



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS
SÓLIDAS BASEADAS EM MANTEIGA DE MURUMURU (*Astrocaryum murumuru* Mart.)
PARA APLICAÇÃO TÓPICA.**

BRASÍLIA
2021

WALBERSON DA SILVA REATGUI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS
SÓLIDAS BASEADAS EM MANTEIGA DE MURUMURU (*Astrocaryum murumuru* Mart.)
PARA APLICAÇÃO TÓPICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva.

BRASÍLIA

2021

WALBERSON DA SILVA REATGUI

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS
SÓLIDAS BASEADAS EM MANTEIGA DE MURUMURU (*Astrocaryum murumuru* Mart.)
PARA APLICAÇÃO TÓPICA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva
(Orientadora)

Prof. Dra. Sonia Nair Bao
(Membro Titular)

Profa. Dra. Kariane Mendes Nunes
(Membro Titular)

Dra. Patrícia Bento da Silva
(Suplente)

BRASÍLIA
2021

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por ter me amparado e me dado a capacidade de vencer e continuar nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais e irmão Jovenita da Silva, Waldson Reatgui e Willian Reatgui, por sempre acreditarem em minha capacidade e me auxiliar em tudo que foi necessário para chegar até aqui. Isso só me fortaleceu nos dias bons e maus.

Aos amigos que a Universidade de Brasília me concedeu, especialmente: Victor Mello, Gabriel Ribeiro e Marina Radicchi, que se tornaram verdadeiros amigos fazendo com que o trabalho se tonasse mais leve e feliz. Foi bom poder contar com vocês.

Ao Prof. Ricardo Azevedo, aos colegas do laboratório de nanobiotecnologia e aos Professores do PPG-Nano que contribuíram para a formação de conhecimento, pela disponibilidade, simpatia e gentileza nas aulas ministradas e pelas conversas nos corredores.

À Prof.^a Dra. Jaqueline Rodrigues, minha orientadora que sempre esteve comigo me incentivando a buscar e alcançar meus objetivos através do seu exemplo humano e profissional. Eu serei eternamente grato a vocês, pois são pessoas incríveis. A todos o meu sincero e profundo Muito Obrigado!

RESUMO

A manteiga vegetal de murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart), oriunda da Amazônia, apresenta características adequadas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos, devido sua composição química rica em ésteres de ácidos graxos, o que confere propriedades anfifílica e biodegradável, tornando-a um importante excipiente na composição dos sistemas como emulsões e nanoemulsões. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas coloidais com uma estrutura morfológica esférica formada por duas camadas, uma externa composta por tensoativos e outra interna chamada de núcleo, composto por lipídeos no estado sólido com tamanho médio de aproximadamente 10 e 1000 nm. Apresentam diversas vantagens quando comparada a sistemas de liberação de fármaco convencional, pois podem alcançar locais de difícil acesso, além da possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas. Diante disso, a aplicação da nanobiotecnologia aos recursos naturais de modo sustentável, a exemplo das NLS propostas neste trabalho, pode agregar valor à matéria prima, impulsionando a criação de ambientes favoráveis a inovação e sustentabilidade. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar NLS baseadas em manteiga de murumuru contendo metronidazol e curcumina, incorporadas em hidrogéis. As NLS foram obtidas pelo método de inversão de fases seguido de ultrasonicação, analisadas quanto as características organolépticas, tamanho da partícula, polidispersão (PDI), carga de superfície (potencial zeta), estabilidade, capacidade de incorporação de fármaco, morfologia, incorporação em formulações de hidrogéis (Carbopol® e Hidroxietilcelulose), viscosidade, ensaio microbiológico, eficiência de encapsulação e cinética de liberação dos fármacos. Os resultados demonstraram que a manteiga de murumuru é um componente promissor para a obtenção das NLS com tamanhos inferiores a 200 nm ($172,3 \pm 1,124$ nm -DLS e $124,6 \pm 2,5$ -ARN), formas esféricas e com boa estabilidade. Os géis contendo metronidazol e curcumina encapsuladas em NLS demonstraram aspecto homogêneo sem formação de grumos; no estudo da viscosidade, as formulações foram caracterizadas como fluídos não-Newtonianos do tipo pseudoplástico, adequado para fácil aplicação tópica. As amostras testadas inibiram o crescimento microbiano e apresentaram uma eficiência de encapsulação de 98,4% com um perfil de liberação controlada dos fármacos. Ademais, conclui-se que as NLS incorporadas nos hidrogéis mantiveram suas características físico-químicas e macroscópicas estáveis para o desenvolvimento futuro de um gel tópico.

