

MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas com nistatina para uma ação antifúngica

Cecília Nascimento

M

2022





Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas com
nistatina para uma ação antifúngica

Cecília Carina Saraiva do Nascimento

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau
de Mestre em Tecnologia Farmacêutica**

Departamento de Ciências do Medicamento
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob a orientação:

Prof. Doutor Paulo Jorge Cardoso da Costa
(**Orientador**)

Prof. Doutora Maria de La Salette de Freitas Fernandes Hipólito Reis Dias Rodrigues
(**Coorientadora**)

Setembro, 2022

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um agradecimento ao meu orientador e Diretor do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, Prof. Doutor Paulo Costa, todo o acompanhamento teórico e técnico, disponibilidade, apoio e toda a ajuda com os diversos aparelhos e conhecimentos informáticos. Agradeço a liberdade de trabalho que me deu e que me permitiu ganhar autonomia no laboratório.

Em segundo lugar, à minha coorientadora, Prof. Doutora Salette Reis por todos os ensinamentos dados, por todas as dicas e palavras de apoio que foi dando ao longo destes meses de trabalho.

Aos restantes Professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, Prof. Doutor Delfim Santos, Prof. Doutora Isabel Almeida, Prof. Doutor José Paulo Sousa e Silva, Prof. Doutora Helena Amaral, Prof. Doutor Paulo Lobão e Prof. Doutor Maurício Barbosa, que contactei durante o meu percurso académico, agradeço todo o conhecimento científico de tecnologia farmacêutica.

Aos meus colegas de laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial, à Filipa Sousa que teve um papel essencial na construção deste trabalho. Agradeço-lhe toda a partilha de conhecimento, direcionamento e ajuda que me deu ao longo deste ano. Agradeço também às restantes colegas por toda a ajuda prestada ao longo deste ano, Inês Teixeira, Sandra Mota, Marta Ferreira, Camila Marques e Letícia Fonseca.

Aos meus colegas de mestrado, mesmo com grande parte de aulas à distância, agradeço o companheirismo e momentos de convívio proporcionados. Em especial, agradecimento à Elen, Sara e Joana.

Um agradecimento especial à Udream, aos amigos que conheci e a todas as pessoas simpáticas e inspiradoras que tive contacto de ter, ajudaram a que este ano de tese se tornasse melhor e com mais sentido.

Aos meus amigos que me apoiaram, à Ana Filipa pela amizade que guardo desde o 1º ano de universidade, à Liliana pela amizade, companhia e, mesmo longe, pelas conversas diárias sobre todos os temas. À Mara e Carla pela amizade ao longo destes anos em Braga, por todos os intervalos passados ou tardes na biblioteca. À Emylle pela amizade sincera e conversas. Um agradecimento à minha irmã, por toda a ajuda, incentivo e apoio desde sempre.

Por fim, agradeço aos meus pais por terem feito sempre todos os esforços, darem-me a liberdade de me deixarem seguir o que eu queria e acreditado em mim independentemente de tudo. Agradeço o apoio e incentivo dado.

Agradecimento também a todas as outras pessoas, família ou não, que sempre estiveram presentes e me apoiaram.

Resumo

As doenças fúngicas afetam atualmente quase um quarto da população em todo o mundo. Infecções fúngicas causadas por *Candida albicans* são consideradas um importante problema de saúde pública, sendo este fungo responsável por diversas doenças, em que as mais conhecidas são candidíase vulvovaginal, candidíase oral, candidemia ou mucosite. O aumento de mecanismos de resistência de antifúngicos é um dos grandes entraves ao tratamento dessas mesmas doenças. A nistatina, fármaco antifúngico, pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando assim baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade intestinal o que constitui um grande desafio para a sua formulação e administração. A nanotecnologia é um campo de destaque na ciência nos dias de hoje e as nanopartículas lipídicas, em especial, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), tornaram-se atrativas nos últimos anos devido às suas propriedades promissoras de vectorização de uma grande variedade de fármacos. Por causa das características hidrofóbicas do fármaco, encapsulou-se a nistatina em SLN, pretendendo-se compreender assim a relação entre a utilização de nanossistemas e a melhoria do efeito terapêutico. O objetivo desse trabalho foi formular SLN com nistatina através de diferentes métodos (homogeneização a elevada velocidade e ultrassonicação) com otimização de vários parâmetros e formulação de 2 géis (um deles contendo SLN).

Inicialmente, utilizaram-se 3 lípidos: Compritol 888 ATO, palmitato de cetilo e Precirol ATO 5 e, após o estudo de diversos parâmetros (tamanho, eficácia de encapsulação (EE) e comportamento polimórfico dos lípidos), escolheu-se o Precirol ATO 5 como o lípido com resultados mais satisfatórios. Os resultados do presente trabalho mostraram que o doseamento de nistatina é linear, específico e apresenta repetibilidade. O diâmetro médio das nanopartículas vazias e com fármaco foi, respetivamente, 306 nm e 260 nm com uma EE de 67,8%. Relativamente à estabilidade, as SLN com fármaco demonstraram ser mais estáveis que as SLN sem fármaco. O polímero usado para formulação de géis foi um polímero carbómero vulgarmente conhecido pelo nome comercial carbopol 940. O rendimento das preparações de gel carbopol a 0,5% e do gel carbopol a 0,5% + NPs Precirol-Nis a 10% foram, respetivamente, 87,2% e 91,39%.

Palavras-chave: *Candida*, nistatina, SLN, estabilidade, carbopol 940

Abstract

Fungal diseases currently affect about a quarter of the population worldwide. Fungi infections caused by *Candida albicans* have been described as a significant concern to public health. The spectrum of clinical diseases caused by this fungi species range between vulvovaginal candidiasis, oral candidiasis, candidemia and mucositis. The emergence of resistance mechanisms towards antifungal therapy greatly hampers successful management of illness and patient outcome. Nystatin, an antifungal drug, is categorized as a class IV of Biopharmaceutical Classification System, presenting low aqueous solubility and low intestinal permeability. Nowadays, the emerging platform of nanotechnology and lipid nanoparticles, notably solid lipid nanoparticles (SLN), has been subject to growing attention over recent past, owing to the promising properties of vectorization among a substantial variety of pharmaceutical drugs. Due to its hydrophobic proprieties, nystatin was encapsulated in SLN. Because of the hydrophobic characteristics of the drug, nystatin was encapsulated in SLNs, thus aiming to understand the relationship between the use of nanosystems and the improvement of the therapeutic effect. The aim of this work was to formulate SLN with nystatin by different methods (high speed homogenization and ultrasonication) with optimization of several parameters and formulation of 2 gels (one of them containing nanoparticles).

Initially, 3 lipids were used: Compritol 888 ATO, cetyl palmitate and Precirol ATO 5 and, after the study of several parameters (size, encapsulation efficiency (EE), polymorphic behaviour of the lipids), Precirol ATO 5 was chosen as the lipid with the most satisfactory results. The results of the present work showed that the dosage of nystatin is linear, specific and presents repeatability. The average diameter of empty nanoparticles and with drug was, respectively, 306 nm and 260 nm and an EE of 67.8%. Regarding stability, SLN with drug proved to be more stable than SLN without drug. The polymer used for formulation of gels was the polymer commonly known by the trade name carbopol 940. The yield of 0.5% carbopol gel preparations and 0.5% carbopol gel + 10% Precirol-Nis NPs were 87.2% and 91.39%, respectively.

Keywords: *Candida*, nystatin, SLN, stability, carbopol 940

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fungos	1
1.1.1	Considerações gerais	1
1.1.2	Fungo Candida albicans.....	2
1.1.2.1	Doenças causadas por Candida albicans	2
1.2	Classe de antifúngicos	2
1.3	Nistatina.....	3
1.3.1	Considerações gerais	3
1.3.2	Farmacocinética.....	4
1.3.3	Mecanismo de ação	4
1.3.4	Formulações comercializadas e vias de administração	5
1.4	Nanopartículas.....	6
1.4.1	Diferentes tipos de nanopartículas	7
1.5	Aplicações das NPs em doenças fúngicas.....	9
1.6	Objetivo do trabalho	10
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1	Matérias-primas	11
2.1.1	Reagentes.....	11
2.1.2	Aparelhos utilizados	11
2.2	Métodos	13
2.2.1	Doseamento de nistatina.....	13
2.2.2	Preparação das nanopartículas lipídicas	17
2.2.2.1	Fase aquosa e fase lipídica	18
2.2.2.1.1	Lípidos	18
2.2.2.1.2	Agente tensioativo	20
2.2.2.2	Métodos de preparação de NPs	21
2.2.2.2.1	Método de homogeneização a alta velocidade e ultrassonificação ...	21
2.2.3	Caracterização físico-química das NPs.....	23
2.2.3.1	Tamanho das partículas	24

2.2.3.1.1	Difratometria de laser	24
2.2.3.1.2	Dispersão dinâmica da luz	25
2.2.3.2	Calorimetria diferencial de varrimento	27
2.2.3.3	Eficácia da encapsulação da nistatina	28
2.2.3.4	Estabilidade	29
2.2.4	Preparações semissólidas cutâneas	30
2.2.5	Reologia e viscosidade	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1	Validação do método de doseamento	34
3.2	Caracterização das nanopartículas	38
3.2.1	Tamanho de partícula	38
3.2.2	Potencial zeta	39
3.3	Estudo das formas polimórficas em função da temperatura	40
3.4	Eficácia de encapsulação da nistatina.....	43
3.5	Estudo da estabilidade	44
3.6	Análise das características organolépticas da preparação semissólida e cálculo do rendimento.....	48
3.7	Estudo do comportamento reológico da preparação semissólida.....	51
4	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	56
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
6	ANEXOS	64

Índice de figuras

<i>Figura 1 - Mecanismos de ação: as quatro classes de antifúngicos, adaptado de [1].</i>	3
<i>Figura 2 – Estrutura de nistatina, adaptado de [13].</i>	3
<i>Figura 3 – Mecanismos de ação de NIS. É mostrado apenas meio poro. Em termos termodinâmicos, a interação mais favorável é entre o antifúngico e as caudas dos fosfolípidos, hidrofóbicas, enquanto a cadeia poliol está em contato com o meio aquoso. M demonstra a localização do anel micosamina. Adaptado de [17].</i>	5
<i>Figura 4 - Diferentes tipo de nanotransportadores, agrupados por classes de acordo com o tamanho; adaptado de [28].</i>	7
<i>Figura 5 – (a) Nanopartículas lipídicas sólidas; (b) vetores lipídicos nanoestruturados.</i>	8
<i>Figura 6 - Representação esquemática de um sistema de HPLC, adaptado de [45].</i>	13
<i>Figura 7 - Exemplo de um cromatograma, onde t_0 e t_R representam, respectivamente, o tempo morto (t_0) e o tempo de retenção (t_R) da substância em estudo.</i>	14
<i>Figura 8 - Estrutura do polisorbato 80 (Tween 80).</i>	20
<i>Figura 9 - Classificação geral dos diferentes métodos de preparação de NPs; adaptado de [30].</i>	22
<i>Figura 10 - Esquema da preparação de nanopartículas, adaptado de [27].</i>	23
<i>Figura 11 - Representações esquemáticas de uma população monodispersa e de uma população polidispersa por DLS, adaptado de [90].</i>	26
<i>Figura 12 - Esquema da definição do PZ, adaptado de [93].</i>	27
<i>Figura 13 - Esquema para determinação de EE de NPs a partir do método indireto.</i>	29
<i>Figura 14 - Representação gráfica do fator de retenção em função da percentagem de metanol da fase móvel.</i>	35
<i>Figura 15 - Cromatograma de nistatina, obtido através da solução padrão 1.</i>	35
<i>Figura 16 - Cromatograma de "branco" que comprova que não há presença de mais nenhum constituinte.</i>	36
<i>Figura 17 – (a) Curva de calibração para NIS. Equação da reta: $y = 0,5572x - 2,1899$; $R^2 = 0,99$, $R = 0,995$ e $SQD = 1,383$; (b) Representação gráfica dos desvios à linearidade.</i>	37
<i>Figura 18 – (a) Tamanho (Dv_{10}, Dv_{50} e Dv_{90}) das NPs sem fármaco usando cada lípido estudado, por LD; (b) Valores, em tabela, dos percentis, Dv_{10}, Dv_{50} e Dv_{90}, das NPs sem fármaco usando cada lípido estudado, por LD.</i>	39
<i>Figura 19 - Diâmetro (em μm) das NPs sem fármaco usando cada lípido, por DLS.</i>	39
<i>Figura 20 – (a) Valores em absoluto obtidos de PZ das formulações com cada lípido usado; (b) valores obtidos de PI.</i>	40
<i>Figura 21 - (a) Termograma de Palmitato de cetilo; (b) Termograma de Precirol ATO 5 ; (c) Termograma de Compritol 888 ATO.</i>	41
<i>Figura 22 - Termograma da NIS.</i>	42
<i>Figura 23 - Termograma de cada lípido estudado com NIS.</i>	42
<i>Figura 24 – (a) Tamanho (Dv_{10}, Dv_{50} e Dv_{90}) das NPs das formulações de SLNs PREC-NIS, ao dia 0, 15º e 30º dia; (b) Valores, em gráfico, do tamanho (Dv_{10}, Dv_{50} e Dv_{90}) das formulações constituídas por Precirol ATO 5, ao dia 0, 15º e 30º dia; (c) Valores, em tabela, dos percentis, Dv_{10}, Dv_{50} e Dv_{90}, das NPs das formulações de SLNs PREC-NIS, ao dia 0, 15º e 30º dia; (d) Valores, em tabela, dos percentis, Dv_{10}, Dv_{50} e Dv_{90}, das NPs das formulações constituídas por Precirol ATO 5, ao dia 0, 15º e 30º dia.</i>	45
<i>Figura 25 - Diâmetro médio de NPs das formulações de SLNs PREC-NIS e as NPs constituídas por Precirol ATO 5, ao 0, 15º e 30º dia, através do DLS. Estão representados os valores da média +/- o desvio padrão.</i>	46
<i>Figura 26 – Valores de IP de NPs das formulações de SLNs PREC-NIS e as NPs constituídas por Precirol ATO 5, ao 0, 15º e 30º dia, através do DLS. Estão representados os valores da média +/- o desvio padrão.</i>	46
<i>Figura 27 - Termograma das SLNs PREC-NIS nos dias 0, 15 e 30.</i>	47
<i>Figura 28 - Termograma das NPs constituídas por Precirol nos dias 0, 15 e 30.</i>	47
<i>Figura 29 - Análise do grau de tixotropia para o GC-0,5-NP-NIS - DIA 0, 7 e 15.</i>	51
<i>Figura 30 - Análise do grau de tixotropia para o GC-0,5 - DIA 0, 7 e 15.</i>	51
<i>Figura 31 – (a) Taxa de corte versus viscosidade para GC-0,5; (b) taxa de corte versus viscosidade para GC-0,5-NP-NIS - DIA 0, 7 e 15.</i>	52

<i>Figura 32 – Viscosidade em função do tempo para as diferentes taxas de corte; (a) GC-0,5; (b) GC-0,5-NP-NIS.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 33 - Determinação do LVER para o GC-0,5 - DIA 0, 7, 15.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 34 - Determinação do efeito de temperatura para os três componentes (componente elástico, componente viscoso e ângulo de fase) para o GC-0,5 - DIA 0.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 35 - Determinação do efeito de temperatura para os três componentes (componente elástico, componente viscoso e ângulo de fase) para o GC-0,5-NP-NIS - DIA 0.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 36 - Determinação do efeito de temperatura. (a) GC-0,5-NP-NIS - DIA 0, 7 e 15; (b) GC-0,5 - DIA 0, 7 e 15.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 37- UltiMate™ 3000, Thermo Scientific™ DIONEX com coluna Coluna Acclaim™ 120 C18.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 38 - (a) soluções padrão obtidas (10,3; 16,3; 20,3; 25,1; 31,1; 35,5 µg/mL, da esquerda para a direita, respetivamente); (b) soluções stock obtidas (10,3; 16,3; 20,3; 25,1; 31,1; 35,5 µg/mL, da esquerda para a direita, respetivamente).</i>	<i>64</i>
<i>Figura 39- Aparelhos utilizados para o método de homogeneização a alta velocidade e ultrassonificação. (a) homogeneizador de elevada velocidade, ultra-turrax T 25 (IKA Labortechnik); (b) Ultrasonificador (Vibro Cell VCX 130, Sonics & Materials).....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 40 – (a) aparelho de dispersão dinâmica da luz (DLS- Dynamic Light Scattering, ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville); (b) aparelho de difração laser (LD- Laser Diffraction, Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument).</i>	<i>65</i>
<i>Figura 41 - DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH</i>	<i>65</i>
<i>Figura 42 - Gako unguator (Instituto galenico, S.A.).....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 43 - Reómetro (Kinexus lab+, Malvern).</i>	<i>66</i>
<i>Figura 44 - À direita, formulação de NPs constituídas por Precirol ATO 5 e, à direita, formulação de SLNs PREC-NIS.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 45 - Tempo de retenção - tr, largura, pratos teóricos, simetria, altura e área obtidos em função da percentagem de fase orgânica, respetivamente, (a); (b); (c); (d); (e); (f), para determinação do valor de k'. No gráfico, no eixo horizontal está representado as % de MeOH e no eixo do vertical está representado os valores de cada um dos parâmetros.</i>	<i>70</i>

Índice de tabelas

<i>Tabela I - Diferentes formulações comerciais disponíveis no mercado com NIS.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabela II - Novos sistemas de vectorização de NIS.</i>	<i>10</i>
<i>Tabela III - Lista de matérias-primas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabela IV – Condições cromatográficas do doseamento de NIS.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabela V - Formulações das NPs.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela VI – Condições do método de LD.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela VII - Quantidade necessária para a preparação de 100 gramas (g) de gel.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela VIII - Condições do ensaio de análise do grau de tixotropia.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela IX - Condições do ensaio de determinação da tensão de cedência.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela X - Condições do ensaio de tensão de corte em função da taxa de corte.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela XI - Condições do ensaio de determinação da zona linear elástica.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela XII - Condições do ensaio do efeito da temperatura.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela XIII - Repetibilidade das áreas dos picos de NIS de 3 ensaios realizados no mesmo dia em 3 concentrações diferentes.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela XIV - Registo dos parâmetros (início do ponto de fusão e entalpia) da análise da DSC, das matérias-primas individualmente e lípido + substância ativa (onde “*” corresponde aos parâmetros do lípido e “**” corresponde aos parâmetros do fármaco).....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela XV - Tamanho obtido, em μm, das SLN obtidas com Compritol 888 ATO (SLN COMP-NIS) e com Precirol ATO 5 (SLN PREC-NIS) e também o valor do PZ e PI.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela XVI - Registo dos parâmetros (início do ponto de fusão e entalpia) da análise da DSC, de SLNs PREC-NIS e de NPs constituídas por Precirol nos dias 0, 15 e 30.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela XVII - Valores obtidos da EE (%) durante o tempo de armazenamento para as SLNs PREC-NIS.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela XVIII - Análise das características organoléticas do GC-0,5-NP-NIS.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela XIX - Análise das características organoléticas do GC-0,5.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela XX - Registo do tamanho, potencial zeta (PZ) em função dos diferentes valores de velocidade (RPM) e tempo (min) em fase oleosa (FO) e para as duas fases (DF). A negrito estão representados os valores escolhidos com base no diâmetro médio e no valor de PZ.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela XXI - Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r, área, altura, pratos teóricos e simetria) para a escolha dos solventes (ACN ou MeOH). Eluentes: ACN ou MeOH: H₂O pH 3; 70:30 (v/v).....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela XXII - Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r, área, altura, pratos teóricos e simetria) para diferentes % de MeOH.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela XXIII - Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r, área, altura, pratos teóricos e simetria) para os dois volumes de injeção estudados (1 e 10) ..</i>	<i>69</i>
<i>Tabela XXIV - Tempos de corrida (min) em comparação às percentagens de MeOH na fase móvel.....</i>	<i>70</i>

Índice de equações

<i>Equação 1 - Tempo de retenção. t'_R corresponde ao tempo de resistência da fase estacionária, t_R ao tempo de retenção e t_0 ao tempo morto.....</i>	<i>15</i>
<i>Equação 2 - Fator de retenção (k'). T'_R corresponde ao tempo de resistência da fase estacionária, t_R ao tempo de retenção e t_0 ao tempo morto.</i>	<i>15</i>
<i>Equação 3 - PZ (z), onde U representa o valor da mobilidade eletroforética, η representa a viscosidade absoluta de corte das partículas, ϵ representa a constante dielétrica, $f(k\alpha)$ representa a função Henry.</i>	<i>26</i>
<i>Equação 4 – Determinação da eficácia de encapsulação através do método direto.</i>	<i>28</i>
<i>Equação 5 - Determinação da eficácia de encapsulação através do método indireto.</i>	<i>29</i>
<i>Equação 6- Determinação do limite de detecção onde σ representa o desvio padrão da resposta e S representa o declive da curva de calibração.....</i>	<i>38</i>
<i>Equação 7 - Determinação do limite de quantificação onde σ representa o desvio padrão da resposta e S representa o declive da curva de calibração.....</i>	<i>38</i>

Lista de abreviaturas, acrónimos e símbolos

ACN – Acetonitrilo

A/O – Emulsão água/óleo

DLS – *Dynamic Light Scattering* – Dispersão dinâmica da luz

DF – Duas fases

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC - *Differential Scanning Calorimetry* - Calorimetria diferencial de varrimento

EE – Eficácia de encapsulação

EHL – Equilíbrio hidrófilo lipofílico

FO – Fase oleosa

GC-0,5 - Gel carbopol a 0,5%

GC-0,5-NP-NIS - Gel carbopol a 0,5% + NPs Precirol-NIS a 10%

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência

Hz – Hertz

ICH – *International Council on Harmonisation* – Conselho Internacional para Harmonização

IP – Índice de polidispersão

k' – Fator de retenção

LD – *Laser Diffraction* – Difração laser

LDT – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

LVER - Limite da região viscoelástica linear

MeOH – Metanol

Mg/mL – Miligrama por mililitro

min – Minutos

µm – Micrómetro

NaOH – Hidróxido de sódio

NIS – Nistatina

nm – Nanómetro

NPs – Nanopartículas

NLC – *Nanostructured lipid carriers* -Vetores lipídicos nanoestruturados

°C – Graus Celsius

O/A – Emulsão óleo/água

σ – Desvio padrão

Pa – Pascal

PZ – Potencial Zeta

RPM – Rotações por minuto

S – Declive da curva de calibração

s- Segundos

SLN - *Solid lipid nanoparticles* - Nanopartículas lipídicas sólidas

t_R – Tempo de retenção

t'_R – Tempo de retenção ajustado

t₀ – Tempo morto

Tween 80 - Polisorbato 80

UV-VIS - Ultravioleta-visível

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos

Recentes estudos, estimam que os números totais de seres eucariotas no planeta rondem os 8,7 milhões e, deste valor, 7% representam os fungos (cerca de 611 mil espécies) em que 600 dessas espécies são espécies patogénicas, responsáveis por infeções nos humanos [1]. As infeções fúngicas são um problema de saúde global e afetam milhões de pacientes por ano. Nas duas últimas décadas, tem ocorrido um aumento no aparecimento de novas doenças causadas por fungos patogénicos que originam um aumento de estudos que visam encontrar tratamentos para essas mesmas doenças [2].

1.1.1 Considerações gerais

As infeções fúngicas afetam milhões de pacientes, podem ser superficiais e são geralmente de fácil tratamento sendo causadas principalmente por fungos do género *Candida*. Estas podem, também, ser invasivas, afetando cerca de 1,5 milhões de pessoas a nível mundial, sendo estas infeções mais raras e difíceis de tratar, afetam pessoas com sistema imunológico em baixo e podem ser causadas por *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* [3].

Os fungos são seres eucarióticos, uma grande parte vive em ambientes terrestres, mas podem também existir alguns fungos que se encontrem parcial ou totalmente em meios aquáticos. São um grupo bastante heterogéneo no que toca ao tamanho, podendo variar entre micrómetros a vários metros. Estes organismos não possuem tecidos de transporte especializado, no entanto, alguns possuem uma mistura de hifas filamentosas com estruturas de leveduras (dimorfismo) característica de fungos patogénicos. Têm na sua composição água, hidratos de carbono, proteínas e lípidos. O esteroide ergosterol tem um papel fundamental na estrutura e função da membrana plasmática e é um análogo fúngico do colesterol sendo responsável pela fluidez e permeabilidade da membrana fúngica [4]. A parede celular fúngica, estrutura rígida, é composta por diferentes açúcares poliméricos: quitina, glucanos e glicoproteínas [5, 6].

A reprodução dos fungos pode acontecer através de reprodução sexuada ou assexuada, sendo que a grande maioria se reproduz através deste último processo, uma vez que este meio de reprodução é compatível com condições extremas de temperaturas ou escassez de água.

A melhoria dos cuidados de saúde e do atendimento médico aumentou a qualidade de vida das pessoas que são mais suscetíveis a agentes patogênicos como é o caso de recém-nascidos, idosos ou doentes imunocomprometidos. No entanto, com aparecimento de novas infecções e tratamentos para as mesmas, apareceram também resistências aos antifúngicos. A resistência ao tratamento da infecção fúngica aumentou com a evolução humana. O largo espectro dos fármacos e outros fatores fazem com que haja cada vez mais resistência aos antifúngicos o que vai dificultando o tratamento. A formação de biofilmes nos fungos é uma das principais formas de resistência antifúngica [7].

