

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FÁRMACIA

WAYANE KARUENA GOMES DE SOUZA

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

GOIÂNIA - GO

2022



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): Wayane Karuena Gomes de Souza

Título do trabalho: 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

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

[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 16/08/2022, às 22:42, 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 **WAYANE KARUENA GOMES DE SOUZA, Discente**, em 20/08/2022, às 00:44, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3019957** e o código CRC **BF134FE6**.

---

Referência: Processo nº 23070.035568/2022-37

SEI nº 3019957

WAYANE KARUENA GOMES DE SOUZA

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

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 - GO

2022

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

Souza, Wayane Karuena Gomes 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 [manuscrito] / Wayane Karuena Gomes de Souza. - 2022.  
29 f.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, , Farmácia, Goiânia, 2022.

1. . 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

Aos 15 dias do mês de agosto do ano de 2022 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “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”, de autoria de Wayane Karuena Gomes de Souza, do curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva - FF/UFG, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz - FF/UFG e Profa. Ma. Bianca Bueno Fontanezi (FF/UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição da estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 9,0, tendo sido o TCC considerado aprovado.

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 16/12/2022, às 17:40, 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 **Danielle Guimarães Almeida Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 19/12/2022, às 09:51, 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 **Bianca Bueno Fontanezi, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 19:53, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3409772** e o código CRC **B803F7B9**.

Dedico esse trabalho em memória da minha avó, Tereza.  
Por tudo o que a senhora significa para mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e me guiou por toda essa jornada. A graduação e esse projeto não seriam possíveis sem a presença dEle.

A minha mãe, Geni, por sempre ter me dado apoio e cuidado de mim, desde o início. O apoio dela durante essa jornada foi crucial. E também ao meu pai, Mário, a razão por eu ter escolhido esse projeto.

Aos amigos Anna Luiza e José Filipi, meus sinceros agradecimentos pela amizade e companheirismo durante essa jornada acadêmica e de vida. Os dias foram mais leves graças a presença de vocês.

Caroline e Juliana, meus agradecimentos também alcançam vocês, por terem dividido comigo a execução desse projeto, e ao Tacio, por todo suporte no desenvolvimento.

Ao meu orientador, professor Luís Antônio, pelo apoio e por todo aprendizado que conseguiu repassar a mim. Sua presença no desenvolvimento desse trabalho foi de suma importância.

Por fim, a toda a equipe do FARMATEC pela colaboração e convivência.



## RESUMO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que causa degeneração articular e leva a perda funcional da área. Um dos fármacos associados ao seu tratamento é a leflunomida, um fármaco que pertence a classe dos isoxazóis e inibe a enzima diidroorotato desidrogenase. Porém, apresenta eventos adversos que podem inviabilizar o uso. Assim, a administração tópica é uma alternativa promissora e para isso, o desenvolvimento de nanoformulações é uma opção. Nanossistemas lipídicos possuem vantagem em acomodar o fármaco em sua estrutura e podem ser desenvolvidos por diferentes métodos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência dos métodos de preparo e da composição de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Utilizou-se os métodos de emulsificação e evaporação do solvente e fusão emulsificação, associados ao uso de microfluidizador ou sonificador. Foram avaliados parâmetros em relação ao tamanho e índice de polidispersão (PDI), em análise em DLS, e foi avaliada a estabilidade por 7 dias. Obteve-se o tamanho médio de 163,4 nm, com PDI de 0,301, mas observou-se uma tendência de aumento desses parâmetros durante a estabilidade, sendo significativo a partir de quatro dias, o que pode estar associado a formulação do nanocarreador. Mais estudos devem ser realizados a fim de otimizar os parâmetros de produção e formulação.

**Palavras chaves:** Nanossistemas, índice de polidispersão, nanoformulações, estabilidade, fármaco.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that causes joint degeneration and leads to loss of function in the area. One of the drugs associated with its treatment is leflunomide, a drug that belongs to the isoxazole class and inhibits the enzyme dihydroorotate dehydrogenase. However, it has adverse events that can make its use unfeasible. Thus, topical administration is a promising alternative and for this, the development of nanoformulations is an option. Lipid nanosystems have the advantage of accommodating the drug in their structure and can be developed by different methods. The objective of this work was to evaluate the influence of preparation methods and composition of nanostructured lipid carriers (NLC). Emulsification and solvent evaporation and emulsification melting methods were used, associated with the use of a microfluidizer or sonicator. Parameters were evaluated in relation to size and polydispersity index (PDI), by DLS method, and stability for 7 days was evaluated. The average size of 163.4 nm was obtained, with a PDI of 0.301, but there was a tendency for these parameters to increase during stability, being significant after four days, which may be associated with the nanocarrier formulation. More studies should be carried out in order to optimize production and formulation parameters.

