificada. Os CLN foram diluídos em água ultrapura na proporção 1:1 (v/v) e, posteriormente, submetidos a um processo de separação do fármaco não encapsulado (livre) com filtros Amicon Ultra-0,5 (Millipore®, Darmstadt, Alemanha) com um tamanho de poro de 30 kDa, através de centrifugação a 8000 rpm por 45 minutos (centrífuga Daiki DTC-16000). O filtrado (fármaco não encapsulado) foi coletado e diluído em solução de HCl 6M para a quantificação do AM por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), baseado no método de Souza (2020). O CLNBr seguiu o mesmo procedimento e foi empregado como o branco da leitura. A EE% foi calculada de acordo com a equação 3.

$$EE\% = \frac{(F_{total}) - (F_{livre})}{F_{total}} \times 100 \text{ Eq. 3}$$

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

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise da morfologia dos CLN foi examinada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), pelo método de contraste negativo (LEON; CHUNG; RINALDI, 2020). Alíquotas de 20 μL dos CLN foram diluídas em água ultrapura na proporção 1:10 (v/v). As amostras foram depositadas em grades de cobre, onde foi gotejado o ácido fosfotúngico (PTA) como contrastante. A grade foi colocada para secar em temperatura ambiente por 48 horas. As amostras foram visualizadas usando um microscópio de transmissão Morgagni 268D (FEI), sob aceleração de 80 kV.

Avaliação da citotoxicidade in vitro dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Um ensaio de citotoxicidade celular foi realizado com o objetivo de avaliar as concentrações tóxicas do AM frente aos macrófagos RAW 264.7, bem como comparar com a citotoxicidade do CLN16 e do CLNBr (SAHU *et al.*, 2016).

Foram realizados ensaios com MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) em macrófagos da linhagem RAW 264.7, os quais foram colocados em placas de 96 poços na quantidade de $0,2 \times 10^5$ células/poço e incubados por 24 horas a 37 °C e atmosfera com 5% de CO_2 . Os compostos (AM, CLN16 e CLNBr) foram adicionados através de diluições seriadas, as concentrações testadas variaram de 4,76 a 609 $\mu\text{g/mL}$, seguida de nova incubação por 72 horas. Como controle negativo foram utilizados apenas meio de cultura, e como controle positivo, foi utilizada a anfotericina B. Posteriormente, foi acrescentado 25 μL de MTT a 5 mg/mL em PBS e incubado por 2 horas a 37 °C. Por fim, parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e adicionado 100 μL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância ocorreu a 570nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC® Multiskan® FC.

Resultados e Discussão

Ensaio de pré-formulação - Triagem lipídica

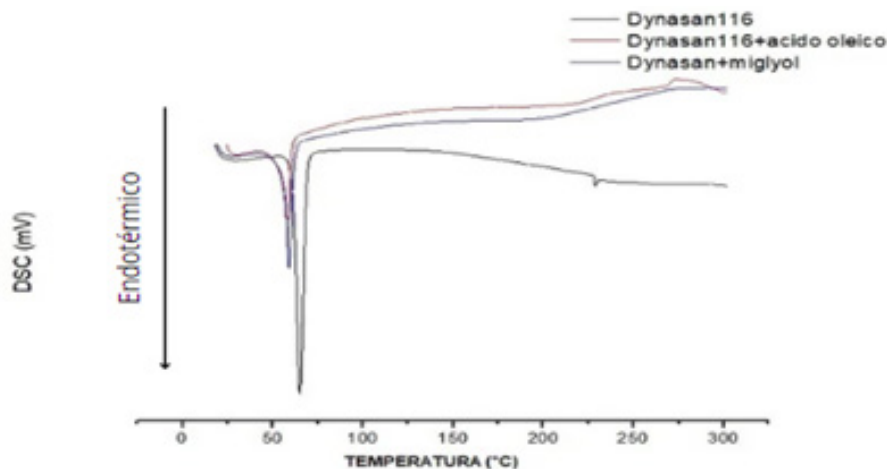
Conforme ilustrado na Figura 1, o pico endotérmico apresentado pelo Dynasan®116 ocorreu em torno da temperatura de 65°C, com entalpia de -188,24 J/g correspondente à sua fusão. Os picos endotérmicos das misturas binárias com Miglyol®812 e ácido oleico ocorreram em 59 °C e 57,91°C, com entalpia de -85,24 J/g e -90,47 J/g, respectivamente.

Foi observada uma diminuição no ponto de fusão e na entalpia das misturas binárias em comparação com o lipídeo sólido puro, o que indicou uma matriz menos cristalina.

Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Souza (2020). A diminuição na entalpia e na temperatura de fusão dos lipídeos sólidos, quando combinados com lipídeos líquidos, pode ser explicada pela solubilização parcial desses componentes, tornando o processo de fusão mais fácil e exigindo menos energia (SEVERINO *et al.*, 2012). Como a mistura Dynasan116+Miglyol foi a mistura binária com maior redução da entalpia de fusão e também apresentou boa diferença entre as temperaturas de início e final da fusão, o Miglyol® 812 foi o lipídeo líquido escolhido para dar continuidade ao estudo.



Figura 1 - Curva DSC do lipídeo sólido Dynasan116® e suas misturas binárias com os lipídeos líquidos ácido oleico e Miglyol®812.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo

As proporções de tensoativos e os valores de EHL de cada formulação obtida com os diferentes tensoativos estão expostos nas Tabelas 1 e 2. Entre os dois pares de tensoativos utilizados, o par Span® 80 e Alkest® CSO 300 resultou em formulações com aspecto translúcido e sem indícios de cremação (KHERADMANDNIA *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Proporções de tensoativos para formulações contendo Span® 80, Pluronic®F-127 e respectivos valores de EHL.

