UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

JULIANA MIDORI NAKAMURA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO LEFLUNOMIDA

Goiânia
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Juliana Midori Nakamura

Título do trabalho: "Desenvolvimento e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo leflunomida"

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Luís Antônio Dantas Silva**, **Professor do Magistério Superior**, em 02/08/2023, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Juliana Midori Nakamura**, **Discente**, em 02/08/2023, às 22:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3886553** e o código CRC **CFC0A687**.

JULIANA MIDORI NAKAMURA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO LEFLUNOMIDA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Bacharel (a) em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva

Goiânia

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Nakamura, Juliana Midori
Desenvolvimento e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo leflunomida [manuscrito] / Juliana Midori Nakamura. - 2023.
xxxiii, 33 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2023.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Leflunomida. 2. Artrite reumatoide. 3. Nanoencapsulação. 4. Nanopartícula lipídica. I. Silva, Luís Antônio Dantas, orient. II. Título.

CDU 615.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao(s) 02 (dois) dia(s) do mês de **Agosto** do ano de **2023** iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado **"Desenvolvimento e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo leflunomida"**, de autoria de **Juliana Midori Nakamura**, do curso de **Farmácia**, do(a) **Faculdade de Farmácia** da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) **Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva** (FF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Mariana Arraes Salomão** (Farmacêutica, Mestre pelo programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFG) e **Tacio Gonçalves Hayasaki** (Farmacêutico, Mestre pelo programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de (**9,5**) , tendo sido o TCC considerado (**aprovada**).

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Luís Antônio Dantas Silva**, **Professor do Magistério Superior**, em 02/08/2023, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Mariana Arraes Salomão**, **Usuário Externo**, em 02/08/2023, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Tacio Goncalves Hayasaki**, **Usuário Externo**, em 02/08/2023, às 18:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3886552** e o código CRC **D76F1554**.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Sandra Ribeiro e Flávio Nakamura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Sandra e Flávio, por sempre me apoiarem e me darem todo o auxílio sem medirem esforços para que eu pudesse concluir a graduação. Sou grata por todo amor, carinho e respeito que me deram, e mesmo com toda a distância sempre foram presentes nesta minha jornada.

Ao meu orientador Luís Antônio, pela disposição, confiança e leveza, tornando possível a realização deste trabalho. Sou grata por todo o aprendizado nestes últimos anos, sendo como meu professor, orientador de iniciação científica e de estágios. Participou de muitos momentos importantes da minha graduação. Sua sabedoria e simplicidade o tornam um profissional grandioso.

Agradeço imensamente a Caroline, que me acompanhou desde o início do projeto. Sempre foi muito solícita e pode compartilhar comigo todos os seus ensinamentos. Sou grata pelo seu companheirismo, paciência e por acreditar no meu potencial.

Ao Tacio, pela sua disponibilidade, paciência e por dar todo o suporte no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço muito por aceitar o convite e fazer parte da minha banca de defesa de Tcc.

Agradeço a Mariana Salomão, que me auxiliou no laboratório no início da minha iniciação científica. E neste momento, por participar também da minha banca.

Agradeço também a Wayane, que esteve comigo no início da pesquisa. Compartilhamos dificuldades e também aprendizados.

Por fim, agradeço a toda a equipe do Laboratório Farmatec pela convivência e por contribuírem também no desenvolvimento da minha pesquisa.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada pela deformação e destruição das articulações periféricas. Um dos medicamentos indicados para o seu tratamento é a leflunomida (LEF). Existem estratégias que podem ser adotadas para melhorar a baixa solubilidade aquosa do fármaco e minimizar os seus efeitos adversos sistêmicos (sintomas gastrointestinais, reações alérgicas, alopecia, erupções cutâneas, infecções oportunistas e hipertensão arterial), como a nanoencapsulação e a administração local. Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e avaliar suas características físico-químicas, estabilidade de armazenamento, estabilidade cinética e eficiência de encapsulação. Utilizou-se o método de emulsificação e evaporação de solvente associado a microfluidização. Na caracterização físico-química e no estudo de estabilidade foram avaliados o tamanho médio e índice de polidispersividade (PdI) através do espalhamento dinâmico da luz (DLS). A estabilidade cinética dos CLN foi avaliada através do espalhamento múltiplo de luz. A eficiência de encapsulação foi determinada por meio do método indireto, quantificando a concentração do fármaco livre presente na formulação. Observou-se a formação de partículas em escala nanométrica e homogêneas (tamanho médio de 213 nm e PdI de 0,239). Os CLN apresentaram baixa variação de *backscattering* (ΔBS), menor que 2%, e eficiência de encapsulação de 73,3% ± 9,1. A partir do método de preparo por emulsificação e evaporação de solvente foi possível obter nanosistemas com características apropriadas para estudos futuros *in vitro* de liberação e permeação cutânea da LEF nanoencapsulada.

Palavras chave: Leflunomida; artrite reumatoide; nanoencapsulação; nanopartícula lipídica.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by deformation and destruction of peripheral joints. One of the drugs indicated for its treatment is leflunomide (LEF). There are strategies that can be adopted to improve the low aqueous solubility of the drug and minimize its systemic adverse effects (gastrointestinal symptoms, allergic reactions alopecia, skin eruptions, opportunistic infections and arterial hypertension), such as nanoencapsulation and local administration. This project aimed to develop nanostructured lipid carriers (NLC) and to evaluate their physicochemical characteristics, storage stability, kinetic stability and encapsulation efficiency. The method of emulsification and solvent evaporation associated with microfluidization was used. In the physical-chemical characterization and in the stability study, the average size and polydispersity index (PdI) were evaluated through dynamic light scattering (DLS). The kinetic stability of NLC was evaluated through multiple light scattering. The encapsulation efficiency was determined using the indirect method, quantifying the concentration of free drug present in the formulation. The formation of nanometric and homogeneous particles (average size of 213 nm and PdI of 0.239) was observed. The NLC showed low backscattering variation (ΔBS), less than 2%, and encapsulation efficiency of 73.3% ± 9.1. The preparation method by emulsification and solvent evaporation obtained systems with appropriate characteristics for future in vitro studies of release and cutaneous permeation of nanoencapsulated LEF.

Key words: Leflunomide; rheumatoid arthritis; nanoencapsulation; lipid nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da leflunomida e seu metabólito ativo A77 1726 (teriflunomida) 11
Figura 2. Representação gráfica da curva analítica de calibração da leflunomida através do método de quantificação CLAE, na faixa de concentrações de 12,5 a 100 µg/mL.....18
Figura 3. Gráfico em relação ao tamanho médio das diferentes formulações de CLN.....21
Figura 4. Gráfico em relação ao PdI das diferentes formulações de CLN.....22
Figura 5. Gráfico em relação ao PdI da formulação contendo fármaco, armazenada a temperatura ambiente e entre 2 a 8 °C, no estudo de estabilidade.....23
Figura 6. Gráfico em relação ao tamanho médio da formulação contendo fármaco, armazenada a temperatura ambiente e entre 2 a 8 °C, no estudo de estabilidade.....24
Figura 7. Estabilidade cinética da formulação 5.1 de CLN contendo leflunomida: a) gráfico completo e b) gráfico ampliado.....27
Figura 8. Estabilidade cinética da formulação 5.2 de CLN contendo leflunomida: a) gráfico completo e b) gráfico ampliado.....28
Figura 9. Estabilidade cinética da formulação 5.3 de CLN contendo leflunomida: a) gráfico completo e b) gráfico ampliado.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção de lipídios e tensoativos utilizados para preparo de diferentes formulações de CLN.....15
Tabela 2. Dados referentes aos ensaios de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de LEF, avaliados a partir das concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica.....19
Tabela 3. Caracterização físico-química dos CLN obtidos pelo método de emulsificação e evaporação do solvente quanto ao tamanho médio e PdI.....21
Tabela 4. Estabilidade do CLN contendo LEF, quanto ao tamanho médio e PdI, em relação ao armazenamento em temperatura ambiente (25 °C) e entre 2 a 8 °C.....23