**Key words:** Nanosystems, polydispersity index, nanoformulations, stability, drug.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição média de tamanhos dos CLN contendo leflunomida, lidos em triplicata por DLS, em dia 0	19
Figura 2 - Gráficos da leitura da triplicata das formulações contendo Leflunomida em dia 0, através da análise em NTA	20
Figura 3 – Gráficos de análise estatística em relação ao tamanho e PDI das análises em DLS	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem utilizada de cada componente da formulação	15
Tabela 2 - Tamanho e PDI das formulações que formaram emulsão em análise por DLS	17
Tabela 3 - Tamanho e PDI médios dos CLN contendo leflunomida pela análise em DLS	18
Tabela 4 - Estabilidade quanto ao tamanho e PDI em relação aos dias de armazenamento em temperatura de 2°C a 8°C, por leitura em DLS	20

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Antiinflamatórios não esteroidais

AR – Artrite reumatoide

CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados

DLS – *Dynamic Light Scattering*

EHL – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

FDA – *Food and Drug Administration*

MMCD – Medicamentos modificadores do curso da doença

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*

PDI – Índice de polidispersão

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 METODOLOGIA	13
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4 CONCLUSÃO	22
5 REFERÊNCIAS	23

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica e autoimune, caracterizada pela inflamação persistente das articulações, levando à destruição da cartilagem, erosão óssea, deformação articular e perda da capacidade funcional local (VILLASEÑOR, 2019). Possui etiologia desconhecida e afeta duas vezes mais mulheres do que homens, além de apresentar maior risco de desenvolvimento com o aumento da idade (LAURINDO et al., 2004). Ainda assim, existem fatores que podem estar associados ao seu desenvolvimento, embora a relação não seja explicitamente clara. O complexo principal de histocompatibilidade do antígeno leucocitário humano possui genes que carregam informações acerca da AR, estabelecendo uma condição genética associada a essa patologia (MARINHO, 2018). Questões ambientais também mostram relação com a AR, como tabagismo e consumo de álcool, o que torna esses indivíduos mais propensos ao desenvolvimento da patologia do que se comparados com aqueles que não fazem uso (CALDEIRA, 2014).

A prevalência mundial da AR varia entre 0,5% a 1,5%, e também possui uma variação de acordo com as populações. No México, a prevalência é de 1,6%, enquanto nos Estados Unidos, estudos apontam 0,55%. Chile apresenta 0,6%, Colômbia 0,15% e Canadá 0,9% (VILLASEÑOR, 2019). Já no Brasil, em 2004, um estudo avaliou amostras populacionais de algumas capitais e determinou uma estimativa de 0,2% a 1,0% de prevalência da AR no país (KIYOMOTO, 2018; REIS, 2019 e SENNA et al, 2004).

O diagnóstico de AR baseia-se em achados clínicos, como poliartrite simétrica, artralgia e rigidez matinal, associados a exames complementares, como atividade inflamatória aumentada e exames de imagens (raio-X, ressonância magnética e ultrassonografia). Existe uma classificação internacional estabelecida pelo *American College of Rheumatology* e pela *European League Against Rheumatism*, que estabelece critérios que ajudam no diagnóstico de AR, os quais são rigidez matinal, artrite de três ou mais articulações, artrite de mãos, artrites simétricas, nódulos reumatoides, fator reumatoide positivo e alterações radiográficas, onde a presença de quatro ou mais desses critérios, por um período igual ou maior do que seis semanas, determina um diagnóstico sugestivo de AR (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O tratamento de AR busca melhorar a qualidade de vida do paciente por meio da remissão da doença, entretanto, nem sempre esse estágio é alcançado. O principal foco consiste em prevenir ou controlar a lesão articular e promover o alívio das dores. O tratamento pode ser dividido em cirúrgico, quando as medidas clínicas não são efetivas; não farmacológico, através de fisioterapia, exercícios aeróbicos e alongamento e relaxamento, buscando sempre atividades com baixo impacto e que ajudam no fortalecimento articular; e o tratamento farmacológico (CALDEIRA, 2014).

O tratamento farmacológico para AR consiste no uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e glicocorticóides, podendo ser prescritos em qualquer momento do tratamento, mas priorizando sempre a menor dosagem e pelo menor tempo possível, além de imunossuppressores e medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD). Em primeira linha, o recomendado é a terapia isolada com MMCD sintéticos, como metotrexato, leflunomida e hidroxicloroquina. Se o uso não trazer o efeito esperado, se houver alguma contraindicação ou se o curso da doença estiver

mais avançado, realiza-se a associação de dois desses fármacos a fim de potencializar a ação. Espera-se em média três meses, no mínimo, para fazer a avaliação do efeito dos medicamentos. À medida que se observa baixo progresso, outras propostas aparecem, que incluem MMCD biológicos, como abatacepte, infliximabe, rituximabe e etanercepte, ou MMCD sintéticos alvo-específico, sendo baricitinibe ou tofacitinibe, sejam estes isolados ou associados a algum MMCD sintético, principalmente o metotrexato (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). No tratamento de AR, as associações mais comuns de medicamentos acontecem entre metotrexato e hidroxicloroquina ou metotrexato e leflunomida (CALDEIRA, 2014).

A leflunomida é um pró-fármaco da classe dos isoxazóis, ativado pelo mecanismo de primeira passagem principalmente no fígado, que foi aprovado pelo FDA em 1998 para o tratamento de AR e se mostra efetivo na melhora dos sinais e sintomas, além da regressão da doença. Seu mecanismo de ação é através da inibição da biossíntese da pirimidina, inibindo a enzima diidroorotato desidrogenase (KIYOMOTO, 2018). A leflunomida é uma molécula com 270,21 g/mol e pKa de 10,8, o que confere à molécula característica de um ácido fraco, além de ponto de fusão em torno de 166°C (CALDEIRA, 2014). Apresenta baixa solubilidade em água, sendo menos que 40 mg/L ( $\log p = 2,43$ ), o que a classifica como classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (baixa solubilidade e alta permeabilidade) (VEJA ET AL, 2005).