ABSTRACT

Vegetable murumuru butter (*Astrocaryum murumuru* Mart), from the Amazon, has adequate characteristics for the development of pharmaceutical and cosmetic products, due to its chemical composition rich in fatty acid esters, which gives it amphiphilic and biodegradable properties, making it an important excipient in the composition of systems such as emulsions and nanoemulsions. Solid lipid nanoparticles (SLN) are colloidal systems with a spherical morphological structure formed by two layers, one external composed of surfactants and another internal called a nucleus, composed of lipids in the solid state with an average size of approximately 10 and 1000 nm. They present several advantages when compared to conventional drug delivery systems, as they can reach places of difficult access, in addition to the possibility of incorporating hydrophilic and lipophilic substances. Therefore, the application of nanobiotechnology to natural resources in a sustainable way, like the SLN proposed in this work, can add value to the raw material, driving the creation of environments favorable to innovation and sustainability. This work aimed to develop and characterize SLN based on murumuru butter containing metronidazole and curcumin, incorporated in hydrogels. The SLN were obtained by the phase inversion method followed by ultrasonication, analyzed for organoleptic characteristics, particle size, polydispersion (PDI), surface charge (zeta potential), stability, drug incorporation capacity, morphology, incorporation in formulations hydrogels (Carbopol® and Hydroxyethylcellulose), viscosity, microbiological assay, encapsulation efficiency and drug release kinetics. The results showed that murumuru butter is a promising component for obtaining SLN with sizes less than 200 nm (172.3 ± 1.124 nm -DLS and 124.6 ± 2.5 -NTA), spherical shapes and with good stability. The gels containing metronidazole and curcumin encapsulated in NLS demonstrated a homogeneous appearance without the formation of lumps; in the study of viscosity, the formulations were characterized as non-Newtonian fluids of the pseudoplastic type, suitable for easy topical application. The tested samples inhibited microbial growth and presented an encapsulation efficiency of 98.4% with a controlled drug release profile. Furthermore, it is concluded that the SLN incorporated in the hydrogels maintained their physico-chemical and macroscopic characteristics stable for the future development of a topical gel.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: LINHA DO TEMPO DOS PRINCIPAIS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS USADOS NA ENTREGA DE FÁRMACOS AO LONGO DA HISTÓRIA. ADAPTADO DE SHI ET AL., 2010.	16
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UMA NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA.	17
FIGURA 3: PRINCIPAIS VIAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA PELE. (1) VIA TRANSEPIDÉRMICA; (2) VIA TRANSFOLICULAR; (3) PASSAGEM DE MOLÉCULAS ATRAVÉS DAS GLÂNDULAS SUDORÍPARAS (ADAPTADO DE VIEIRA, 2013).	19
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO METRONIDAZOL.....	20
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DOS CURCUMINOIDES ENCONTRADOS EM <i>CURCUMA LONGA</i> L. SENDO (I) CURCUMINA; (II) DEMETOXICURCUMINA E (III) BIS-EMETOXICURCUMINA.	22
FIGURA 6: MICROGRAFIAS TIRADAS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO E FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BASEADO NAS MICROGRAFIAS: (A) NLS-VAZIA; (B) NLS MET; (C) NLS CURCUMINA E (D) NLS MET+CUR.....	35
FIGURA 7: VISCOSIDADE DOS GÉIS DE CARBOPOL E HIDROXIETILCELULOSE.....	38
FIGURA 8: VISCOSIDADE DOS GÉIS DE CARBOPOL CONTENDO DIFERENTES VOLUMES DE NLS.	39
FIGURA 9: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CURCUMINA OBTIDO POR ESPECTROFOTÔMETRO.....	40
FIGURA 10: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE METRONIDAZOL OBTIDO POR ESPECTROFOTÔMETRO.	40
FIGURA 11: PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA E METRONIDAZOL NANOENCAPSULADOS OBTIDO PELO MÉTODO DE DIÁLISE.	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA O PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PELA TÉCNICA DE TEMPERATURA DE INVERSÃO DE FASE (PIT) E AS DIFERENTES ENERGIAS APLICADAS NA PREPARAÇÃO.	24
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DO GEL BASE DE CARBOPOL.	27
TABELA 3: COMPOSIÇÃO DO GEL BASE DE HIDROXIETILCELULOSE.	27
TABELA 4: RESULTADOS DE TAMANHO, PDI, POTENCIAL ZETA E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DAS NANOPARTÍCULAS.....	31
TABELA 5: RESULTADOS DE TAMANHO, PDI, POTENCIAL ZETA E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DAS NANOPARTÍCULAS.....	32
TABELA 6: RESULTADOS OBTIDOS APÓS A CARACTERIZAÇÃO COLOIDAL POR ARN.....	34
TABELA 7: : MÉDIA DO DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (MM) FRENTE A <i>CANDIDA ALBICANS</i> ; <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> , <i>S. AUREUS</i> E <i>E. COLI</i> ; CONTROLE (GEL DE CARBOPOL); GN (GEL COM NLS); GN MET+CUR (GEL COM NLS METRONIDAZOL E CURCUMINA); GN MET (GEL COM NLS MAIS METRONIDAZOL); N-M+C (NLS MAIS METRONIDAZOL E CURCUMINA); N-MET (NLS MAIS METRONIDAZOL) E N-CUR (NLS CURCUMINA).	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARN - Análise de rastreamento de nanopartículas

Cur – Curcumina

DDS - Drug Delivery Systems

DLS - Espalhamento dinâmico de luz

EDTA – Ácido Etilenodiamino

EE: Eficiência de encapsulação

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

Met - Metronidazol

MetOH - Metanol

NaOH – Hidróxido de Sódio

NLS - Nanopartículas lipídicas sólidas

NLS vazia – Nanopartícula sem fármaco

NLS Curcumina – Nanopartícula com curcumina

NLS Met – Nanopartícula com metronidazol

NLS Met+Cur – Nanopartícula com metronidazol e curcumina

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PDI - Índice de polidispersidade