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

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Entre as nove formulações obtidas, foi escolhida a B6 (EHLreq = 8,74) por apresentar aspecto mais translúcido, sugerindo a obtenção de partículas em tamanho menor (LI *et al.*, 2016; MULLER *et al.*, 2016), esses resultados são semelhantes aos encontrados por Rocha (2022). Os tensoativos e suas respectivas proporções na formulação B6 foram aplicados para o preparo dos CLN. Parte superior do formulário.



Tabela 2 - Proporções de tensoativos para formulações contendo Span® 80 e Alkest® CSO 300 e respectivos valores de EHL.

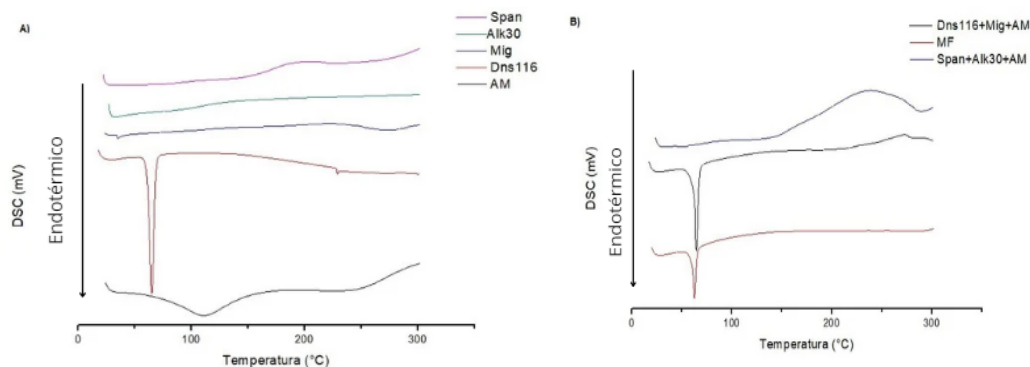
EMULSÃO	Span® 80	Alkest® CSO 300	EHLreq
B1	90%	10%	5,04
B2	80%	20%	5,78
B3	70%	30%	6,52
B4	60%	40%	7,26
B5	50%	50%	8,00
B6	40%	60%	8,74
B7	30%	70%	9,48
B8	20%	80%	10,22
B9	10%	90%	10,96

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Ensaio de Compatibilidade

Conforme exposto na Figura 2A, foi possível notar na curva do AM um evento endotérmico caracterizado por um pico alargado na temperatura de 110,80 °C, com um valor de entalpia de -212,51 J/g, referente à fusão do AM e à perda de água de solvatação. Esses resultados estão em consonância com os encontrados por outros estudos (SILVA, 2016; SOUZA, 2020).

Figura 2 - (A) Gráfico DSC dos compostos isolados. (B) Gráfico DSC das misturas ternárias e total. Legenda: Dns116= Dynasan; AM = antimoniato de meglumina; Span = Span®80; Alk30=Alkest®CSO 300; MF= mistura total física.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

O Dynasan®116 apresentou um pico por volta de 65°C, com entalpia de -188,24 J/g correspondente à sua fusão. Em relação às curvas do Miglyol® 812, Span® 80 e Alkest® CSO 300, não foram observados eventos na faixa de temperatura analisada, visto que são substâncias líquidas à temperatura ambiente.

Na Figura 2B, ao avaliar a curva da mistura ternária formada pelos lipídeos e o fármaco, foi possível observar um pico endotérmico em 64,69°C, referente à fusão do Dynasan®116, com entalpia de -70,49 J/g. A diminuição na quantidade de energia necessária para que ocorra a fusão do lipídeo, em comparação com os resultados obtidos apenas com os dois lipídeos na triagem lipídica, pode ser um indicativo de que o fármaco colabora com o aumento da desorganização da estrutura, haja vista que quanto menor a entalpia envolvida na fusão da mistura de lipídeos, maior a redução de



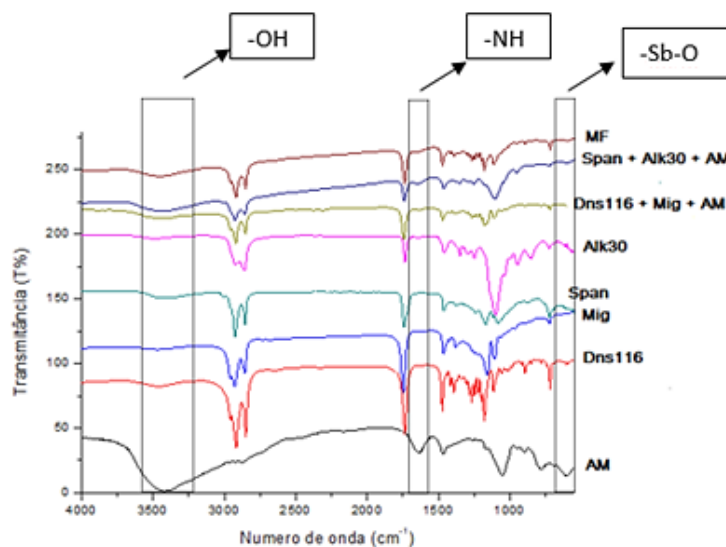
crystalinidade da matriz lipídica na mistura física (ZHENG *et al.*, 2013).

A combinação ternária dos tensoativos com o fármaco exibiu um perfil de curva semelhante ao dos agentes tensoativos, não apresentando eventos consideráveis. A ausência do evento de fusão do fármaco indicou a solubilização do AM na mistura líquida dos agentes tensoativos (SILVA, 2016). Por fim, a curva referente à mistura física completa apresentou um perfil semelhante à mistura ternária formada pelo AM e os lipídeos, com um pico que corresponde à fusão do Dynasan®116 em 62,73°C, um pouco alargado, menos intenso e com entalpia ainda mais reduzida (-49,07 J/g), mostrando a influência das misturas dos insumos na cristalinidade do lipídeo sólido.