1.1.2 Fungo *Candida albicans*

A *Candida* é um género de fungo bastante estudado por ser responsável por várias doenças, tem cerca de 150 espécies, sendo que 20 delas são de extrema importância clínica. Podem ser encontradas na mucosa oral, no trato gastrointestinal, urinário, na pele ou nas unhas [8]. Infecções fúngicas causadas por *Candida albicans*, principalmente, são consideradas um relevante problema de saúde pública. Ao longo dos anos este fungo ficou bastante associado a formação de biofilmes, além de aparecerem nas superfícies mucosas dos indivíduos ou em dispositivos médicos (cateteres ou sondas) [9, 10].

1.1.2.1 Doenças causadas por *Candida albicans*

Como dito anteriormente, este fungo é responsável por diversas doenças, as mais conhecidas são candidíase vulvovaginal, candidíase oral, candidemia, mucosite ou monilíase [1, 11]. Na cavidade oral, em indivíduos saudáveis, esta espécie pode permanecer de forma benigna, no entanto, fatores ambientais, a idade, uso de antibióticos ou presença de outras doenças, como vírus da imunodeficiência humana, diabetes ou cancro, faz com que estes indivíduos fiquem imunocomprometidos e estejam mais propícios a sofrerem infecções tanto superficiais como sistêmicas [12].

1.2 Classe de antifúngicos

Os agentes antifúngicos presentes atualmente no mercado para tratar de infecções fúngicas invasivas podem dividir-se em quatro classes consoante o seu alvo terapêutico (Figura 1). Têm ação na membrana plasmática, na síntese de ácidos nucleicos ou na parede celular dos fungos e são eles os azólicos, equinocandinas, polienos e alilaminas [1]. Estes quatro mecanismos de ação apresentam alguns inconvenientes em relação aos seus espectros de ação, mecanismo de resistência ou interações terapêuticas entre medicamentos. As propriedades físico-químicas (carácter hidrofóbico que provoca baixa solubilidade em água) e a similaridade das células fúngicas com as células animais

também pode provocar problemas de seletividade, influenciando assim a eficácia e eficiência clínica [7].

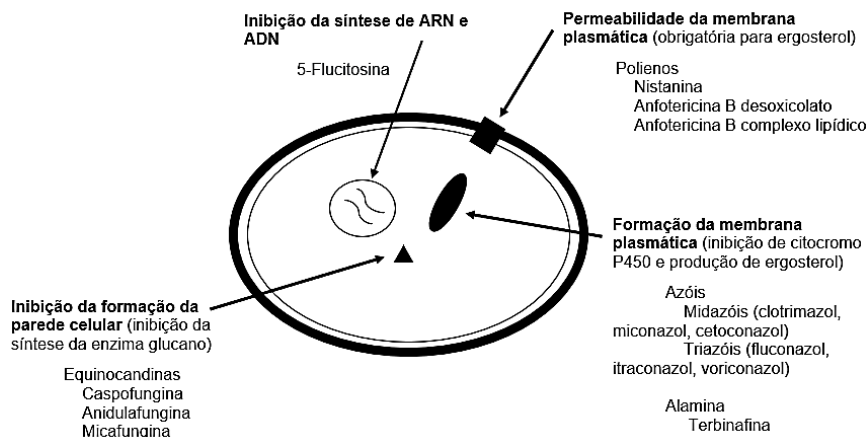


Figura 1 - Mecanismos de ação: as quatro classes de antifúngicos, adaptado de [1].

1.3 Nistatina

1.3.1 Considerações gerais

A nistatina (NIS), apresentada na Figura 2, com estrutura química $C_{47}H_{75}NO_{17}$, foi descoberta em 1950, como o primeiro polieno antifúngico, por Brown e Hazen. É um polieno macrolídeo derivado de policetídeos, isolada a partir do microrganismo *Streptomyces noursei* [13]. A NIS é constituída por 7 grupos hidroxilos livres o que lhe confere característica anfipática. A NIS também tem uma cadeia lateral constituída por um resíduo micosamina (lactona) que tem um grupo amina livre. Este complexo poliênico é constituído por três componentes biologicamente ativos (A1, A2 e A3), cujo componente principal é a nistatina A1. Tem atividade fungicida e fungistática. A principal ação antifúngica é contra espécies *Candida*. Também tem ação contra *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Blastomyces* [14].

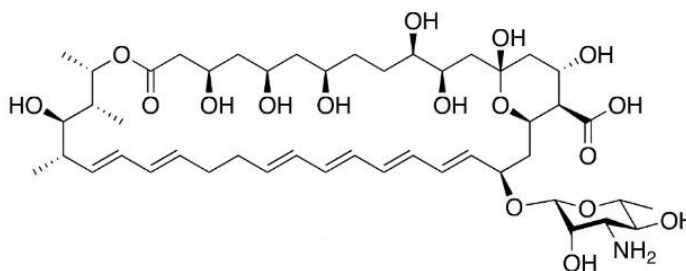


Figura 2 – Estrutura de nistatina, adaptado de [13].

A NIS apresenta-se como um pó higroscópico amarelo, com cheiro sugestivo a cereais e com sabor desagradável [15]. Este fármaco pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresenta baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade intestinal [16]. A presença de grupos polares hidroxilo, carboxilo e um grupo amino e lactona na cadeia lateral, em contraste com o grupo hidrofóbico (grupo polieno), forma a base para o caráter anfipático das moléculas de polieno. Isso faz com que este fármaco seja pouco solúvel em solventes polares e apolares [17]. Apresenta fortes propriedades redutoras e é um fármaco com características hidrofóbicas [10], é praticamente insolúvel em água e álcool, pouco solúvel em álcool n-propílico, álcool metílico e álcool n-butílico e insolúvel em clorofórmio, éter e benzeno. A solubilidade, a 28°C, em água é de cerca de 4,0 mg/mL, em metanol 11,2 mg/mL e etanol 1,2 mg/mL. As suas propriedades físico-químicas são afetadas pela exposição solar, calor e ar. Deve sempre ser armazenado em condições herméticas e abrigadas da luz [18]. Os fármacos existentes para tratar de doenças causadas por NIS são de tratamento tópico. Ainda não existem preparações de nistatina para administração sistêmica.

1.3.2 Farmacocinética

A farmacocinética estuda o trajeto de um fármaco no organismo. A absorção, distribuição, biotransformação e eliminação são os parâmetros observados para analisar a ação do fármaco [19]. Para tratamento de doenças sistêmicas é necessário que o fármaco tenha biodisponibilidade para entrar na corrente sanguínea e que se distribua pelos diferentes órgãos do corpo. A NIS pode ser administrada por via oral mas a sua absorção no trato gastrointestinal é muito reduzida pelo que a sua ação será apenas local. A excreção ocorre com o fármaco na forma inalterada. A NIS não pode ser usada sistemicamente pois é muito tóxica, estando associada a graves efeitos secundários, principalmente toxicidade para os eritrócitos [20, 21].

De acordo com Andreas H. Groll, *et al*, a NIS encapsulada em lipossomas demonstrou ter um perfil farmacológico não linear pois de acordo com o estudo realizado, a NIS demonstrou um aumento da concentração plasmática máxima e área sobre a curva com o aumento da dose e uma diminuição da depuração e do processo de eliminação dependente da dose [22].

1.3.3 Mecanismo de ação

Como foi referido anteriormente, a NIS tem um amplo espectro de ação. A atividade antifúngica está diretamente relacionada com a sua estrutura anfifílica que facilita a ligação ao ergosterol da membrana provocando a destruição da mesma [20]. Na Figura 3 está

representado o mecanismo de ação de NIS. Na membrana celular existem canais transmembranares responsáveis pela saída de água e iões essenciais, e a NIS vai formar um complexo com o ergosterol, ligando-se a esses mesmos canais que provoca a libertação de gradientes eletroquímicos, que aumenta a permeabilidade da membrana, levando à morte celular [13, 17]. O mecanismo de ação de NIS é idêntico à do antifúngico anfotericina B, uma vez que as suas estruturas químicas são semelhantes. A NIS consegue ligar-se ao colesterol (presente nas células animais), e essa ligação, apesar de fraca, provoca efeitos adversos o que explica o facto de os antifúngicos apresentarem um certo nível de toxicidade [14].

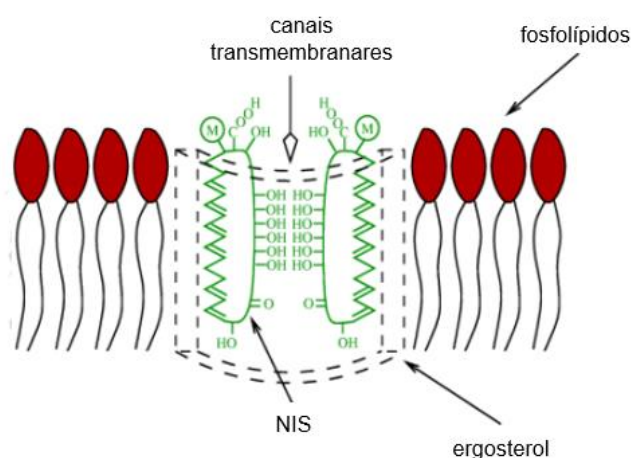


Figura 3 – Mecanismos de ação de NIS. É mostrado apenas meio poro. Em termos termodinâmicos, a interação mais favorável é entre o antifúngico e as caudas dos fosfolípidos, hidrofóbicas, enquanto a cadeia poliol está em contato com o meio aquoso. M demonstra a localização do anel micosamina. Adaptado de [17].

1.3.4 Formulações comercializadas e vias de administração

Para determinar qual a via de administração a usar é necessário ter em conta as propriedades do fármaco e os objetivos terapêuticos. A NIS pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, é um fármaco de difícil administração por via oral. A primeira formulação clinicamente disponível de NIS foi em 1954 administrada por via oral e tópica. Atualmente existem diversas formulações comerciais usadas para o tratamento de candidíase vulvovaginal, candidíase oral, candidemia ou mucosite [35].

Na Tabela I estão apresentadas as diferentes formulações comerciais disponíveis no mercado.

Tabela I - Diferentes formulações comerciais disponíveis no mercado com NIS.

Nome comercial	Forma farmacêutica	Vias de administração	Tratamento	Referência
Mycostatin	Suspensão oral	Oral	Candidíase oral	[13]
Nilstat	Suspensão oral	Oral	Candidíase oral	[23]
Nystat	Suspensão oral	Oral	Candidíase oral	[23]
Nystop	Suspensão tópica	Tópica	Candidíase vulvovaginal	[23]

1.4 Nanopartículas

Ao longo das últimas décadas ocorreu um aumento do estudo sobre nanoestruturas, demonstrando que os transportadores (“*carriers*”) de um fármaco podem ser uma forma bastante eficaz de levar os fármacos no organismo até ao local alvo. A nanomedicina consiste em usar elementos à escala nanométrica, nanopartículas (NPs), por exemplo, para algum diagnóstico, prevenção ou tratamento de patologias. A nanomedicina é usada para o tratamento de diversas doenças desde a segunda metade do século XX e uma das primeiras abordagens foi no tratamento de anemia através de NPs de óxido de ferro em soluções de ferro [24, 25].

Muitos fármacos na sua forma livre apresentam algumas limitações, tais como o curto tempo na corrente circulatória, baixa solubilidade em água ou fraca biodisponibilidade que pode causar muitos efeitos adversos. Com o objetivo de superar muitas dessas desvantagens, os fármacos começaram a ser encapsulados em nanossistemas de transporte de fármaco [26, 27]. As principais vantagens deste tipo de nanotransportadores são:

- Capacidade de atravessar algumas barreiras e células, pois o alvo terapêutico pode não se encontrar na corrente sanguínea;
- Melhorar a ação terapêutica, onde o fármaco é direcionado para os alvos terapêuticos específicos;
- Evitar também a distribuição de fármacos em tecidos nos quais produzem toxicidade;
- Poder haver uma libertação controlado do fármaco;
- Possibilitar a administração de doses mais elevadas;
- Haver uma proteção da molécula do fármaco;
- Possibilitar também novas vias de administração e haver também a possibilidade de absorção transmucosa ou transdérmica.

1.4.1 Diferentes tipos de nanopartículas

Existem vários tipos de nanotransportadores (Figura 4). Os vetores de fármacos podem ser divididos em dois grupos, vetores macromoleculares e vetores coloidais [28]. No grupo dos vetores macromoleculares, ou vetores solúveis, fazem parte os polímeros hidrossolúveis e anticorpos monoclonais. No grupo dos vetores coloidais, fazem parte as micro e nanopartículas poliméricas, as nanopartículas metálicas, as nanopartículas lipídicas, as micelas e os lipossomas. Estes sistemas micro ou nanoparticulados podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis e podem também ser divididos em 3 classes: nanomateriais orgânicos, inorgânicos ou híbridos. Os nanomateriais orgânicos são os lipossomas, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas, as micelas, as micro ou nanopartículas poliméricas e todos os outros nanossistemas orgânicos. Nos nanossistemas inorgânicos, encontram-se as nanopartículas de metais de transição (nanopartículas metálicas) que podem ser constituídas por substâncias como o dióxido de titânio, ouro, óxido de zinco ou prata.

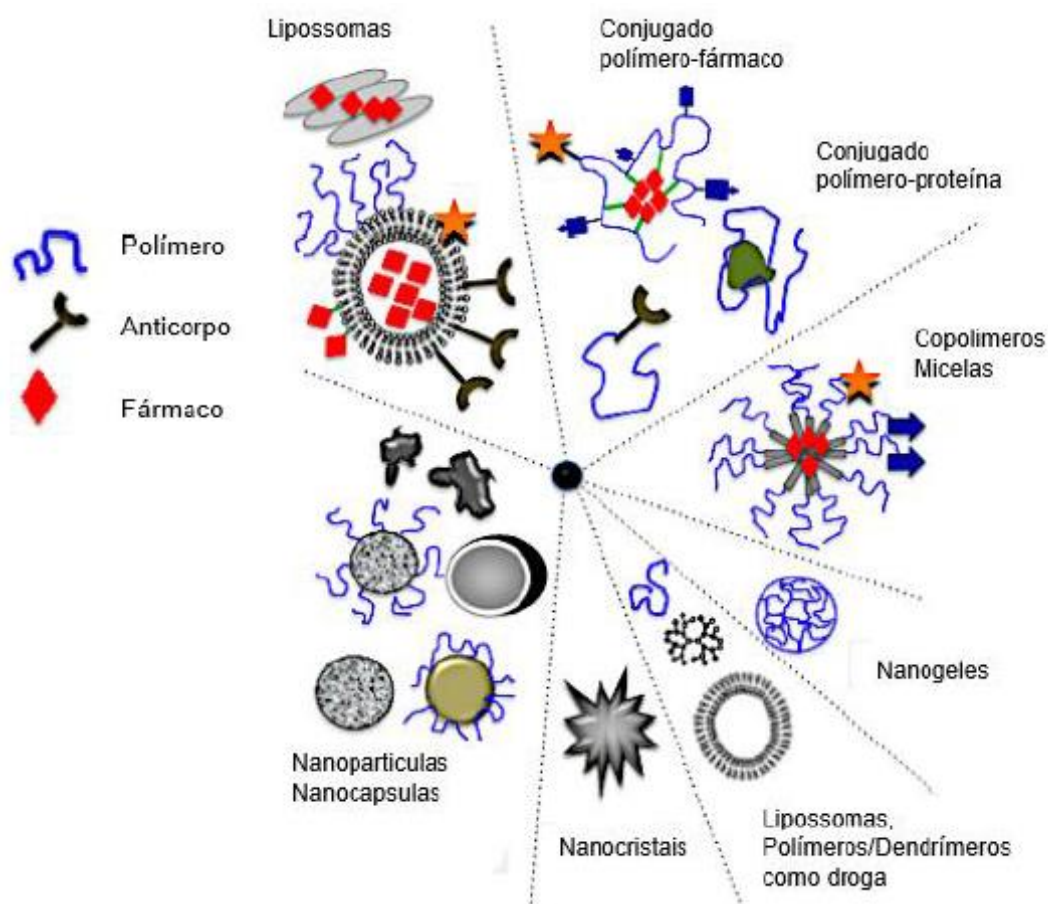


Figura 4 - Diferentes tipo de nanotransportadores, agrupados por classes de acordo com o tamanho; adaptado de [28].

As NPs lipídicas agrupam 3 tipos de NPs: NPs lipídicas sólidas (SLN – *Solid lipid nanoparticles*), vetores lipídicos nanoestruturados (NLC – *Nanostructured lipid carriers*) e conjugados lípido-fármaco. As SLNs são transportadores compostos de lípidos sólidos à temperatura ambiente, enquanto os transportadores lipídicos nanoestruturados são obtidos de lípidos com diferentes valores de ponto de fusão (Figura 5) [27]. A vantagem dos transportadores lipídicos nanoestruturados é que uma mistura de lípidos sólidos e lípidos líquidos formam uma matriz cristalina imperfeita. Este tipo de NPs tem maior capacidade de carga, maior estabilidade e apresentam maior facilidade de controlar a libertação do fármaco [29].

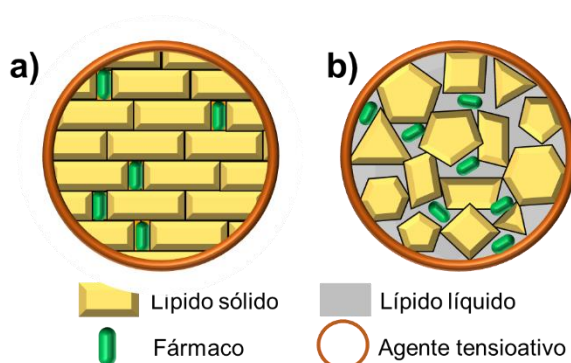


Figura 5 – (a) Nanopartículas lipídicas sólidas; (b) vetores lipídicos nanoestruturados.

Os lípidos podem ser definidos como moléculas insolúveis em água, hidrofóbicas, ou anfipáticas e solúveis em solventes orgânicos [30]. O uso de NPs lipídicas oferece uma nova perspectiva na formulação de fármacos pouco solúveis e também outras vantagens como o uso de matérias primas com características biodegradáveis, não tóxicas e biocompatíveis que diminui assim os efeitos adversos e aumentando a eficácia do fármaco [31].

As SLN, foram desenvolvidas pela primeira vez no início da década de 1990 e, como dito anteriormente, são constituídos por lípidos sólidos biocompatíveis e biodegradáveis dispersos numa solução aquosa que contém um agente tensioativo (tem a função de manter a estabilidade física do sistema) [32]. As nanopartículas estão geralmente na faixa de tamanho 10-1000 nm [33] e as SLN podem encontrar-se na entre 50-1000 nm [32]. A percentagem de agente tensioativo é influenciada pelo tipo de lípido utilizado e pela sua concentração [30]. As SLN podem agrupar-se em 3 tipos distintos: SLN tipo I, SLN tipo II e SLN tipo III. Nas SLN tipo I, o fármaco encontra-se encapsulado disperso numa matriz homogénea, no tipo II, o fármaco está disposto na parede da matriz, sendo que no interior está o lípido. Por último, o tipo III, oposto do tipo II, o fármaco encontra-se no interior e está rodeado por uma parede lipídica. Este tipo de NPs apresentam algumas vantagens em

relação a outros nanossistemas, como os lipossomas ou nano emulsões, tal como toxicidade inferior ou uma facilidade superior de controlar a libertação do fármaco, apesar de também apresentarem algumas desvantagens como a capacidade de carga de fármaco baixa, apresentarem uma elevada percentagem de água e também há possibilidade de expelirem o fármaco durante o armazenamento [34]. As SLN, dado o seu tamanho, promovem um melhor contacto com o estrato córneo, aumentando a penetração do fármaco. Como dito anteriormente, NIS é um composto sensível e uma das muitas vantagens de SLN é ser capaz de aumentar a estabilidade química de compostos que são sensíveis à luz, hidrólise e oxidação [7].

Existem alguns fatores que podem influenciar a quantidade de substância ativa encapsulada, como a estrutura físico-química da matriz ou o estado cristalino do lípido [35]. A homogeneização a quente é a técnica mais utilizada mesmo em compostos sensíveis à temperatura pois o tempo exposto é relativamente curto sendo a técnica de homogeneização a frio apenas recomendada para compostos extremamente sensíveis à temperatura [34].

1.5 Aplicações das NPs em doenças fúngicas

Como anteriormente referido, existem cada vez mais estudos e maior progresso na preparação de novos sistemas de libertação de fármacos, incluindo para fármacos antifúngicos. Existem já várias formulações comerciais disponíveis no mercado para tratamento de doenças causadas pelo fungo *Candida* mas, no entanto, todas elas apresentam toxicidade e baixa biodisponibilidade (dada as características de NIS). Uma forma de contornar esse problema é através da vectorização de NIS, aumentando assim a eficácia e eficiência da terapêutica, tornando viável o tratamento sistémico. Vários estudos demonstraram principalmente reduções significativas na toxicidade, mantendo a atividade antifúngica [14], e até formas para mascarar o sabor desagradável da NIS, podendo também ser prescrita na forma de comprimidos bucais para o tratamento de candidíase oral [36]. As NPs oferecem características físico-químicas notáveis quando comparadas com os seus homólogos (não vetorizados) e, por isso, têm sido utilizadas com sucesso.

Já existem alguns estudos e desenvolvimento de formulações de NPs com NIS para o tratamento de diversas doenças, mas grande parte incide sobre candidíase oral ou candidíase vulvovaginal. Na Tabela II estão apresentadas exemplos dessas formulações, encontrando assim uma solução para os problemas relacionados com NIS.

Tabela II - Novos sistemas de vectorização de NIS.

Sistemas de transporte	Vias de administração	Tratamento	Referência
		Candidíase	
SLN	Tópico	cutânea	[38]
Nanoemulsões	Tópico	Candidíase	[39]
Lipossomas	Intravenoso	Candidíase	[40] [41]
Niossomas	Parenteral	Candidíase	[42]

1.6 Objetivo do trabalho

O aumento de resistência antifúngica e as características físico-químicas de NIS faz com que seja essencial desenvolver uma formulação farmacêutica que contorne estas problemáticas. Pretende-se compreender a relação entre a utilização de nanossistemas com antifúngicos e a melhoria do efeito terapêutico. O objetivo desse trabalho foi:

- Desenvolver NPs lipídicas com NIS através de diferentes métodos (homogeneização a elevada velocidade e ultrassonicação), com otimização de vários passos;
- Analisar os diversos parâmetros obtidos (tamanho, eficácia de encapsulação da NIS, comportamento polimórfico dos lípidos e do lípido + substância ativa e sua estabilidade);
- Formulação de geles (com e sem as NPs formuladas) e comparar as propriedades reológicas obtidas.

Inicialmente, utilizaram-se 3 lípidos: Compritol 888 ATO, palmitato de cetilo e Precirol ATO 5 e o objetivo, através do estudo dos valores dos diferentes parâmetros obtidos, foi escolher o que apresentava valores mais satisfatórios e promissores.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matérias-primas

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as matérias-primas que estão descritas na Tabela III.

2.1.1 Reagentes

Para os ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) foi utilizado metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) e água ultrapura acidificada a pH 3 (água ultrapura e ácido acético glacial, preparada no laboratório, com o auxílio de medidor de pH).

2.1.2 Aparelhos utilizados

Os equipamentos usados, assim como, o respetivo modelo e marca, foram os seguintes:

- Agitador magnético (Cimarec®, Barnstead International, mod. SP131320-33)
- Aparelho de DLS (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY)
- Aparelho de DSC (DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH)
- Aparelho de HPLC (Thermo Scientific, Dionex UltiMate 3000, Rapid Separation LC (RSLC) systems, Alemanha; software Chromeleon 7, Dionex)
- Aparelho medidor de pH (Hanna Instruments, HI 2211 pH / ORP Meter)
- Aparelho de Ultrassons (Bandelin SONOREX™ SUPER)
- Balança digital (Ohaus, Explorer® Pro, EUA, modelo: EP612)
- Balança analítica (Radwag Wagi Elektroniczne, Polónia; modelo: AS 220.R2)
- Banho de água (termostático) (5 L, 100°C; Nahita Auxilab S.L.)
- Centrífuga (Thermo Scientific Multifuge X1R)
- Gako unguator (Instituto galenico, S.A.)
- Mastersizer 3000 (Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument)
- Placa de aquecimento (Cimarec®, Barnstead International, mod. SP131320-33)
- Reómetro (Kinexus lab+, Malvern)
- Sistema para obtenção de água ultrapura (Direct-Q® Ultrapure Water Systems, Merck Millipore)
- Sonicador (Modelo Vibro Cell VCX 130, sonda CV18 de 6 mm, Sonics & Materials)
- Agitador de alta intensidade T 25 (IKA T25 digital ultraturrax, Labortechnik).