PIT - Temperatura inversão de fase

q.s.p. - Quantidade suficiente para preparo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	15
MURUMURU (<i>Astrocaryum murumuru</i> Mart)	15
NANOTECNOLOGIA	15
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	17
APLICAÇÃO TÓPICA	18
METRONIDAZOL	20
CURCUMINA	21
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
MATERIAL	24
MÉTODOS	24
Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....	24
Caracterização organoléptica das NLS	25
Caracterização Físico Química das NLS	25
Determinação de tamanho, índice de polidispersidade e carga de superfície (potencial zeta)	25
Análise de rastreamento de nanopartículas (ARN).....	26
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	26
Obtenção de géis mucoadesivos contendo NLS	26
Estudo da estabilidade das NLS e dos géis	27
Análise de Viscosidade	28
Avaliação da atividade antimicrobiana dos géis mucoadesivos contendo NLS	28
Quantificação do Metronidazol e Curcumina (RAPALLI et al., 2020).....	29
Curva de calibração - Metronidazol.....	29
Curva de calibração - Curcumina.....	29
Eficiência de encapsulação	29
Estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações contendo metronidazol e curcumina.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
Obtenção e Caracterização da NLS	31
Análise de rastreamento de nanopartículas (ARN).....	33

Microscopia eletrônica de transmissão	34
Avaliação da atividade antimicrobiana dos géis contendo NLS.....	35
Análise de Viscosidade do Géis.....	37
Estudo da estabilidade.....	39
Eficiência de encapsulação	39
Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas lipídicas sólidas contendo metronidazol e curcumina	41
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os problemas ambientais e as mudanças dos paradigmas de saúde pública estão servindo como estímulo para consumidores sobre a mudança necessária dos sistemas de cadeias produtivas na geração de bioprodutos pelos setores industriais farmacêuticos, cosméticos e biotecnológicos, uma vez que existe um grande apelo mercadológico por parte dos consumidores, que passam a ter um consumo mais consciente e responsável (LERIPIO & LERIPIO, 2015; UBANDO et al., 2020).

A região Amazônica apresenta uma biodiversidade com enorme potencial para o desenvolvimento de produtos de origem natural baseado em uma cadeia produtiva sustentável. Os principais insumos inovadores de origem vegetal com interesse industrial são as manteigas, os óleos e as gorduras, como por exemplo a manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e o óleo de buriti (*Mauritia flexuosa L.*) utilizados nos diferentes setores da indústria, dentre elas destaca-se a gordura vegetal de murumuru (BARATA, 2005).

A manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), um dos destaques na produção de bioprodutos, é extraída das sementes de *A. murumuru* e apresenta uma composição química rica em ésteres de ácidos graxos como láurico, mirístico e oleico, os quais conferem à manteiga uma característica anfifílica, a qual permite a sua aplicação na obtenção de sistemas emulsionados, tais como sistemas de liberação de fármacos líquido cristalinos e nanoparticulados, com propensão de ser um emoliente natural, com capacidade inodora, de reter água, além de nutrir tecidos celulares em estado de recuperação (NASCIMENTO et al., 2007; LIMA et al., 2017; NEVES et al., 2018). Além disso, suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade garantem o emprego seguro no desenvolvimento de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (ROSSAN, 2011; MENEZES, 2012).

A produção e aplicação de estruturas biológicas ou não biológicas na escala nanométrica, chamada de nanotecnologia (SAHOO, et al., 2007) possui ferramentas aplicáveis nas diferentes áreas da ciência desde a engenharia, medicina e farmácia; que promovem o aprimoramento dos sistemas de liberação e entrega de fármacos. Atualmente, o grande gargalo na indústria farmacêutica é a busca por alternativas tecnológicas que possam otimizar os aspectos biofarmacêuticos na produção de medicamentos e novas formas farmacêuticas (ETHERIDGE et al., 2012).

Os sistemas em escala nano, como nanopartículas metálicas (ouro, óxido de ferro, prata), nanocarreadores baseados em lipídeos, nanopartículas poliméricas, e nanotubos de carbono, apresentam características funcionais únicas, que não são encontradas em outras escalas dimensionais (CHAU et al., 2007). É sabido que formulações farmacêuticas quando associadas a tecnologia nanométrica possibilitam vantagens tecnológicas avançadas quando comparadas aos sistemas de

liberação convencionais (pomadas, cápsulas gelatinosas, comprimidos), tais como diminuição da dosagem convencional e absorção irregular de medicamentos, liberação prematura medicamentosa, aumento do tempo de permanência da formulação e eficácia terapêutica, controle deficiente da cinética de liberação além da possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas (JEBORS et al., 2010; KUMAR et al., 2020).

Dentre os sistemas nanométricos lipídicos desenvolvidos, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), que são sistemas coloidais disperso em um meio aquoso, estabilizado por surfactantes, e utilizados para encapsular, proteger e distribuir compostos lipofílicos funcionais (HOU et al., 2003; HELGASON et al., 2009; JESUS et al., 2015; PALIWAL et al., 2020). Apresentam uma estrutura morfológica esférica formada por duas camadas, uma externa composta por tensoativos e outra interna chamada de núcleo, composto por lipídeos no estado sólido. Por possuírem um tamanho na escala nanométrica aproximadamente entre 10 e 1000 nm e biocompatibilidade, são capazes de proteger substâncias ativas da degradação e modular a liberação do fármaco no local de ação (WANG et al., 2015; LINGAYAT et al., 2017).