O ensaio de DSC das amostras permitiu a avaliação de mudanças em eventos térmicos das substâncias isoladas e em mistura, visando a avaliação de possíveis incompatibilidades. A redução na temperatura de fusão identificada em algumas das misturas pode ser vantajosa para a produção dos CLN, pois contribui para evitar o alcance de temperaturas elevadas que poderiam resultar na fusão do fármaco e na evaporação da solução aquosa utilizada nas nanopartículas. Não foram observadas mudanças nos perfis térmicos indicativas de incompatibilidade entre os insumos, apenas um comportamento que reflete a mistura das substâncias.

A segunda avaliação de compatibilidade foi realizada por FTIR, os resultados contendo os espectros da região do infravermelho das amostras isoladas e misturas estão demonstrados na Figura 3, com os principais picos do fármaco destacados. Conforme pode ser observado na Figura 3, O Miglyol®812 e o Dynasan®116 apresentaram picos característicos de lipídeos, como picos fortes em 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} referentes às vibrações de estiramento dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, picos em 1740 cm^{-1} do estiramento de $\text{C}=\text{O}$ das carbonilas (características de ésteres), em 1465 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} dos dobramentos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ (características de alcanos), em 1172 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} do estiramento assimétrico de $\text{C}-\text{O}$ (característico de ésteres), um pico pequeno em 1060 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}-\text{O}$ de álcool secundário, e em 721 cm^{-1} de dobramento dos grupos CH_2 de cadeias longas; tais resultados são semelhantes aos destacados por Souza, 2020. Ademais, o Dynasan®116 também apresentou picos justapostos entre 1215 e 1288 cm^{-1} do estiramento assimétrico $\text{C}-\text{O}$, característico de triglicerídeos. Os tensoativos apresentaram espectros com picos semelhantes aos dos lipídeos já detalhados, justificado pelo fato de serem derivados de lipídeos.

Figura 3 - Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total. Legenda: AM= Antimoniato de meglumina; MF=mistura total com todos os componentes analisados; Span = Span®80; Alk30=Alkest®CSO 300; Mig =Miglyol®812; Dns116= Dynasan®116.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.



O Span® 80 também possui uma banda de baixa intensidade em 3400 cm^{-1} relacionada aos estiramentos dos grupos -OH (presentes nos monoglicérides). Já o Alkest® CSO 300, além dos picos em regiões já citadas nos lipídeos, apresentou um pico de forte intensidade em 1090 cm^{-1} do estiramento C-O-C característico de éter alifático, devido ao alto grau de etoxilação da molécula. Estes resultados estão de acordo com os disponíveis na literatura (IBRAHIM; ALOMRANI; YASSIN, 2014; SOUZA, 2020).

Sobre o espectro vibracional apresentado pelo AM isolado, as principais bandas se encontram na região de 3410 cm^{-1} das vibrações de estiramento dos grupos -OH e -NH, 2800 cm^{-1} referente aos estiramentos -CH, 1641 cm^{-1} de dobramento de -NH, 1465 cm^{-1} da deformação angular dos grupos C-O, 1060 cm^{-1} de estiramento dos grupos C-N e CO, além da banda em 601 cm^{-1} do estiramento Sb-O (SILVA, 2016; SOUZA, 2020).

Nas misturas ternárias com os lipídeos, apenas picos de baixa intensidade, relacionados ao fármaco, foram identificados; sendo o 1641 cm^{-1} referente ao grupo -NH das aminas secundárias. Já na mistura ternária contendo os tensoativos, a presença do AM foi detectada através da presença dos picos a 1641 cm^{-1} do -NH e 601 cm^{-1} correspondente ao estiramento Sb-O.

Por fim, na mistura total, apenas uma banda fraca em 3400 cm^{-1} e o sinal fraco em 1641 cm^{-1} foram identificados (SOUZA, 2020). Tais diminuições de intensidade dos picos do IFA ou ausência deles no espectro de infravermelho das misturas podem ser justificadas pela proporção diminuída do AM quando em combinação com os excipientes.

Em todas as análises, tanto das misturas ternárias quanto da mistura total, não foram identificadas mudanças nas posições das bandas de absorção, tampouco surgimento de picos em novas regiões do espectro. Com base nesses resultados, foi possível confirmar o resultado do DSC, em que não foram observados sinais de incompatibilidade dos insumos com o fármaco, sugerindo que as alterações observadas nas análises são oriundas de interações físicas.

Planejamento quali-quantitativo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

Conforme os dados expressos na Tabela 3, foi possível obter CLN com diâmetro médio variando de 29 a 58 nm, Pdl entre 0,162 e 0,448 e potencial zeta entre -6,76 e -24 mV.

As formulações exibiam um aspecto que variou entre translúcido e leitoso, além de um reflexo azulado característico das nanopartículas. Informações disponíveis na literatura indicam que, para garantir uma penetração eficaz na pele por meio de aplicação tópica, o diâmetro das partículas não deve ultrapassar 100 nm, devido às propriedades da camada córnea e sua limitada permeabilidade (LI *et al.*, 2016; MULLER *et al.*, 2016). Por outro lado, nanopartículas ideais para uso oral devem possuir diâmetros inferiores a 300 nm, haja vista que esse tamanho promove a permeabilidade intestinal e absorção sistêmica (THUY *et al.*, 2022).