O metabólito ativo é a teriflunomida, que possui alta afinidade pela diidroorotato desidrogenase, inibindo de maneira reversível a produção de uridina, que interrompe a proliferação clonal de linfócitos T, parando o ciclo celular entre as fases G1 e S. Reduz ainda a quimiotaxia dos neutrófilos, reduzindo sua infiltração na cavidade articular (VILLASEÑOR, 2019). Outro mecanismo de ação associado ao fármaco é a

inibição do acúmulo de prostaglandinas e redução dos níveis de citocinas inflamatórias que são produzidas pelas células T ao bloquear a expressão gênica do fator nuclear kB (CALDEIRA, 2014). A leflunomida apresenta como eventos adversos associados ao seu uso, distúrbios gastrointestinais, perda de peso, reação alérgica, erupção cutânea e alopecia, além de aumento de infecções e desregulação das funções hepáticas, porém as últimas de forma menos frequente (KIYOMOTO, 2018).

A administração tópica da leflunomida poderia superar as limitações em relação aos efeitos adversos e melhorar a adesão de pacientes, assim, uma forma de viabilizar essa via de administração, seria por meio de nanossistemas (BAE&PARK, 2015 e COELHO, 2017). Esse tipo de sistema em escala nanométrica pode ser capaz de levar o fármaco ao tecido alvo e controlar sua liberação, além de aumentar a estabilidade dos ativos (SILVA et al, 2010). Os nanossistemas também podem ser chamados de nanocarreadores e podem aparecer como nanopartículas lipídicas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, entre outros (DELGADO, 2013).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) possuem em sua composição um lipídeo sólido a temperatura ambiente e tensoativos que formam a sua estrutura e permitem a encapsulação do fármaco desejado. A vantagem acerca das NLS é a facilidade de produção e armazenamento, além de um largo espectro para vias de administração, em contrapartida, a estabilidade do sistema depende das características do lipídeo, do arranjo destes na matriz e da solubilidade do ativo (DELGADO, 2013).

A fim de melhorar essa questão da estabilidade, surgiram os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que podem ser do tipo imperfeito, composto por glicerídeos de diferentes ácidos graxos, e com imperfeições na formação do cristal; amorfo, que usa mistura de lipídeos sólidos e líquidos, gerando partículas em estado sólido amorfo pela maior quantidade de lipídeo líquido; ou múltiplo, sendo uma dispersão de óleo em lipídeo sólido em água, onde o óleo se sobressai em quantidade, formando gotículas na matriz lipídica (MARCATO, 2009). A variação na concentração de lipídeos líquidos em sua composição permite um maior espaço estrutural na

partícula, o que resulta na melhor encapsulação de fármacos pelo arranjo amorfo da matriz, que impede a expulsão do fármaco (SENA, 2016). A escolha dos componentes da formulação deve ainda levar em consideração a solubilidade do fármaco nos lipídeos e a biocompatibilidade, além do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) dos tensoativos, uma vez que eles estão relacionados com as características físico-químicas e com a estabilidade do sistema (JUNIOR, 2016).

Quanto à forma de preparo desses sistemas, existem diferentes métodos que utilizam baixa ou alta energia, como métodos de fusão e emulsificação, emulsificação e evaporação do solvente, spray-drying e homogeneização a alta pressão. O método influencia nas características da formulação final e são uma etapa importante no processo. As vantagens e desvantagens devem ser analisadas a cada caso, a fim de avaliar o objetivo final, como por exemplo, a fusão e emulsificação geram uma população de nanopartículas mais heterogênea, mas não faz uso de solventes orgânicos (SOUTO, 2011). A emulsificação e evaporação do solvente apresenta a formação de partículas pequenas, mas pode gerar aglomeração das mesmas em decorrência da presença de solvente residual. Já a homogeneização a alta pressão pode apresentar PDI elevado, entretanto, é um método reproduzível e que confere estabilidade ao sistema (SARALEGUI, 2020).

A emulsificação e evaporação do solvente consiste em solubilizar os lipídeos em um solvente orgânico imiscível ou parcialmente miscível em água e então, sob agitação contínua, misturar as fases aquosas e orgânicas, levando para evaporação em sequência (COELHO, 2017). Já no método de fusão e emulsificação, os lipídeos são fundidos previamente, junto com o fármaco, e então a fase aquosa contendo tensoativo é incorporada ao meio (MARCATO, 2009).

Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a influência do método de preparo e da composição da formulação para o desenvolvimento de CLN contendo leflunomida, a fim de superar as limitações associadas ao seu uso e disponibilizar uma nova via de administração para o fármaco.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Preparo dos CLN sem o fármaco**

O critério de escolha dos lipídeos e tensoativos utilizados foi baseado em um estudo prévio que mostrou o comportamento do fármaco diante desses componentes. Assim, miglyol, ácido esteárico, taurodeoxicolato de sódio e span60 demonstraram as menores interferências com o fármaco e foram considerados promissores para o preparo das nanopartículas (HAYASAKI, 2021). A proporção utilizada de cada componente foi determinada experimentalmente, com base na literatura (SANT'ANNA, 2015).