As NLS são amplamente utilizadas para aplicação tópica, principalmente pela indústria cosmética, uma vez que a matriz lipídica possui grande interação com o estrato córneo, tendo maior penetração devido as características anatômicas e fisiológicas da pele, formando uma camada oclusiva e possibilitando a permeação do fármaco (DUBEY et al., 2012).

O tratamento destas desordens epiteliais consiste na aplicação de pomadas, cremes, loções e géis contendo agentes anti-inflamatórios e antibióticos. Entretanto, essas formas farmacêuticas convencionais apesar de serem comumente utilizadas podem apresentar problemas de execução dependendo do local de aplicação como a desestruturação física da formulação, baixa adesão ao epitélio, lixiviação salivar na mucosa bucal resultando em menor tempo de residência, além de causar reações adversas por propriedades intrínsecas dos fármacos tornando o tratamento ineficaz (SALAMAT-MILLER et al., 2005; ENSIGN et al., 2012).

Nanopartículas baseados em lipídeos sólidos possuem fluxo adequado e boa adesão, quando incorporadas em formulações poliméricas, o que contribui para uma fácil aplicação, aumento do tempo de retenção da formulação no local de aplicação e possibilita uma liberação sustentada de fármacos (ZHENG, 2016; KUMAR et al., 2020).

Diversos nanosistemas com produtos naturais estão sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar e gerar novas tecnologias para o uso terapêutico e biomédico. Diante disso, a aplicação da nanobiotecnologia aos recursos naturais de modo sustentável, a exemplo das NLS propostas neste trabalho, pode agregar valor à matéria prima, impulsionando a criação de ambientes favoráveis a inovação, sustentabilidade, além de contribuir para o desenvolvimento sócio econômico da região amazônica, garantindo ao formulador o desenvolvimento de produtos seguros, e ao consumidor, o

uso de produtos de origem natural, corroborando com o apelo mercadológico atual (MORAIS, 2008; LERIPIO & LERIPIO, 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MURUMURU (*Astrocaryum murumuru* Mart)

Astrocaryum murumuru é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, de origem amazônica, mais especificamente no norte do Brasil. É uma espécie disseminada em outros países por sua fácil adaptação a áreas de inundação sazonal, como Bolívia, Colômbia, Peru e Venezuela, no Brasil sua predominância encontra-se principalmente nos estados amazônicos (LOPES et al., 2019).

Esta palmeira conhecida popularmente como murumuruzeiro, possui um crescimento com cerca de 10 a 15 metros de altura, com 17 a 27 cm de diâmetro. Suas folhas são de conformação pinada com variação de tamanho entre 12 a 20 cm. O caule é revestido por longos espinhos pretos, o que dificulta a colheita dos frutos (BEZERRA, 2012).

A manteiga de murumuru é extraída das sementes de *Astrocaryum murumuru*, obtendo-se uma gordura de cor ligeiramente amarela, apresenta uma composição química rica em ésteres de ácidos graxos como láurico, mirístico e oleico, os quais proporcionam à manteiga uma alta ação nutritiva, propensão de um emoliente natural, com capacidade inodora, de reter água mantendo a pele hidratada e protegida, além de nutrir tecidos celulares em estado de recuperação formando uma película protetora. Suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade garantem o emprego seguro no desenvolvimento de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (ROSSAN, 2011; NASCIMENTO et al., 2007; MENEZES, 2012; NEVES et al., 2018).

O consumo regular desta gordura vegetal é utilizado popularmente de forma in natura pelas comunidades tradicionais da Amazônia, como também é empregada em formulações de venda comercial após o processamento da matéria prima para a produção de margarinas pela indústria alimentícia, cremes, loções, máscaras faciais, hidratantes de pele, shampoos, produtos de nutrição capilar entre outros produtos dermocosméticos (BEZERRA, 2012).

Isso é visto no número de pedidos de patentes depositados nos últimos anos por universidades como o pedido BR 102015030888-4 que trata de sistemas líquidos cristalinos contendo como ingrediente base a manteiga de murumuru para liberação de fármacos; e grandes empresas como Natura e L'OREAL, cuja última empresa dispõe do pedido WO 2017/185155 A1 que trata de *nanostructured lipid carriers and methods for making and using them*.

2.2. NANOTECNOLOGIA

Aclamada como a próxima revolução industrial, a nanotecnologia vem crescendo com avanços significativos após estudos provenientes da microscopia de tunelamento em 1981, juntamente com a descoberta de estruturas como fulereno e grafeno, tendo sua maior aplicação na indústria eletrônica, com o desenvolvimento de microprocessadores mais complexos. É uma ciência

em progressão que trabalha com a obtenção, observação e manipulação de materiais na escala do bilionésimo do metro (10^{-9} m) que equivale a 1 nm (TAN et al., 2016; KIM et al., 2010).

A nanotecnologia destaca-se por melhorar as propriedades dos materiais encontrados em escala macro, transformando-os em escala nano com propriedades distintas, isto pode ser atribuído a fatores como por exemplo a relação área/ volume de superfície, que torna o material altamente reativo, mudando seu comportamento quando aplicado em alguns sistemas físico-químicos ou biológicos. Assim, ao longo do tempo, diversos nanomateriais orgânicos e inorgânicos foram desenvolvidos como sistemas terapêuticos eficazes na entrega de fármacos (Figura 1) (RODUNER, 2006; SHI et al., 2010; FARIA-TISCHER et al., 2012).