Tabela III - Lista de matérias-primas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Nome	Fornecedor/origem
Água ultrapura	Direct-Q® Ultrapure Water Systems, Merck Millipore, Alemanha
Álcool Etílico 96% V/V Puro	Fabrica do Álcool – Manuel Vieira & C ^a (Irmão), Surs, Lda, Portugal
Carbopol 934	Vaz Pereira, Portugal
Dimetilsulfóxido	Carlo Erba Reagents, França
Gliceril diestearato (Ph. Eur.) ou Gliceril de behenato (USP-NF) (Compritol® 888 CG ATO)	
Gliceril diestearato – tipo I (Ph. Eur.) ou Gliceril palmitoestearato (USP) (Precirol® ATO 5)	Gattefossé, França
Palmitato de cetilo	
Para-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno)	Acofarma, Portugal
Para-hidroxibenzoato de propilo (propilparabeno)	Acofarma, Portugal
Monoleato de polioxietilenossorbitano	Acofarma, Portugal
Metanol (MeOH)	Honeywell Riedel-de-Haën™, França
Hidróxido de sódio (NaOH) 10%	Lab. Tecnologia Farmacêutica, Portugal
Nistatina (NIS)	Fagron Ibérica SAL, Espanha

2.2 Métodos

2.2.1 Doseamento de nistatina

O HPLC é um método bastante usado para analisar constituintes de uma mistura, separando individualmente os diferentes constituintes, sendo assim uma excelente ferramenta de separação e quantificação dos constituintes. É possível, através disso, identificar, quantificar e/ou obter substâncias puras para diferentes aplicações [43, 44].

Este sistema de análise quantitativa, composto por quatro componentes essenciais: uma bomba, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de injeção e todos conectados (Figura 6). A fase móvel, fluída, é uma mistura de componentes líquidos polares e não polares e está em constante movimento em relação à fase estacionária e o eluente passa através da fase móvel para componentes da fase estacionária. Cada soluto é eluído, de modo sequencial, de acordo com a interação que tem com a coluna, que passa sob elevada pressão (normalmente 100-400 bar). As colunas devem seguir algumas especificações consoante o tipo de composto que se pretende analisar. A separação cromatográfica das substâncias que compõe a amostra ocorre através da interação e partição diferencial entre as duas fases inseridas na coluna cromatográfica - a fase móvel e a fase estacionária.

Os solutos que interagem pouco com a fase estacionária são eluídos primeiro e os solutos que ficaram retidos mais tempo (que interagem mais fortemente com a coluna) são eluídos mais tarde. Existem 3 tipos de cromatografia de acordo com a classificação da fase móvel: cromatografia líquida, cromatografia gasosa e cromatografia com fluidos supercríticos [45-49].

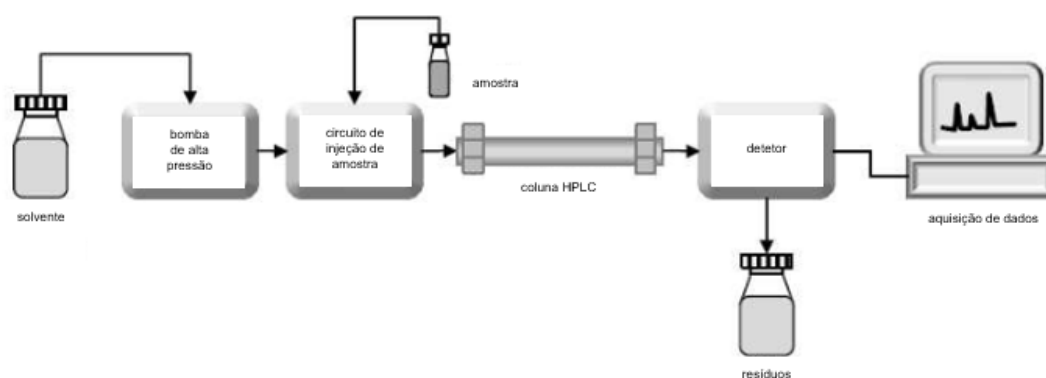


Figura 6 - Representação esquemática de um sistema de HPLC, adaptado de [45].

Na cromatografia líquida, na fase móvel, os pontos principais a ter em consideração são a viscosidade e a polaridade dos solventes e os solventes devem ser também compatíveis com o método de detecção. Já a fase estacionária deve ter uma elevada área de superfície/unidade de volume, tamanho e forma uniforme e deve ser também resistente a danos mecânicos e químicos, mas esses fatores levam a requisitos de alta pressão e também elevados custos [48, 50]. Dependendo do tipo de fase estacionária usada, o HPLC pode-se dividir em vários tipos: HPLC de fase normal [51]; HPLC de fase reversa [52, 53]; HPLC por gel de filtração [52]; HPLC por troca iônica [52]. Os detetores HPLC podem ser: Ultravioleta-visível (UV-VIS), Fluorescência, Índice de Refração, Detetor *Light Scattering* e *Diode Array Detector* e Espectrometria de Massa. Os detetores UV-VIS são os mais utilizados em HPLC e também foram os utilizados neste trabalho [54-57].

Na Figura 7, está representada um esquema de um cromatograma que retrata os sinais em função do tempo em que são detetados. No cromatograma os picos dão informações quantitativas e qualitativas sobre a amostra analisada, os picos registam os compostos eluídos que são transportados pela fase móvel até ao detetor. Oferece valiosas informações para a análise qualitativa e quantitativa sobre a amostra em estudo, pois ao se comparar os tempos de retenção e amplitudes dos compostos estudados com os de padrões conhecidos, as moléculas são identificadas e quantificadas [58].

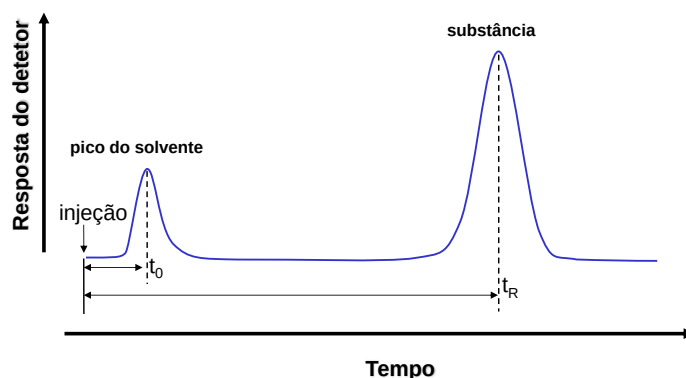


Figura 7 - Exemplo de um cromatograma, onde t_0 e t_R representam, respetivamente, o tempo morto (t_0) e o tempo de retenção (t_R) da substância em estudo.

Para uma análise qualitativa o parâmetro tempo de retenção (t_R) (Equação 1), é fundamental. É o tempo entre a injeção da amostra e o registo de um pico e corresponde ao somatório do tempo morto (t_0) (tempo necessário para a fase móvel passar pela coluna) e do tempo de retenção ajustado (t'_R) (tempo de resistência da fase estacionária e varia de composto para composto). O t_R é o tempo que leva um componente a atravessar uma coluna (o comprimento da coluna é conhecido) [46].

$$t'_R = t_R - t_0$$

Equação 1 - Tempo de retenção. t'_R corresponde ao tempo de resistência da fase estacionária, t_R ao tempo de retenção e t_0 ao tempo morto.

O t_R é um parâmetro essencial para calcular o fator de retenção (k'). Ao contrário do t_R , o k' não depende do fluxo da fase móvel ou do comprimento da coluna e pode ser definido como o rácio dos tempos retidos do composto na fase estacionária e na fase móvel (Equação 2). O seu valor deve estar compreendido entre 1 e 10, sendo que a *Reviewer Guidance - Validation of Chromatographic Methods (Center for Drug Evaluation and Research – Food and Drug Administration)* recomenda que seja superior a 2 [46, 49].

$$k' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Equação 2 - Fator de retenção (k'). t'_R corresponde ao tempo de resistência da fase estacionária, t_R ao tempo de retenção e t_0 ao tempo morto.

Por consulta bibliográfica, verificou-se que o t_R de NIS, com as condições cromatográficas, coluna e eluentes semelhantes, ronda os 3-4 min [59, 60]. Em suma, existem vários parâmetros a ter em conta durante a análise por HPLC, na altura de validar um método analítico. Esses parâmetros encontram-se descritos em *International Council on Harmonisation (ICH) - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. A validação deve ser adaptada ao caso em estudo, critérios como a precisão, exatidão, linearidade, especificidade, amplitude, limite de deteção e limite de quantificação [60]. As condições cromatográficas utilizadas durante o doseamento de NIS estão expressas na Tabela IV.

Tabela IV – Condições cromatográficas do doseamento de NIS.

Volume de injeção	10 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Eluentes	MeOH:Água pH 3; 75:25
Deteção	305 nm
Temperatura	25°C
Tempo de corrida	8 min

O doseamento de NIS foi feito por HPLC com o método de fase reversa utilizando o equipamento Ultimate 3000, Thermo Scientific™ DIONEX com a coluna Acclaim™ 120 C18

Thermo Scientific™ (diâmetro das partículas internas: 5 µm; dimensões: 100 x 46 mm) (Figura 39, presente em Anexos). Os resultados analíticos foram adquiridos pelo programa informático Chromeleon, versão 7.2. A eluição usada foi isocrática, ou seja, a composição dos eluentes foi constante ao longo da eluição, sendo que a fase móvel utilizada foi metanol e água ultrapura a pH 3 na razão 75:25 (v/v).

Para a construção da curva de calibração foram preparadas seis soluções padrão cada uma com uma concentração independente. A curva de calibração permite determinar, por interpolação de resultados obtidos com padrões de concentrações conhecidas, a concentração do analito presente na amostra. A curva de calibração, formada por 6 pontos, traduz a área do pico de NIS em função da concentração, por regressão linear simples, utilizando o Método dos Quadrados Mínimos.

Foram utilizadas 6 concentrações diferentes (10,3; 16,3; 20,3; 25,1; 31,1; 35,5 µg/mL) e diluídas em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 100% em agitação durante 30 min, sempre ao abrigo da luz, obtendo-se assim 6 soluções padrão (Figura 40 – (a), presente em Anexos). Seguidamente, procedeu-se à diluição das soluções padrão com o solvente 60:10:30 (MeOH:DMSO:Água ultrapura). Dilui-se na proporção 1:100 e obtiveram-se as seguintes soluções, denominadas soluções stock (Figura 40 – (b), presente em Anexos).

A escolha desta mistura de solventes para diluição e não apenas DMSO, deveu-se ao facto de esta proporção além de já ter sido utilizada em trabalhos anteriores, a NIS, como referido no capítulo 1, é uma molécula insolúvel em água e metanol e o DMSO é um solvente organossulfurado incolor que se dissolve em compostos polares e não polares, miscível numa grande parte de solventes orgânicos e também miscível em água. Este solvente tem uma viscosidade muito elevada quando misturado com a água e pode provocar um grande aumento do tempo de retenção e, por isso, deve-se diluir com acetonitrilo ou com metanol [27].

Em seguida, cada solução padrão foi filtrada (filtro PTFE de 0,45 µm, OlimPeak®). Os filtros são usados para remover possíveis impurezas que se encontrem nas amostras antes da análise. Também diminuem o tempo de inatividade do HPLC e melhoram a qualidade e consistência dos cromatogramas. O não filtrar pode provocar vários problemas com o movimento das partículas oriundas da amostra, podendo originar deformações nos picos cromatográficos ou provocar um aumento progressivo de pressão em relação ao número de injeções.

Os padrões foram injetados por ordem crescente de concentração e cada padrão foi injetado três vezes.

2.2.2 Preparação das nanopartículas lipídicas

Regra geral, os componentes principais para a formulação de nanopartículas lipídicas (no caso de SLN) são lípidos sólidos, tensioativo, substância ativa e água. As NPs podem ser preparadas de diferentes formas e por diferentes métodos através das duas fases, a fase aquosa e a fase lipídica. No fundo podemos descrever a preparação das NPs em três etapas:

- 1) incorporação da substância ativa ou de composto bioativo,
- 2) divisão em partículas com pequenas dimensões;
- 3) estabilização das partículas formadas através de processos químicos ou físicos.

A incorporação da substância ativa na matriz pode ser feita por dissolução, fusão ou emulsificação. Para dividir as partículas em pequenas dimensões usam-se técnicas como emulsificação, atomização ou moldagem. A estabilização das partículas anteriormente feitas pode ser obtido através de adição de um agente *salting-out*, coacervação, difusão e substituição do solvente, evaporação, extração ou gelificação [61, 62].

A escolha dos lípidos deve ser uma parte crucial no trabalho pois o lípido vai constituir a matriz na nanopartícula e tem de ter características específicas. Geralmente a concentração de um lípido, para a produção de SLN, está compreendida entre 5-10% [63]. A escolha do método também deve ter em atenção às características físico-químicas da substância ativa em estudo e da aplicação destinada às NPs. Como a NIS é uma substância muito hidrofóbica e com um ponto de fusão bastante elevado é importante que o lípido em estudo tenha um ponto de fusão inferior, mas não muito, sendo importante também ter em conta, a tensão superficial e o número de cadeias [30].

Foi necessário para a preparação das NPs perceber quais os tipos de lípidos e tensioativos que se ia utilizar para encapsular a sustância ativa em estudo. Assim, o Compritol 888 ATO, palmitato de cetilo e Precirol ATO 5 foram os lípidos escolhidos e o Polisorbato 80 foi tensioativo selecionado. O fármaco foi incorporado na formulação numa percentagem de 0,1% e foi depois dissolvido no lípido sólido e no agente tensioativo. As NPs formaram-se por emulsificação da fase lipídica na fase aquosa e foram estabilizadas por solidificação (arrefecimento rápido da dispersão obtida). As formulações testadas (sem e com NIS) foram as mesmas, estando representadas na Tabela V. Tanto a escolha dos componentes das NPs como as suas percentagens foram escolhidas com base em literatura científica encontrada e também com base em trabalhos prévios [64].

Tabela V - Formulações das NPs.

	SLN	SLN-fármaco
Lípido sólido	0,5 g	0,495 g
Polisorbato 80	0,1 g	0,1 g
Nistatina	-	0,005 g
Água	9,4 g	9,4 g

2.2.2.1 Fase aquosa e fase lipídica

Para a preparação das NPs são necessárias 2 fases imiscíveis: uma fase aquosa e uma fase lipídica. A fase aquosa neste trabalho foi composta por água destilada.

Os lípidos são essenciais para a vida, são moléculas biológicas e são constituídas por uma parte hidrófila (uma solubilidade limitada com a água) e outra hidrófoba (solubilidade em solventes apolares). As interações intermoleculares são devidas ao efeito hidrofóbico e às forças de van der Waals, mas também podem interagir com solventes aquosos por ligação aos átomos de hidrogénio [65]. O Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) é um sistema de classificação desenvolvido pela *Imperial Chemical Industries Americas INC*, sendo uma forma de calcular o equilíbrio entre os grupos hidrofílicos e lipofílicos que constituem a molécula de um tensioativo não iónico, compreendido entre 0 e 20. Agentes tensioativos com um valor de EHL entre 3-6 (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos gordos de propilenoglicol e ésteres de poliglicerol) são comumente usados em emulsões água/óleo (A/O), tensioativos com valores de EHL entre 8-16 promovem a formação de emulsões óleo/água (O/A) e entre 8 e 16 compreendem-se as proteínas, fosfolípidos, sais de potássio e de sódio e alginatos. Quanto maior o valor do EHL, maior a hidrofília e quanto menor o seu valor, maior a lipofília. Também se pode concluir que o aumento do número de carbonos nas cadeias de ácidos gordos e um maior grau de esterificação provoca um valor de EHL menor [66, 67]. A tensão superficial, segundo Celia Mouzouvié *et al*, 2017, “é a tendência elástica de uma superfície de fluido para adquirir uma área superficial mínima”, ocorre na interface entre duas fases químicas e um valor elevado significa que tem uma elevada força coesiva entre as moléculas [68].

2.2.2.1.1.1 Lípidos

Os lípidos são o principal material estrutural das NPs lipídicas e vão influenciar as propriedades das NPs. Alguns lípidos podem favorecer a formação dos sistemas coloidais pois têm uma atividade tensioativa. Segundo *Gordillo-Galeano e Mora-Huertas*, as NPs

lipídicas podem ser constituídas por ácidos gordos livres, álcoois gordos, ésteres de glicerol, ceras, fosfolípidos, glicolípidos e esfingolípidos. Estes autores referem também, que os lípidos escolhidos para preparação deste trabalho são os mais utilizados para formulações de NPs. Os lípidos sólidos utilizados têm diferentes estruturas, características e valores diferentes de EHL (Figura 4). O objetivo foi estudar cada um deles, individualmente, através dos valores obtidos do tamanho e potencial zeta das nanopartículas encapsuladas com e sem fármaco e estudar também as transições endotérmicas e exotérmicas dos lípidos [30].

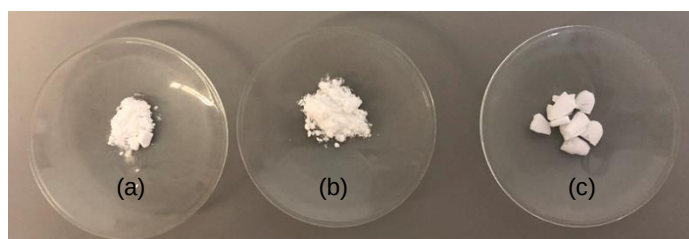


Figura 4 - Aspeto físico dos lípidos sólidos utilizados – (a) Precirol ATO 5; (b) Compritol 888 ATO; (c) palmitato de cetilo.

O Compritol 888 ATO, nomes químicos: docosanoato de 2,3-dihidroxipropilo: ácido beénico ou 2,3-éster dihidroxipropílico: monobehenato de glicerol, é um excipiente bastante utilizado na área farmacêutica, pode ser usado como lubrificante para a preparação de cápsulas ou comprimidos orais (numa concentração entre 1,0 - 3,0 %), devido às suas boas propriedades de ligação [69]. Nos últimos anos, este lípido tem vindo a ser utilizado em sistemas de libertação controlada de fármacos, numa concentração de >10% [70]. Também pode ser utilizado como agente de revestimento [71]. Em cosmética, pode ser utilizado como emoliente ou agente que aumenta a viscosidade de emulsões. O intervalo de concentrações utilizado do glicerilo de behenato como géis de silicone e em emulsões O/A ou A/O, são, respetivamente, 1,0-15,0% e 1,0-5,0% [72]. Pode apresentar diferentes formas como pó solto branco, em aglomerados semissólidos ou em flocos quase brancos. Apresenta um elevado ponto de fusão (69-74°C) e um valor de EHL por volta de 2 [73]. Além disso, também apresenta um valor de peróxido menor que 6 meqO²/kg, o que indica uma estabilidade química relativamente alta, isto é um aspeto importante devido à instabilidade da NIS. É solúvel, quando aquecido, em clorofórmio, diclorometano e outros solventes orgânicos. Parcialmente solúvel em etanol 96% quente e praticamente insolúvel em etanol 96% frio, hexano, óleo mineral e água [29, 74].

O Precirol ATO 5 também chamado de gliceril palmitoestearato é um ácido octadecanóico, éster 2,3-dihidroxipropílico misturado com 3-hidroxi-2-[(1-oxohexadecil) -oxi] propil octadecanoato, é obtido, sem catalisador, pela esterificação direta dos ácidos

palmitico e esteárico com glicerol. Na indústria farmacêutica é utilizado como agente de revestimento, agente gelificante, podendo ser empregado em sistemas de liberação de fármacos, formando uma matriz lipofílica (numa concentração entre 10,0 - 25,0 %), para mascarar sabor desagradáveis (numa concentração entre 2,0 - 6,0 %) ou como lubrificante para comprimidos e cápsulas (numa concentração entre 1,0 - 3,0 %) [72, 75, 76]. Apresenta-se como um pó branco fino com um leve odor, com um ponto de fusão entre 52-55 °C e um valor de EHL por volta de 2. Não deve ser armazenado em temperaturas acima de 35°C e é solúvel em clorofórmio e diclorometano e parcialmente insolúvel em etanol 95% [72, 77].

O palmitato de cetilo também chamado hexadecanoato de hexadecil, apresenta uma fórmula molecular de $C_{32}H_{64}O_2$ e peso molecular de 480,85 g/mol [78]. O éster palmitato de cetilo é o principal componente encontrado no crânio dos cachalotes, o espermacete. É usado como fragância, emoliente e agente emulsivo e é um lípido que apresenta baixa taxa de degradação in vitro e baixa toxicidade in vivo [79].

2.2.2.1.1.2 Agente tensioativo

O agente tensioativo utilizado foi o polisorbato 80, ou também chamado Tween 80, é um tensioativo não-iônico do tipo O/A e é bastante utilizado para a formulação de SLN [80]. Tem uma estrutura química $C_{64}H_{124}O_{26}$, massa molecular de 1310 g/mol e um valor de EHL = 15,0 (Figura 8). É solúvel em etanol e água e insolúvel em óleo mineral ou óleo vegetal e apresenta uma tensão superficial, a 20°C, de 42,5 mN/m. À temperatura ambiente encontra-se no estado líquido, tem um odor característico e apresenta-se com um líquido amarelo oleoso. Pode ser empregue como agente emulsivo (numa concentração entre 1,0 - 15,0 %), como agente solubilizante (numa concentração entre 1,0 - 10,0 %) ou como agente humectante para constituintes ativos insolúveis em bases lipofílicas (numa concentração entre 0,1 - 3,0 %) [68, 72, 81].

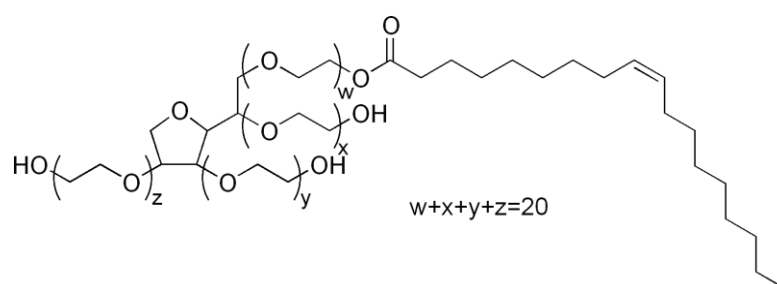


Figura 8 - Estrutura do polisorbato 80 (Tween 80).

O agente tensioativo tem como função manter a homogeneidade e estabilidade durante o armazenamento das NPs formadas, pois como formam uma camada na interface das duas fases imiscíveis, capaz de reduzir a energia interfacial [62]. Influenciam também a estrutura cristalina das partículas e determina, entre outras características, o seu comportamento eletrocinético. *Gordillo-Galeano and Mora-Huertas* afirmam que o Poloxamero 188, Tween 80 e o Tyloxapol são os tensioativos mais encontrados nas literaturas científicas para o desenvolvimento de SLN [30]. Existem duas formas distintas de preparação de SLN que consistem na adição do tensioativo na fase lipídica ou na adição do tensioativo na fase aquosa.

Além da quantidade, a distribuição do agente tensioativo pode afetar a qualidade das NPs. O estudo de *Yanzhi Wang et al*, conclui que adicionar o tensioativo na fase lipídica traduz em NPs de diâmetro inferior, potencial zeta, em valor absoluto, ligeiramente maior e uma maior eficácia de encapsulação (EE) em relação à técnica oposta. Esses resultados podem ser explicados pelo facto de o lípido e o fármaco terem contacto logo durante a preparação, o que provoca uma melhor homogeneização, divisão e EE das NPs. O estudo determinou que a fase onde é adicionada o tensioativo não provoca grandes diferenças notórias nem existe um impacto na formulação das NPs uma vez que os valores não diferem muito [82].

2.2.2.2 Métodos de preparação de NPs

Existem diferentes métodos de preparação de NPs, como o exemplificado na Figura 9. Podem ser divididos em 3 grandes grupos: baseado em técnicas de elevada energia, baixa energia ou em técnicas baseadas em solventes orgânicos. Segundo *Gordillo-Galeano e Mora-Huertas*, a técnica de homogeneização é o método mais conhecido e usado por quase 50% da literatura estudada, seguida da ultrassonificação. Esta técnica pode ser realizada a frio para substâncias termolábeis ou a quente para substâncias mais estáveis. O método de homogeneização a alta velocidade e ultrassonificação foram os adotados neste trabalho para a síntese de NPs [30].

2.2.2.2.1 Método de homogeneização a alta velocidade e ultrassonificação

Este método utiliza elevada velocidade (>5000 rpm) através de um instrumento de dispersão de alto desempenho, vai gerar elevadas tensões de corte e forças cavitacionais que vão reduzir as gotas dos dois líquidos imiscíveis a tamanhos nanométricos. O tempo de produção curto, a economicidade do método, a facilidade de produção, a possibilidade de transposição de escala e o facto de ser uma técnica que não utiliza solventes orgânicos, faz com que seja um dos métodos mais utilizados para a produção de NPs. A principal

desvantagem desta técnica é o risco de contaminação dos produtos com metais presentes nos instrumentos utilizados o longo da preparação [30, 63].