Todas as formulações obtidas apresentaram diâmetro de partícula adequado tanto para administração tópica quanto oral (LI *et al.*, 2016; MULLER *et al.*, 2016; THUY *et al.*, 2022). No que diz respeito ao Pdl, apenas duas formulações não atenderam ao valor recomendado abaixo de 0,300, o qual assegura uma homogeneidade mais proeminente nos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos e farmacológicos. Em relação ao PZ, valores em módulo $\geq 30\text{ mV}$ são considerados ideais para conferir estabilidade eletrostática, sendo que apenas 3 amostras alcançaram valores próximos ao ideal (KISS *et al.*, 2019). Quanto à eficácia de encapsulamento, fármacos hidrofílicos como o AM são mais difíceis de serem incorporados em CLN de forma satisfatória (POONIA *et al.*, 2016), no entanto, neste estudo, foram alcançados valores elevados.



Tabela 3 - Matriz do planejamento quali-quantitativo realizado no estudo de pré-formulação. Legenda: Lip. = quantidade de lipídio total; Sol/Liq= proporção de lipídeo sólido/líquido do total de lipídios; Pot. = Potência; Diam. = diâmetro médio; PZ = potencial zeta; EE= eficiência de encapsulação.

Amostra	Lip. (%)	Sol/liq	Tempo (min)	Pot. (A %)	Diam. (nm)	Pdl	PZ (mV)	EE (%)
F1	7	65	5	70	35,96 ± 0,058	0,162 ± 0,006	-14,5 ± 0,60	78,00
F2	7	65	10	70	35,72 ± 0,025	0,179 ± 0,009	-12,4 ± 2,03	77,47
F3	7	85	10	50	31,38 ± 0,114	0,260 ± 0,003	-10,4 ± 1,60	84,49
F4	7	65	10	50	34,49 ± 0,165	0,320 ± 0,032	-20,4 ± 0,55	77,78
F5	7	85	5	70	34,66 ± 0,438	0,300 ± 0,004	-19,2 ± 1,62	59,00
F6	7	85	10	70	58,17 ± 0,275	0,488 ± 0,020	-24,0 ± 0,72	77,90
F7	7	65	5	50	34,59 ± 0,319	0,267 ± 0,004	-17,7 ± 0,70	80,50
F8	7	85	5	50	38,05 ± 0,553	0,221 ± 0,01	-22,6 ± 2,27	79,10
F9	10	85	10	50	58,47 ± 0,049	0,244 ± 0,008	-11,3 ± 0,57	77,86
F10	10	65	5	50	49,73 ± 0,419	0,241 ± 0,004	-14,1 ± 0,56	79,47
F11	10	85	10	70	54,39 ± 0,248	0,284 ± 0,002	-13,9 ± 0,53	80,21
F12	10	65	5	70	49,41 ± 0,225	0,270 ± 0,006	-18,1 ± 0,94	80,91
F13	10	85	5	70	54,23 ± 0,342	0,297 ± 0,006	-11,8 ± 0,65	81,82
F14	10	85	5	50	53,27 ± 0,474	0,284 ± 0,009	-12,4 ± 0,52	87,08
F15	10	65	10	50	49,53 ± 0,424	0,258 ± 0,004	-18,1 ± 0,87	88,52
F16	10	65	10	70	29,00 ± 0,193	0,251 ± 0,007	-6,76 ± 0,25	94,33

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Dessa forma, a formulação mais promissora escolhida para dar continuidade ao trabalho foi a F16, que apresentou bom Pdl, o menor diâmetro (29 nm) e melhor eficiência de encapsulação (>94%), além de possuir a maior quantidade de fármaco (proporcional à quantidade de lipídio). Embora o PZ da formulação F16 não esteja dentro do valor ideal para melhor estabilidade (>30mV), o tensoativo Alkest[®] CSO 300 utilizado nos CLN é um polietoxilado, conferindo estabilidade estérica às nanopartículas e auxiliando em casos de baixa estabilidade eletrostática (KISS *et al.*, 2019). Além disso, estudos posteriores empregando o método de liofilização serão conduzidos com o objetivo de melhorar o PZ dos CLN (LIMA, 2019).



Obtenção e caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Com base nos resultados do planejamento quali-quantitativo, foram definidos parâmetros para a obtenção das nanopartículas, sendo o tempo de sonicação de 10 minutos à uma potência de 70% de amplitude, utilizando 10% de lipídeo, com a proporção de 65% de Dynasan® 116 e 35% de Miglyol® 812, 10% de tensoativos (40% de Span® 80 e 60% de Alkest® CSO 300). A solução contendo o fármaco foi utilizada na quantidade de 29% em relação à fase lipídica, e a concentração utilizada foi de 23 mg/mL. Assim, a formulação mais promissora escolhida para dar seguimento ao estudo foi reproduzida e passou por caracterizações de suas propriedades físico-químicas.