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – Artrite reumatoide

MMCD – Medicamentos modificadores do curso da doença

LEF – Leflunomida

FDA – *Food and Drug Administration*

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

DPR – Desvio padrão relativo

DLS – Espalhamento dinâmico da luz

PdI – Índice de polidispersividade

BS – *Backscattering*

ΔBS – Variação de *backscattering*

T – Transmissão

EE – Eficiência de encapsulação

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**..... 10
2. **METODOLOGIA**..... 13
   - 2.1 COVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO..... 13
     - 2.1.1 Linearidade..... 13
     - 2.1.2 Precisão e exatidão..... 14
     - 2.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação..... 14
   - 2.2 PREPARO DE CLN POR EMULSIFICAÇÃO E EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE..... 14
   - 2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CLN..... 15
   - 2.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO 16
   - 2.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO..... 16
   - 2.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE CINÉTICA..... 17
   - 2.7 ANÁLISE ESTATÍSICA..... 18
3. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 18
   - 3.1 COVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO..... 18
     - 3.1.1 Linearidade..... 18
     - 3.1.2 Precisão e exatidão..... 19
     - 3.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação..... 19
   - 3.2 FORMAÇÃO DE CLN POR EMULSIFICAÇÃO E EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE..... 19
   - 3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CLN..... 20
   - 3.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO..... 22
   - 3.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO..... 25
   - 3.6 ESTABILIDADE CINÉTICA..... 25
4. **CONCLUSÃO**..... 30
5. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... 30

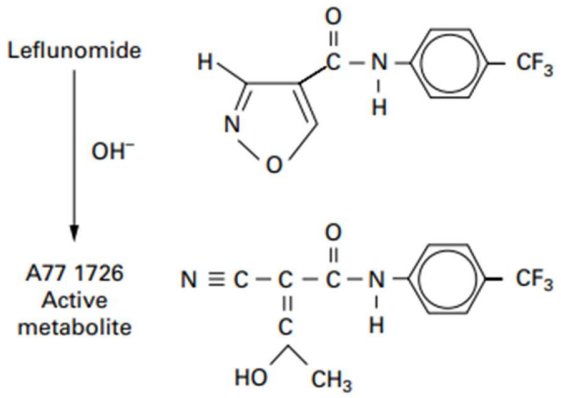
1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica do tecido sinovial das articulações periféricas, causando deformação e destruição dessas articulações por meio de erosões dos tecidos ósseo e cartilaginoso (MOTA et al., 2012; KÖHLER et al., 2019). Sua etiologia ainda é desconhecida, entretanto, fatores genéticos e ambientais influenciam em sua patogênese (GOELDNER et al., 2011). Acomete cerca de 1% da população mundial e afeta três vezes mais as mulheres que os homens (GOELDNER et al., 2011).

O tratamento farmacológico da AR consiste no uso clínico de diferentes classes de fármacos para aliviar as dores, controlar a inflamação e buscar a remissão da doença ou, ao menos, a diminuir a manifestação da doença nos pacientes (KÖHLER et al., 2019). Sendo assim, são indicados o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, glicocorticoides, agentes imunobiológicos e, ainda, medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) (GOELDNER et al., 2011). Dentre a classe dos MMCDs, destaca-se a leflunomida (LEF) na terapia farmacológica da AR (COSTA e BECK, 2011; MOTA et al., 2012; KÖHLER et al., 2019).

A LEF (Figura 1), aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1998, é considerada um agente imunomodulador derivado de isoxazol, quimicamente conhecida como 5-metil-N-[4-trifluormetilfenil]-4-isoxazolcarboxamida. Ao ser administrada, a LEF converte-se em seu metabólito ativo (Figura 1), teriflunomida, que inibe a enzima diidroorotato desidrogenase (envolvida na síntese de pirimidina) e impede a proliferação de linfócitos T ativos, apresentando, assim, atividade antiproliferativa e anti-inflamatória no tratamento da AR (FDA, 1998; BREEDVELD e DAYER, 2000; OSIRI et al. 2003; FRAGOSO e BROOKS, 2015).

Figura 1. Estrutura química da leflunomida e seu metabólito ativo A77 1726 (teriflunomida).



Fonte: BREEDVELD e DAYER, 2000.

Apresenta forma molecular C12H9F3N2O2, massa molar de 270,21 g/ mol, pka de 10,8 e log P igual a 2,43 (CALDEIRA, 2014; SOUZA, 2022). Além disso, é um fármaco que pertence à classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade em água (menos de 40 mg/ L) (VEGA et al., 2006).

Além de apresentar baixa solubilidade aquosa, as formulações presentes no mercado são de administração oral e, após absorção, as moléculas do fármaco sofrem intensa metabolização, principalmente pelo fígado (efeito de primeira passagem), e também por enzimas presentes na parede intestinal (metabolismo pré-sistêmico), o que reduz consideravelmente a sua biodisponibilidade oral (FDA, 1998; VEGA et al., 2006).

Apresenta, ainda, efeitos adversos associados ao uso sistêmico como sintomas gastrointestinais (diarreia, dispepsia, vômitos e úlceras orais), reações alérgicas, alopecia, erupções cutâneas, infecções oportunistas e hipertensão arterial (OSIRI et al. 2003; FRAGOSO e BROOKS, 2015). Ademais, apresenta potencial toxicidade embriofetal e hepatotoxicidade com um aumento significativo de enzimas hepáticas (FDA, 1998; OSIRI et al. 2003; FRAGOSO e BROOKS, 2015).

Existem estratégias que podem ser adotadas para melhorar estas limitações biofarmacêuticas e minimizar os efeitos adversos sistêmicos, como a nanoencapsulação e a administração local (tópica). Tais abordagens podem favorecer a disponibilidade do

fármaco no local de ação e maior controle na sua liberação, podendo aumentar a sua efetividade (BAE e PARK, 2016; CHUANG et al., 2018).

Os carreadores nanoestruturados são sistemas de encapsulação de princípios ativos que podem conferir estabilidade físico-química, proteção à degradação de fármacos lábeis, são biocompatíveis e podem ser administrados por diferentes vias, por apresentarem tamanho reduzido, entre 100 a 1000 nm (MARCATO, 2009; SOUTO et al., 2011). Podem ser classificados como lipossomas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas (MARCATO, 2009).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), consideradas nanopartículas de primeira geração, foram desenvolvidas como alternativa para os sistemas coloidais tradicionais (emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas) (SOUTO et al., 2011; ANDRADE, 2014; SANTOS, 2017). São constituídas por tensoativos e lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal. Esta característica pode ser limitante para a capacidade de encapsulação e estabilidade durante o armazenamento, pois a ocorrência da transição polimórfica na matriz das nanopartículas pode expulsar o fármaco do seu interior (MARCATO, 2009; ANDRADE, 2014; SANTOS, 2017).