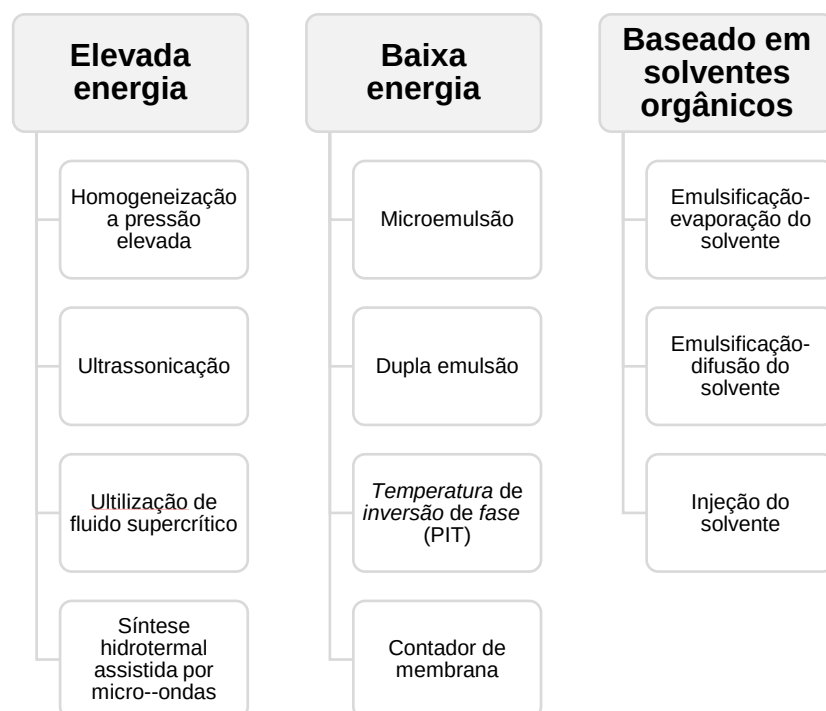


Figura 9 - Classificação geral dos diferentes métodos de preparação de NPs; adaptado de [30].

A homogeneização é usada como pré-tratamento antes da ultrassonicação pois a eficiência deste método é maior em comparação com a homogeneização ou ultrassonicação isoladas [83]. Para a homogeneização a alta velocidade é necessário aquecer, em banho de água, a fase oleosa (lípidos sólidos + tensioativo + substância ativa) a uma temperatura de 5 a 10 °C acima do ponto de fusão do lípido sólido. A fase aquosa (água ultrapura) é aquecida também à mesma temperatura. A pré-emulsão é formada quando à mesma temperatura, se adiciona a fase aquosa na fase oleosa. Esta etapa é efetuada sob agitação e submetida ao homogeneizador de alta velocidade, o ultra-turrax T 25 (IKA Labortechnik) (Figura 41, apresentada em Anexo). A emulsão obtida é depois submetida ao sonicador, onde ocorre agitações promovidas pela energia ultrassônica e seguidamente foi colocada em banho de gelo que provoca uma rápida solidificação das nanopartículas. Na Figura 10, está exemplificado um esquema de preparação de NPs.



Figura 10 - Esquema da preparação de nanopartículas, adaptado de [27].

Neste trabalho laboratorial, inicialmente produziram-se 3 formulações diferentes de NPs, cada uma com o lípido sólido respectivo, mas sem a substância ativa. Estas experiências iniciais tiveram o objetivo de testar as diferentes velocidades versus tempo da homogeneização, e também comparar, no fim, com as características físico-químicas de cada uma das formulações. Os pontos de fusão dos lípidos sólidos foram obtidos por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) (capítulo 3.6) e são 69,8 °C, 46,6 °C e 50,0 °C, respectivamente para o Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5 e palmitato de cetilo. Na Tabela XX, presente em Anexos, estão os diferentes valores de velocidade e os tempos de agitação. Os valores aceites (a negrito) foram escolhidos com base no diâmetro, na homogeneidade e no valor de potencial zeta das NPs, calculados posteriormente. Valores de tamanho mais baixos e valores absolutos elevados de PZ foram os critérios de escolha.

De seguida, procedeu-se à homogeneização a alta velocidade com o auxílio do sonicador, Modelo Vibro Cell VCX 130, sonda de 6 mm, Sonics & Materials, durante 15 min a 70% de amplitude, estes valores de tempo e amplitude já tinham sido utilizados em trabalhos anteriores, mas, no entanto, também foram encontrados diversos artigos científicos que apoiam esses valores [84, 85]. De seguida, a emulsão foi arrefecida em gelo para que ocorra uma rápida solidificação das NPs e posteriormente foram armazenadas no frio, a 4°C, sem contacto direto com a luz.

2.2.3 Caracterização físico-química das NPs

É necessário proceder a várias técnicas que permitem fazer uma conclusão sobre as características físico-químicas das NPs e sobre a previsão do destino desses nanossistemas no corpo humano. Esta caracterização é realizada frequentemente em condições que não refletem a complexidade do ambiente fisiológico (por exemplo, em ensaios *in vitro*), procedendo à utilização de métodos adequados e assim prever os resultados terapêuticos nas fases iniciais do desenvolvimento do produto.

Os parâmetros analisados foram: o tamanho, a EE da nistatina, o comportamento polimórfico dos lípidos e do lípido + substância ativa e a estabilidade das NPs.

2.2.3.1 Tamanho das partículas

O tamanho das partículas é outro aspeto crucial a ter em atenção aquando da caracterização das NPs. Tamanhos entre 100-300 nanómetros são os recomendados, e valores fora deste intervalo podem influenciar a biodistribuição e retenção nos órgãos alvo, afetar a velocidade de libertação (partículas menores com maior área de superfície, ter em regra geral uma libertação mais rápida), afetar também a estabilidade (partículas menores tendem a agregar durante o armazenamento). Para a determinação do tamanho das partículas foram utilizados dois aparelhos diferentes e, conseqüentemente, dois métodos diferentes, dispersão dinâmica da luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*, ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville) e difração laser (LD – *Laser Diffraction*, Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument) (Figura 42, presente em Anexos).

2.2.3.1.1 Difratometria de laser

Esta técnica mede o tamanho das partículas através de difração a laser (LD), analisa partículas na escala de 0,01 – 3500 μm . As distribuições de tamanho das partículas vão ser obtidas pela medição da variação angular da intensidade da luz. Os detetores vão medir a intensidade da luz difundida pelas partículas na amostra, em relação aos comprimentos de onda de luz monocromática (laser) com uma ampla gama de ângulos [86].

Trata-se de um método fácil e rápido de usar, que pode ser adaptado para medir amostras com diferentes formas físicas. Apresenta algumas desvantagens, tais como: a dificuldade em analisar amostras de partículas com tamanho abaixo de 50 μm ou partículas relativamente transparentes. A medição do tamanho é feita pela medição da intensidade da luz espalhada à medida que o feixe de laser (luz monocromática) interage com as partículas dispersas da amostra [87].

A distribuição do tamanho das partículas é apresentada maioritariamente sob a forma de distribuição estatística. O resultado apresenta-se como um gráfico de densidade em volume (%) em função do tamanho das NPs e os tamanhos das partículas e são apresentados em percentis. São obtidos 3 valores, Dv10, Dv50 e Dv 90, percentil 10, 50 e 90, respetivamente, em que, percentil 10 significa que 10% das partículas apresentam um tamanho abaixo desse valor [88, 89].

As condições utilizadas para a determinação do tamanho de partícula, por LD encontram-se na Tabela VI e foram definidas no início da experiência.

Tabela VI – Condições do método de LD.

Índice de Refração da partícula	1,6
Índice de Absorção da partícula	0,001
Densidade (g/cm³)	1,0
Dispersante	Água
Índice de Refração do dispersante	1,33

2.2.3.1.2 Dispersão dinâmica da luz

Para a avaliação do tamanho das partículas presentes nas emulsões também se utilizou o método de dispersão dinâmica da luz (do inglês, “*Dynamic Light Scattering*” - DLS). Analisa escalas de tamanho bastante inferiores ao método anterior, pois analisa partículas com dimensões de 0,6 a 6000 nm. As partículas em suspensão vão difundir-se em todas as direções e vão estar em constante movimento - movimento Browniano das partículas – e este movimento resulta do diâmetro hidrodinâmico, através do modo como as partículas se difundem no líquido. A luz laser ao incidir nas partículas é espalhada a diferentes intensidades, que é influenciada pela velocidade de difusão das partículas e, conseqüentemente, com o tamanho destas. Quanto maior for a partícula, mais lentos serão os seus movimentos Brownianos (menor velocidade de difusão). Uma das desvantagens é o facto de a temperatura influenciar muito o processo, interferindo diretamente com a viscosidade do meio [86, 89].

A análise de DLS estima também o índice de polidispersão (IP). O IP é calculado a partir de uma análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz, a escala está entre 0 e 1 e preferenciam-se valores inferiores a 0,3 pois representam uma população de partículas com elevada homogeneidade. Um valor elevado sugere uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo a existência de várias populações (Figura 11) [90, 91].

DLS é uma técnica com maior sensibilidade para partículas mais pequenas, enquanto a técnica LD, permite medir distribuições de tamanho de maiores amplitudes. Desta forma, estes dois métodos complementam-se e foram usados em conjunto.

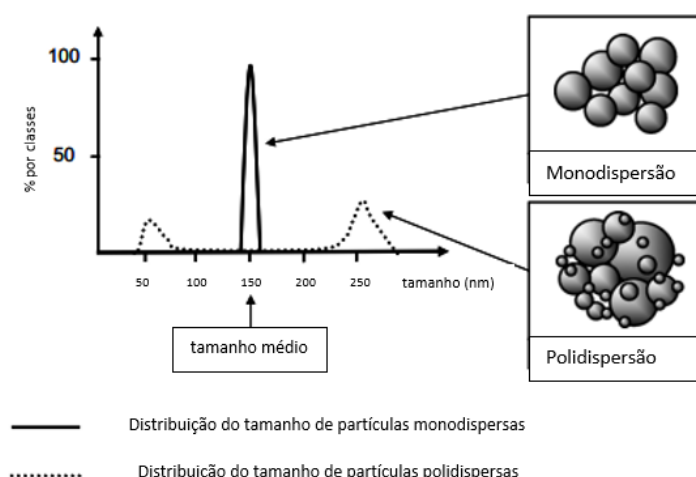


Figura 11 - Representações esquemáticas de uma população monodispersa e de uma população polidispersa por DLS, adaptado de [90].

2.4.3.2. Potencial Zeta

As partículas suspensas que se encontram na dispersão coloidal estão rodeadas por uma densa camada de íões que têm carga elétrica específica. Esta camada está rodeada por outra camada mais difusa de íões que possuem carga elétrica própria. A diferença de carga elétrica entre as duas camadas é o potencial zeta (PZ) da partícula. Este parâmetro é determinado pela técnica de “*laser doppler anemometry*” que se baseia na determinação da velocidade das partículas quando submetidas a um campo elétrico, designada mobilidade eletroforética. Os valores de mobilidade eletroforética são transformados em PZ através de uma equação (Equação 3), que é usada para medir a estabilidade num sistema coloidal e indica o grau de repulsão elétrica entre as partículas próximas e igualmente carregadas [92].

$$U = \frac{2\varepsilon_z f(k\alpha)}{3\eta}$$

Equação 3 - PZ (z), onde U representa o valor da mobilidade eletroforética, η representa a viscosidade absoluta de corte das partículas, ε representa a constante dielétrica, $f(k\alpha)$ representa a função Henry.

O PZ é usado como indicativo da estabilidade das dispersões coloidais ao longo do tempo e pode ser influenciado pela iónica das NPs e pelo pH do meio. Quando o PZ toma valores elevados, acima de 30 mV, em valor absoluto, indica uma elevada estabilidade, já que a repulsão entre partículas evita a ocorrência de agregação. Valores, em valor absoluto, entre 0 e 5 mV significa uma aglomeração rápida das partículas pois a atração excede a repulsão das partículas (Figura 12) [93]. No entanto, é preferível os valores de

PZ serem de carga elevada e negativa por serem mais estáveis e menos tóxicas do que valores de PZ de carga positiva [94].

Para calcular o PZ utiliza-se o método de dispersão dinâmica da luz, através do aparelho Dynamic Light Scattering, ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville, NY. A amostra é colocada numa cuvete com um eletrodo que vai criar um potencial elétrico atraindo as partículas de carga oposta. A amostra foi analisada pelo mesmo aparelho da DLS, mas com um programa informático diferente, BIC PALS Zeta Potencial Analyzer. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

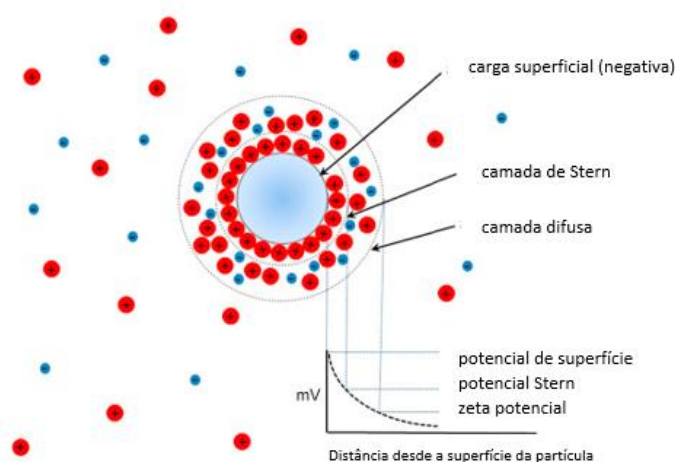


Figura 12 - Esquema da definição do PZ, adaptado de [93].

2.2.3.2 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (do inglês, “*Differential Scanning Calorimetry*” - DSC) é uma técnica de análise térmica e vai fornecer informações acerca dos diferentes estados cristalinos das matérias-primas, bem como do seu grau de cristalinidade, ou seja, mede a energia calorífica absorvida/libertada durante o aquecimento/arrefecimento de uma substância ou uma mistura, sempre com a amostra de referência como comparação. Os resultados obtidos, através de um termograma, vão fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre os processos endotérmicos e exotérmicos, absorção e libertação de energia calorífica, respetivamente, sendo possível assim concluir se ocorreram alterações das propriedades físicas e/ou químicas das análises em estudo. O gráfico obtido nas medições DSC está representado pelo fluxo de calor em função do tempo ou da temperatura [95, 96].

O aparelho utilizado neste trabalho foi o DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH (Figura 43, presente em Anexos), constituído por um duplo forno com duas posições, cadinho da amostra e cadinho de referência, e este último, em regra geral, encontra-se vazio. Os

parâmetros obtidos através do termograma, a entalpia e a temperatura de início de fusão (*onset*), são calculados com o auxílio do programa informático NETZSCH Proteus Thermal Analysis. Através da área do pico obtemos a entalpia, obtida por integração deste [97-99].

Neste trabalho, analisou-se o comportamento eventualmente polimórfico dos três lípidos em estudo, da substância ativa utilizada e também uma mistura, em quantidades semelhantes, de lípido + NIS, com o objetivo de analisar as interferências da substância ativa no comportamento polimórfico do lípido. Todas as amostras (matérias-primas e formulações) foram submetidas a um programa de temperatura entre 25°C a 210°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

2.2.3.3 Eficácia da encapsulação da nistatina

A determinação da EE, ou seja, da quantidade de fármaco encapsulado é um cálculo essencial para a caracterização físico-química das NPs. Para isso é necessário separar o fármaco livre incorporado nas NPs do fármaco encapsulado. Existem várias técnicas utilizadas para separar essas duas frações: ultracentrifugação, ultrafiltração e cromatografia de exclusão, a mais utilizada e também a utilizada neste trabalho laboratorial foi a técnica de ultracentrifugação [62, 100]. Após centrifugação, a concentração de substância livre é avaliada no sobrenadante (método indireto).

Existem diferentes abordagens para calcular a eficácia de encapsulação, a determinação é possível através do método direto ou através do método indireto. No método direto, calcula-se a quantidade de fármaco que está presente nas NPs, e em regra, adiciona-se um solvente orgânico às NPs que vai provocar a sua destruição, depois o solvente orgânico é evaporado e adiciona-se numa proporção predefinida, geralmente, de água/etanol às formulações contendo NPs. Esta adição vai provocar a solubilização do fármaco já que as NPs foram previamente desfeitas pela adição do solvente orgânico. Por fim, observa-se por espectroscopia UV-VIS e obtém-se uma estimativa de quanto fármaco estava encapsulado. A percentagem de EE é obtida, assim, através da Equação 5.

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de fármaco incorporado}}{\text{Quantidade de fármaco inicial}} \times 100$$

Equação 4 – Determinação da eficácia de encapsulação através do método direto.

No método indireto, o estudo da EE consiste na filtração das NPs através de tubos Amicon® Ultra-0.5, pois têm a particularidade de serem constituídos por uma membrana que vai gerar pressão sob a força centrífuga, permitindo assim a filtração da amostra e dividindo os constituintes da amostra de acordo com o tamanho dos poros do filtro [101].

Segue-se a centrifugação da amostra e no fim, no sobrenadante (parte inferior do tubo) está presente o fármaco não encapsulado. No filtro do tubo Amicon® Ultra-0.5 encontra-se as NPs com fármaco, conforme explicado na Figura 13 [61]. A EE é calculada a partir da diferença de fármaco total adicionado à amostra concentração do fármaco livre. A percentagem de EE é obtida, assim, através da Equação 6 [102].

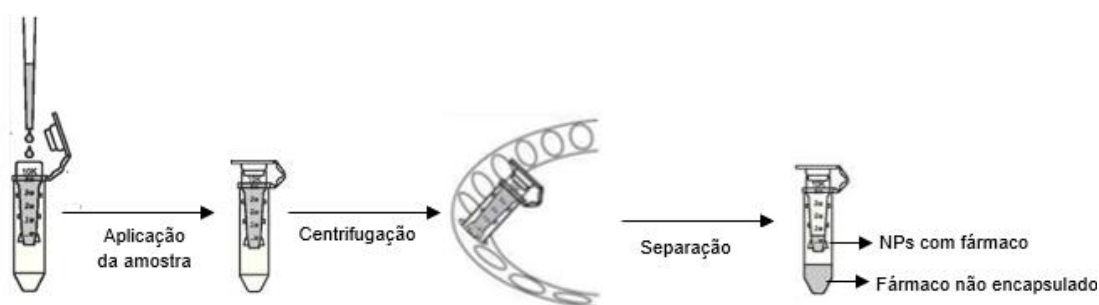


Figura 13 - Esquema para determinação de EE de NPs a partir do método indireto.

$$EE (\%) = \frac{Farmaco_{total} - Farmaco_{livre}}{Farmaco_{total}} \times 100$$

Equação 5 - Determinação da eficácia de encapsulação através do método indireto.

Para este trabalho foi usado para calcular a EE, como dito anteriormente, o método indireto. Primeiramente, retirou-se 2 mL de NPs e dilui-se em 10 mL de água ultrapura, agitando no Vortex. Retirou-se 0,5 mL e dilui-se com 2 mL de solvente 60:10:30. Foi utilizada uma força centrífuga de 4000 G durante 15 min. Ambos foram filtrados com filtro PTFE de 0,45 µm, OlimPeak® e injetadas três vezes nas condições cromatográficas predefinidas anteriormente (as mesmas utilizadas para fazer a curva de calibração).

2.2.3.4 Estabilidade

O fator estabilidade é crucial pois irá influenciar o perfil de liberação do fármaco e, consequentemente, a eficácia e segurança do mesmo. A avaliação da estabilidade através do tamanho do diâmetro das NPs é importante, mas não é um parâmetro único, é importante avaliar também o polimorfismo dos lípidos. Estes fatores são avaliados através da estabilidade química e física [103].

A estabilidade química estuda instabilidade termodinâmica e modificações químicas de todas as substâncias utilizadas. Pode ser avaliada através dos aparelhos DSC e cristalografia de raios X (do inglês, *X-ray diffraction*). Existem vários fatores que influenciam

a estabilidade química das formulações, tais como, a exposição à luz, ao oxigênio, a elevadas/baixas temperaturas ou presença de água ou metais [89].

A estabilidade física estuda as características físicas das formulações. As partículas coloidais apresentam tendência para sofrer agregação ao longo do tempo, principalmente e quando são conservadas sob a forma de dispersões aquosas. Pode ser medida através da determinação do estado físico e homogeneidade das partículas ou através de métodos de ressonância magnética nuclear e ocorrem quando há variações bruscas de temperatura, processos de produção inadequados, contaminação das NPs com metais ou outras preparações coloidais que por sua vez provocam instabilidade. A exposição à luz também pode afetar a estabilidade por adição de energia cinética ao sistema e uma das formas de colmatar esse problema é proteger sempre as preparações coloidais de fontes luminosas [89, 103].

2.2.4 Preparações semissólidas cutâneas

As formas farmacêuticas mais comuns de apresentação de NIS são através de formas farmacêuticas semissólidas, em forma de géis ou cremes, como referido no Capítulo 1. Escolheu-se a formulação de um gel porque foi uma formulação bastante encontrada em literatura científica e também porque é uma formulação onde não é preciso obter 2 fases (uma aquosa e outra oleosa) e, por isso, torna o procedimento mais simples [104, 105]. De acordo com a Farmacopeia Portuguesa, um gel é um sistema coloidal semissólido ou sólido, composto por um ou mais fármacos, excipientes e adjuvantes. Os agentes gelificantes são geralmente proteínas ou hidratos de carbono e vão conferir firmeza à forma farmacêutica que quando dispersos num veículo líquido vão ter a capacidade de formar uma rede tridimensional no interior do próprio líquido. O metilparabeno, o propilparabeno, o ácido sórbico, o ácido benzoico, os sais de amónio quaternário e os fenóis são os conservantes mais utilizados para preparações tópicas [106].

Existem duas classes de géis, nomeadamente os géis lipófilos, também, chamados oleogeles, compostos por bases como parafina líquida com polietilenos ou com óleos gordurosos gelificados com sílica coloidal, sabões de alumínio ou de zinco e os géis hidrófilos, também chamados hidrogeles, em que as suas bases são constituídas maioritariamente por água, glicerol ou propilenoglicol e são gelificadas por agentes gelificantes hidrodispersíveis.

Por questões de disponibilidade e preço, o polímero mais usado para formulação de géis é o polímero vulgarmente conhecido, pelo nome comercial, carbopol 940 e foi também

o gelificante mais encontrado em literatura científica e, por isso, foi o polímero escolhido [107]. A escolha e quantidades de concentração de parabenos e a escolha de NaOH como estabilizador de pH, foram decididas com base na Formulário Galénica Português, B. 24 e também em trabalhos prévios [106]. Decidiu-se formular um gel carbopol a 0,5% (GC-0,5) e um gel carbopol a 0,5% + NPs Precirol-NIS a 10% (GC-0,5-NP-NIS). As fórmulas dos géis hidrófilos utilizadas foram obtidas a partir da Farmacopeia Galénica Portuguesa, B. 24. As matérias-primas usadas e as quantidades estão apresentadas na Tabela VII.

Para cada um dos géis, primeiramente, triturou-se o carbopol 940 num almofariz de porcelana. Misturou-se o concentrado de parabenos com a água purificada e adicionou-se, com agitação, a mistura ao preparado anterior de carbopol. A preparação ficou em repouso durante 24 h e após isso, adicionou-se, lentamente, a solução aquosa de NaOH, confirmou-se, também, o valor de pH através de uma tira de papel indicador de pH. Para o GC-0,5-NP-NIS, adicionou-se no misturador a massa correspondente à base e a massa correspondente à formulação de NPs. Colocou-se no misturador Gako unguater durante 2 min com uma velocidade de 600 rpm (Figura 44, em Anexos).

Tabela VII - Quantidade necessária para a preparação de 100 gramas (g) de gel.

	GC-0,5	GC-0,5-NP-NIS
Carbopol 940	0,5 g	0,5 g
NaOH 10%	0,8 mL	0,8 mL
Concentrado de parabenos (metilparabeno + propilparabeno)	1,5 g	1,5 g
Água qbp	100 g	100 g
NPs Precirol-NIS	-	10 g

2.2.5 Reologia e viscosidade

Para se estudar as condições de escoamento e deformação de materiais ditos complexos (não são classificados como gás, líquido ou sólido) recorreu-se a ensaios reológicos, através do aparelho Kinexus Lab +, Malvern (Figura 45, em Anexo). Estes ensaios permitem investigar as propriedades e o comportamento mecânico de corpos que sofrem uma deformação (sólidos elásticos), um escoamento (fluidos) ou ambos (viscoelásticos). A viscosidade, parâmetro usado para avaliar a consistência das formas farmacêuticas semissólidas, é uma medida da resistência interna de um material ao escoamento. Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos, com viscosidade

constante independentemente da força aplicada, e não-Newtonianos onde a viscosidade é alterada com a variação da taxa de corte aplicada.

O primeiro parâmetro analisado foi o grau de tixotropia, que vai submeter as duas formulações a taxas de corte constantes, durante um certo período, em 3 etapas sucessivas. O teste foi realizado uma vez para cada formulação, nas condições apresentadas na Tabela VIII. Estes testes são constituídos por três fases, na primeira não existe quase tensão de deformação, na segunda fase, já existe uma elevada tensão de deformação (há uma rutura da sua estrutura); na terceira e última fase, as condições de deformação são idênticas às da primeira fase e verifica-se a eventual recuperação da viscosidade do sistema.

Tabela VIII - Condições do ensaio de análise do grau de tixotropia.

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Taxa de corte (s^{-1})	0,1	100	0,1
Tempo (min)	2	0,5	10
Intervalo (s)	5	5	5

O segundo parâmetro analisado foi o teste de tensão de cedência que vai submeter as duas formulações a um esforço que estica o material até à rutura, encontrando assim o valor denominado como tensão de cedência (*yield stress*). O teste foi realizado uma vez para cada formulação, nas condições apresentadas na Tabela IX.