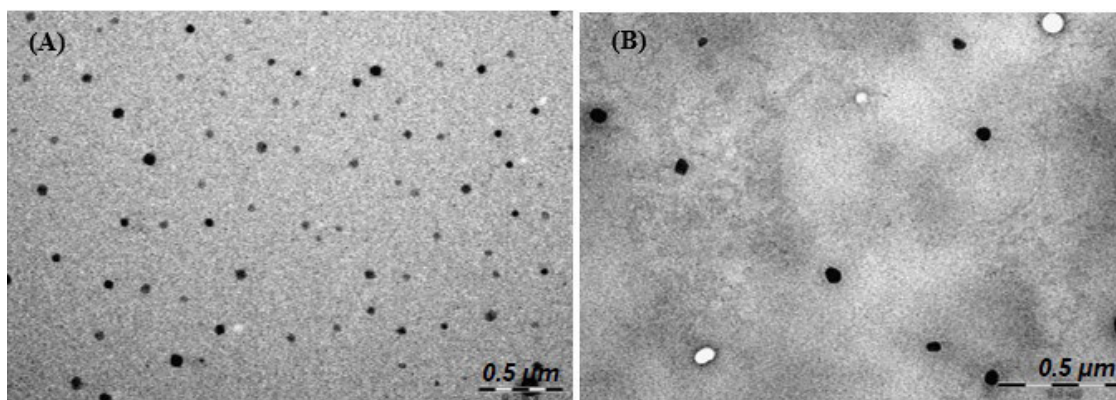
O CLN contendo o fármaco (CLN16) apresentou 29 nm de diâmetro, Pdl de 0,251 e PZ de -6,76 mV, enquanto o CLN branco (CLNBr), sem o fármaco, tinha 55,23 nm, Pdl de 0,224 e PZ de -12,6 mV, respectivamente. A diferença de tamanho dos CLN com e sem fármaco pode estar relacionada a diversos fatores que influenciam a formação das nanopartículas. A redução no tamanho e no PZ do CLN16 com relação ao CLNBr pode ser justificada com uma possível interação do AM com os componentes lipídicos, funcionando como um agente de nucleação, promovendo a formação de partículas menores; além de interagir eletrostaticamente com os íons presentes na formulação afetando o PZ do CLN (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2021). Entretanto, essa possível propriedade do AM não foi reportada em nenhum estudo anterior a esse. Assim, esse trabalho pode ser um pioneiro ao sugerir essa influência do AM na redução do tamanho e PZ dos CLN.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

A avaliação da morfologia das nanopartículas por MET permitiu a visualização direta dos CLN, com e sem fármaco, conforme pode ser observado na Figura 4. Na Figura 4A, pode ser observada a microfotografia do CLNBr, sem fármaco, que apresentaram diâmetros inferiores a 100 nm, com morfologia sugerindo uma alta eficiência no processo de emulsificação e formação dos nanocarreadores.

Na Figura 4B, é mostrada a microfotografia do CLN16, também com partículas de morfologia esférica e diâmetros inferiores a 100 nm, corroborando os resultados obtidos pelo DLS. Além disso, o CLN16 apresentou partículas predominantemente mais escuras em comparação ao CLNBr, o que pode ser atribuído ao fármaco, que possui um metal na molécula e pode gerar maior contraste na microscopia.

Figura 4 - Microfotografias obtidas por MET do CLNBr (A) e CLN16 (B).



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

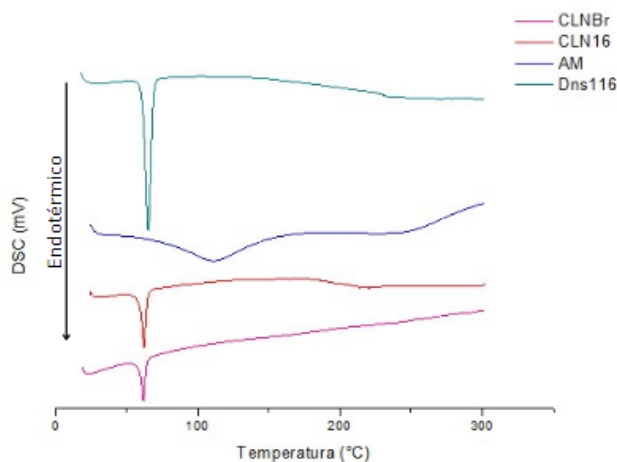
Calorimetria diferencial exploratória dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Foram conduzidas análises utilizando DSC para avaliar o comportamento térmico dos CLN, comparando os sistemas com e sem o fármaco, e avaliando a cristalinidade da matriz lipídica. De acordo com a Figura 5, é possível observar na curva do CLN16 que o evento de fusão do fármaco ($\pm 110^{\circ}\text{C}$)



não apareceu, indicando sua incorporação na matriz lipídica da nanopartícula. Apenas é observado um pico endotérmico referente à fusão do Dynasan® 116, com um deslocamento de 65 °C para 62 °C e uma redução de entalpia para -68,34 J/g.

Figura 5 - Gráficos de DSC do lipídio, fármaco e dos nanocarreadores. Legenda: Dns116= Dynasan; AM = antimoniato de meglumina; CLN16 = nanocarreador com AM; CLNBr= nanocarreador branco.



Na curva do CLNBr, também só aparece o pico de fusão do Dynasan® 116, com redução para 61,8 °C e entalpia -61,63 J/g. Tal diferença está relacionada à presença do fármaco no CLN16, que por ter um componente a mais, eleva a temperatura e entalpia de fusão. Em comparação com o lipídeo sólido isolado, a redução de entalpia de -188,24 J/g para -68,34 J/g está relacionada à formação de uma estrutura menos cristalina do lipídeo no nanocarreador (LIU *et al.*, 2017).

Com o intuito de obter conclusões mais precisas sobre a diminuição da cristalinidade do lipídeo durante o processo de formação das nanopartículas, utilizou-se o resultado da DSC para calcular o IC. A equação de IC, descrita nos procedimentos, foi empregada para esse cálculo. O resultado mostrou um IC de 55,8% para o CLN16, indicando que aproximadamente 55% da matriz lipídica voltou para sua conformação mais estável (cristalinizada). Um IC baixo indica uma cristalização menor, o que, como já mencionado, é um parâmetro desejável para a obtenção de nanocarreadores mais estáveis e com maior tempo de retenção do fármaco em sua matriz (PATHAK; KESHRI; SHAH, 2011). Entretanto, um IC muito baixo não é ideal, haja vista que deixa os CLN susceptíveis a processos de instabilidade e pode reduzir a EE% (MADUREIRA *et al.*, 2015).

Dessa forma, os resultados de IC do CLN obtido informam que a incorporação do lipídeo líquido foi eficaz para a redução da cristalinidade, favorecendo o elevado encapsulamento do fármaco.

Difratometria de Raios X (DRX)

De acordo com o gráfico obtido pela DRX, exposto na Figura 6, o padrão DRX do AM confirmou sua morfologia amorfa e geometria estrutural indefinida, favorável para sua maior incorporação nas matrizes lipídicas devido à menor necessidade de gasto energético (SILVA, 2016).