Para superar essas limitações das NLS, foram desenvolvidas a segunda geração de nanopartículas lipídicas, chamados de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (SANTOS, 2017). Estes são constituídos pela combinação de lipídeos sólidos com lipídeos líquidos ou semissólidos, permitindo a formação de uma matriz lipídica mais desorganizada, o que confere maior capacidade de encapsulação (MARCATO, 2009; ANDRADE, 2014; SANTOS, 2017). Ademais, os CLN possuem vantagem de poder transportar mais de um fármaco em sua nanoestrutura (co-encapsulação), apresentarem baixa toxicidade, maior estabilidade do fármaco e serem produzidos em larga escala (ANDRADE, 2014; SANTOS, 2017).

Diversos métodos de preparo de CLN têm sido descritos na literatura para a incorporação de fármacos (MARCATO, 2009; SOUTO et al., 2011), dentre eles têm-se a emulsificação e evaporação do solvente. Neste método uma fase orgânica, contendo lipídio dissolvido num solvente orgânico imiscível em água, é emulsificada em uma fase aquosa com tensoativos e, após formada a emulsão, é realizada a evaporação do solvente orgânico com agitação, podendo ser submetida à uma baixa pressão (SOUTO

et al., 2011). Além disso, apesar desse método apresentar resíduos de solvente orgânico na dispersão final, origina partículas com dimensões reduzidas e evita a exposição do ativo a temperaturas elevadas (MARCATO, 2009; SOUTO et al., 2011).

Com isso, o objetivo foi o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados, com a perspectiva de desenvolvimento de um sistema que possa ser usado para a administração tópica da LEF, a partir do método de emulsão e evaporação de solvente, avaliando suas características físico-químicas, estabilidade de armazenamento, estabilidade cinética e eficiência de encapsulação.

2 METODOLOGIA

2.1 Covalidação do método analítico

Foi realizada a covalidação do método analítico para quantificação da leflunomida descrito por Hayasaki (2021). Neste método foram avaliados os parâmetros como linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017).

A LEF foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o equipamento Infinity 1260 (Agilent Technologies) e coluna Zorbax SB-C18 (250 nm x 4,6 mm, 5 µm). A corrida cromatográfica foi realizada com um volume de injeção de 20 µL, tempo de corrida de 10 minutos, fluxo de fase móvel igual a 1,0 mL/min e detecção na faixa do UV-VIS com comprimento de onda de absorção máxima de 260 nm.

2.1.1 Linearidade

A linearidade foi realizada a partir de uma solução estoque (1 mg/mL) de LEF, utilizando acetonitrila (Sigma-Aldrich, USA) e água ultrapurificada (Milli-Q, Millipore). Com isso, foram realizadas diluições seriadas a partir da solução mãe da LEF nas concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, em triplicata, preparadas em diluente

acetonitrila:água (60:40) para preparação das curvas analíticas. Foram calculados o desvio padrão entre as áreas dos picos e o coeficiente de correlação (r).

2.1.2 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram realizadas a partir das concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica, em triplicata e de formas independentes, em 3 dias diferentes e por 3 analistas diferentes. A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das médias das concentrações obtidas em experimento. A exatidão foi demonstrada pelo cálculo da relação entre a concentração média, obtida em experimento, e a concentração teórica de cada amostra.

2.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir dos parâmetros da curva analítica e calculados os valores teóricos pelas Equações 1 e 2, respectivamente.

$$LD = \frac{3{,}3 \times \sigma}{IC}$$ **Equação 1**

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$ **Equação 2**

Onde: IC é a inclinação da curva de calibração e σ é o desvio padrão.

2.2 Preparo de CLN por emulsificação e evaporação de solvente

A seleção dos lipídeos e tensoativos foi baseada no estudo de pré-formulação de Hayasaki (2021), o qual avaliou as interações físico-químicas entre o fármaco e diferentes excipientes pré-selecionados. Dessa forma, ácido esteárico, miglyol, span 60 e taurodeoxicolato de sódio se apresentaram compatíveis com a LEF (HAYASAKI, 2021) e foram utilizadas para o preparo dos CLN. Além disso, as proporções utilizadas de lipídeos

e tensoativos foram ajustadas experimentalmente, baseando-se na literatura (SANT'ANNA, 2015; SOUZA, 2022).

Para o preparo dos CLN foi utilizado o método de emulsificação e evaporação de solvente, sendo a fase orgânica composta por ácido esteárico (Vetec Química Fina, Brasil), miglyol (PIC Química, Brasil) e span 60 (Sigma-Aldrich, USA) dissolvidos em acetona (Honeywell Riedel-de Haen®, USA). A fase aquosa composta por taurodeoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, USA) dissolvido em água Milli-Q, a proporção utilizada em cada CLN foi demonstrada conforme a Tabela 1. Em seguida, ambas as fases foram levadas para o banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Unique) a 40 °C por 5 minutos para dissolução completa. Posteriormente, com auxílio da chapa magnética (IKA® RT 10 power) para formar a emulsão, nas formulações 1 e 2, as fases orgânicas foram logo vertidas nas fases aquosas sem aquecimento, enquanto as formulações 3, 4 e 5 foram mantidas em aquecimento (40 °C) para verter as fases.

Tabela 1. Proporção de lipídios e tensoativos utilizados para preparo de diferentes formulações de CLN.

CLN	Ácido esteárico (mg)	Miglyol (mg)	Span 60 (mg)	Tauro (mg)	Acetona (mL)	Água Milli-q (mL)	Aquecimento
1	150	0,095	18	-	20	40	-
2	150	0,095	-	18	20	40	-
3	150	0,095	18	-	20	40	40 °C
4	150	0,095	15	15	20	40	40 °C
5	90	0,086	60	40	20	40	40 °C

Por fim, a acetona foi evaporada em rotaevaporador (IKA® RV10) com rotação de 50 rpm e pressão final de 200 mbar em banho a 40 °C. Os CLN formados ficaram dispersos na fase aquosa do sistema e foram levados para a microfluidização

(Microfluidics LV1) para a redução do tamanho das partículas, sendo realizados 4 ciclos a pressão de 800 mbar.

Salienta-se que o fármaco foi adicionado na formulação que formou uma emulsão e apresentou os melhores resultados em relação aos parâmetros físico-químicos. Dessa forma, a incorporação da LEF no sistema foi realizada na fase orgânica, sendo adicionado 20 mg do fármaco, o qual representa 6,7% dos componentes da emulsão.

2.3 Caracterização físico-química dos CLN

Foram avaliados os parâmetros físico-químicos, como tamanho médio e índice de polidispersividade (PdI), por meio do espalhamento dinâmico da luz (DLS) com o equipamento ZetaSizer Nano SZEN 1600. Ressalta-se que somente as formulações que apresentaram parâmetros visuais adequados, sem partículas/gotículas de lipídios visíveis, foram analisadas a partir do DLS, sendo realizada triplicata de leitura a partir da diluição de uma alíquota de CLN em água Milli-Q (1:20).

2.4 Estudo de estabilidade de armazenamento

No estudo de estabilidade do CLN contendo o fármaco, foi avaliado as características físico-químicas (tamanho médio e PdI) em temperatura ambiente (25 °C) e entre 2 a 8 °C nos dias 0, 1, 3, 5 e 7.

2.5 Eficiência de encapsulação

Inicialmente, realizou-se a determinação de fármaco total na formulação por meio da diluição em solvente acetonitrila, seguindo a proporção 60:40 solvente e fase aquosa. Sendo assim, 1 mL de CLN foi diluído em 3 mL de água Milli-q e 6 mL de acetonitrila. A amostra foi levada ao banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Unique) por 10 minutos, seguida pela agitação em vórtex (AV-2, Gehaka) por 1 minuto, a fim de ‘quebrar’ a matriz lipídica que forma o nanocarreador lipídico, e com isso, desestruturando e liberando o fármaco encapsulado. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf®

Centrifuge 5430 R) a 5000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram filtrados em filtro de seringa Millex® (0,45 µm). Por fim, foi realizada a leitura em CLAE nas mesmas condições cromatográficas descritas no item 2.1.