Tabela IX - Condições do ensaio de determinação da tensão de cedência.

Tensão de corte inicial (Pa)	0
Tensão de corte final (Pa)	200
Taxa de rampa (s)	100

Também se analisou a tensão de corte em função da taxa de corte, onde se submete o material a taxas de corte com diferentes valores durante um determinado período de tempo. O teste foi realizado uma vez para cada formulação, nas condições apresentadas na Tabela X.

Tabela X - Condições do ensaio de tensão de corte em função da taxa de corte.

Taxa de corte inicial (s^{-1})	0,1
Taxa de corte final (s^{-1})	100
Amostras por década	10

O seguinte teste realizado tem como objetivo determinar o limite da região viscoelástica linear (LVER) e é um teste oscilatório com movimentos de ciclos contínuos. O teste foi realizado uma vez para cada formulação, nas condições apresentadas na Tabela XI.

Tabela XI - Condições do ensaio de determinação da zona linear elástica.

Deformação de corte inicial (%)	0,1
Deformação de corte final (%)	100
Frequência (Hz)	1
Amostras por década	10

Para determinar o efeito de temperatura, os géis foram submetidos a um intervalo de temperatura que permite a análise do seu comportamento quando submetido a condições de aquecimento e arrefecimento. O teste foi realizado uma vez para cada formulação, nas condições apresentadas na Tabela XII.

Tabela XII - Condições do ensaio do efeito da temperatura.

Temperatura inicial ($^{\circ}C$)	15
Temperatura final ($^{\circ}C$)	50
Taxa de rampa ($^{\circ}C/min$)	5
Frequência (Hz)	1
Deformação de corte (%)	0,8 para GC-0,5 0,9 para GC-0,5-NP-NIS
Intervalo (s)	5

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação do método de doseamento

A construção da curva de calibração foi feita por HPLC. Para perceber qual as percentagens ideais para o doseamento de NIS, foi necessário realizar vários doseamentos com diferentes solventes e diferentes proporções de solventes. Primeiramente é necessário definir as condições a usar, ou seja, quais os eluentes e a sua percentagem, o comprimento de onda de deteção, o fluxo da fase móvel, tipo de coluna, volume de injeção. Algumas delas foram adotadas em função do que está escrito em literatura, tal como, o tipo de coluna – coluna C18, o comprimento de onda de deteção – 305 nm e fluxo de 1,0 mL/min [59]. Para as restantes condições foi necessário realizar diferentes ensaios a fim de otimizar o método descrito. As condições estudadas e a escolha final por ordem de acontecimento foram as seguintes:

- Escolha dos eluentes. Inicialmente, os eluentes escolhidos foram ACN e água ultra-pura acidificada a pH3, no entanto, com esta combinação de solventes verificou-se que o tempo de retenção e a área dos picos não era de acordo com o esperado, segundo prévia literatura científica. Alterou-se então o solvente orgânico para MeOH e a decisão foi tomada com base no coeficiente de variação reduzido que este eluente apresenta em praticamente todos os parâmetros. Esses resultados também foram concordantes com a leitura científica lida. Segundo *Llabot et al.* como a NIS é uma molécula muito insolúvel o uso de MeOH como o solvente orgânico em maior percentagem provocou picos simétricos e no tempo de retenção pretendido. Fluxos de 0,6 mL/min, provocavam tempos de retenção bastante longos e o aumento da taxa de fluxo (1,2 mL/min) provoca uma fraca resolução do fármaco [59]. Dados apresentados em Tabela XXI, presente em Anexo.

- Percentagem de MeOH na fase móvel. Com a certeza de que MeOH era o solvente orgânico escolhido, foi necessário estudar a percentagem do mesmo. Foram testadas 6 percentagens (65%, 70%, 75%, 80%, 85% e 90%). O critério para a escolha da percentagem foi o valor de k' que deve ser, pelo menos, superior a 2. Assim, as percentagens 80%, 85% e 90%, não são aceitáveis pois o valor de k' é inferior a 2. A escolha pela percentagem de metanol de 75% prendeu-se no facto de diminuir os tempos de corrida e consequentemente o gasto de eluente (Figura 14). Concluindo, e também como já referido no capítulo 2, a proporção escolhida foi 75% MeOH e 25% água ultrapura a pH 3. Em Anexo, Figura 47, Tabela XXII e Tabela XXIV, respetivamente, estão apresentados os gráficos do tempo de retenção em função da percentagem de fase orgânica, a tabela do tempo de retenção - t_r , área, altura, largura, pratos teóricos e simetria

obtidos que foram necessários para a determinação do valor de k' , bem como a tabela exemplificativa dos tempos de corrida versus % de MeOH.

- Influência do volume de injeção, como referido anteriormente o volume adotado foi 10 μ L. A decisão foi tomada com base no coeficiente de variação reduzido que este volume de injeção apresenta em praticamente todos os parâmetros (tempo de retenção, simetria, altura e pratos teóricos), ao contrário do outro volume de injeção (1 μ L).

Todos esses resultados estão apresentados nos Anexos (Tabela XXI, XXII e XXIII) e foram injetados e obtidos a partir da mesma solução, solução padrão 1, da curva de calibração apresentada em Anexos.

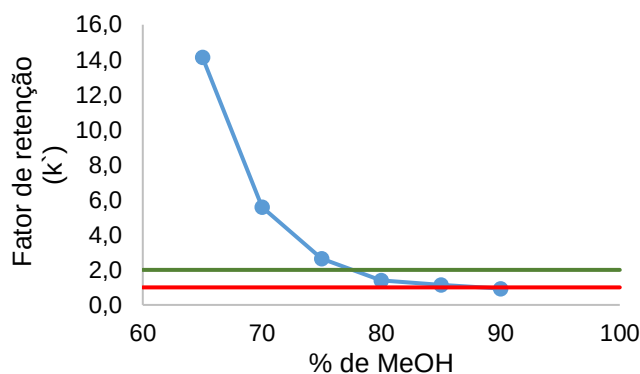


Figura 14 - Representação gráfica do fator de retenção em função da percentagem de metanol da fase móvel.

Após as condições cromatográficas estarem definidas foi obtido o cromatograma (Figura 15), sendo o passo seguinte avaliar alguns parâmetros da validação do método de doseamento de NIS por HPLC.

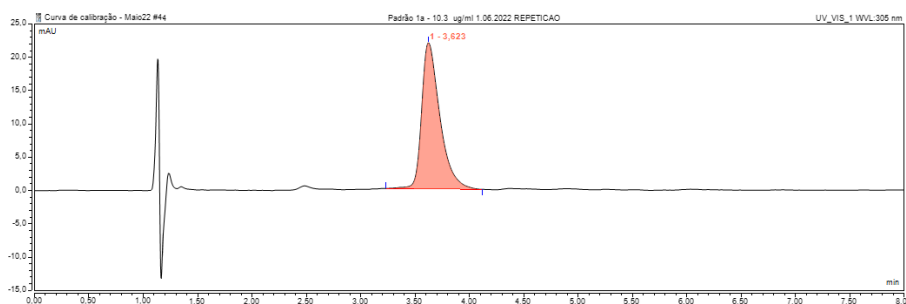


Figura 15 - Cromatograma de nistatina, obtido através da solução padrão 1.

Um dos objetivos deste trabalho foi a validação do método analítico por HPLC, como referido anteriormente, e os parâmetros normalmente usados para analisar a validação de uma substância por HPLC são: exatidão, linearidade, precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade), especificidade, seletividade, amplitude, limite de

deteção e limite de quantificação. Todos esses parâmetros que fazem parte do processo de validação de métodos analíticos e foram avaliados tendo em referência as condições definidas pela farmacopeia dos Estados Unidos e a farmacopeia europeia e os ensaios foram validados de acordo com as diretrizes de ICH [19].

Para estudar a amplitude é necessário saber qual a gama de trabalho compreendida na concentração em estudo. Neste ensaio e para avaliação dos parâmetros de validação, a gama de trabalho foi realizada no intervalo de concentração 10,3-35,5 µg/mL.

A especificidade é definida como a possibilidade de um analito individual ser determinado numa mistura, ou seja, com a presença de outras substâncias propensas de estarem presentes na amostra, como impurezas. Este parâmetro, foi avaliado através da análise uma amostra com NIS, onde se obteve um pico, confirmando a sua presença (Figura 15). Na Figura 16, está representado um cromatograma de uma amostra sem substância ativa e verifica-se a ausência de este pico previamente obtido.

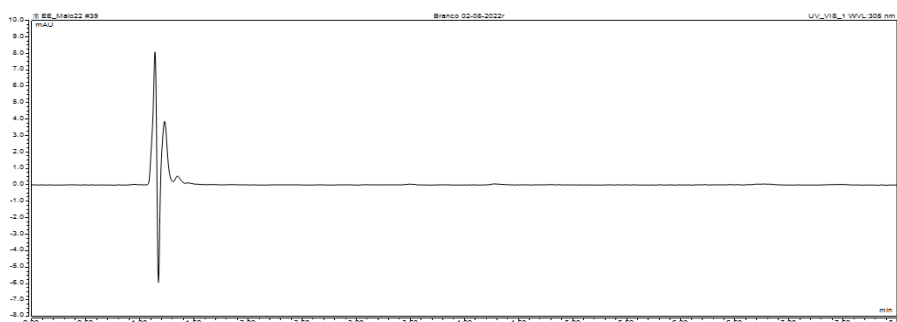


Figura 16 - Cromatograma de "branco" que comprova que não há presença de mais nenhum constituinte.

Como dito anteriormente procedeu-se à construção de uma curva de calibração. A linearidade é um parâmetro bastante útil, já que garante proporcionalidade entre a concentração da amostra e a área, o parâmetro analisado. A curva de calibração foi preparada com MeOH e água ultrapura a pH 3, a comprimento de onda, λ , de 305 nm onde a NIS apresenta a máxima linearidade. Na Figura 17 está representada a curva de calibração obtida (equação da reta: $y = 0,5572x - 2,1587$), coeficiente de determinação (R^2): 0,99, coeficiente de correlação: 0,995 e soma do quadrado dos desvios (SQD): 1,383). Segundo literatura, os valores de coeficiente de correlação devem ser superiores a 0,99, o que se verifica, demonstrando assim a linearidade do método, significando que este método tem a capacidade de obter resultados com uma relação diretamente proporcional à concentração do analito [108]. Também está representado o gráfico dos desvios à linearidade; pela observação deste gráfico, conclui-se que os resíduos são reduzidos e estão dispostos aleatoriamente, como esperado.

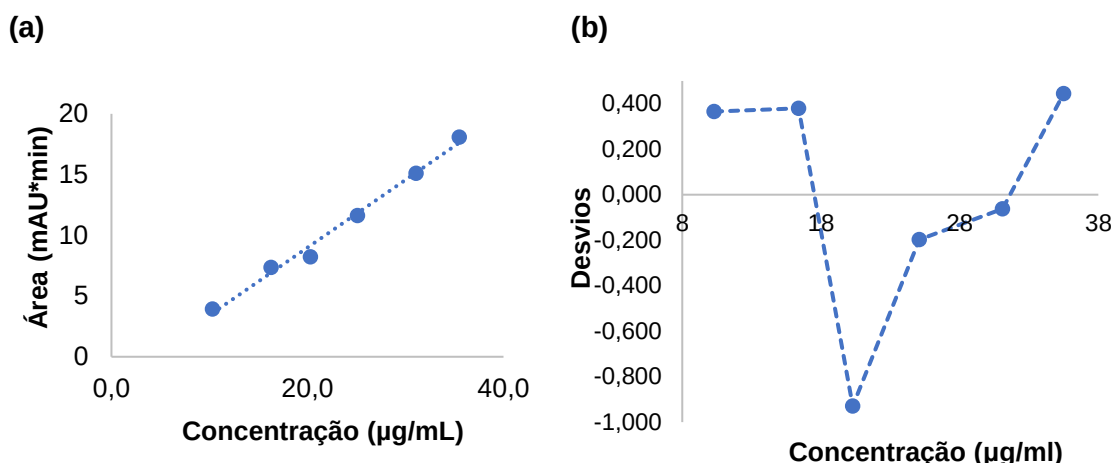


Figura 17 – (a) Curva de calibração para NIS. Equação da reta: $y = 0,5572x - 2,1899$; $R^2 = 0,99$, $R = 0,995$ e $SQD = 1,383$; (b) Representação gráfica dos desvios à linearidade.

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor de referência e o valor encontrado no procedimento analítico, mas não foi possível avaliar este parâmetro, pelo que vai inferida uma vez que a precisão, a linearidade e a especificidade foram estabelecidas. A precisão mede a proximidade de uns valores em relação aos outros, para um certo número de determinações nas mesmas condições analíticas, engloba três pontos: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade e é usualmente, expressa como variância, desvio padrão ou coeficiente de variação. O parâmetro estudado foi a repetibilidade que exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, está apresentada na Tabela XIII, foi avaliada para 3 concentrações de nistatina, 25,1; 31,1; e 35,5 µg/mL e os resultados expressos em média $\pm$ coeficiente de variação.

Tabela XIII - Repetibilidade das áreas dos picos de NIS de 3 ensaios realizados no mesmo dia em 3 concentrações diferentes.

Concentração NIS (µg/mL)	Área (mAU*min)			Média $\pm$ C.V.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
25,100	12,2631	11,1527	11,452	11,6226 $\pm$ 4,9%
31,100	16,3336	14,3575	14,6323	15,1078 $\pm$ 7,1%
35,500	19,2424	17,3156	17,6525	18,0701 $\pm$ 5,7%

O limite de deteção (LDT) pode ser determinado pela análise visual, relação sinal/ruído, desvio padrão da resposta e na inclinação, baseada na curva de calibração. O LDT é a quantidade mais baixa de analito numa amostra que pode ser detetada, é o valor onde se consegue distinguir este do ruído com certo grau de confiança. Ou seja, se a

concentração do analito na amostra for muito pequena, é preciso estabelecer um limite para não confundir este valor com o ruído. A partir da determinação do LDT é possível afirmar que uma determinada quantidade de analito não é ruído do método de detecção e que ele está qualitativamente presente na amostra. A equação utilizada foi a seguinte:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

Equação 6- Determinação do limite de detecção onde σ representa o desvio padrão da resposta e S representa o declive da curva de calibração.

O limite de quantificação (LQ) determinado pela análise visual, relação sinal/ruído, desvio padrão da resposta e na inclinação e precisão do método, baseada na curva de calibração. É a quantidade mais baixa de analito numa amostra que pode ser quantitativamente determinada com a exatidão e precisão adequada. A equação utilizada foi a seguinte:

$$DQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

Equação 7 - Determinação do limite de quantificação onde σ representa o desvio padrão da resposta e S representa o declive da curva de calibração.

Os valores obtidos de LDT e DQ foram, respetivamente, 5,87 e 17,78 µg/mL.

3.2 Caracterização das nanopartículas

3.2.1 Tamanho de partícula

Como dito anteriormente, os valores recomendados para as NPs para o tratamento de doenças causadas pelo fungo *Candida* devem estar entre os 100-300 nm, e assim vão permanecer mais tempo na corrente sanguínea e, com isso, apresenta maior eficácia na terapêutica [22]. Após a formulação de cada NP com o respetivo lípido com os valores de velocidade (em rpm) e tempo (em min) em fase oleosa (FO) e para as duas fases (DF) estão apresentados, em Anexo, na Tabela XX. Os resultados obtidos estão apresentados em forma de gráficos, nas Figuras 18 e 19, obtidos através das técnicas LD e DLS, respetivamente.

Pela análise dos dois gráficos concluímos que o lípido Precirol ATO 5 é o que tem valores mais próximos do pretendido e o palmito de cetilo foi o que obteve tamanhos superiores ao pretendido.

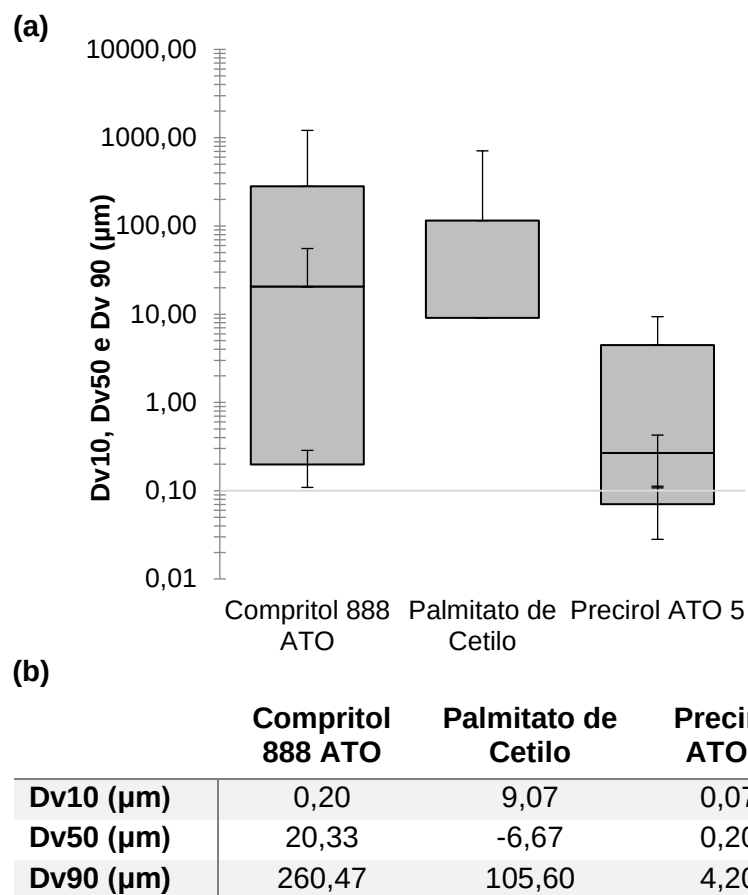


Figura 18 – (a) Tamanho (Dv10, Dv50 e Dv90) das NPs sem fármaco usando cada lípido estudado, por LD; (b) Valores, em tabela, dos percentis, Dv10, Dv50 e Dv90, das NPs sem fármaco usando cada lípido estudado, por LD.

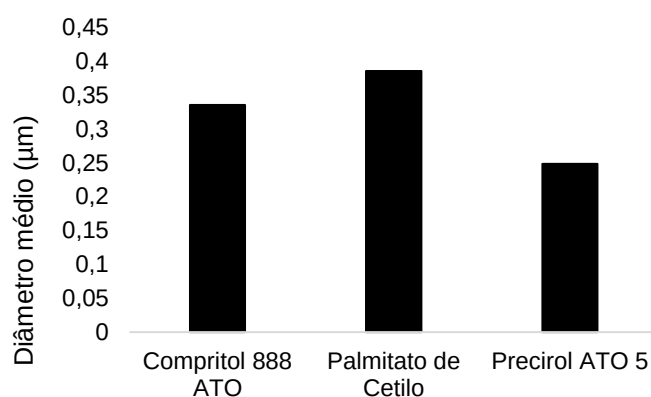


Figura 19 - Diâmetro (em μm) das NPs sem fármaco usando cada lípido, por DLS.

3.2.2 Potencial zeta

O PZ é um indicador da estabilidade do sistema coloidal. As três formulações obtidas apresentaram valores de PZ elevados e negativos. Na Figura 20, à esquerda, (a), estão

apresentados, os valores em absoluto do PZ obtidos de cada lípido e com isso conclui-se que os valores, por serem elevados e negativos, indicam que as NPs apresentam elevada estabilidade.

Na Figura 20, à direita, (b), está representado também em gráfico os valores obtidos do PI das formulações. É um indicador de estabilidade e dá informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, todos os valores apresentados estão conforme o pretendido ($<0,3$) e conclui-se assim que as três formulações são constituídas por uma população de partículas com elevada homogeneidade.

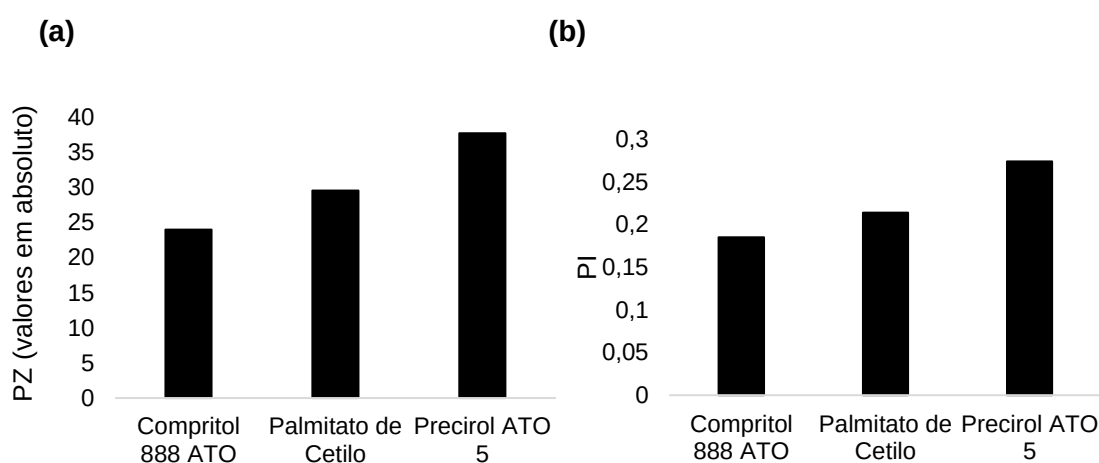


Figura 20 – (a) Valores em absoluto obtidos de PZ das formulações com cada lípido usado; (b) valores obtidos de PI.

3.3 Estudo das formas polimórficas em função da temperatura

Primeiramente observou-se o comportamento térmico dos 3 lípidos, individualmente, em função do aumento da temperatura. Analisou-se cada lípido com 3 ciclos de aquecimento - Figura 21. Também se analisou o comportamento térmico do fármaco utilizado neste trabalho – Figura 22 e também se analisou cada um dos lípidos com o fármaco com o objetivo de analisar as interferências deste no eventual comportamento do lípido sólido – Figura 23. Na Tabela XIV, estão apresentados os parâmetros utilizados para poder comparar o comportamento térmico das matérias-primas analisadas: *onset*, temperatura onde ocorre o início do ponto de fusão, e entalpia, área do pico.

As condições de análise foram sempre as mesmas (razão de aquecimento de 10°C/min) para os 3 ciclos de cada um dos 3 lípidos. Para o palmitato de cetilo, Figura 21 (a), observamos que os 3 ciclos começam e acabam no mesmo valor de temperatura. No ciclo 1, a área é maior o que significa que é mais cristalino (maior entalpia). Os ciclos 2 e

3 são coincidentes, mas no ciclo 3 observa-se a existência de um segundo pico, originado por uma estrutura cristalina diferente (polimorfismo). Para o Precirol ATO 5, Figura 21 (b), observamos que o ciclo 1 apresenta ponto de fusão ligeiramente superior, mas os restantes ciclos são coincidentes, ou seja, houve alteração da estrutura cristalina (polimorfismo). Na Figura 21 (c), para o Compritol 888 ATO observa-se que não houve alteração da estrutura cristalina para o ciclo 1, 2 e 3, pois quer os picos quer as áreas são semelhantes.

Na Figura 22 pode ser visto o pico endotérmico de NIS que se situa nos 167°C, valor coincidente com o da bibliografia consultada [38].

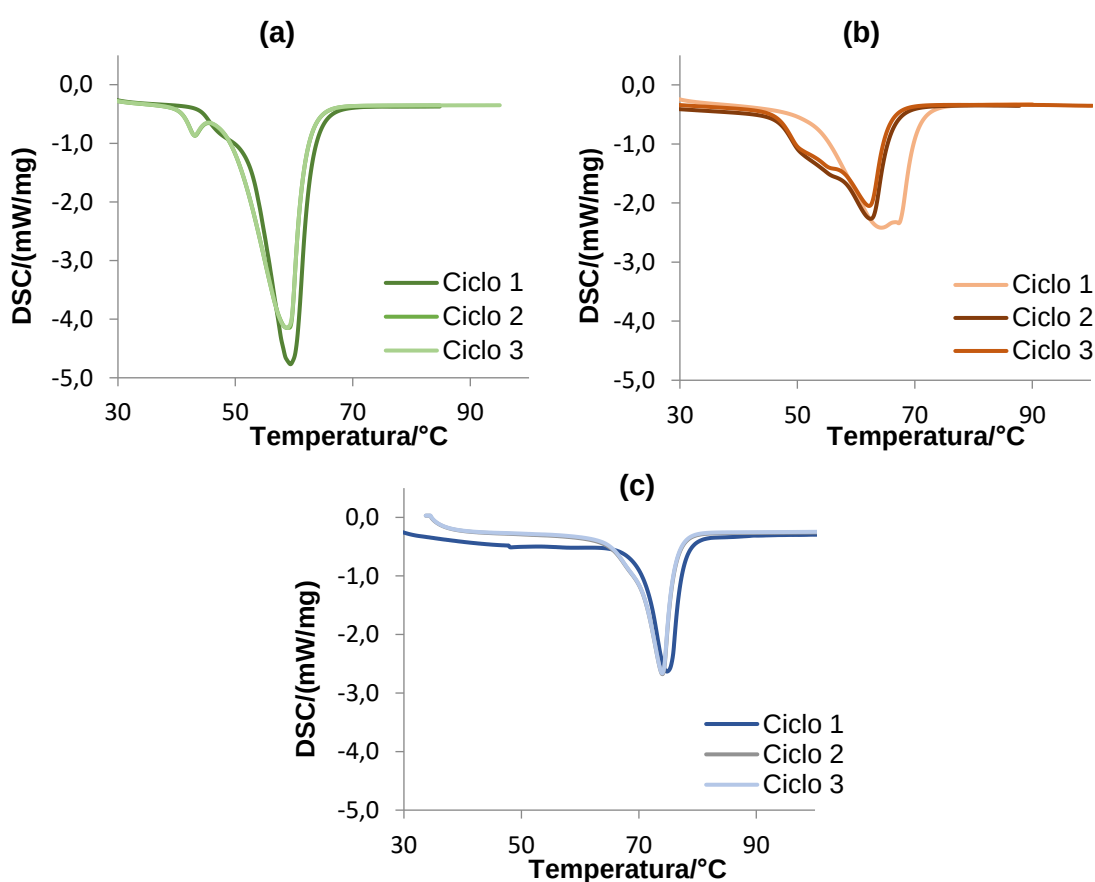


Figura 21 - (a) Termograma de Palmitato de cetilo; (b) Termograma de Precirol ATO 5 ;
(c) Termograma de Compritol 888 ATO.