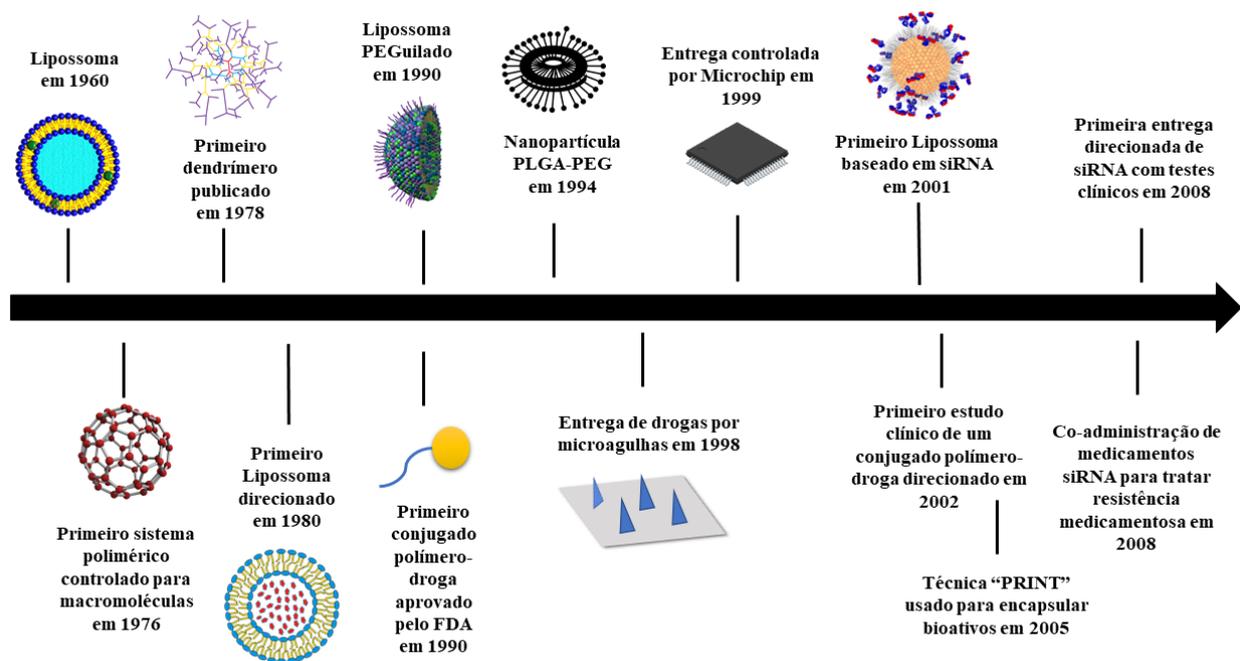


Figura 1: Linha do tempo dos principais sistemas nanoestruturados usados na entrega de fármacos ao longo da história. Adaptado de SHI et al., 2010.

Por possuir uma diversa aplicabilidade, a nanotecnologia surgiu com o propósito de integrar diferentes áreas do conhecimento científico como a química, física, biologia e engenharias; em consequência disso surgiram subáreas, a exemplo da nanomedicina e nanobiotecnologia, que atuam na geração de novos processos terapêuticos para diagnóstico, tratamento e cura de doenças (FARIA-TISCHER et al., 2012; CHHIKARA, 2017).

Os estudos voltados para nanomedicina e a nanobiotecnologia tiveram uma grande importância no desenvolvimento de novos medicamentos e novas formas farmacêuticas com um crescente potencial terapêutico, otimizando técnicas convencionais como medicina regenerativa, criação de nanobiossensores para uso em diagnóstico, imageamento, e nanossistemas de liberação e

entrega de fármacos (do inglês, *Drug Delivery Systems* – DDS) utilizando as nanopartículas metálicas, poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, entre outros (CHHIKARA, 2017; GANESAN et al., 2017; SHARMA et al., 2018).

2.3. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

As nanopartículas lipídicas sólidas foram introduzidas na década 1990 mediante a tendência/apelo mercadológico por produtos de composição natural, sendo uma alternativa mais atraente que os lipossomas (vesículas com bicamada lipídica), nanopartículas poliméricas e emulsões devido as características físico-química dos lipídeos, biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixa toxicidade em sistemas biológicos, além do aumento da biodisponibilidade de drogas, possibilitando modular perfis de liberação em condições adversas (CHHIKARA, 2017).

Nanopartículas lipídicas sólidas são obtidos apenas de lipídeos sólidos, tanto na temperatura corporal quanto na temperatura ambiente, considerados sistemas coloidais efetivos para o transporte de medicamentos hidrossolúveis e lipossolúveis, com tamanho médio correspondente entre 10 e 1000 nm, principalmente entre 150 e 300 nm, podendo ser incorporado em polímeros adequados para uma melhoria do transporte de medicamentos (MUKHERJEE et al., 2009; SAMIMI et al., 2019).