A eficiência de encapsulação (EE) da LEF foi determinada através do método indireto, onde quantificou-se a concentração do fármaco livre presente na formulação. Desta forma, 1 mL de CLN foi adicionado no dispositivo de ultrafiltração Vivaspin® 2 (10 kDa MWCO, Sartorius) e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, uma alíquota de 400 µL do filtrado foi diluída em 600 µL de acetonitrila (60:40) e quantificada por CLAE.

A quantidade de LEF encapsulada nos CLN foi determinada pela diferença entre a concentração total de fármaco e a concentração de fármaco livre, não encapsulado. Então, a EE foi calculada conforme a Equação 3.

$$EE\% = \frac{(\text{LEF Total} - \text{LEF Livre})}{\text{LEF Total}} \times 100 \qquad \textbf{Equação 3}$$

Onde, EE% é a eficiência de encapsulação de leflunomida nos nanocarreadores lipídicos; LEF Total é a concentração total de leflunomida e LEF Livre é a concentração de leflunomida não encapsulada nos nanocarreadores.

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada em triplicata e, a partir dos resultados, obteve-se a média de EE% e o seu desvio padrão.

2.6 Estudo de estabilidade cinética

A estabilidade cinética do CLN contendo fármaco foi avaliada através do espalhamento múltiplo de luz, utilizando o equipamento Turbiscan Lab®. Este estudo foi avaliado em triplicata e as leituras das amostras de CLN foram realizadas a cada 2 minutos durante 2 horas a uma temperatura de 25 °C. Os resultados obtidos de *backscattering* (BS) no Turbiscan Lab® foram tratados pelo software Origin.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão. Foi utilizado o software GraphPad Prism 8 para a análise estatística dos dados, adotando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

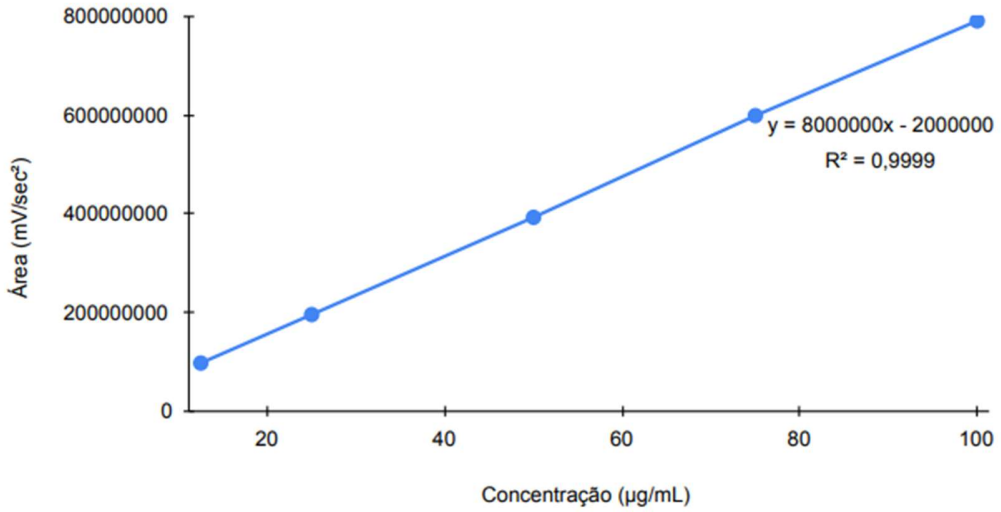
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Covalidação do método analítico

3.1.1 Linearidade

Uma curva de trabalho foi construída, obtendo uma equação da reta de y = 8000000x - 2000000, em que y representa a área do sinal analítico e x, a concentração (µg/mL), conforme Figura 2. O coeficiente de correlação linear (r) obtido foi de 0,9999, demonstrando a linearidade do método, visto que, de acordo com o preconizado pela RDC n° 166/ 2017, o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,990 (BRASIL, 2017).

Figura 2. Representação gráfica da curva analítica de calibração da leflunomida através do método de quantificação CLAE, na faixa de concentrações de 12,5 a 100 µg/mL.



3.1.2 Precisão e exatidão

Para a precisão, foi encontrado o valor de DPR de 1,25, 1,08 e 0,91% (Tabela 2) para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente. Para a exatidão, foi obtido valores de recuperação do fármaco de 99,59, 99,15 e 98,72% (Tabela 2) para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente. Sendo assim, concluiu-se que o método se mostrou preciso e exato, nas condições avaliadas.

Tabela 2. Dados referentes aos ensaios de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de LEF, avaliados a partir das concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
12,5	12	1,25	99,59
50	50	1,08	99,15
100	99	0,91	98,72

3.1.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos matematicamente, sendo encontrados os valores de 1,7 µg/mL e 5,2 µg/mL, respectivamente. Dessa forma, são os valores em que é possível detectar a menor quantidade de LEF em uma amostra e a menor quantidade que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

3.2 Formação de CLN por emulsificação e evaporação de solvente

Através do método de preparo de CLN por emulsificação e evaporação do solvente, observou-se que as formulações 1, 2, 3 e 4 apresentaram problemas quanto à dissolução de ácido esteárico e miglyol, podendo ser devido a elevada concentração

desses lipídios e a baixa dos tensoativos span 60 e taurodeoxicolato de sódio. Ressalta-se que na formulação 2 ocorreu a separação total de fases. Já nas formulações 1 e 3 foram utilizadas proporções iguais entre elas dos componentes, entretanto nesta última, foi utilizado o aquecimento, o que contribuiu para uma melhor dissolução e formação de CLN, sendo aderido nas formulações seguintes.

Ainda, observa-se que ao utilizar somente um tensoativo não foi o suficiente para formar um sistema emulsionado estável e aparência adequada, apresentando partículas/gotículas de lipídios visíveis nas formulações 1 e 3. Dessa forma, foi empregado mais um tensoativo na formulação 4, o taurodeoxicolato de sódio na fase aquosa, havendo uma melhora na emulsão, entretanto, notou-se que a quantidade de tensoativos ainda não era suficiente para a formação de CLN, sendo possível ainda visualizar partículas/gotículas de lipídios.

Foi realizado ajuste nas proporções dos componentes na formulação 5, reduzindo a quantidade de ácido esteárico e miglyol e aumentando de span 60 e taurodeoxicolato de sódio, resultando na formação de um sistema com os parâmetros visuais, de tamanho e PdI. Além do método de preparo influenciar nas características da formulação final, a composição da matriz lipídica, a solubilidade do fármaco e as concentrações de lipídios e tensoativos são fatores que influenciam na formação dos CLN (MARCATO, 2009; SOUTO et al., 2011; SOUZA, 2022).