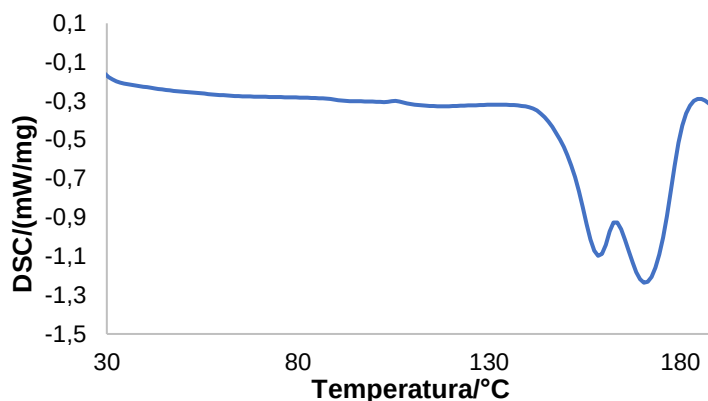


Figura 22 - Termograma da NIS.

Pela análise da Figura 23, podemos verificar, que todos os valores de *onset* dos lípidos + fármaco *versus* lípidos analisados individualmente, aumentaram ligeiramente e os valores da entalpia diluíram o que significa que há uma pequena interação da NIS no comportamento dos lípidos. Tanto pela análise das figuras como da Tabela XIV, observamos que o palmitato de cetilo apresenta um pico bem definido, assim como o Compritol 888 ATO. Também se pode observar que o Precirol ATO 5 após a primeira a fusão, altera bastante o formato do seu pico, ou seja, o lípido adquire várias formas cristalinas - polimorfismo. As formas polimórficas dependem da taxa de cristalização e temperatura durante a produção e o armazenamento. O Compritol 888 ATO apresenta ponto de fusão mais elevado (68,8 °C) e o Precirol ATO 5 apresenta ponto de fusão mais baixo (46,4 °C). Por exemplo, o ponto de fusão do Compritol 888 ATO varia entre 68,8 °C (início do pico endotérmico) e 76,1 °C (fim do pico endotérmico) e varia de acordo com a forma polimórfica criada [74]. De acordo com o analisado nos capítulos 3.2. e 3.3., decidiu-se continuar apenas com os lípidos sólidos: Compritol 888 ATO e Precirol ATO 5.

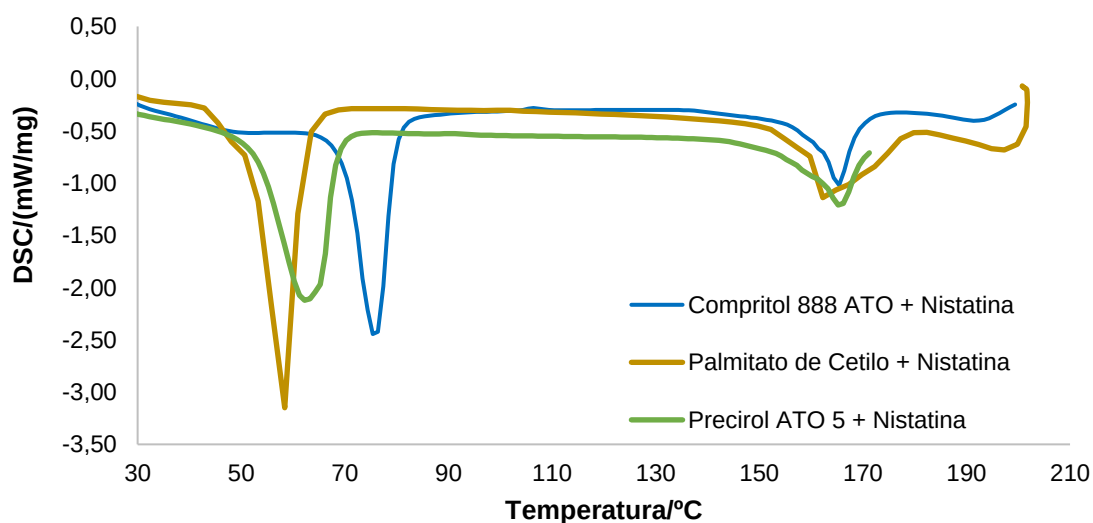


Figura 23 - Termograma de cada lípido estudado com NIS.

Tabela XIV - Registo dos parâmetros (início do ponto de fusão e entalpia) da análise da DSC, das matérias-primas individualmente e lípido + substância ativa (onde “ * ” corresponde aos parâmetros do lípido e “ ** ” corresponde aos parâmetros do fármaco).

		Onset (°C)	Entalpia (J/g)
Lípido	Compritol 888 ATO	69,8	-73,15
	Palmitato de cetilo	50,2	-169,9
	Precirol ATO 5	46,4	-112,5
Fármaco	Nistatina	164,2	-36,09
Lípido + fármaco	Compritol 888 ATO + Nistatina	71,2 *	-59,82 *
		162,8 **	-36,94 **
	Palmitato de cetilo + Nistatina	53,2 *	-116,3 *
		160,8 **	-49,42 **
	Precirol ATO 5 + Nistatina	53,9 *	-94,75 *
		159,9 **	-33,8 **

3.4 Eficácia de encapsulação da nistatina

Procedeu-se a nova formulação de SLN com Compritol 888 ATO e Precirol ATO 5 com NIS com o objetivo de determinar a EE, primeiramente procedeu-se à determinação do tamanho, através de DLS, e também a determinação do PZ e PI – Tabela XV.

Tabela XV - Tamanho obtido, em μm , das SLN obtidas com Compritol 888 ATO (SLN COMP-NIS) e com Precirol ATO 5 (SLN PREC-NIS) e também o valor do PZ e PI.

	DLS (μm)	PZ	PI
SLN COMP-NIS	0,386	-24,36	0,209
SLN PREC-NIS	0,295	-26,47	0,293

Procedeu-se à determinação da EE de cada SLN formulada, através do método indireto. O método indireto consistiu em diluir 2 mL de NP em 10 mL de água ultrapura, levar ao Vortex durante 30 s, retirar 0,5 mL dessa mistura e diluir novamente com 8 mL de solvente 60:10:30, colocando num tubo Amicon® Ultra-0.5. Centrifugou-se a 4000 G

durante 15 min. A EE para SLN COMP-NIS foi de 47,19 % e para SLN PREC-NIS foi de 50,66%.

Pelos valores obtidos de EE e também pelos valores apresentados na Tabela XV, decidiu-se descartar o lípido Compritol 888 ATO e prosseguir o estudo da estabilidade com o lípido Precirol ATO 5.

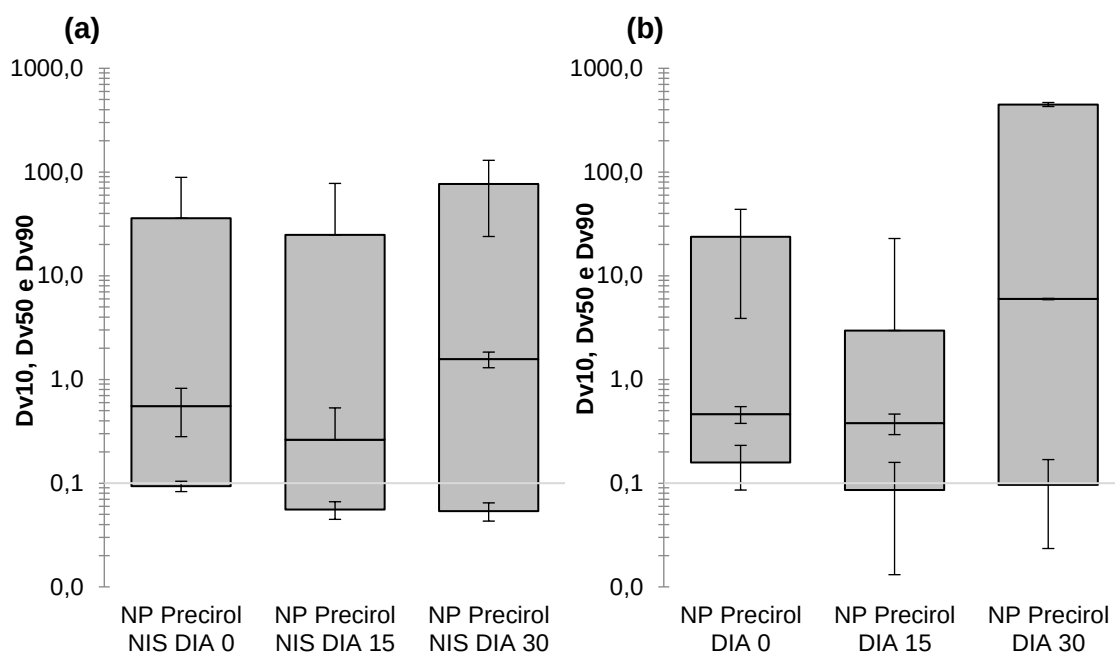
3.5 Estudo da estabilidade

Preparou-se um novo lote de SLNs PREC-NIS e apenas NPs constituídas por Precirol ATO 5 com o objetivo de estudar a estabilidade ao longo do tempo e também comparar os diferentes parâmetros das duas formulações (Figura 46, em Anexo). Procedeu-se à avaliação dos parâmetros pré-definidos das partículas durante o armazenamento, a 4 °C durante 1 mês (em intervalos de 0, 15, 30 dias) com o objetivo de estudar a sua estabilidade física.

Para se estudar a estabilidade foram avaliados vários parâmetros: tamanho das NPs por Mastersizer 3000 e por DLS, PZ, PI, EE e cristalinidade.

Na Figura 24, está apresentado o diâmetro médio NPs por LD, das formulações de SLNs PREC-NIS e das NPs constituídas por Precirol ATO 5, durante 30 dias. Na Figura 25, está apresentado o diâmetro médio NPs por DLS. Pela análise das duas figuras, pode-se analisar que o tamanho vai-se alterando ao longo do tempo de armazenamento, no caso das formulações de SLNs PREC-NIS observa-se que o tamanho se mantém constante até à análise do 30º dia, o seu diâmetro mediano aumentou significativamente nesse dia pois apresenta valores ligeiramente superiores, que pode dever-se à aglomeração das NPs durante o armazenamento ao longo do tempo. Os resultados são concordantes em ambas as técnicas de análise para esta formulação. Em relação às NPs constituídas por Precirol ATO 5, estas diminuíram de tamanho ao fim de 15 dias e ao fim de 30 dias apresentavam um tamanho ligeiramente superior ao que tinham no dia da preparação.

As duas técnicas utilizadas para a determinação do tamanho das NPs apresentaram resultados concordantes. Apesar de serem dois métodos que detetam gama de tamanhos diferente, DLS analisa partículas com tamanho inferior, mas o LD, como dito anteriormente, é um método mais fiável. As NPs com fármaco demonstraram ser mais estáveis ao longo de tempo de armazenamento do que as NPs que não contêm fármaco.



(c)

	NP PRECIROL NIS DIA 0	NP PRECIROL NIS DIA 15	NP PRECIROL NIS DIA 30
Dv10 (µm)	0,09	0,06	0,05
Dv50 (µm)	0,46	0,21	1,51
Dv90 (µm)	35,39	24,47	75,20

(d)

	NP PRECIROL DIA 0	NP PRECIROL DIA 15	NP PRECIROL DIA 30
Dv10 (µm)	0,16	0,09	0,10
Dv50 (µm)	0,30	0,29	5,86
Dv90 (µm)	23,31	2,58	442,04

Figura 24 – (a) Tamanho (Dv10, Dv50 e Dv90) das NPs das formulações de SLNs PREC-NIS, ao dia 0, 15º e 30º dia; (b) Valores, em gráfico, do tamanho (Dv10, Dv50 e Dv90) das formulações constituídas por Precirol ATO 5, ao dia 0, 15º e 30º dia; (c) Valores, em tabela, dos percentis, Dv10, Dv50 e Dv90, das NPs das formulações de SLNs PREC-NIS, ao dia 0, 15º e 30º dia; (d) Valores, em tabela, dos percentis, Dv10, Dv50 e Dv90, das NPs das formulações constituídas por Precirol ATO 5, ao dia 0, 15º e 30º dia.

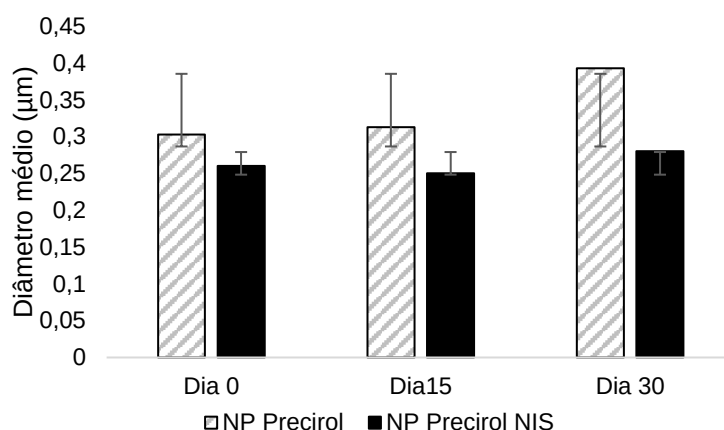


Figura 25 - Diâmetro médio de NPs das formulações de SLNs PREC-NIS e as NPs constituídas por Precirol ATO 5, ao 0, 15º e 30º dia, através do DLS. Estão representados os valores da média +/- o desvio padrão.

Na Figura 26, está apresentado o IP de ambas as NPs determinado por DLS e os valores mantêm-se constantes ao longo do tempo de armazenamento (para NPs com fármaco) e a gama de valores situa-se entre o esperado. Nas NPs que não contêm fármaco, o valor de PI teve um ligeiro aumento ao fim de 30 dias tal pode ser justificado pela possível aglomeração das NPs e esses valores corroboram com o dito anteriormente, na análise do diâmetro médio. Os valores de PZ não são apresentados porque o elétron não se encontrava em correto funcionamento.

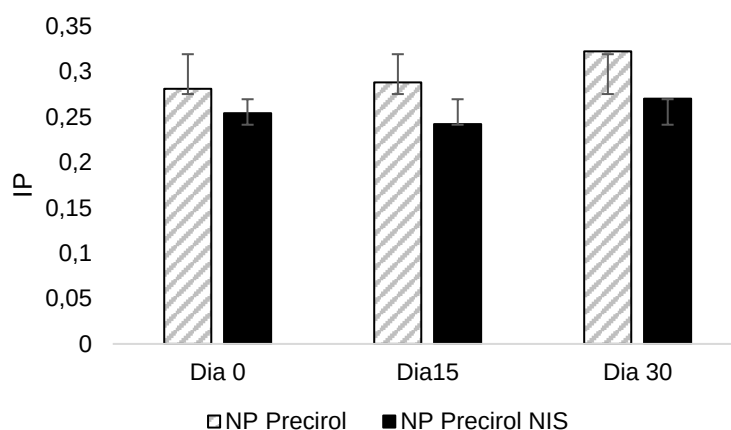


Figura 26 – Valores de IP de NPs das formulações de SLNs PREC-NIS e as NPs constituídas por Precirol ATO 5, ao 0, 15º e 30º dia, através do DLS. Estão representados os valores da média +/- o desvio padrão.

Nas Figuras 27 e 28 estão representados os termogramas, respetivamente, das NPs com fármaco e das NPs sem fármaco ao longo dos dias de estudo (0, 15 e 30 dias). Pela análise dos eventos térmicos que ocorrem durante o aquecimento, observam-se vários picos endotérmicos e um deles, o pico com maior entalpia, referente ao lípido,

apresenta uma temperatura de transição vítrea +/- 59 °C, dados apresentados na Tabela XVI, que se mantém constante ao longo do mês de armazenamento concluindo que as NPs mantêm a estabilidade e não libertam o fármaco. O valor de entalpia e o de pico também se mantém constante ao longo do tempo.

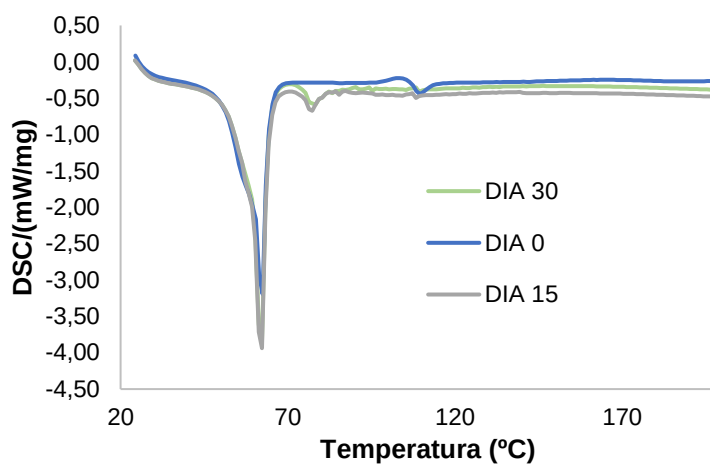


Figura 27 - Termograma das SLNs PREC-NIS nos dias 0, 15 e 30.

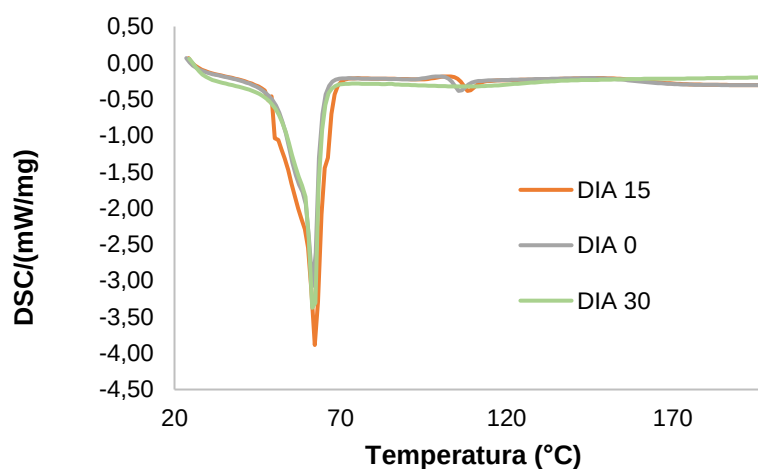


Figura 28 - Termograma das NPs constituídas por Precirol nos dias 0, 15 e 30.

Tabela XVI - Registo dos parâmetros (início do ponto de fusão e entalpia) da análise da DSC, de SLNs PREC-NIS e de NPs constituídas por Precirol nos dias 0, 15 e 30.

		DIA 0	DIA 15	DIA 30
SLNs PREC-NIS NPs constituídas por Precirol	Onset (°C)	59,7	59,4	59,2
	Entalpia (J/g)	-120,6	-119,9	-119,7
	Pico (°C)	62,0	62,0	61,9
	Onset (°C)	58,1	59,2	58,9
	Entalpia (J/g)	-118,7	-122,6	-117,6
	Pico (°C)	61,9	62,5	62,0

Em relação à EE, os valores obtidos estão apresentados na Tabela XVII. Como observada a eficácia de encapsulação diminui ao longo do tempo.

Tabela XVII - Valores obtidos da EE (%) durante o tempo de armazenamento para as SLNs PREC-NIS.

	DIA 0	DIA 15	DIA 30
SLNs PREC-NIS	67,8	43,66	43,57

3.6 Análise das características organoléticas da preparação semissólida e cálculo do rendimento

As características organoléticas são o indicador mais acessível para avaliar a qualidade de uma preparação semissólida e para detetar alterações. O simples exame visual pode funcionar como um indicativo da homogeneidade da preparação [109]. A análise organolética realizada nas formulações decorreu após a produção (dia 0), 7 dias e 15 dias após. A partir da análise visual foi possível avaliar a cor, o aspeto, a textura e o odor, na Tabelas XVIII e XIX estão sumariadas as características organoléticas dos géis formulados.

O rendimento das preparações de GC-0,5 e GC-0,5-NP-NIS foi, respetivamente, 87,2% e 91,39%.

Tabela XVIII - Análise das características organoléticas do GC-0,5-NP-NIS.

Gel		Imagem	Cor	ODOR	ASPETO	CONSISTÊNCIA
GC-0,5-NP-NIS	DIA 0		Branco	Inodoro	Homogêneo	Adequada
	DIA 1		Branco	Inodoro	Homogêneo	Adequada
	DIA 7		Branco	Inodoro	Homogêneo	Adequada
	DIA 15		Branco	Inodoro	Homogêneo	Adequada

Tabela XIX - Análise das características organoléticas do GC-0,5.

Gel	Imagem	Cor	ODOR	ASPETO	CONSISTÊNCIA	
GC-0,5	DIA 0		Translúcido	Inodoro	Homogéneo	Gel com pouca consistência
	DIA 1		Translúcido	Inodoro	Homogéneo	Adequada
	DIA 7		Translúcido	Inodoro	Homogéneo	Adequada
	DIA 15		Translúcido	Inodoro	Homogéneo	Adequada

3.7 Estudo do comportamento reológico da preparação semissólida

Na Figura 29, são apresentadas as 3 análises realizadas para avaliar o grau de tixotropia para o GC-0,5-NP-NIS durante 0, 7 e 15 dias. Pela análise dos gráficos verifica-se que o gel não apresenta tixotropia. Pode-se observar que recomposição da estrutura ocorreu de forma quase idêntica em relação ao processo de destruição da estrutura inicial.

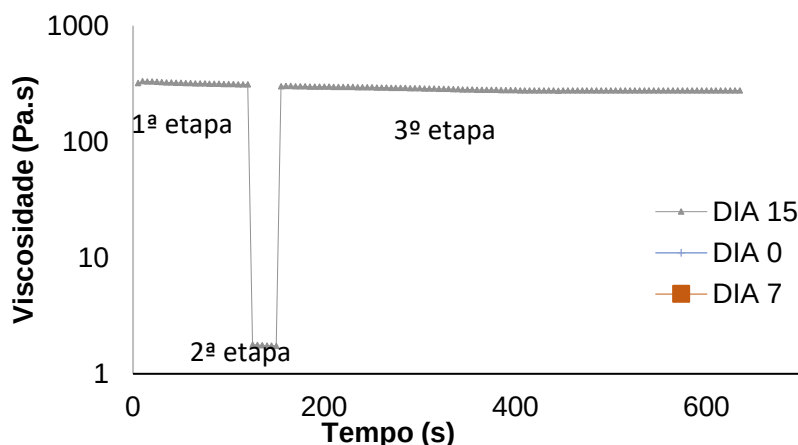


Figura 29 - Análise do grau de tixotropia para o GC-0,5-NP-NIS - DIA 0, 7 e 15.

Na Figura 30, está apresentado as 3 análises realizadas para avaliar o grau de tixotropia para o GC-0,5 durante 0, 7 e 15 dias. Pela análise do gráfico verifica-se que o gel não apresenta, mais uma vez, tixotropia. Pode-se observar que recomposição da estrutura ocorreu de forma quase idêntica em relação ao processo de destruição da estrutura inicial.

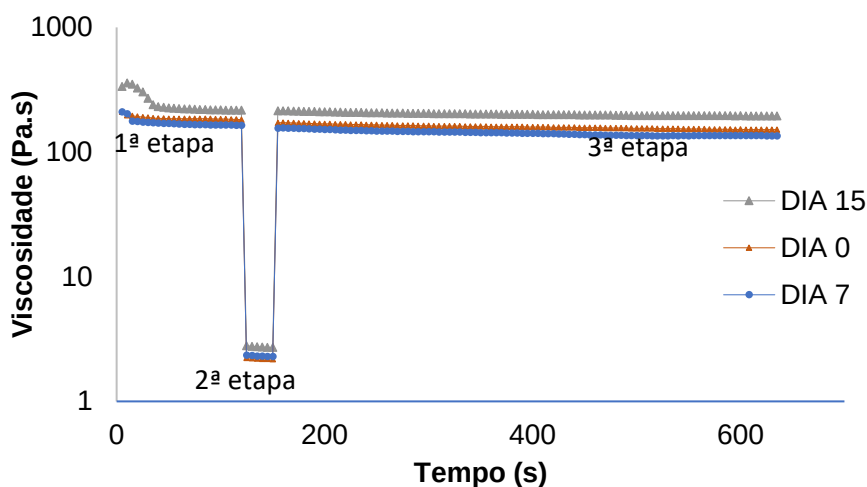


Figura 30 - Análise do grau de tixotropia para o GC-0,5 - DIA 0, 7 e 15.