Apresentam uma estrutura morfológica esférica formada por duas camadas, uma externa composta por surfactantes e outra interna chamada de núcleo, composto por lipídeo no estado sólido (Figura 2) (LINGAYAT et al., 2017).



Figura 2: Representação da estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida.

Entretanto, as NLS possuem algumas desvantagens por estarem sujeitas a processos químicos de oxidação lipídica, como a rancificação oxidativa, gelificação irreversível e hidrólise ácida, alterando sua performance macroscópica aplicável (JAISWAL et al., 2016; LINGAYAT et al., 2017).

Estes sistemas são amplamente utilizadas para aplicação tópica, principalmente pela indústria cosmética, uma vez que princípios ativos de caráter lipofílico nanoencapsulados terão maior penetração devido as características anatômicas e fisiológicas da pele, além das propriedades tecnológicas de adesão que este sistema oferece, formando um filme protetor de restauração sobre a pele danificada quando aplicado (MÜLLER et al., 2000; FARJADIAN et al., 2019).

2.4. APLICAÇÃO TÓPICA

A pele é o maior órgão do corpo humano, funcionando como a principal barreira externa do corpo; formado por três principais camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme. Cada camada apresenta função específica de proteção. A epiderme é a camada mais superficial da pele formando a principal barreira contra o exterior. A derme é a camada abaixo da epiderme e tem por principal função conferir ações estruturais para dar força a pele. A hipoderme atua na disposição de células de tecido adiposo para reserva de energia (ZARRINTAJ et al., 2017).

A administração pela via tópica ou cutânea consiste na aplicação de medicamento sobre a superfície cutânea ou mucosa, sendo absorvida pela camada epidérmica para dentro da derme através das principais vias gerais de penetração cutânea: a via anexial e a via transepidérmica que pode subdividir-se nas vias intracelular ou transcelular, e intercelular (Figura 3).

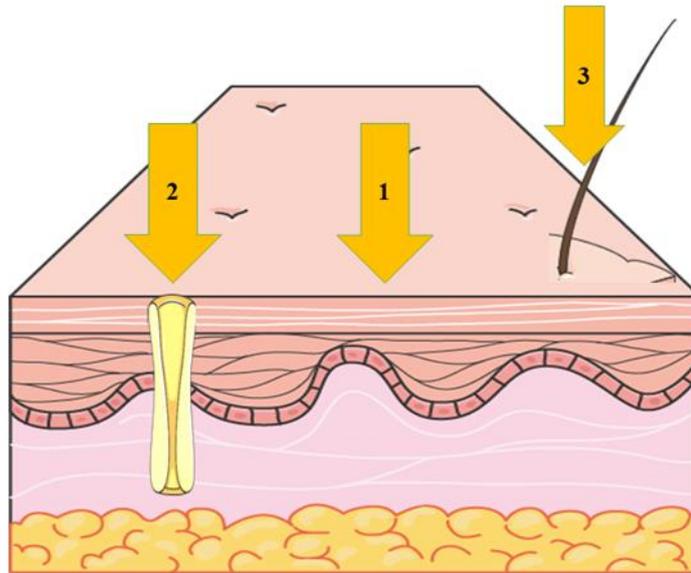


Figura 3: Principais vias de transporte de fármacos através da pele. (1) Via transepidermica; (2) Via transfolicular; (3) Passagem de moléculas através das glândulas sudoríparas (adaptado de Vieira, 2013).

A penetração pela via anexial ocorre através dos anexos presentes na pele como glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos, enquanto na via transepidermica a passagem ocorre pela camada córnea através das células (via intracelular) ou através da matriz lipoproteica (via intercelular) (VIEIRA, 2013).

A administração tópica apesar de não ser muito utilizada devido as barreiras da pele e a dificuldade na velocidade de travessia de fármacos, apresenta vantagens quando comparada a outras vias de administração, pois além de ser um importante local para a absorção de fármacos no tratamento de feridas ou lesões na superfície externa ou interna do corpo (REZAIE et al., 2019), evita o metabolismo hepático de primeira passagem, possui a capacidade de controlar a administração do fármaco por mais tempo, facilidade na autoadministração, conveniência e boa aceitação pelos pacientes, e por apresentar níveis sistêmicos muito baixo, reduz a possibilidade de toxicidade do medicamento (MOODY, 2010; SINGLA et al., 2012).

As formas farmacêuticas de aplicação tópica mais comuns são cremes, pomadas, géis, sprays, e formulações líquidas, que são facilmente encontradas nas prateleiras comerciais, em contrapartida alguns fatores podem limitar o transporte de medicamentos através da pele, como a presença de suor nas glândulas sudoríparas e lipídeos nas glândulas sebáceas, que impedem o transporte de fármacos hidrofílicos, como é o caso do metronidazol, que se desloca contra a via de difusão do fármaco, e também a possibilidade de ocorrência de irritações e reações alérgicas (CHEN et al., 2012; LOURENÇO, 2013).

O surgimento da nanotecnologia trouxe diversos avanços para o âmbito da ciência e tecnologia moderna, atuando principalmente na área de entrega de fármacos em sistemas biológicos de difícil acesso terapêutico, por isso a necessidade de utilizar partículas pequenas que sejam capazes de atravessar o estrato córneo, amplificando seu uso para uma escala industrial devido as aplicabilidades relacionadas a questões terapêuticas e de diagnóstico (ZARRINTAJ et al., 2017).