Inicialmente os CLN foram preparados pelo método de emulsificação e evaporação do solvente associado a sonicação ou a microfluidização, a fim de diminuir e melhorar a distribuição das partículas formadas. Também foi avaliado o método de fusão e emulsificação, associado a microfluidização. Miglyol, ácido esteárico e span60, foram usados em proporções variando de 30 a 36%, 33 a 54% e 5 a 34%, respectivamente, em relação 300 mg da composição total. Esses componentes lipídicos foram dissolvidos em 20 mL de acetona aquecida a aproximadamente 40°C, sendo então vertidos em 40 mL de fase aquosa aquecida a mesma temperatura, e sob agitação de 100 rpm, contendo taurodeoxicolato de sódio, variando de 5 a 13%. Posteriormente, o solvente foi evaporado a baixa pressão em rotaevaporador (IKA® RV10) com rotação de 100 rpm e pressão final de 300 mbar, e os CLN formados ficaram dispostos na fase aquosa do sistema, sendo então, levados para sonicação (MISONIX Ultrasonic Liquid Processor) ou para microfluidização (Microfluidics LV1).

No sonicador de probe, o sistema foi submetido a uma amplitude de 40, com tempo variando entre 4 e 15 minutos, enquanto no microfluidizador, o sistema foi submetido de um a cinco ciclos, com pressão de 800 mbar e 1200 mbar.

Já no método de fusão e emulsificação, as proporções foram mantidas. A fase lipídica foi aquecida a 70°C e a fase aquosa contendo taurodeoxicolato de sódio também foi aquecida a mesma temperatura. Posteriormente, a fase aquosa foi vertida na fase lipídica sob agitação de 100 rpm, durante 15 minutos, mantendo a mesma temperatura. Ainda aquecido, o sistema foi levado para microfluidização, em quatro ciclos com pressão de 800 mbar.

## 2.2 Preparo dos CLN contendo Leflunomida

A incorporação do fármaco no sistema foi realizada na fase lipídica pelo método de fusão e emulsificação. A fase aquosa com taurodeoxicolato de sódio e a fase

lipídica com 20 mg do fármaco foram aquecidas a cerca de 70°C, então a fase aquosa foi vertida na fase oleosa sob agitação em chapa magnética, durante 15 minutos sob a mesma temperatura. Logo em seguida, o sistema foi levado para microfluidização e submetido a três e quatro ciclos com pressão igual a 800 mbar

### 2.3 Caracterização dos CLN

Para se avaliar como os parâmetros de formulação e de processos poderiam influenciar na obtenção, nas propriedades físico-químicas e estabilidade dos nanossistemas, foram determinados tamanho médio e PDI no desenvolvimento dos CLN. Para a leitura, fez-se diluições de 50:950 µL, então analisou-as por espalhamento dinâmico da luz em DLS (Zetasizer Nano SZEN1600), para o tamanho e PDI, e em NTA (Nanosight NS500), em diluição 1:1000, para confirmação de parâmetros relacionados ao tamanho e distribuição dos mesmos.

### 2.4 Estudo de estabilidade

A estabilidade preliminar dos CLN foi avaliada em temperatura entre 2°C e 8°C (geladeira), a fim de manter a conservação microbiológica, em dias zero, um, quatro e sete, usando como parâmetros o tamanho e o PDI. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o Prisma, através do teste ANOVA seguido de Tukey, considerando  $p > 0,05$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros CLN produzidos não continham o fármaco e foram produzidos por evaporação do solvente para que a proporção de lipídeos e tensoativos fossem determinadas, além de se avaliar o método de preparo e os resultados acerca do tamanho e do PDI. As proporções utilizadas nas formulações estão dispostas na Tabela 1, com base em 300 mg de composição final.

Tabela 1 - Porcentagem utilizada de cada componente da formulação

NP	Miglyol (%)	Ácido esteárico (%)	Span60 (%)	Taurodeocolato de sódio (%)
1	35,7	53,6	5,3	5,3
2	34,5	51,7	6,9	6,9
3	30,3	45,4	12,1	12,1
4	32,3	48,4	9,7	9,7
5	33,3	50,0	10,0	6,7
6	33,9	50,8	10,2	5,1
7	33,3	33,3	20,0	13,3
8	33,3	33,3	23,3	10,0
9	33,3	33,3	33,3	-
10	33,3	33,3	26,7	6,7

O ajuste de concentração dos componentes foi feito experimentalmente. As formulações de 1 a 6 apresentaram problemas quanto a solubilidade do miglyol ou do ácido esteárico na acetona, então os ajustes feitos foram voltados para o aumento da concentração de tensoativos e a diminuição da concentração de ácido esteárico. As formulações de 7 a 10 tiveram essas questões resolvidas e formaram uma emulsão. Com a emulsão formada, as formulações foram levadas ao rotaevaporador e então para o sonicador de probe. Em seguida foram analisadas em DLS, onde os resultados podem ser visualizados na Tabela 2. A formulação 7 apresentou resultados de tamanho considerados adequados, então foi levada para o microfluidizador. Em pressão de 1200 mbar, a formulação não formou partículas em escala nanométrica em avaliação de um a cinco ciclos, mas em pressão de 800 mbar, com quatro e cinco ciclos, a formulação apresentou tamanho médio nanométrico em torno de 255,6 nm e um PDI em torno de 0,233, se mostrando promissora.

A ausência de reprodutibilidade, com variação em relação aos tamanhos, PDI e formação dos gráficos, por meio da emulsificação e evaporação do solvente pode ser explicada pela presença residual de solvente na formulação ou pela incompatibilidade dos componentes utilizados (JUNIOR, 2016), o que levou a uma tentativa do método de fusão e emulsificação. A formulação 7 não formou um sistema estável nesse método e mesmo sendo microfluidizada, apresentou partículas menores que 100 nm, o que poderia ter ocorrido pela formação de micelas ou instabilidade, então tentou-se a formulação 8, que foi levada para microfluidização ainda aquecida.