3.3 Caracterização físico-química do CLN

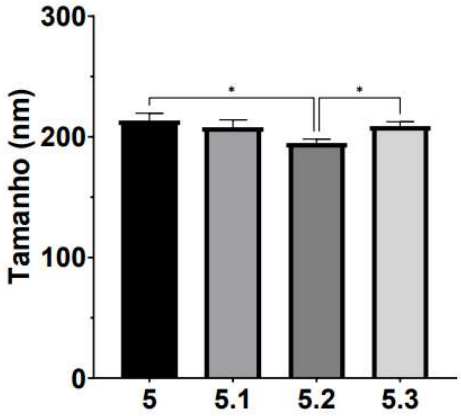
Os parâmetros físico-químicos das formulações foram avaliados por meio de triplicata de leitura, utilizando o espalhamento dinâmico da luz (DLS). Como as formulações 1, 3 e 4 apresentaram problemas quanto à dissolução dos lipídeos e a formulação 2 apresentou-se instável (separação total de fases), somente a formulação 5 foi analisada através do DLS. Dessa forma, o CLN 5 obteve tamanho médio de 213 nm e valor de PdI de 0,239 (Tabela 3). Ressalta-se que foram feitas 3 novas formulações (5.1, 5.2 e 5.3), com a mesma proporção da formulação 5, a fim de avaliar e confirmar a reprodutibilidade do método de preparo por emulsificação e evaporação do solvente (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização físico-química dos CLN obtidos pelo método de emulsificação e evaporação do solvente quanto ao tamanho médio e PdI.

CLN	Tamanho médio (nm)	PdI
5	213 ± 6	0,239 ± 0,025
5.1	207 ± 7	0,288 ± 0,055
5.2	194 ± 4	0,262 ± 0,020
5.3	209 ± 4	0,274 ± 0,006

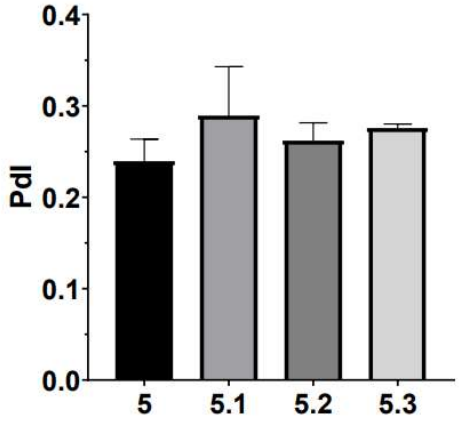
Ainda, observa-se nas Figuras 3 e 4, os gráficos resultantes da análise estatística quanto ao tamanho médio e PdI das formulações, respectivamente.

Figura 3. Gráfico em relação ao tamanho médio das diferentes formulações de CLN.



Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa entre os CLN, com $p<0,05$.

Figura 4. Gráfico em relação ao PdI das diferentes formulações de CLN.



Observa-se na Figura 3, que a diferença foi significativa em relação ao tamanho médio somente entre os CLN 5 e 5.2 e entre 5.2 e 5.3, com $p<0,05$. Em relação ao PdI na Figura 4, não foi observado diferença significativa ($p>0,05$).

Com a reprodutibilidade desse método, o fármaco foi incorporado no sistema e, posteriormente, analisado em DLS, apresentando tamanho médio e PdI de 192 nm e 0,259, respectivamente.

Estes parâmetros, tamanho e distribuição das partículas, são essenciais para a avaliação da qualidade da dispersão (MARCATO, 2009). Assim como a formação de uma emulsão, o tamanho das nanopartículas lipídicas podem ser influenciadas pela composição da formulação e pelo método empregado no preparo (MARCATO, 2009; SOUTO et al., 2011). Com isso, a partir da avaliação do tamanho médio e PdI por DLS, observou-se a formação de partículas em escala nanométrica e homogêneas, além de garantir a reprodutibilidade do método de emulsificação e evaporação de solvente.

3.4 Estudo de estabilidade de armazenamento

O estudo de estabilidade compreendeu a análise do tamanho médio e PdI da formulação 5 contendo 20 mg do fármaco nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 em temperatura ambiente

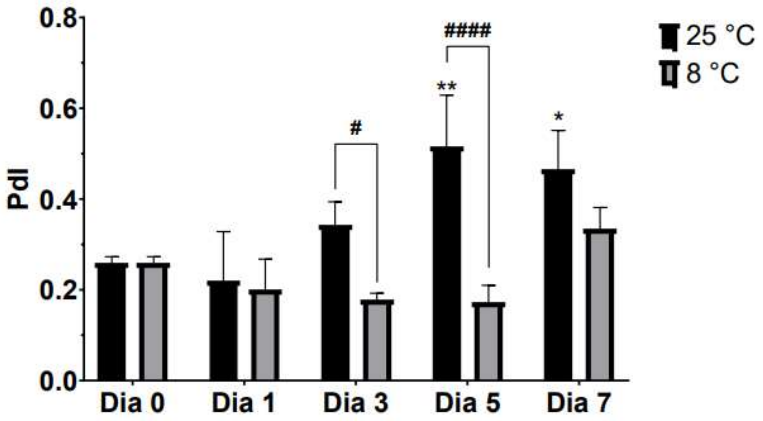
(25 °C) e entre 2 a 8 °C. Foi realizada triplicata de leitura para cada dia das diferentes temperaturas de armazenamento, os resultados obtidos se encontram na Tabela 4.

Tabela 4. Estabilidade do CLN contendo LEF, quanto ao tamanho médio e PdI, em relação ao armazenamento em temperatura ambiente (25 °C) e entre 2 a 8 °C.

CLN com fármaco	**25 °C**		**2 – 8 °C**	
Dia	**Tamanho médio (nm)**	**PdI**	**Tamanho médio (nm)**	**PdI**
Dia 0	192 ± 3	0,259 ± 0,01	192 ± 3	0,259 ± 0,01
Dia 1	237 ± 45	0,217 ± 0,11	211 ± 33	0,198 ± 0,07
Dia 3	260 ± 26	0,342 ± 0,05	220 ± 0,4	0,177 ± 0,02
Dia 5	316 ± 62	0,514 ± 0,11	252 ± 6	0,172 ± 0,04
Dia 7	267 ± 14	0,463 ± 0,09	220 ± 5	0,332 ± 0,05

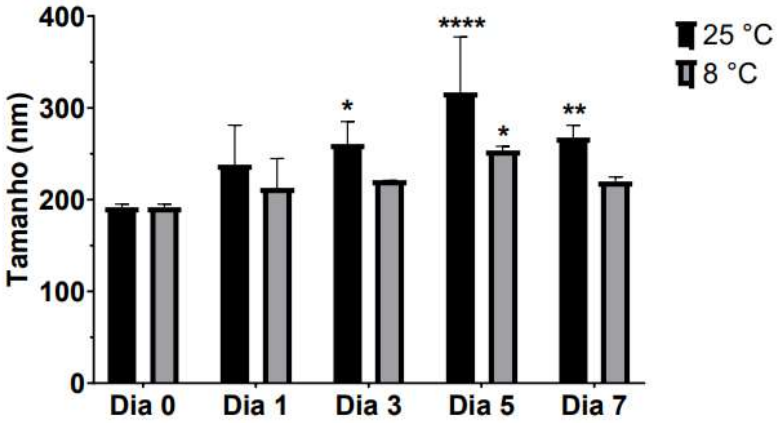
As Figuras 5 e 6 correspondem aos gráficos da análise estatística de PdI e tamanho médio, respectivamente.

Figura 5. Gráfico em relação ao PdI da formulação contendo fármaco, armazenada a temperatura ambiente e entre 2 a 8 °C, no estudo de estabilidade.



Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa entre os dias em relação ao dia 0 em armazenamento a 25 °C, com p<0,05; e as cerquilhas indicam a diferença estatisticamente significativa entre o armazenamento a 25 °C e a 8 °C, com p<0,05.

Figura 6. Gráfico em relação ao tamanho médio da formulação contendo fármaco, armazenada a temperatura ambiente e entre 2 a 8 °C, no estudo de estabilidade.



Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa entre os dias em relação ao dia 0 em armazenamento a 25 °C e a 8 °C, com p<0,05.

A partir dos resultados obtidos (Figuras 5 e 6), observou-se que a formulação armazenada em baixas temperaturas (2 - 8 °C) apresentaram uma melhor estabilidade com uma menor variação de PdI e tamanho médio das nanopartículas comparada ao armazenamento em temperatura ambiente (25 °C). Além disso, a Figura 5 mostra que em baixas temperaturas, o PdI não apresentou diferença significativa (p>0,05) entre os dias. Já em temperatura ambiente, houve um aumento significativo (p<0,05) no valor de PdI entre os dias 0 e 5 e entre os dias 0 e 7. Ao comparar as diferentes temperaturas de armazenamento, foi observada uma diferença significativa no valor de PdI nos dias 3 e 5. Em relação ao tamanho médio, a Figura 6 mostra que a formulação armazenada em temperatura ambiente apresentou um aumento significativo (p<0,05) entre os dias 0 e 3, dias 0 e 5 e entre os dias 0 e 7. O armazenamento em baixas temperaturas só apresentou aumento significativo entre os dias 0 e 5. E ao comparar o tamanho médio nas diferentes temperaturas de armazenamento não foi observado diferença significativa.

3.5 Eficiência de encapsulação

A partir da determinação indireta do encapsulamento de LEF, as formulações preparadas apresentaram um valor médio de 73,3% ± 9,1 de eficiência de encapsulação. Ressalta-se que a eficiência de encapsulação possui relação com a capacidade que o sistema tem em reter o fármaco de interesse encapsulado, e este parâmetro pode ser influenciado pela composição da matriz das nanopartículas e pela solubilidade do fármaco na fase lipídica (TAMJIDI et al., 2013; SANTOS, 2017). A composição da matriz lipídica influencia no arranjo específico dos cristais, assim, pode favorecer um aumento na capacidade de incorporação do fármaco (MÜLLER et al., 2000; LACERDA 2009). Além disso, a capacidade de encapsulação também depende do método empregado no preparo dos CLN, da natureza e das concentrações do lipídio e tensoativo (MARCATO, 2009; SOUTO et al., 2011).

3.6 Estabilidade cinética

O aparelho Turbiscan Lab® realiza análise por dispersão óptica, sendo composto por um feixe de luz na região do infravermelho (λ = 850 nm) e dois detectores sincronizados (HENRIQUES et al., 2011; LACERDA, 2009; GASPAR, 2015). O detector de transmissão (T) mede a quantidade de luz que atravessa a amostra e o detector de *backscattering* (BS) mede a quantidade de luz espalhada e refletida pela amostra (HENRIQUES et al., 2011; MARCO, 2009; LACERDA, 2009). O sistema realiza varreduras da base em direção ao topo do frasco cilíndrico, que contém a amostra, em intervalos de tempo pré-programados e obtém os dados de T e BS (LACERDA, 2009; GASPAR, 2015).

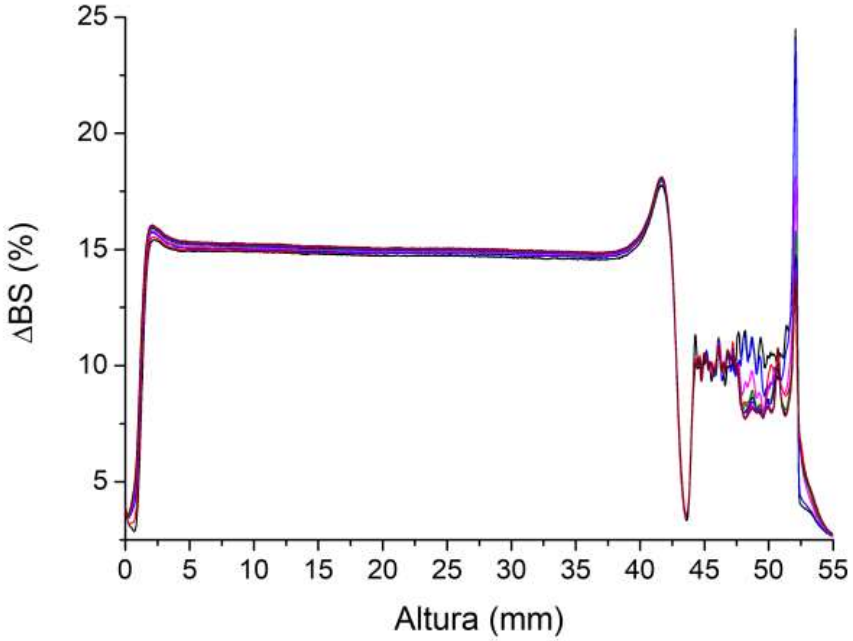
Este método possibilita a análise das amostras sem uma prévia diluição e pode identificar variações na concentração de emulsões e do diâmetro da partícula ou gota, ao longo da altura do frasco e em função do tempo (MARCO, 2009; LACERDA, 2009; GASPAR, 2015). Dessa forma, permite identificar fenômenos de desestabilização no sistema, como sedimentação, cremação, floculação, coalescência e entre outros.

Os gráficos para a análise da estabilidade cinética são apresentados nas Figuras 7, 8 e 9, onde o eixo y representa a intensidade de luz retroespalhada (%) e o eixo x a altura do frasco cilíndrico (mm). A primeira varredura do sistema é representada pela curva de cor preta e a última (após duas horas) de cor vermelha escura, enquanto as curvas intermediárias são representadas por diferentes cores.

Observa-se nas Figuras 7, 8 e 9 que em “a” há a representação do gráfico completo e em “b” a ampliação do gráfico para melhor visualização dos resultados. Estes gráficos apresentaram baixa variação de *backscattering* (ΔBS), menor que 2%, demonstrando estabilidade do sistema coloidal (CELIA et al., 2009). Dessa forma, não foram identificados a ocorrência de fenômenos de desestabilização devido ao aumento no tamanho ou migração das partículas, e ainda, zonas de clarificação ao longo do cumprimento do frasco contendo amostra (MENGUAL et al., 1999; LACERDA, 2009). Além disso, a estabilidade do sistema pode ser observada pelos perfis de varredura de *backscattering*, ou seja, pela sobreposição das curvas obtidas nos intervalos de tempo pré-programados (MENGUAL et al., 1999; LACERDA, 2009).