2.5. METRONIDAZOL

O metronidazol também conhecido pelo nome comercial *Flagyl*[®] (2-metil-5-nitro-imidazol-1-etanol) é um agente antimicrobiano sintético, cuja estrutura básica derivou da azomicina, um nitroimidazol (possui em sua constituição química uma molécula de imidazol com grupo funcional nitro) isolado de *Streptomyces* sp., utilizado pela medicina clínica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos anaeróbios (Figura 4). Este fármaco foi introduzido no mercado no ano de 1959 como a única terapia efetiva contra tricomoníase, uma infecção vaginal causada pelo parasita *Trichomonas vaginalis* (LÖFMARK et al., 2010; LEITSCH, 2019).

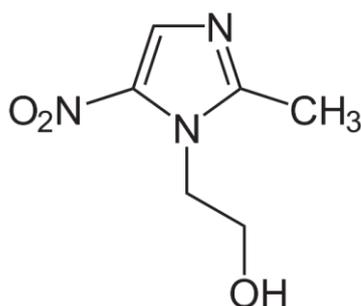


Figura 4: Estrutura química do metronidazol.

Apesar de inicialmente ter sido utilizado contra parasitas, diversos estudos relataram sua eficácia ativa contra bactérias anaeróbicas e microaerofílicas, como *Clostridium* spp., *Helicobacter pylori* e *Bacteroides fragilis*, tendo assim seu espectro de ação contra patógenos ampliado, tornando-se um fármaco indispensável nos arsenais antimicrobianos utilizados atualmente (ALAUZET et al., 2019).

Sua entrada na célula é por difusão passiva na forma de um pró-fármaco, e seu modo de ação é baseado na redução de seu grupo nitro no interior de células bacterianas que possuem nitroreductase, ou seja, concentrações baixas de oxigênio, formando um produto intermediário altamente reativo e citotóxico que reage a vários alvos na célula (modo de ação pleiotrópica), perturbando a maquinaria genômica bacteriana por meio da quebra de DNA sem lise celular, entre outras macromoléculas,

resultando em produtos não tóxicos e inativos. Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado (LEITSCH, 2019; ALAUZET et al., 2019).

Comercialmente o metronidazol está disponível nas formas farmacêuticas de comprimidos e suspensões líquidas, como é o caso do Flagyl[®], e pomadas para tratamento vaginal, tendo sua administração por via oral e tópica. Apresenta ótima eficácia no tratamento de infecções por bactérias anaeróbicas, como infecções intra-abdominais, ginecológicas, infecções ósseas e articulares, infecções na pele, infecções orais e dentárias, entre outros, possui um baixo custo no mercado, além de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas favoráveis, com baixos efeitos adversos (LÖFMARK et al., 2010).

2.6. CURCUMINA

A curcumina (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) é um curcuminoide polifenólico laranja-amarelado isolado de rizomas de *Curcuma longa* L., uma espécie vegetal conhecida popularmente como açafrão da terra, pertencente à família Zingiberaceae. Esta planta tem sido utilizada na medicina tradicional asiática a mais de 4000 anos devido seu alto potencial biológico e farmacológico como ação anti-inflamatória, anti-mutagênica, antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, cicatrizante, imunomodulatório, antirreumática etc., atraindo a atenção de diversos pesquisadores para o uso terapêutico contra diversas patologias como depressão, câncer, ansiedade, infecções, doenças hepáticas e síndromes metabólicas (HEWLINGS et al., 2017; RAUF et al., 2018).

Juntamente com a curcumina, na *Curcuma longa* L, são encontrados outros compostos químicos curcuminoídeos como demetoxicurcumina e bis-emetoxicurcumina, sendo a curcumina o composto majoritário (Figura 5). Entretanto, essas moléculas apresentam algumas características/propriedades que as impedem de se tornarem um medicamento aprovado como baixa bioatividade, biodisponibilidade e instabilidade em soluções aquosas neutras e/ou alcalinas, mesmo diante de estudos comprobatórios de que o uso da curcumina é seguro e tolerável até mesmo em doses muito altas (PANDIT et al., 2015; SALEHI et al., 2019).