Três e quatro ciclos foram avaliados, apresentando tamanho médio de 186,8 nm e PDI de 0,290, sendo considerados promissores à incorporação do fármaco, além de mostrarem resultados reprodutíveis, conforme mostra a Tabela 2.

Os resultados obtidos dos CLN brancos mostram uma homogeneidade quanto ao tamanho médio das nanopartículas formadas, alcançando a formação em escala nanométrica. A sonicação e a microfluidização atuam a fim de reduzir o tamanho das partículas formadas, uma vez que os métodos de evaporação e de emulsificação não foram eficientes de forma isolada para a formação do sistema nanométrico. O funcionamento do sonicador se dá pelo envio de ondas sonoras que quebram as partículas e reduzem o seu tamanho, enquanto o microfluidizador aplica uma pressão para que a formulação atravesse um canalículo, levando à diminuição da partícula (PEREIRA, 2010).

Tabela 2 - Tamanho e PDI das formulações que formaram emulsão em análise por DLS

NP	Método	Tamanho (nm)	PDI
	Evaporação do solvente	563,1 ± 145,7	0,635 ± 0,137
	Evaporação do solvente + sonicação 10 min	185,2 ± 21,6	0,506 ± 0,052
7	Evaporação do solvente + sonicação 4 min	391,7 ± 64,0	0,465 ± 0,022
	Evaporação do solvente + microfluidização 4 ciclos em 800 mbar	183,5 ± 32,7	0,447 ± 0,053
	Emulsão + microfluidização 4 ciclos em 800 mbar	255,6 ± 14,1	0,233 ± 0,004
	Evaporação do solvente	395,6 ± 52,5	0,476 ± 0,048
	Evaporação do solvente + sonicação 10 min	336,3 ± 14,3	0,518 ± 0,099
8	Evaporação do solvente + sonicação 4 min	353,7 ± 26,3	0,588 ± 0,178
	Emulsão + microfluidização 4 ciclos em 800 mbar	186,8 ± 28,3	0,290 ± 0,088
	Evaporação do solvente	290,3 ± 62,1	0,259 ± 0,159
9	Evaporação do solvente + sonicação 4 min	194,7 ± 3,0	0,358 ± 0,060
10	Evaporação do solvente	269,7 ± 14,0	0,497 ± 0,011

Em ambos métodos, a composição inadequada ou excesso de energia do método também podem ser os responsáveis pela quebra excessiva das partículas, que podem não estar formando um sistema estável das nanopartículas. As formulações, embora tenham tido embasamento na literatura, foram testadas experimentalmente e ajustes de proporções foram realizados. Os tensoativos são essenciais na formação das nanopartículas lipídicas, mas a interação deles com o sistema ou mesmo entre eles, pode interferir na formação e estabilidade do mesmo, levando a perda das características requeridas para o sistema. A finalidade do tensoativo na formulação é de diminuir a tensão superficial, assim, o excesso deste no sistema pode levar a formação de micelas, entretanto, a baixa quantidade pode não permitir a formação adequada do sistema. Essa formação acaba sendo favorecida pelo meio aquoso externo às micelas (SHIMIZU, 2004).

As demais formulações, embora tenham apresentado tamanhos entre 183,5 e 563,1 nm, não possuíram reprodutibilidade, além de PDIs variando até 0,635, o que não é interessante no desenvolvimento das formulações brancas e nem nas formulações com o fármaco devido a grande distribuição dos tamanhos das nanopartículas.

Com a reprodutibilidade do método de fusão e emulsificação no CLN 8, e o PDI de 0,290, a leflunomida foi incorporada ao sistema e o mesmo foi submetido a três e quatro ciclos no microfluidizador. Os sistemas de três ciclos não apresentaram homogeneidade na distribuição de tamanhos das nanopartículas, então seguiu-se apenas a formulação de quatro ciclos, cujo resultado pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 - Tamanho e PDI médios dos CLN contendo leflunomida pela análise em DLS

NP	Método	Tamanho (nm)	PDI
8	Emulsão + microfluidização 4 ciclos em 800 mbar	163,4 ± 13,2	0,301 ± 0,075

O tamanho e PDI apresentados pelo DLS são correspondentes aos valores médios. Outros parâmetros da análise também são observados a fim de garantir a confiabilidade do sistema. Embora a leitura tenha apresentado tamanho médio de 163,4 nm e PDI de 0,301, a distribuição dos tamanhos das partículas se mostrou abaixo de 100 nm. Ainda que haja população nanométrica com tamanho médio de

163,4 nm, a maioria das partículas se encontra entre 30 e 90 nm, como pode ser visualizado na Figura 1.

Esse tamanho reduzido pode ter origens distintas relacionadas aos tensoativos, que conferem o arranjo da partícula (SHIMIZU, 2004) ou ao método de preparo. A situação apresentada mostra que embora o tamanho médio seja favorável, ele não é a representação ideal da distribuição de tamanhos. Essa variação nos tamanhos explica também o PDI, que mesmo sendo baixo, ainda é considerado ruim pela falta de homogeneidade na formação das nanopartículas.