Figura 7. Estabilidade cinética da formulação 5.1 de CLN contendo leflunomida: a) gráfico completo e b) gráfico ampliado.

a)



b)

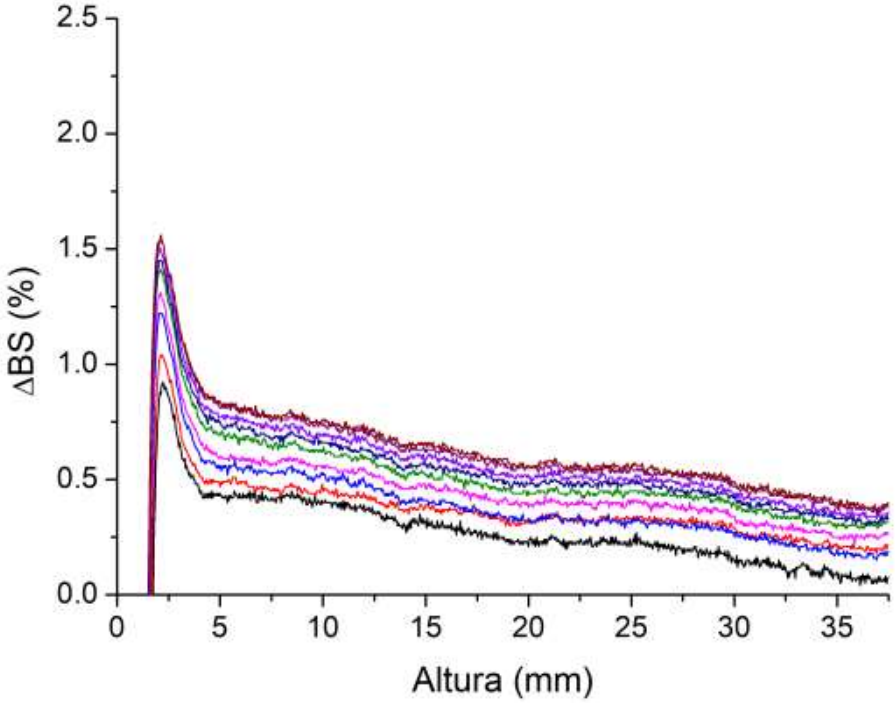
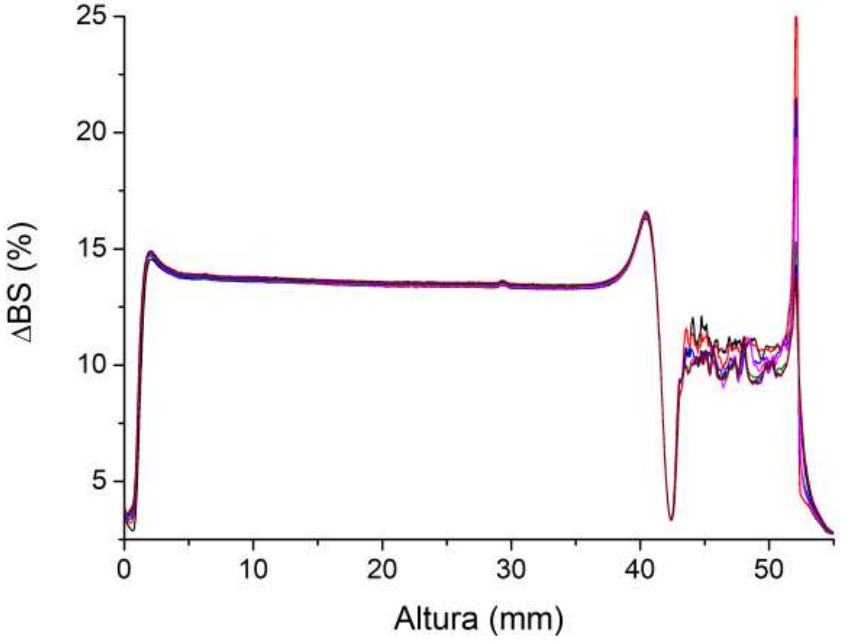


Figura 8. Estabilidade cinética da formulação 5.2 de CLN contendo leflunomida: a) gráfico completo e b) gráfico ampliado.

a)



b)

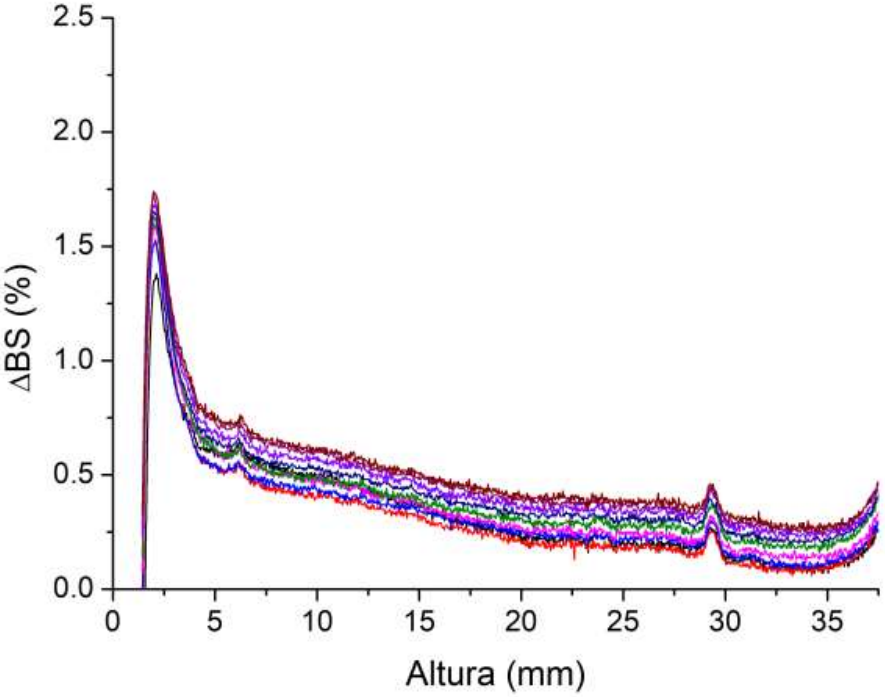
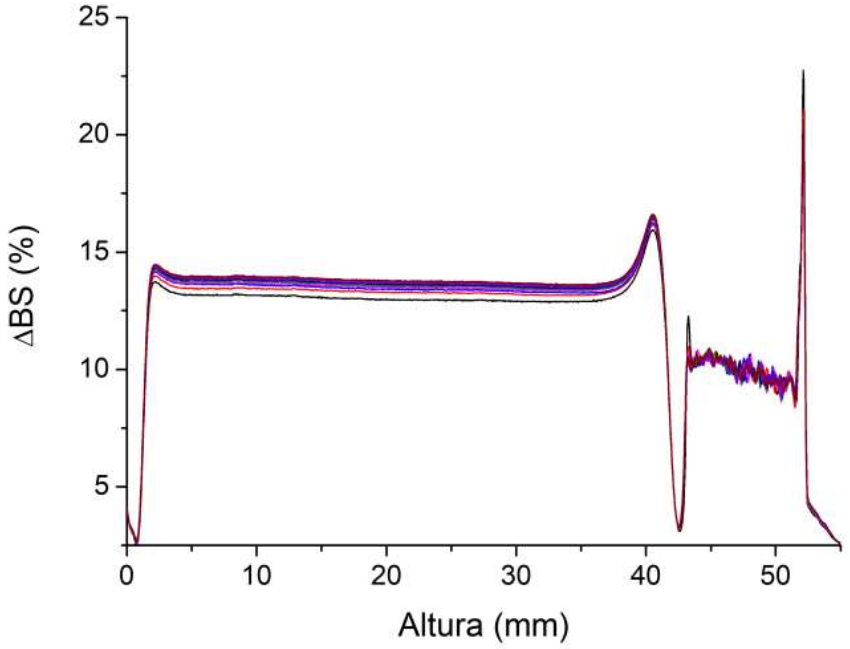
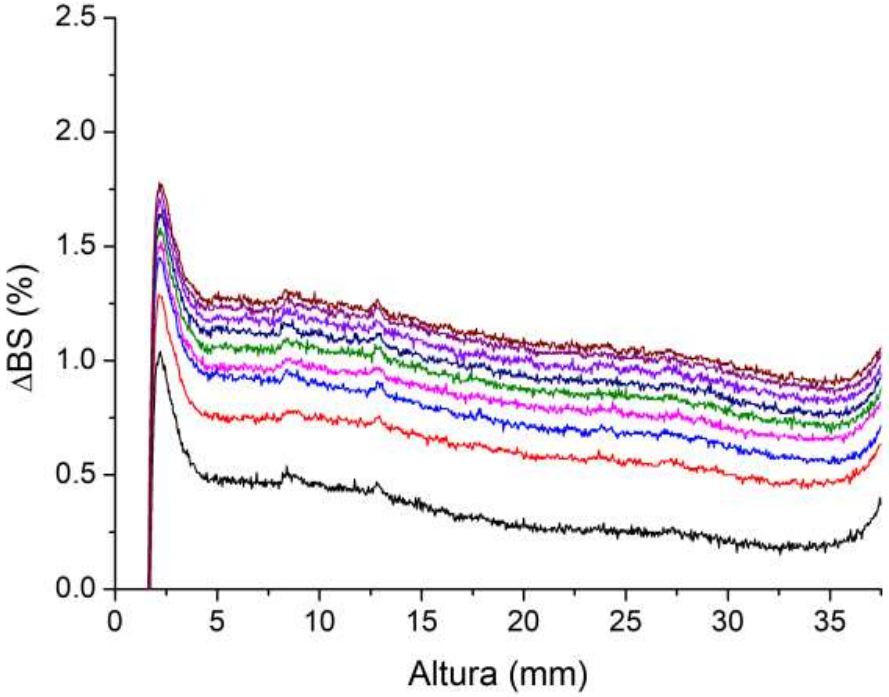