Para estudar a relação entre a viscosidade em função da taxa de corte analisou-se através duas figuras, referente aos dois géis formulados e respetivos dias de análise, Figura 31. Pode-se concluir que ambos os géis são fluidos não-Newtonianos do tipo pseudoplástico pois a viscosidade diminui ao longo do aumento da taxa de corte.

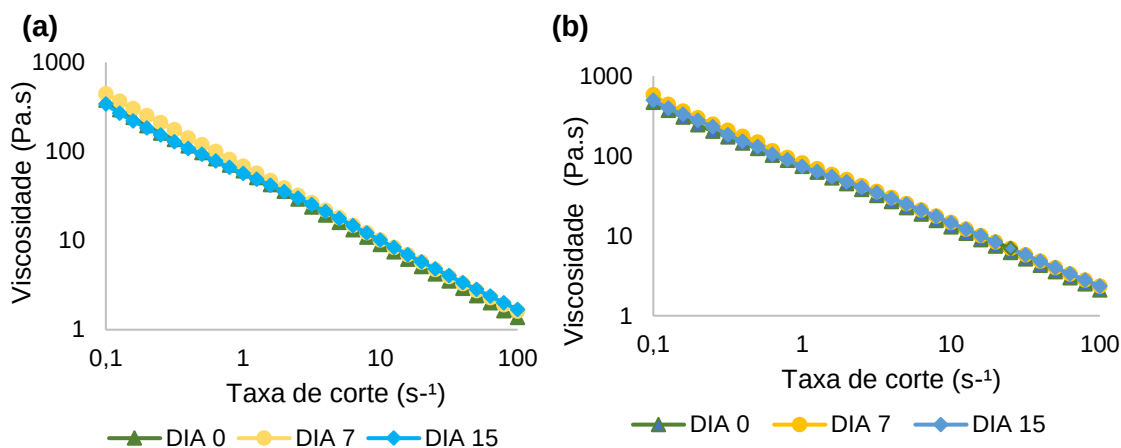


Figura 31 – (a) Taxa de corte versus viscosidade para GC-0,5; (b) taxa de corte versus viscosidade para GC-0,5-NP-NIS - DIA 0, 7 e 15.

Em relação aos resultados da viscosidade em função do tempo, apresentados na Figura 32, verifica-se que há uma manutenção dos valores da viscosidade para as quatro taxas de corte (0,1, 1, 10 e 100 s⁻¹) indicadas. Também se pode observar que os valores de viscosidade para taxa de corte 0,1 para o gel GC-0,5-NP-NIS é ligeiramente inferior em comparação ao outro gel, demonstrando que a presença de NPs influencia o valor de viscosidade.

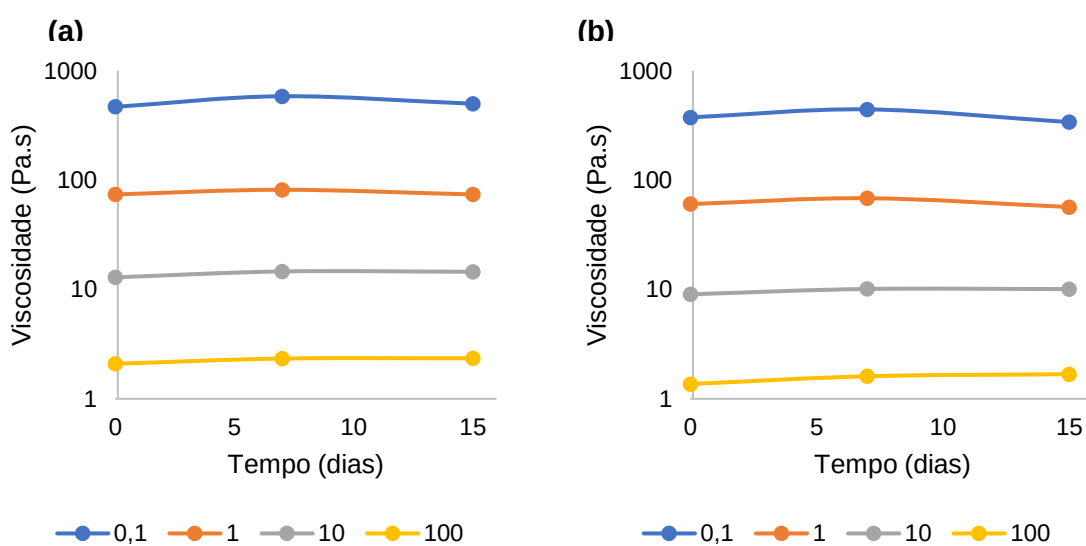


Figura 32 – Viscosidade em função do tempo para as diferentes taxas de corte; (a) GC-0,5; (b) GC-0,5-NP-NIS.

Com a análise da Figura 33 é possível determinar o valor de LVER e observa-se que até ao valor de $\pm 0,8\%$ de deformação o GC-0,5 mantém a sua estabilidade nos 3 períodos de tempo pois não ocorreu uma alteração do valor G' e G'' . O valor $0,9\%$ traduz-se como limite da região viscoelástica linear, momento em que o gel começa a deformar-se de modo irreversível. Outro parâmetro que reforça o caráter de sólido aparente é o valor do ângulo de fase que se encontra entre 0° e 90° . O gráfico para determinar o LVER de GC-0,5-NP-NIS foi semelhante com o de GC-0,5.

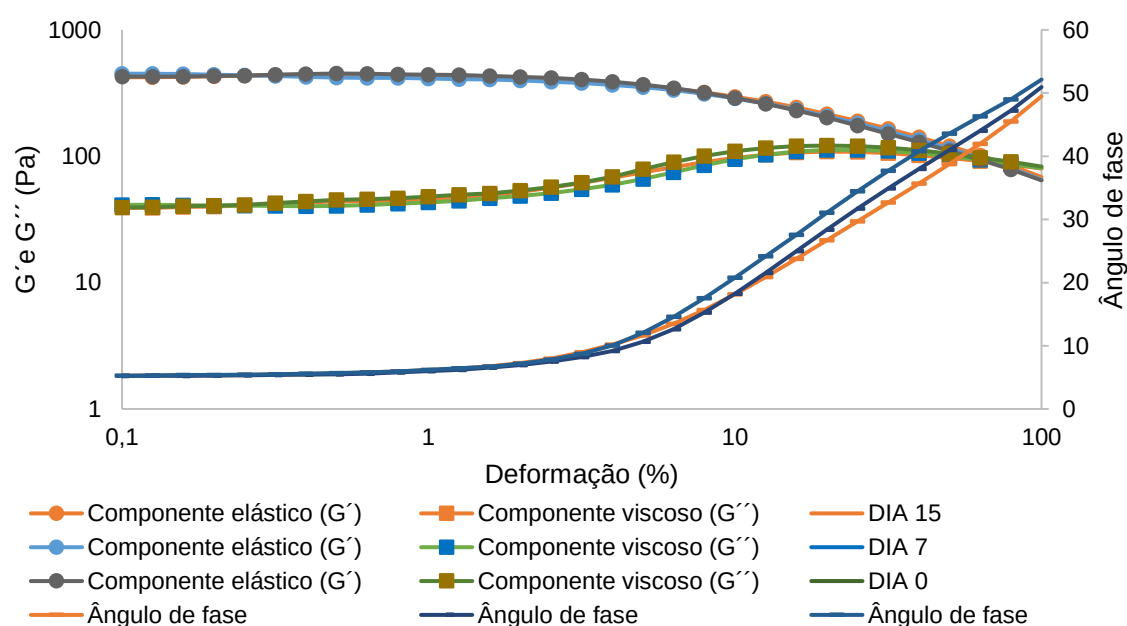
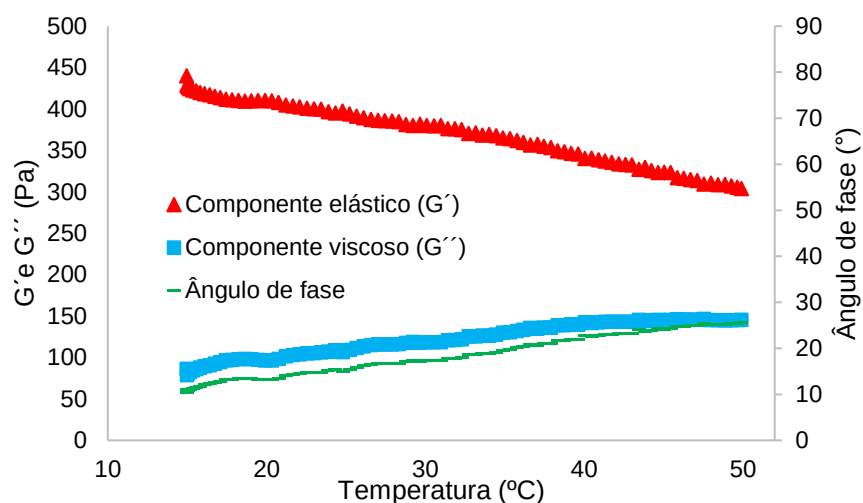


Figura 33 - Determinação do LVER para o GC-0,5 - DIA 0, 7, 15.

Em relação aos resultados do efeito de temperatura (Figuras 34-36), ambos os géis que foram submetidos a intervalo de temperatura de 15°C a 50°C , à exceção da análise do dia 0 para o GC-0,5-NP-NIS que foi analisada apenas a partir dos 25°C .

Na Figura 34 representa o efeito de temperatura para os três componentes (componente elástico, componente viscoso e ângulo de fase) para o GC-0,5; no dia 0, observa-se, em comparação com a Figura 35, que o componente elástico tem uma diminuição mais acentuada ao longo do aumento da temperatura, enquanto o ângulo de fase e o componente viscoso aumentam. Isto pode ser justificado pelo facto de o gel após preparação ser menos consistente e após o período de repouso formar mais ligações, dados concordantes com a análise das características organoléticas, na Tabela XIX. O ângulo de fase nunca passa os 45° demonstrando que o gel nunca deixa o estado sólido mesmo com o aumento da temperatura.



Figura

34 -

Determinação do efeito de temperatura para os três componentes (componente elástico, componente viscoso e ângulo de fase) para o GC-0,5 - DIA 0.

A Figura 35 representa o efeito de temperatura para os três componentes (componente elástico, componente viscoso e ângulo de fase) para o GC-0,5-NP-NIS, no dia 0, observa-se que o componente elástico diminui ao longo do aumento da temperatura, enquanto o ângulo de fase e o componente viscoso têm um ligeiro aumento. Através do facto de o ângulo de fase nunca passar os 45° conclui-se que o gel fica sempre no estado sólido mesmo com o aumento da temperatura.

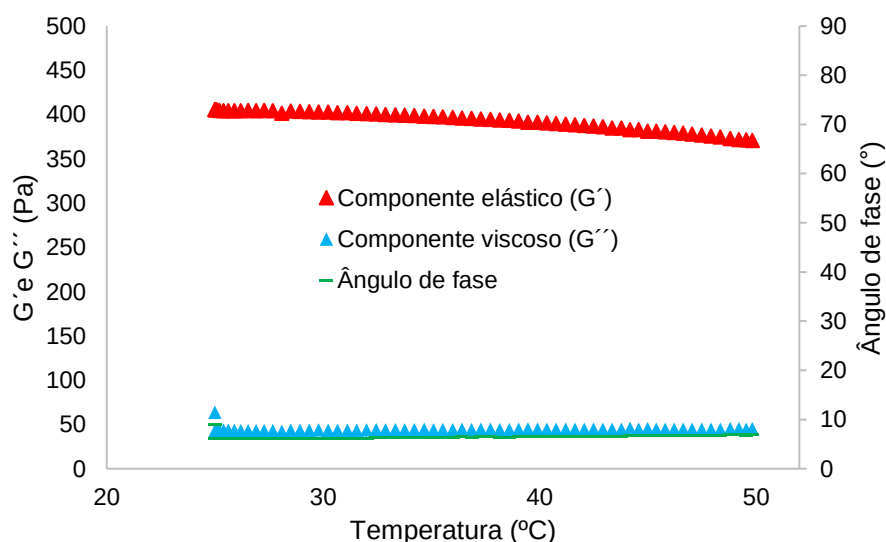


Figura 35 - Determinação do efeito de temperatura para os três componentes (componente elástico, componente viscoso e ângulo de fase) para o GC-0,5-NP-NIS - DIA 0.

Na Figura 36 pode observa-se a viscosidade para o GC-0,5-NP-NIS (a) e para GC-0,5 (b) nos 3 tempos de análise em função da temperatura de análise e verifica-se que no gel sem NPs a viscosidade inicial é inferior no dia 0 mas nos dias seguintes a viscosidade

aumenta e, em comparação com o GC-0,5-NP-NIS, os valores de viscosidade são superiores nos dias 7 e 15. Isso pode dever-se ao facto de durante o período de repouso a rede de cadeias poliméricas interligar-se por ligações cruzadas, tornando o gel mais consistente e provocando um aumento do valor da viscosidade desde o dia 7. Para o GC-0,5-NP-NIS, os valores de viscosidade não variam muito em função da temperatura nem ao longo dos dias. Os valores de viscosidade são constantes e inferiores ao do outro gel concluindo assim que a presença de NPs influencia os valores de viscosidade.

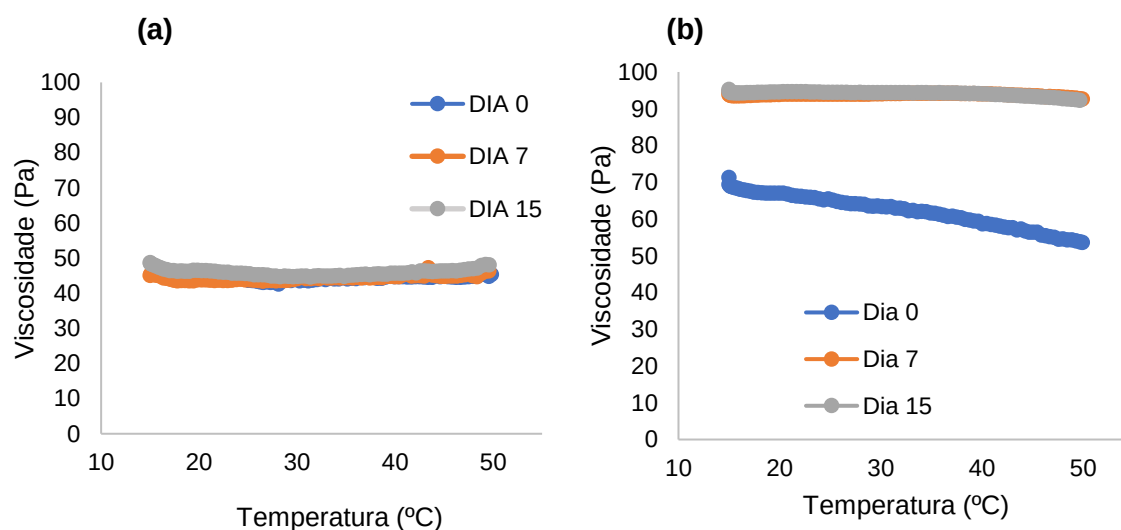


Figura 36 - Determinação do efeito de temperatura. (a) GC-0,5-NP-NIS - DIA 0, 7 e 15; (b) GC-0,5 - DIA 0, 7 e 15.

4 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os fungos são seres eucarióticos que são responsáveis por diversas doenças no Homem. O fungo *Candida*, mais especificamente a espécie *Candida albicans*, é responsável por várias doenças, entre as quais, a doença denominada Candidíase. Este tipo de infeção é bastante comum nos seres vivos e pode causar infeções tanto no foro vaginal como oral. A NIS é um tipo de fármaco usado para o tratamento dessas mesmas infeções, no entanto, este composto na sua forma livre é muito pouco solúvel em água e apresenta baixa absorção e alguma toxicidade, o que traz algumas desvantagens. Uma das formas de atenuar esse inconveniente é através da encapsulação do fármaco em nanossistemas. A vetorização em NPs é uma forma eficaz de aumentar a eficácia e biodisponibilidade dos fármacos, principalmente, fármacos com muito baixa solubilidade em água. As NPs lipídicas, SLN e NLC têm atraído cada vez mais atenção nos últimos anos sendo um centro de foco de uma diversificada e inúmera investigação, em diversas áreas, sendo descritas como vantajosas face a outro tipo de NPs, pois apresentam menor toxicidade e não apresentam tanta perda de fármaco ao longo do tempo.

As SLN foram desenvolvidas através de diferentes métodos (homogeneização a elevada velocidade e ultrassonicação) e são necessários métodos analíticos apropriados para a caracterização do SLN. Inicialmente formularam-se 3 tipos de SLN, com e sem fármaco, cada uma com um lípido diferente, com o objetivo de concluir qual dos lípidos apresentava melhores resultados. Os lípidos escolhidos foram: Compritol 888 ATO, palmitato de cetilo e Precirol ATO 5. Em termos de tamanho, por DLS, Compritol 888 ATO, palmitato de cetilo e Precirol ATO 5, sem fármaco, apresentaram um diâmetro médio de 0,335 µm, 0,385 µm e 0,248 µm, respetivamente. Após análise, por DSC, dos termogramas dos lípidos observa-se que no termograma do palmitato de cetilo há a existência de uma forma cristalina adicional, que origina uma estrutura polimórfica diferente em comparação com os restantes lípidos, descartando-se assim o palmitato de cetilo. Entre o Compritol 888 ATO e o Precirol ATO 5, escolheu-se este último pois apresentou uma EE superior. Estudou-se a estabilidade de SLN PREC-NIS apresentando uma EE de 67,8% ao dia 0, 43,66%, ao dia 15 e 43,57% ao dia 30. O tamanho médio, para os dias 0,15 e 30, para as NPs sem fármaco, foi, respetivamente, 0,302 µm, 0,312 µm, 0,392 µm, e com fármaco, foi, respetivamente, 0,260 µm, 0,250 µm, 0,280 µm e verificou-se que nas NPs que não contêm fármaco houve um ligeiro aumento ao fim de 30 dias o que pode ser justificado pela possível aglomeração das NPs. Estes resultados obtidos levam a concluir que as SLN serão uma potencial formulação para veicular NIS.

Também se formulou dois géis, com fármaco e sem fármaco. O polímero utilizado foi o carbopol 940. Além das características organoléticas do gel carbopol a 0,5% e do gel carbopol a 0,5% + NPs Precirol-NIS a 10%, também se estudou o seu comportamento reológico durante 15 dias. Os resultados demonstraram que ambos os géis não apresentaram tixotropia, mantiveram a viscosidade ao longo desse período e o aumento da temperatura não afetou gravemente a sua viscosidade ao longo dos 15 dias.

Um passo seguinte, seria a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança das SLN com NIS como antifúngico para o tratamento de doenças. Outra possibilidade seria desenvolver NLC e comparar, estudando a sua influência na biodisponibilidade do fármaco, uma vez que esse tipo de NPs tem outras vantagens: ser constituído por uma matriz imperfeita que, por conseguinte, aumenta a capacidade de encapsulação de fármaco e previne a sua expulsão do interior das NPs, colmatando as desvantagens de SLN.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayer, F.L., D. Wilson, and B. Hube, *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence, 2013. **4**(2): p. 119-28.
2. Fisher, M.C., et al., *Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health*. Nature, 2012. **484**(7393): p. 186-94.
3. Pianalto, K. and J. Alspaugh, *New Horizons in Antifungal Therapy*. Journal of Fungi, 2016. **2**(4): p. 26.
4. Abdullah, S., et al., *Biophysical characterization of antibacterial compounds derived from pathogenic fungi Ganoderma boninense*. Journal of Microbiology, 2021. **59**(2): p. 164-174.
5. van Leeuwe, T.M., et al., *A seven-membered cell wall related transglycosylase gene family in Aspergillus niger is relevant for cell wall integrity in cell wall mutants with reduced alpha-glucan or galactomannan*. Cell Surf, 2020. **6**: p. 100039.
6. Fesel, P.H. and A. Zuccaro, *beta-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants*. Fungal Genet Biol, 2016. **90**: p. 53-60.
7. Sousa, F., et al., *Current Insights on Antifungal Therapy: Novel Nanotechnology Approaches for Drug Delivery Systems and New Drugs from Natural Sources*. Pharmaceuticals, 2020. **13**(9): p. 248.
8. Ng, K.P., et al., *Candida species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report*. Trop Med Int Health, 2015. **20**(11): p. 1447-1453.
9. Benavent, C., C. Torrado-Salmerón, and S. Torrado-Santiago, *Development of a Solid Dispersion of Nystatin with Maltodextrin as a Carrier Agent: Improvements in Antifungal Efficacy against Candida spp. Biofilm Infections*. Pharmaceuticals, 2021. **14**(5): p. 397.
10. Benavent, C., et al., *Nystatin antifungal micellar systems on endotracheal tubes: development, characterization and in vitro evaluation*. Pharmazie, 2019. **74**(1): p. 34-38.
11. Arendrup, M.C., *Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology*. Dan Med J, 2013. **60**(11): p. B4698.
12. Kim, J. and P. Sudbery, *Candida albicans, a major human fungal pathogen*. J Microbiol, 2011. **49**(2): p. 171-7.
13. La Clair, J.J., *Accessing Nystatin through Mariculture*. Molecules, 2021. **26**(24).
14. Offner, F., et al., *Liposomal Nystatin in Patients with Invasive Aspergillosis Refractory to or Intolerant of Amphotericin B*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004. **48**(12): p. 4808-4812.
15. de Aguiar, M.M., et al., *Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination*. Drug Dev Ind Pharm, 2010. **36**(5): p. 594-600.
16. Day, T.P., et al., *Imbuing Aqueous Solubility to Amphotericin B and Nystatin with a Vitamin*. Molecular Pharmaceutics, 2011. **8**(1): p. 297-301.
17. Kristanc, L., et al., *The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2019. **1861**(2): p. 418-430.
18. Bylund, D.B., S.J. Enna, and S. Elsevier, *xPharm : the comprehensive pharmacology reference*. 2008, Place of publication not identified: Elsevier.
19. Batrawi, N., S. Wahdan, and M. Abualhasan, *Analytical Method Validation of High-Performance Liquid Chromatography and Stability-Indicating Study of Medroxyprogesterone Acetate Intravaginal Sponges*. Analytical Chemistry Insights, 2017. **12**: p. 117739011769015.
20. Wasan, K.M., et al., *Physical characteristics and lipoprotein distribution of liposomal nystatin in human plasma*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(9): p. 1871-5.

21. Blaschke-Hellmessen, R., U. Pannwitz, and R. Schwarze, [Intestinal excretion of nystatin during and after oral administration to newborn infants at risk]. *Monatsschr Kinderheilkd*, 1991. **139**(2): p. 89-91.
22. Groll, A.H., et al., *Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of multilamellar liposomal nystatin in rabbits*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(4): p. 950-7.
23. *Nystatin*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012: Bethesda (MD).
24. Shi, J., et al., *Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications*. *Nano Letters*, 2010. **10**(9): p. 3223-3230.
25. Khan, M., et al., *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Juniperus procera Extract: Their Characterization, and Biological Activity*. *Crystals*, 2022. **12**(3): p. 420.
26. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Drug delivery systems: entering the mainstream*. *Science*, 2004. **303**(5665): p. 1818-22.
27. Ferreira, M.A., et al., *Annatto Oil Loaded Nanostructured Lipid Carriers: A Potential New Treatment for Cutaneous Leishmaniasis*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(11): p. 1912.
28. Duncan, R. and R. Gaspar, *Nanomedicine(s) under the microscope*. *Mol Pharm*, 2011. **8**(6): p. 2101-41.
29. Souto, E.B., W. Mehnert, and R.H. Muller, *Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC*. *J Microencapsul*, 2006. **23**(4): p. 417-33.
30. Gordillo-Galeano, A. and C.E. Mora-Huertas, *Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018. **133**: p. 285-308.
31. Hu, L., X. Tang, and F. Cui, *Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010. **56**(12): p. 1527-1535.
32. Muller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000. **50**(1): p. 161-77.
33. Parveen, S., R. Misra, and S.K. Sahoo, *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*. *Nanomedicine*, 2012. **8**(2): p. 147-66.
34. Muller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54 Suppl 1**: p. S131-55.
35. Uner, M. and G. Yener, *Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives*. *Int J Nanomedicine*, 2007. **2**(3): p. 289-300.
36. Sakeer, K., et al., *Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation*. *Archives of Pharmacal Research*, 2010. **33**(11): p. 1771-1779.
37. Pillwein, K., W. Rauschmeier, and H. Berger, [Clinical experiences with an antimycotic foam preparation with added prednisolone (Nystacorton foam)]. *Padiatr Padol*, 1986. **21**(1): p. 75-80.
38. Khalil, R.M., et al., *Preparation and in vivo Assessment of Nystatin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery against Cutaneous Candidiasis*. 2014: p. 401-409.
39. Fernandez-Campos, F., et al., *Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections*. *Mycoses*, 2013. **56**(1): p. 70-81.
40. Offner, F., et al., *Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(12): p. 4808-12.
41. Carrillo-Munoz, A.J., et al., *In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole*. *J Antimicrob Chemother*, 1999. **44**(3): p. 397-401.
42. El-Ridy, M.S., et al., *Niosomes as a potential drug delivery system for increasing the efficacy and safety of nystatin*. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011. **37**(12): p. 1491-508.