Figura 1 - Distribuição média de tamanhos dos CLN contendo leflunomida, lidos em triplicata por DLS, em dia 0

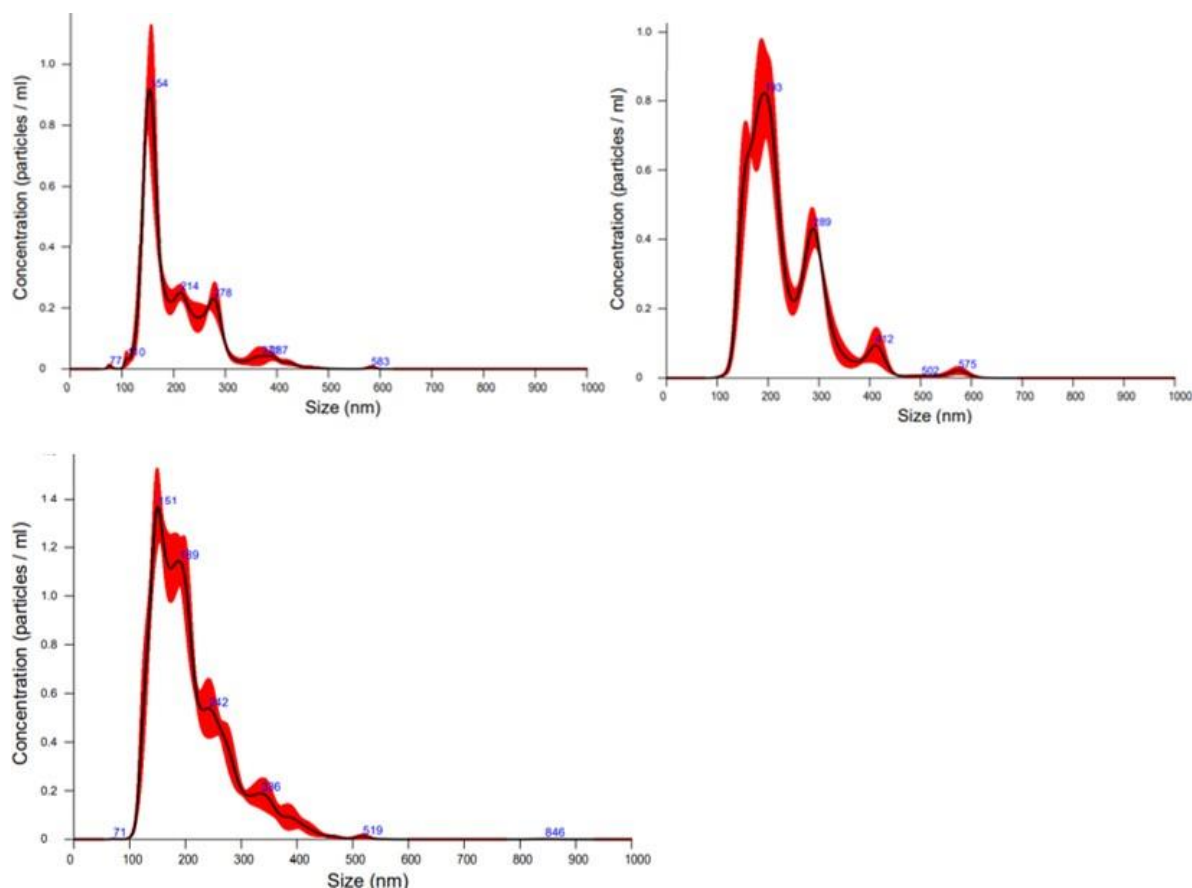
Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0	0,0	5,615	0,0	0,0	78,82	3,7	2,7	1106	0,0	0,0
0,4632	0,0	0,0	6,503	0,0	0,0	91,28	2,0	1,5	1281	0,0	0,0
0,5365	0,0	0,0	7,531	0,0	0,0	105,7	1,1	0,8	1484	0,0	0,0
0,6213	0,0	0,0	8,721	0,0	0,0	122,4	0,7	0,4	1718	0,0	0,0
0,7195	0,0	0,0	10,10	0,0	0,0	141,8	0,4	0,2	1990	0,0	0,0
0,8332	0,0	0,0	11,70	0,0	0,0	164,2	0,3	0,1	2305	0,0	0,0
0,9649	0,0	0,0	13,54	0,0	0,0	190,1	0,2	0,1	2669	0,0	0,0
1,117	0,0	0,0	15,69	0,0	0,0	220,2	0,1	0,1	3091	0,0	0,0
1,294	0,0	0,0	18,17	0,0	0,0	255,0	0,1	0,0	3580	0,0	0,0
1,499	0,0	0,0	21,04	0,0	0,0	295,3	0,1	0,0	4145	0,0	0,0
1,736	0,0	0,0	24,36	0,6	1,6	342,0	0,0	0,0	4801	0,0	0,0
2,010	0,0	0,0	28,21	3,5	5,8	396,1	0,0	0,0	5560	0,0	0,0
2,328	0,0	0,0	32,67	10,2	9,2	458,7	0,0	0,0	6439	0,0	0,0
2,696	0,0	0,0	37,84	18,7	8,0	531,2	0,0	0,0	7456	0,0	0,0
3,122	0,0	0,0	43,82	21,9	5,5	615,1	0,0	0,0	8635	0,0	0,0
3,615	0,0	0,0	50,75	18,0	5,9	712,4	0,0	0,0	1,000e4	0,0	0,0
4,187	0,0	0,0	58,77	11,7	5,8	825,0	0,0	0,0			
4,849	0,0	0,0	68,06	6,7	4,3	955,4	0,0	0,0			

O DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*, através da dispersão da luz e do movimento Browniano das partículas, é que determina o tamanho e o PDI das partículas do sistema, com base na velocidade do seu movimento (DELGADO, 2013). O NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*, é um segundo equipamento que possui princípio semelhante, mas a leitura acontece de forma diferente, com base em gravações feitas por um ângulo acima da amostra, onde então a velocidade de descolamento é calculada, fornecendo o tamanho das partículas, além das análises serem feitas em diluições diferentes. Dados adicionais também são fornecidos, como concentração de partículas, além de uma visualização mais clara sobre a distribuição de tamanho.