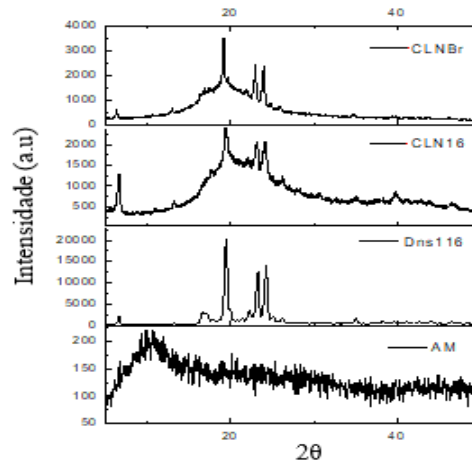
O Dynasan® 116 exibiu picos intensos em ângulos 2θ aproximados de 19,52, 23,19, 24,27, indicando natureza cristalina. Esses picos estão relacionados às formas polimórficas α , β e β/β' , respectivamente, e estão de acordo com a literatura (KIPRIYE; ŞENEL; YENILMEZ, 2017).

Os CLN apresentaram difratogramas semelhantes, com um grande halo amorfo que sobrepõe e diminui os picos cristalinos do lipídeo sólido. Essa redução de cristalinidade corrobora o resultado de IC obtido pelo DSC, que demonstrou um menor grau de cristalização da matriz lipídica. Também



é possível notar que o CLN16 apresentou uma sobreposição pelo halo amorfo com picos de menor intensidade quando comparado ao CLNBr, o que é justificável pela presença do fármaco que possui característica amorfa e contribui para o perfil de cristalinidade reduzido (LIU *et al.*, 2017). Ademais, esses resultados são semelhantes aos relatados por Souza (2022) e Silva (2016).

Figura 6 - Difratogramas do lipídio, fármaco e dos nanocarreadores. Legenda: Dns116= Dynasan; AM = antimoniato de meglumina; CLN16 = nanocarreador com AM; CLNBr= nanocarreador branco.

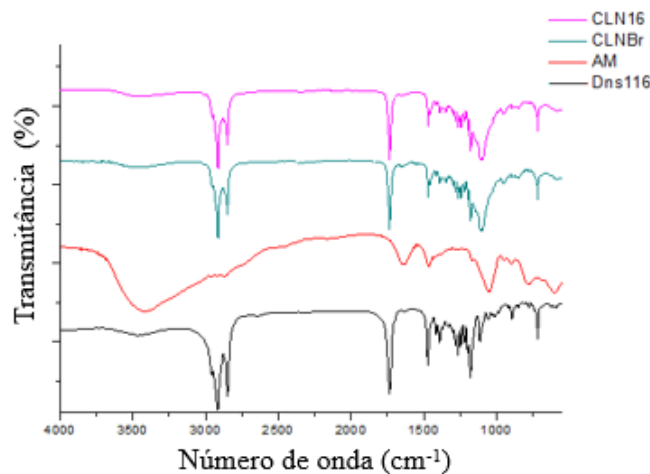


Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier

De acordo com a Figura 7, foi possível observar que o CLNBr e CLN16 apresentaram espectros na região do infravermelho muito similares, com predominância dos picos em regiões características do lipídio. Os picos referentes ao fármaco não foram observados no CLN16 devido à alta taxa de encapsulação (>90%), sendo visíveis apenas as bandas referentes ao lipídio sólido, que é o componente majoritário do CLN.

Figura 7 - Espectro de infravermelho do lipídio, fármaco e dos nanocarreadores. Legenda: Dns116= Dynasan; AM = antimoniato de meglumina; CLN16 = nanocarreador com AM; CLNBr= nanocarreador branco.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

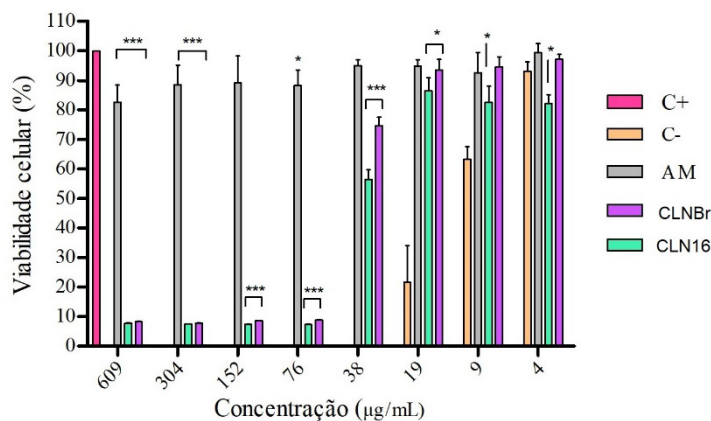
Avaliação da citotoxicidade in vitro dos carreadores lipídicos nanoestruturados

De acordo com os resultados expressos na Figura 8, a viabilidade dos macrófagos, quando ex-



postos ao AM, sofreu alterações significativas em comparação ao controle positivo nas concentrações mais elevadas, embora não seja considerado citotóxico, visto que os níveis de viabilidade permaneceram superiores a 82%. Os CLN apresentaram toxicidade acima da concentração de 38 µg/mL, onde o CLNBr apresentou 74,5% de viabilidade celular, enquanto o CLN16 apresentou 56,5% de viabilidade nessa concentração.

Figura 8 – Citotoxicidade *in vitro* do fármaco e dos nanocarreadores frente aos macrófagos RAW 264.7. Legenda: CLN16= nanocarreador com AM; AM = antimoniato de meglumina; CLNBr = nanocarreador sem AM.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Considera-se citotóxico um produto que provoca uma inibição no crescimento celular acima de 30% (ISO, 2009). Assim, os resultados indicaram que o fármaco em solução (AM) não exibiu citotoxicidade nas concentrações estudadas para os macrófagos.