Figura 9. Estabilidade cinética da formulação 5.3 de CLN contendo leflunomida: a) gráfico completo e b) gráfico ampliado.

a)



b)



4 CONCLUSÃO

Através deste estudo, pode-se concluir que a composição da formulação, as naturezas e concentrações de lipídios e tensoativos influenciam na qualidade da formação de carreadores lipídicos nanoestruturados, estabilidade cinética e eficiência de encapsulação. Além disso, a partir do método de preparo por emulsificação e evaporação de solvente foi possível obter nanosistemas com características apropriadas para estudos futuros *in vitro* de liberação e permeação cutânea da LEF nanoencapsulada.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. M. Obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo clobetasol e tacrolimus e avaliação da permeação cutânea. 2014. 76 f. Dissertação de mestrado – **Universidade Federal de Goiás,** Goiânia, 2014.

BAE, J.; PARK, J. W. Topical delivery of leflunomide for rheumatoid arthritis treatment: evaluation of local tissue deposition of teriflunomide and its anti-inflammatory effects in an arthritis rat model. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** vol. 42, n. 2, p. 254-262, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução n° 166, de 24 de julho de 2017.** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2017.

BREEDVELD, F. C.; DAYER, J-M. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthrits. **Annals of the Rheumatic Diseases,** vol. 59, n. 11, p. 841-849, 2000.

CALDEIRA, A. S. P. Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida. 2014. 194 f. Dissertação de mestrado - **FIOCRUZ,** Rio de Janeiro, 2014.

CAMARGO, G. dos S. Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da eficiência de encapsulação de nanocápsulas poliméricas contendo tacrolimus. 2020. 113 f. Dissertação de mestrado – **Universidade Estadual de Ponta Grossa,** Ponta Grossa, 2020.

CELIA, C.; TRAPASSO, E.; COSCO, D.; PAOLINO, D.; FRESTA, M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids Surf B Biointerfaces**, vol. 72, n. 1, p. 155-160, 2009.

CHUANG, S.-Y.; LIN; C.-H.; HUANG, T.-H.; FANG, J.-Y. Lipid-Based Nanoparticles as a Potential Delivery Approach in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Nanomaterials (Basel),** vol. 8, n. 1, 2018.

COSTA, J. P. da C.; BECK, S. T. Avanços no diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide. **Revista Saúde (Santa Maria),** vol. 37, n. 1, p. 65-76, 2011.

FRAGOSO, Y. D.; BROOKS, J. B. B. Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. **Expert Reviews Clinical Pharmacology,** vol 8, n. 3, p. 315-320, 2015.

GASPAR, R. B. Avaliação da estabilidade de emulsões para bebidas. 2015. 97 f. Dissertação de mestrado – **Universidade Federal do Rio de Janeiro,** COPPE, Rio de Janeiro, 2015.

GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. de M.; UTIYAMA, S. R. da R. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** vol. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.

HAYASAKI, T. G. Estudo de compatibilidade da leflunomida com excipientes lipídicos por técnicas térmicas, espectroscópicas e estudo de estresse isotérmico. 2021. 46 f. Dissertação de graduação - **Universidade Federal de Goiás,** Goiânia, 2021.

HENRIQUES, C. B.; WINTER, A.; KOROISHI, E. T.; MACIEL FILHO, R.; BUENO, M. I. M. S. Estudo da influência dos particulados no fenômeno de agregação dos asfaltenos por espectrometria de varredura óptica. **Química Nova,** vol. 34, n. 3, p 424-429, 2011.

KÖHLER, B. M.; GÜNTHER, D. K.; LORENZ, H. M. Current Therapeutic Options in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Clinical Medicine,** vol. 8, n. 7, p. 1-15, 2019.

LACERDA, S. de P. Carreador lipídico nanoestruturado à base de cera de carnaúba: desenvolvimento, caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3. 2009. 188 f. Dissertação de mestrado – **Universidade Federal de Pernambuco,** Recife, 2009.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia,** vol. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

MARCO, S. L. de. Propriedades físico-químicas de nanocápsulas contendo um antioxidante e um filtro solar químico co-encapsulados. 2009. 92 f. Dissertação de mestrado – **Universidade Federal do Rio Grande do Sul,** Porto Alegre, 2009.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K., SANABRE, P. Characterisan of instability of concentrated dispersions by optical analyser: TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A,** vol. 152, p. 111-123, 1999.

MOTA, L. M. H. da; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L. S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C. de; SILVA, N. A. da; LOUZADA-JÚNIOR; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. da R. C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia,** vol. 52, n. 2, p. 152-174, 2012.

MÜLLER, R. H.; MEHNERT, MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** vol. 50, p. 161-177, 2000.

OSIRI, M.; SHEA, B.; ROBINSON V.; SUAREZ-ALMAZOR, M.; STRAND, V.; TUGWELL, P.; WELLS, G. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic (review). **The Journal of Rheumatology,** vol. 30, n. 6, p. 1182-1190, 2003.

SANT'ANNA, T. C.; CORTÉS-ROJAS, D. F. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Encapsulação de compostos bioativos de *Bidens pilosa L.* em partículas lipídicas sólidas. **Universidade de São Paulo,** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2015.

SANTOS, R. L. Avaliação da influência da composição dos carreadores lipídicos nanoestruturados sobre o tamanho da partícula e eficiência de encapsulação para a liberação controlada de carvacrol. 2017. 66 f. Dissertação de graduação – **Universidade Federal de Sergipe,** São Cristóvão, 2017.

SOUZA, W. K. G de. Avaliação preliminar da influência do método de preparo e da composição da formulação nas características físico-químicas e estabilidade cinética de carreadores lipídicos nanoestruturados delineados como sistemas para liberação cutânea da leflunomida. 2022. 24 f. Dissertação de graduação – **Universidade Federal de Goiás,** Goiânia, 2022.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova,** vol. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** vol. 19, p. 29-43, 2013.

UNITED STATES. **Food and Drug Administration.** Arava. 1998.

VEGA, D., PETRAGALLI, A., FERNÁNDEZ, D., ELLENA, J. A. Polymorphism on Leflunomide: Stability and Crystal Structures. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** vol. 95, n. 5, p. 1075-1083, 2006.