A análise em NTA foi realizada com o intuito de apresentar uma segunda leitura das amostras contendo o fármaco, uma vez que a distribuição em DLS se mostrou inferior a 100 nm. As informações obtidas por meio do NTA mostraram que o tamanho médio das partículas ficou em torno de 215 nm, mas a maioria da população estava concentrada entre 151 nm e 412 nm, como mostra a Figura 2, com uma concentração de partículas variando de  $5,86 \times 10^{11}$  a  $1,57 \times 10^{12}$  partículas/mL. Quando se compara os resultados das duas análises, nota-se uma variação, que se explica por dois parâmetros simples: o primeiro é a possibilidade do NTA em apresentar o tamanho das partículas um pouco maior, variação de erro causada pelo próprio equipamento em decorrência do método de análise, mas que não emite uma diferença exorbitante; a segunda razão se dá pela diluição realizada. O sistema em que os CLN se encontram é um sistema aquoso, com componentes lipofílicos e componente anfótero. A proporção dos componentes ou mesmo o excesso de energia do processo levou a formação de partículas muito pequenas, ou micelas, que nas diluições realizadas podem ter sido desfeitas, resultando na predominância de tamanhos maiores na leitura em NTA.

Figura 2 - Gráficos da leitura da triplicata das formulações contendo Leflunomida em dia 0, através da análise em NTA



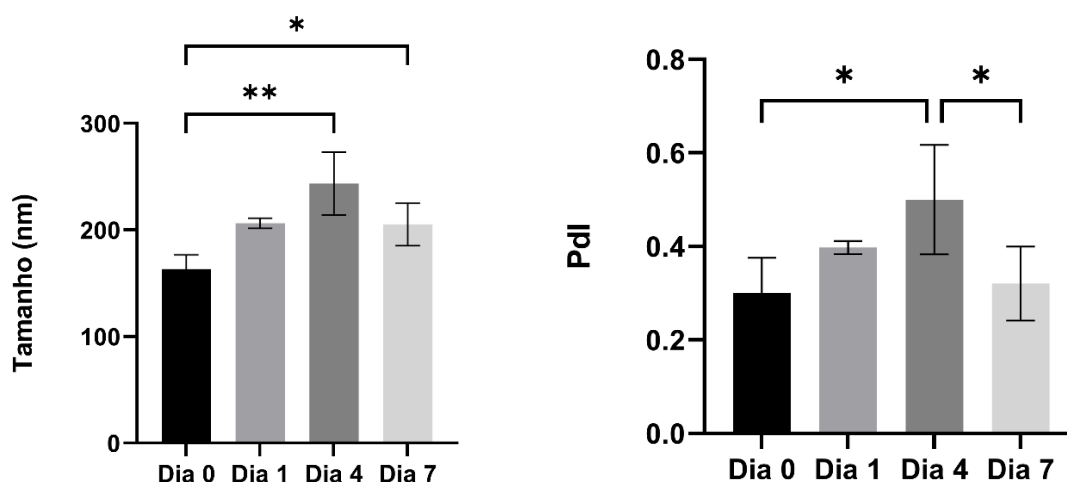
Quanto à estabilidade da formulação, a análise se deu observando os parâmetros de tamanho e PDI em análises feitas pelo DLS, considerando apenas o tamanho médio resultante. Os dados obtidos se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 - Estabilidade quanto ao tamanho e PDI em relação aos dias de armazenamento em temperatura de 2°C a 8°C, por leitura em DLS

Dia	Tamanho (nm)	PDI
0	163,4 ± 13,2	0,301 ± 0,075
1	206,3 ± 4,8	0,398 ± 0,014
4	243,6 ± 29,6	0,500 ± 0,117
7	205,3 ± 19,8	0,320 ± 0,079

A análise estatística dos dados constantes na Tabela 4, resultou nos gráficos que constam na Figura 3.

Figura 3 – Gráficos de análise estatística em relação ao tamanho e PDI das análises em DLS



Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa em relação aos dias, com  $p > 0,05$ .

A formulação foi armazenada entre 2°C e 8°C a fim de se ter uma melhor conservação. Tendo como dia 0 o dia em que as formulações foram preparadas, nota-se que há uma variação em relação ao tamanho e ao PI. O tamanho dos CLN aumenta em dia 1 e dia 4, e os respectivos PDI também, entretanto, no dia 7 há redução dessas características comparadas aos dias anteriores. O método de conservação pode estar relacionado a esse aumento, uma vez que a composição possui lipídeo que é sólido em temperatura ambiente, ou seja, a formulação sendo conservada em geladeira pode promover a solidificação de partículas do lipídeo que estejam desarranjadas (SOUTO, 2011). A oscilação de dados da formulação, de acordo com a análise estatística, mostra que o aumento do PDI foi significativo entre o dia 0 e o dia 4, e a variação de tamanho foi significativa entre os dias 0 e 4 e entre 0 e 7. Esses resultados mostram que o tamanho aumenta de forma significativa, entretanto, a variação do PDI demonstra pouca significância, indicando apenas um possível erro de leitura em dia 4. Assim, essa variação pode estar relacionada com a composição da formulação, o que pode estar levando à agregação das partículas com consequente variação de tamanho.