Por outro lado, os CLN apresentaram citotoxicidade em diferentes concentrações, sendo o CLNBr considerado citotóxico acima de 38 µg/mL ($CC_{50}=39,3$ µg/mL) e o CLN16 a partir de 19 µg/mL ($CC_{50}=39,2$ µg/mL). A citotoxicidade do CLNBr pode ser explicada pela presença dos tensoativos presentes na formulação. Estudos relatam que tensoativos não iônicos polietoxilados em concentrações acima de 0,02% podem manifestar citotoxicidade (GRANT *et al.*, 1992). Já o aumento da citotoxicidade do AM que ocorreu quando incorporado no CLN16 se dá ao fato de que a interação e internalização do fármaco nas células são acentuadas pelo nanocarreador, devido ao seu tamanho reduzido e aumento da área superficial de contato. Entretanto, sua atividade depende da liberação a partir da nanopartícula, nos CLN é esperado que essa liberação ocorra de forma lenta e prolongada. É importante ressaltar que o CLN, ao favorecer a internalização do fármaco nas células, permite sua conversão para a forma ativa, que é a forma tóxica para as leishmanias. Espera-se então, que o CLN potencialize a toxicidade do AM contra as leishmanias em uma menor concentração de fármaco, resultando em um regime posológico reduzido e com doses menores. Entretanto, ensaios para avaliar a atividade leishmanicida e perfil de liberação dos CLN ainda serão realizados.

Comparativamente a outras investigações, concentrações tóxicas do AM já foram relatadas e variaram entre 112,1 e 1125 µg/mL em macrófagos J774. Já em diferentes tipos de carreadores, as concentrações tóxicas abrangem uma faixa de 148,1 a 1000 µg/mL (BORBOREMA *et al.*, 2016; BARAZESH *et al.*, 2018; ALBALAWI *et al.*, 2021).

Conclusão

Os ensaios de pré-formulação resultaram em CLN com características físico-químicas promissoras para o alvo terapêutico, com diâmetro e eficiência de encapsulação adequados para nanocarreadores de administração oral ou tópica. Devido ao PZ obtido, espera-se a realização de



estudos posteriores empregando liofilização visando conferir estabilidade a esses nanocarreadores e permitir incorporação em diferentes formas farmacêuticas. A matriz menos cristalina confirmada pelas técnicas de caracterização indica a obtenção de um CLN com matriz lipídica amorfizada que permitiu uma alta eficiência de encapsulação (>90%). O ensaio de viabilidade celular permitiu conhecer concentrações citotóxicas do fármaco em macrófagos, que foram intensificadas quando incorporadas na nanopartícula, devido a melhor interação com as células que permitiu a metabolização do fármaco e conversão na sua forma ativa. Dessa forma, estudos posteriores serão realizados para avaliar as concentrações tóxicas em leishmanias, permitindo conhecer concentrações seguras para uso dos CLN obtidos. Também será testado o perfil da cinética de liberação e incorporação dos CLN em formas farmacêuticas.

Agradecimentos

A Central de multiusuário do departamento de física (DF) da UFPE, ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN) e ao Centro de tecnologias estratégicas do Nordeste (CETENE) pelas análises realizadas que contribuíram para este estudo.

Referências

ALBALAWI, A. E; ABDEL-SHAFY, S; KHUDAIR KHALAF, A; ALANAZI, A. D; BAHARVAND, P; EBRAHIMI, K; MAHMOUDVAND, H. Therapeutic potential of green synthesized copper nanoparticles alone or combined with meglumine antimoniate (glucantime®) in cutaneous leishmaniasis. **Nanomaterials**, v. 11, n. 4, p. 891, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/891>. Acesso em: 23 de nov. de 2023.

AMINU, N; CHAN, S. Y; MUMUNI, M. A; UMAR, N. M; TANKO, N; ZAURO, S. A; TOH, S. M. Physicochemical compatibility studies of triclosan and flurbiprofen with excipients of pharmaceutical formulation using binary, ternary, and multi-combination approach. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.1, p.1-16, 2021. Disponível em: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-021-00302-7>. Acesso em: 13 de maio 2023.

BARAZESH, A; MOTAZEDIAN, M. H; SATTARAHMADY, N; MOROWVAT, M. H.; RASHIDI, S. Preparation of meglumine antimonate loaded albumin nanoparticles and evaluation of its anti-leishmanial activity: an in vitro assay. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, p. 416-422, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12639-018-1018-7>. Acesso em: 23 de nov. de 2023.

BORBOREMA, S. E. T; OSSO JUNIOR, J. A; ANDRADE JUNIOR, H. F. D; NASCIMENTO, N. D. Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine liposomes: physicochemical evaluation and antileishmanial activity. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v.49, p.196-203, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/VBxZwZhhfLvNSQZHFjFmSYt/?lang=en>. Acesso em: 28 de nov. de 2023.

CHADHA, R; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 87, p. 82-97, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708513002665>. Acesso em: 13 de nov. de 2023.

CORREIA, D; MACEDO, V.O; CARVALHO, E. M; BARRAL, A; MAGALHÃES, A. V; DE ABREU, M. V; ORGE, M. L; MARSDEN, P. Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p. 447-453, 1996. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/8966308>. Acesso em: 25 de out. de 2023.

COSTA, L. A. G. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo antimoniat**



de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea. 2019. 77 f. TCC (farmácia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

DOROFEEV, G. A. *et al.* Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction. *Colloid Journal*, v. 74, p. 675-685, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/s1061933x12060051>. Acesso em: 09 de jan de 2024.