43. Hameedat, F., et al., *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection for Quantification of Steroids in Clinical, Pharmaceutical, and Environmental Samples: A Review*. Molecules, 2022. **27**(6): p. 1807.
44. Campas-Baypoli, O.N., et al., *HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products*. Biomedical Chromatography, 2009: p. n/a-n/a.
45. Braithwaite, A. and F.J. Smith, *Chromatographic methods*. Fifth edition. ed. 1999, Dordrecht: Springer-Science+Business Media, B.V.
46. Meyer, V. and ProQuest, *Practical high-performance liquid chromatography*. 5th ed. 2010, Chichester, U.K: Wiley.
47. Stanbury, P.F., S.J. Hall, and A. Whitaker, *Principles of fermentation technology*. 2017, Amsterdam: Elsevier Butterworth-Heinemann.
48. Brezinski, M.E., et al., *Optical coherence tomography : principles and applications*. 2006, Amsterdam ; Boston: Academic Press.
49. Hirose, T., et al., *Comparison of Retention Behavior between Supercritical Fluid Chromatography and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Various Stationary Phases*. Molecules, 2019. **24**(13): p. 2425.
50. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2021: Elsevier.
51. Lu, M., et al., *Hydrophobic Fractionation Enhances Novel Protein Detection by Mass Spectrometry in Triple Negative Breast Cancer*. Journal of Proteomics & Bioinformatics, 2017. **03**(02): p. 029-038.
52. Kadakeri, S., et al., *Protein synthesis and characterization*. 2020, Elsevier. p. 121-161.
53. Sillanpää, M.E.T. and ScienceDirect, *Natural organic matter in water : characterization and treatment methods*. First edition. ed. 2015, Oxford, England: Butterworth-Heinemann.
54. Jurica, J., et al., *HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **852**(1-2): p. 571-7.
55. Liang, H., Q. Yuan, and M. Liu, *Simultaneous determination of glucoraphanin and sulforaphane in Brassica oleracea seeds by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detector*. Nat Prod Res, 2013. **27**(2): p. 194-7.
56. Firoznejhad, M., et al., *Formulation and In Vitro Efficacy Assessment of Teucrium marum Extract Loading Hyalurosomes Enriched with Tween 80 and Glycerol*. Nanomaterials, 2022. **12**(7): p. 1096.
57. Bertini, S., et al., *Application of An Improved HPLC-FL Method to Screen Serine Palmitoyl Transferase Inhibitors*. Molecules, 2017. **22**(7): p. 1198.
58. Anderson, J.L., et al., *Analytical Separation Science*. First edition. ed. 2015, Weinheim: Wiley-VCH.
59. Llabot, J.M., et al., *HPLC method for the determination of nystatin in saliva for application in clinical studies*. J Pharm Biomed Anal, 2007. **45**(3): p. 526-30.
60. Marzuka, K. and D. Mohamed Hassan, *VALIDATION OF A BIOANALYTICAL REVERSE-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE QUANTITATION OF NYSTATIN IN AN ANIMAL MODEL AFTER INTRANASAL IN SITU GEL ADMINISTRATION*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2020: p. 180-184.
61. Reis, C.P., et al., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine, 2006. **2**(1): p. 8-21.
62. Pandey, S., et al., *A Recent Update: Solid Lipid Nanoparticles for Effective Drug Delivery*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2021.
63. Duong, V.A., T.T. Nguyen, and H.J. Maeng, *Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method*. Molecules, 2020. **25**(20).

64. Pietkiewicz, J., M. Sznitowska, and M. Placzek, *The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates*. Int J Pharm, 2006. **310**(1-2): p. 64-71.
65. Bradshaw, R.A. and P.D. Stahl, *Encyclopedia of cell biology*. 2016, Waltham, MA: Elsevier Science.
66. Ahmad, M. and X. Xu, *Polar lipids : biology, chemistry, and technology*. 2015, Urbana, Illinois: AOCS Press.
67. Borges, F.T.P., G. Papavasiliou, and F. Teymour, *Synthesis of Polyphosphate-Loaded Nanoparticles Using Inverse Miniemulsion Polymerization for Sustained Delivery to the Gastrointestinal Tract*. Macromolecular Reaction Engineering, 2019. **13**(2): p. 1800068.
68. Mouzouvi, C.R.A., et al., *Surface active properties of lipid nanocapsules*. PLOS ONE, 2017. **12**(8): p. e0179211.
69. Jennings, V. and S.H. Gohla, *Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN)*. J Microencapsul, 2001. **18**(2): p. 149-58.
70. Obaidat, A.A. and R.M. Obaidat, *Controlled release of tramadol hydrochloride from matrices prepared using glyceryl behenate*. Eur J Pharm Biopharm, 2001. **52**(2): p. 231-5.
71. Jannin, V., et al., *Comparative study of the lubricant performance of Compritol 888 ATO either used by blending or by hot melt coating*. Int J Pharm, 2003. **262**(1-2): p. 39-45.
72. Owen, S.C., R.C. Rowe, and P.J. Sheskey, *Handbook of pharmaceutical excipients : edited by Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Siñ C. Owen*. 5th ed. 2006, London ; Greyslake, IL

Washington, DC: Pharmaceutical Press

American Pharmacists Association. xxi, 918 p. : ill.

73. Fini, A., et al., *Theophylline-loaded compritol microspheres prepared by ultrasound-assisted atomization*. J Pharm Sci, 2011. **100**(2): p. 743-57.
74. Aburahma, M.H. and S.M. Badr-Eldin, *Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals*. Expert Opin Drug Deliv, 2014. **11**(12): p. 1865-83.
75. Morin, G. and L. Briens, *The Effect of Lubricants on Powder Flowability for Pharmaceutical Application*. AAPS PharmSciTech, 2013. **14**(3): p. 1158-1168.
76. Barakat, N.S., I.M. Elbagory, and A.S. Almurshedi, *Controlled-Release Carbamazepine Granules and Tablets Comprising Lipophilic and Hydrophilic Matrix Components*. AAPS PharmSciTech, 2008. **9**(4): p. 1054-1062.
77. Kallakunta, V.R., et al., *Effect of formulation and process variables on lipid based sustained release tablets via continuous twin screw granulation: A comparative study*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **121**: p. 126-138.
78. Liu, Y., M. Inaba, and K. Matsuoka, *Catalytic Deoxygenation of Hexadecyl Palmitate as a Model Compound of Euglena Oil in H₂ and N₂ Atmospheres*. Catalysts, 2017. **7**(11): p. 333.
79. Fanguiero, J.F., et al., *Thermodynamic behavior of lipid nanoparticles upon delivery of Vitamin E derivatives into the skin: in vitro studies*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2012. **108**(1): p. 275-282.
80. Sznitowska, M., et al., *The effect of a lipid composition and a surfactant on the characteristics of the solid lipid microspheres and nanospheres (SLM and SLN)*. Eur J Pharm Biopharm, 2017. **110**: p. 24-30.
81. Mondal, B., et al., *Development of a simple high performance liquid chromatography (HPLC)/evaporative light scattering detector (ELSD) method to determine Polysorbate 80 in a pharmaceutical formulation*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2020. **28**(3): p. 325-328.
82. Wang, Y., et al., *Characterization and body distribution of beta-elemene solid lipid nanoparticles (SLN)*. Drug Dev Ind Pharm, 2005. **31**(8): p. 769-78.
83. Banasaz, S., et al., *Encapsulation of Lipid-Soluble Bioactives by Nanoemulsions*. Molecules, 2020. **25**(17).

84. Siddiqui, A., et al., *Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM)*. Pharm Dev Technol, 2014. **19**(3): p. 342-6.
85. Musielak, E., A. Feliczak-Guzik, and I. Nowak, *Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis*. Molecules, 2022. **27**(7).
86. Ashizawa, K., *Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS)*. YAKUGAKU ZASSHI, 2019. **139**(2): p. 237-248.
87. Bailey-Hytholt, C.M., et al., *Formulating and Characterizing Lipid Nanoparticles for Gene Delivery using a Microfluidic Mixing Platform*. J Vis Exp, 2021(168).
88. Ming, Y., et al., *Preparation of polyurea/melamine formaldehyde double-layered self-healing microcapsules and investigation on core fraction*. J Microencapsul, 2016. **33**(4): p. 307-14.
89. Mehnert, W. and K. Mader, *Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**(2-3): p. 165-96.
90. Gaumet, M., et al., *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): p. 1-9.
91. Helgason, T., et al., *Formation of transparent solid lipid nanoparticles by microfluidization: influence of lipid physical state on appearance*. J Colloid Interface Sci, 2015. **448**: p. 114-22.
92. Clogston, J.D. and A.K. Patri, *Zeta potential measurement*. Methods Mol Biol, 2011. **697**: p. 63-70.
93. Babu, S.V., S.V. Babu, and Knoel, *Advances in chemical mechanical planarization (CMP)*. Woodhead publishing series in electronic and optical materials number 86. 2016, Waltham, MA: Woodhead Publishing.
94. Kedmi, R., N. Ben-Arie, and D. Peer, *The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation*. Biomaterials, 2010. **31**(26): p. 6867-75.
95. Durowoju, I.B., et al., *Differential Scanning Calorimetry - A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen*. J Vis Exp, 2017(121).
96. Bunjes, H. and T. Unruh, *Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(6): p. 379-402.
97. Massella, D., et al., *Functionalization of Cotton Fabrics with Polycaprolactone Nanoparticles for Transdermal Release of Melatonin*. J Funct Biomater, 2017. **9**(1).
98. Pathak, Y. and N. Islam, *Handbook of lung targeted drug delivery systems : recent trends and clinical evidences*. 1st ed. 2021, Boca Raton: CRC Press.
99. Shah, M. and K. Pathak, *Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2(3) full-factorial design*. AAPS PharmSciTech, 2010. **11**(2): p. 489-96.
100. Santos-Magalhaes, N.S., et al., *Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **208**(1-2): p. 71-80.
101. Garvin, A.M. and A. Fritsch, *Purifying and concentrating genomic DNA from mock forensic samples using Millipore Amicon filters*. J Forensic Sci, 2013. **58** Suppl 1: p. S173-5.
102. Garms, B.C., et al., *Evaluating the effect of synthesis, isolation, and characterisation variables on reported particle size and dispersity of drug loaded PLGA nanoparticles*. Materials Advances, 2021. **2**(17): p. 5657-5671.
103. Wissing, S.A., O. Kayser, and R.H. Muller, *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(9): p. 1257-72.
104. Sastri, T.K., et al., *Novel Gels: An Emerging Approach for Delivering of Therapeutic Molecules and Recent Trends*. Gels, 2022. **8**(5): p. 316.

105. Samein, L.H., *PREPARATION AND EVALUATION OF NYSTATIN LOADED-SOLID-LIPID NANOPARTICLES FOR TOPICAL DELIVERY*. 2014, International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences: Madhya Pradesh, India. p. 592-597.
106. Safitri, F.I., D. Nawangsari, and D. Febrina. *Overview: Application of Carbopol 940 in Gel*. Atlantis Press.
107. Gilani, S.J., et al., *Formulation and Evaluation of Nano Lipid Carrier-Based Ocular Gel System: Optimization to Antibacterial Activity*. Gels, 2022. **8**(5): p. 255.
108. Miller, J.N., J.C. Miller, and Dawsonera, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Sixth edition. ed. 2010, Harlow, England: Prentice Hall.
109. Kulawik-Pióro, A., J. Kurpiewska, and A. Kułaszka, *Rheological and sensory properties of hydrophilic skin protection gels based on polyacrylates*. International Journal of Occupational Safety and Ergonomics, 2018. **24**(1): p. 129-134.

6 ANEXOS



Figura 37- UltiMate™ 3000,
DIONEX com coluna

Thermo Scientific™
Coluna Acclaim™ 120 C18.



Figura 38 - (a) soluções padrão obtidas (10,3; 16,3; 20,3; 25,1; 31,1; 35,5 µg/mL, da esquerda para a direita, respectivamente); (b) soluções stock obtidas (10,3; 16,3; 20,3; 25,1; 31,1; 35,5 µg/mL, da esquerda para a direita, respectivamente).

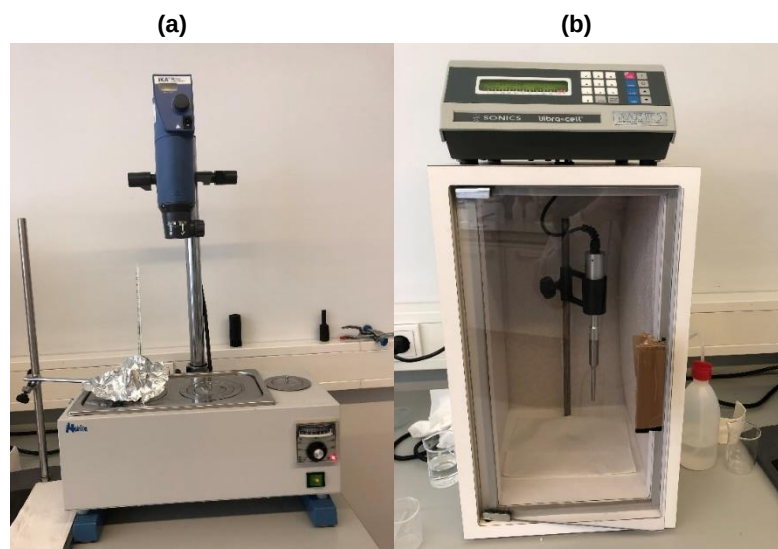


Figura 39- Aparelhos utilizados para o método de homogeneização a alta velocidade e ultrassonificação. (a) homogeneizador de elevada velocidade, ultra-turrax T 25 (IKA Labortechnik); (b) Ultrasonificador (Vibro Cell VCX 130, Sonics & Materials).

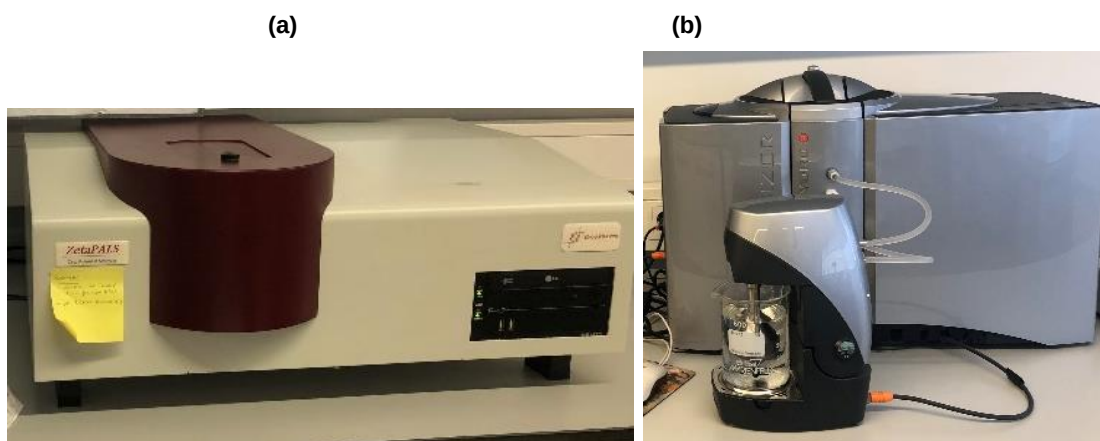


Figura 40 – (a) aparelho de dispersão dinâmica da luz (DLS- Dynamic Light Scattering, ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville); (b) aparelho de difração laser (LD- Laser Diffraction, Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument).



Figura 41 - DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH



Figura 42 - Gako unguator (Instituto galenico, S.A.).

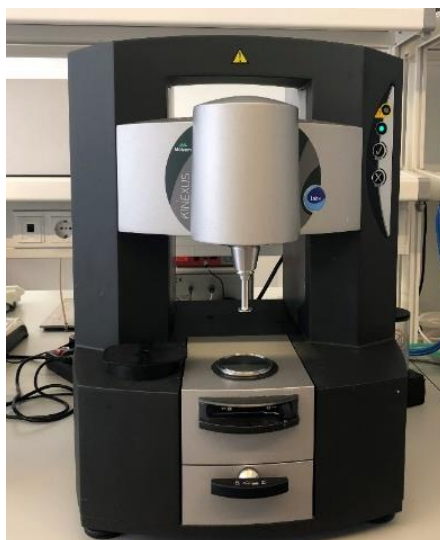


Figura 43 - Reómetro (Kinexus lab+, Malvern).



Figura 44 - À esquerda, formulação de NPs constituídas por Precirol ATO 5 e, à direita, formulação de SLNs PREC-NIS.

Caracterização das NPs

Tabela XX - Registo do tamanho, potencial zeta (PZ) em função dos diferentes valores de velocidade (RPM) e tempo (min) em fase oleosa (FO) e para as duas fases (DF). A negrito estão representados os valores escolhidos com base no diâmetro médio e no valor de PZ.

	Compritol 888 ATO		Precirol		Cetil Palmitato	
F1	Velocidade (FO)	12000	Velocidade (FO)	12000	Velocidade (FO)	12000
	Tempo (FO)	7	Tempo (FO)	7	Tempo (FO)	7
	Velocidade (DF)	15000	Velocidade (DF)	15000	Velocidade (DF)	15000
	Tempo (DF)	7	Tempo (DF)	7	Tempo (DF)	7
	Diâmetro NP	395.2	Diâmetro NP	315.8	Diâmetro NP	320.1
	PZ	-24.15	PZ	-23.12	PZ	-24.36
F2	Velocidade (FO)	11600	Velocidade (FO)	9000	Velocidade (FO)	9000
	Tempo (FO)	7	Tempo (FO)	7	Tempo (FO)	8
	Velocidade (DF)	14000	Velocidade (DF)	13000	Velocidade (DF)	15000
	Tempo (DF)	8	Tempo (DF)	5	Tempo (DF)	7
	Diâmetro NP	386.0	Diâmetro NP	295.6	Diâmetro NP	350.5
	PZ	-24.36	PZ	-26.47	PZ	-20.42

Doseamento de nistatina

Tabela XXI - Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria) para a escolha dos solventes (ACN ou MeOH). Eluentes: ACN ou MeOH: H₂O pH 3; 70:30 (v/v).

		Escolha dos eluentes	
		ACN	MeOH
t_r	Média	1.814	6.690
	c.v.	6%	0.021%
Área	Média	6.142	7.963
	c.v.	0.058%	0.048%
Altura	Média	64.12	22.960
	c.v.	0.078%	0.065%
Pratos Teóricos	Média	2361.333	2500.167
	c.v.	0.01173%	0.055%
Simetria	Média	1.303	1.647
	c.v.	0.0177%	0.014%
k'	Média	0.7143	5.590
	c.v.	0.0071%	0.025%

Tabela XXII - Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria) para diferentes % de MeOH

		% de MeOH					
		65	70	75	80	85	90
t_r	Média	15.249	6.690	3.735	2.494	2.238	2.031
	c.v.	0.003%	0.021%	0.001%	0.001%	0.001%	0.008%
Área	Média	8.090	7.963	7.863	7.717	7.721	8.254
	c.v.	0.092%	0.048%	0.001%	0.029%	0.033%	0.019%
Altura	Média	10.710	22.960	38.180	57.133	65.993	49.480
	c.v.	0.068%	0.065%	0.004%	0.015%	0.007%	0.057%
Pratos Teóricos	Média	2581.333	2500.167	2238.667	2294.000	2690.667	1149.667
	c.v.	0.048%	0.085%	0.010%	0.008%	0.011%	0.111%
Simetria	Média	1.807	1.647	1.637	1.557	1.670	2.240
	c.v.	0.026%	0.014%	0.009%	0.020%	0.067%	0.029%
k'	Média	14.149	5.590	2.635	1.394	1.138	0.934
	c.v.	0.003%	0.025%	0.002%	0.002%	0.002%	0.025%

Tabela XXIII - Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria) para os dois volumes de injeção estudados (1 e 10)

		Volume de injeção (μ L)	
		1	10
t_r	Média	6,263333	5,808
	c.v.	0,009349%	0,008918%
Área	Média	100	98,23
	c.v.	0%	0,000269%
Pratos Teóricos	Média	3325,667	939,3333
	c.v.	0,02185%	0,010449%
Altura	Média	13,78333	93,80333
	c.v.	0,01702%	0,008493%
Simetria	Média	1,51	2,943333
	c.v.	0,010833%	0,001019%

Tabela XXIV - Tempos de corrida (min) em comparação às percentagens de MeOH na fase móvel

Tempo corrida (min)	Fase Móvel
17	65% MeOH 35% H ₂ O pH 3
8	70% MeOH 30% H ₂ O pH 3
10	70% MeOH 30% H ₂ O pH 3
8	75% MeOH 25% H₂O pH 3
8	80% MeOH 20% H ₂ O pH 3
6	85% MeOH 15% H ₂ O pH 3
6	90% MeOH 10% H ₂ O pH 3

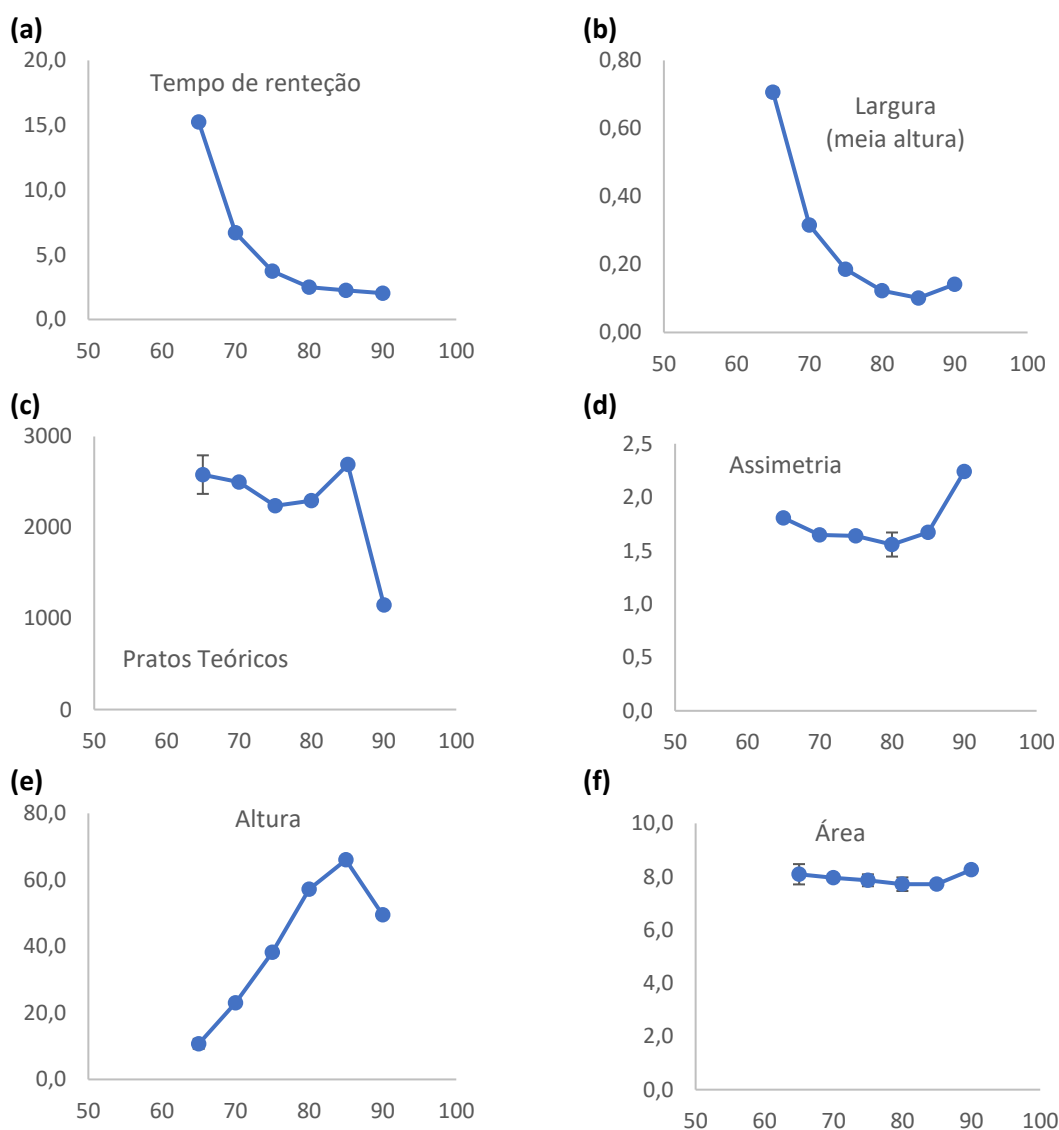


Figura 45 - Tempo de retenção - t_r , largura, pratos teóricos, simetria, altura e área obtidos em função da percentagem de fase orgânica, respetivamente, (a); (b); (c); (d); (e); (f), para determinação do valor de k' . No gráfico, no eixo horizontal está representado as % de MeOH e no eixo do vertical está representado os valores de cada um dos parâmetros.