#### 4 CONCLUSÃO

Os parâmetros relacionados a formulação de CLN contendo leflunomida apresentaram variações que se associam ao método de preparo, a composição e a natureza dos componentes. A escolha da composição foi baseada na interação com

o fármaco, sendo selecionados aqueles que tiveram menor interação, entretanto, a natureza desses componentes ou a proporção utilizada, tanto para os CLN brancos quanto para os CLN contendo o fármaco, não foram adequadas para a geração de um sistema de tamanho constante, entretanto a homogeneidade se mantém com pouca variação. O método também foi modificado no decorrer do processo e testado outras vertentes. A fusão e emulsificação associada a microfluidização foi a que se mostrou a melhor escolha por causa da reprodutibilidade, o que é um fator relevante no desenvolvimento de uma formulação.

Dessa forma, o trabalho realizado analisou formas de preparo e identificou a melhor opção para a continuação dos estudos, sendo necessária a realização de ajustes na composição, a fim de dar continuidade no desenvolvimento da formulação de CLN contendo leflunomida.

## 5 REFERÊNCIAS

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 Dev and Ind Pharm.** 42 (2), 254-262 maio 2015.

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.

COELHO, S. M. T. C. D. **Planejamento racional de nanopartículas lipídicas como estratégia de liberação controlada de fármacos para uso anti-HIV pediátrico.** 2017, 186 f. Tese de doutorado – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2017.

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Brasília: **Ministério da Saúde.** Protocolo Clínica e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. Disponível em:

<[http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/Relatrio\\_Artrite\\_Reumatoide\\_CP\\_21\\_2020.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/Relatrio_Artrite_Reumatoide_CP_21_2020.pdf)>. Acesso em 6 de julho de 2022.

DELGADO, J. M. F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa.** 2013. 117 f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

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

JUNIOR, A. P. D. **Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo dexametasona para tratamento**

**tópico de inflamações cutâneas.** 2016. 191 f. Tese de doutorado – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2016

KYIOMOTO, H. D. **Drogas modificadoras do curso da doença no tratamento da artrite reumatoide - sintéticos combinados versus agentes biológicos: revisão sistemática e estudo econômico.** 2018. 132 f. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

LAURINDO, I. M.M., XIMENES, A. C., LIMA, F. A. C., PINHEIRO, G. R. C., BATISTELLA, L. R., BERTOLO, M. B., ALENCAR, P., XAVIER, R. M., GIORGI, R. D. N., CICONELLI, R. M., RADOMINSKI, S. C. Artrite reumatoide: diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Reumatol**, 4(6), 435-442, dezembro 2004.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Rev Eletrônica Farm**, 6(2), 1-37, junho 2009.

MARINHO, A. D. P. **Desenvolvimento e caracterização de nanoagentes para a artrite reumatoide** [dissertation]. 2018, 100 f. Dissertação de mestrado – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2018.

PEREIRA, J. C. **Estudo de comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões** [dissertation]. 2010. 112 f. Dissertação de mestrado – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

REIS, A. P. M. G. **Perfil terapêutico de pacientes com artrite reumatoide no Brasil: estudo de vida real.** 2019. 118 f. Tese de doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

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. 2015. Disponível em: <[www.proceedings.blucher.com.br/article-details/encapsulao-de-compostos-bioativos-de-bidens-pilosa-l-em-partculas-lipdicas-slidas-20768](http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/encapsulao-de-compostos-bioativos-de-bidens-pilosa-l-em-partculas-lipdicas-slidas-20768)>. Acesso em 30 de julho de 2022.

SARALEGUI, R. B. **Nanopartículas lipídicas como sistemas de administración de sustancias activas: aspectos tecnológicos y aplicaciones terapêuticas.** 2020. 28 f. Trabalho de conclusão de curso – Universidad del País Vasco, Lejona, 2020.

SENNA, L. W. P. **Obtenção e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.)** 2016. 116 f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SENNA, E. R., DE BARROS A. L., SILVA E. O., COSTA I. F., PEREIRA L. V., CICONELLI R. M., et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol**. 2004;31(3):594-7.

SHIMIZU S. **Novos tensoativos catiônicos: efeitos da estrutura do grupo hidrofílico sobre adsorção e agregação em soluções aquosas.** 181 f. Tese de doutorado – Universidade Paulista, São Paulo. 2004.

SILVA, J. A., APOLINÁRIO, A. C., SOUZA, M. S. R., DAMASCENO, B. P. G. L., MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, 31(3), 125-131, 2010.

SOUTO, E. B., SEVERINO, P., SANTANA, M. H. A., PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídeos sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Quím Nova**, 34(10), 1762-1769, dezembro 2011.

VEGA, D., PETRAGALLI, A., FERNÁNDEZ, D., ELLENA, J. A. Polymorphism on leflunomide: stability and crystal structures. **J Pharm Sci**, 95(5), 1075-1083, maio 2006.

VILLASEÑOR, N. A. **Síntesis de nanopartículas de PLGA caragadas com leflunomida para su evaluación in-vitro como sistemas de administración y liberación en el tratamiento de artritis reumatoide**. 104 f. Dissertação de mestrado – Universidad Autonoma de Baja California, Tijuana, 2019.