GORDILLO-GALEANO, A; MORA-HUERTAS, C. E. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: Emphasizing some parameters for correct measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 620, p. 126610, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775721004799>. Acesso em: 09 de jan de 2024.

GORDILLO-GALEANO, A; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.133, p.285–308, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641118310610>. Acesso em: 09 de jan de 2023.

GRANT, R. L; YAO, C; GABALDON, D; ACOSTA, D. Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. **Toxicology**, v. 76, p. 153-176, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300483X92901628>. Acesso em: 09 de jan de 2024.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 1, p. 311-325, 1949. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Classification-of-surface-active-agents-by-%22HLB%22-Griffin/faf8af2f92ef95478be33f5e9929ade7c98d545b>. Acesso em: 27 de nov. de 2023.

HENDRICKX, S; CALJON, G; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology research**, v. 118, p. 2743-2752, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-019-06443-2>. Acesso em 09 de jan de 2024.

HOMMA, A; FREIRE, M. S; POSSAS, C. Vacinas para doenças negligenciadas e emergentes no Brasil até 2030: o “vale da morte” e oportunidades para PD&I na Vacinologia 4.0. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, 2020.

IBRAHIM, W. M; ALOMRANI, A. H; YASSIN, A. E. B. Novel sulpiride-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 129--144, 2014.

KAMNEV, A. A; DYATLOVA, Y. A; KENZHEGULOV, O. A; VLADIMIROVA, A. A; MAMCHENKOVA, P. V; TUGAROVA, A. V. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1146, 2021.

KHERADMANDNIA, S; VASHEGHANI, E. F; NOSRATI, M; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.

KIPRIYE, Z; ŞENEL, B; YENILMEZ, E. Preparation and evaluation of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for targeted drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 9, p. 2057–2068, 2017.

KISS, E. L; BERKÓ, S; GÁCSI, A; KOVÁCS, A; KATONA, G; SOÓS, J; BUDAI-SZŰCS, M. Design and optimization of nanostructured lipid carrier containing dexamethasone for ophthalmic use. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, p. 679, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/12/679>.



Acesso em: 28 de nov. de 2023.

LI, Q; CAI, T; HUANG, Y; XIA, X; COLE, S. P; CAI, Y. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 6, p. 122, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/7/6/122>. Acesso em: 27 de nov. de 2023.

LIMA, M. N. **Caracterização de nanopartículas de PCL liofilizadas contendo dietilcarbamazina**. 2019. 38 f. TCC (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2019.

LIU, J; CHRISTOPHERSEN, P. C; YANG, M; NIELSEN, H. M; MU, H. The impact of particle preparation methods and polymorphic stability of lipid excipients on protein distribution in microparticles. **Drug development and industrial Pharmacy**, v. 43, n. 12, p. 2032–2042, 2017.

MADUREIRA, A. R; CAMPOS, D. A; FONTE, P; NUNES, S; REIS, F; GOMES, A. M; SARMENTO, B; PINTADO, M. M. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. **RSC Advances**, v. 5, n. 29, p. 22665–22673, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c4ra15802d>. Acesso em: 16 set. 2023.

MÜLLER, R. H; ALEXIEV, U; SINAMBELA, P; KECK, C. M. Nanostructured lipid carriers (NLC): the second generation of solid lipid nanoparticles. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers**, p. 161-185, 2016.

PATHAK, K; KESHRI, L; SHAH, M. Lipid nanocarriers: influence of lipids on product development and pharmacokinetics. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 28, n. 4, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2017.1361967>. Acesso em: 25 de nov. de 2023.

PERES, L. B; DE ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 317–323, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776515303829>. Acesso em: 28 de nov. de 2023.

POONIA, N; KHARB, R; LATHER, V; PANDITA, D. Nanostructured lipid carriers: versatile oral delivery vehicle. **Future science OA**, v. 2, n. 3, p. FSO135, 2016. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/fsoa-2016-0030>. Acesso em: 28 de nov. de 2023.

ROCHA, M. L. A. **Planejamento experimental de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo nitrato de gálio para fins terapêuticos**. 2022. 63 f. TCC (farmácia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SAHU, D; KANNAN, G. M; TAILANG, M; VIJAYARAGHAVAN, R. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles: A Comparison between Particle Size and Cell Type . **Journal of Nanoscience**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

SEVERINO, P; PINHO, S. C; SOUTO, E. B; SANTANA, M. H. Crystallinity of Dynasan® 114 and Dynasan® 118 matrices for the production of stable Miglyol®-loaded nanoparticles. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 101-108, 2012.

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

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

THUY, V. N.; VAN, T. V.; DAO, A. H.; LEE, B. J. Nanostructured lipid carriers and their potential applications



for versatile drug delivery via oral administration. **OpenNano**, v. 8, p. 100064, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352952022000263>. Acesso em: 02 de nov. de 2023.

TIMÓTEO, T. R. R.; DE MELO, C. G.; DE ALENCAR DANDA; L. J.; SILVA, L. C. P. B. B.; FONTES, D. A. F.; SILVA, P. C. D.; NETO, P. J. R. Layered double hydroxides of CaAl: A promising drug delivery system for increased dissolution rate and thermal stability of praziquantel. **Applied Clay Science**, v. 180, p. 105197, 2019.

VASCONCELOS, J. M.; GOMES, C. G.; SOUSA, A.; TEIXEIRA, A. B.; LIMA, J. M. LEISHMANIOSE tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2019/01/RBAC-vol-50-3-2018-ref-722-final.pdf>. Acesso em: 09 de jan. de 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 20 de jan. de 2023.

ZHENG, M.; FALKEBORG, M.; ZHENG, Y.; YANG, T.; XU, X. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 430, p. 76-84, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775713002987>. Acesso em: 05 de dez. de 2023.