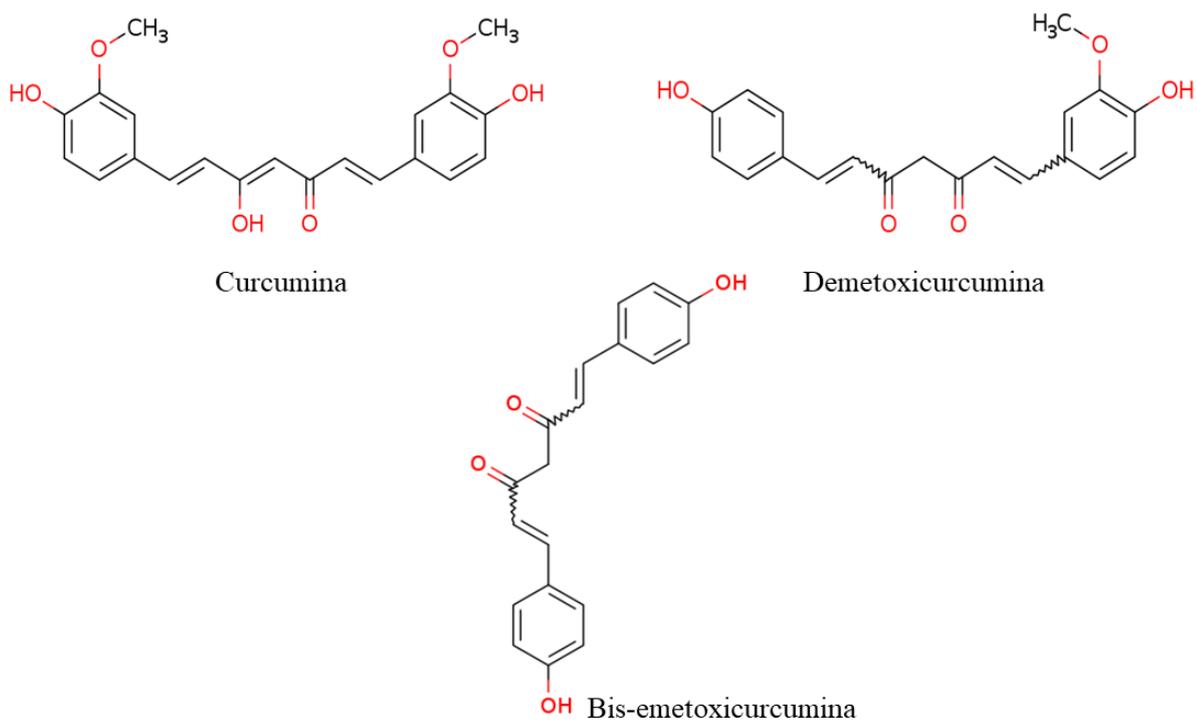


Figura 5: Estrutura química dos curcuminoides encontrados em *Curcuma longa* L. sendo (I) Curcumina; (II) Demetoxicurcumina e (III) Bis-emetoxicurcumina.

Assim, várias estratégias de entrega da molécula como o uso de micelas, dispersões sólidas, nanopartículas a base de polímeros e lipídeos, e lipossomas foram testadas com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade da curcumina em sistemas biológicos, uma vez que apresenta alta capacidade de regular a expressão de diversos alvos moleculares como fatores de transcrição e de crescimento, receptores, citocinas e fatores anti-apoptótico (ZAMARIOLI et al., 2015; MIRZAEI et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar géis poliméricos contendo nanopartículas lipídicas sólidas baseados em manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) com potencial aplicação tópica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas lipídicas sólidas baseadas em murumuru contendo metronidazol e/ou curcumina para aplicação tópica;
- Caracterizar as nanopartículas lipídicas sólidas quanto as características organolépticas;
- Caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas quanto ao tamanho da partícula, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta, morfologia
- Determinar a eficiência de encapsulação do metronidazol e curcumina nas nanopartículas lipídicas sólidas;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas;
- Obter géis poliméricos para incorporação das nanopartículas lipídicas sólidas contendo metronidazol e curcumina;
- Determinar a viscosidade dos géis poliméricos contendo nanopartículas lipídicas sólidas;
- Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana dos géis poliméricos contendo nanopartículas lipídicas sólidas;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do metronidazol e curcumina nanoencapsulados por nanopartículas lipídicas sólidas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.MATERIAL

Pluronic[®] F-127, Polissorbato[®] 80, Tween 20, Metronidazol[®] (Sigma-Aldrich, EUA), Natrozol[®] 250, Carbopol[®] 940 (Sigma-Aldrich, EUA) e curcumina (Sigma-Aldrich, EUA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA; a Manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) foi comprado na Industria Amazon Oil (Pará, Brasil).

4.2.MÉTODOS

4.2.1. Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

As NLS foram preparadas pela da técnica de temperatura inversão de fase – PIT (do inglês, Phase Inversion Temperature) seguida de ultrassonicação, descrita por MÜLLER et al., 2000. Inicialmente foram preparadas quatro formulações baseadas no triângulo ternário para padronização de cada componente (fase oleosa e aquosa) variando as concentrações de (i) água, (ii) manteiga e (iii) mix de tensoativos, além do tipo de energia aplicada (ultrassonicação e Ultra-turrax T-25[®]).

Na Tabela 1 pode-se verificar as composições das formulações preparadas, tendo como fase oleosa a manteiga de murumuru e um mix com proporções de diferentes tensoativos de caráter lipofílico (Tween 20, Pluronic[®] F-127, Cremophor 35 e 1,2-Propilenoglicol), enquanto a fase aquosa era apenas água ultrapura.

Tabela 1: Composição das formulações para o preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas pela técnica de temperatura de inversão de fase (PIT) e as diferentes energias aplicadas na preparação.

Formulações	Fase Oleosa		Fase Aquosa	Energia
	Murumuru	Tensoativo	Água	
F1	15%	5% (Tween 20: Pluronic [®] F-127 1:1)	80%	Ultrassonicador
F2	15%	5% (Cremophor 35: 1,2-Propilenoglicol 3:1)	80%	Ultra Turrax
F3	15%	5% (Cremophor 35: 1,2-Propilenoglicol 3:1)	80%	Ultrassonicador
F4	15%	5% (Tween 20: Pluronic [®] F-127 1:1)	80%	Ultra Turrax

No processo de preparação, a fase oleosa para **F1** e **F4** foi aquecida a 60 °C com agitação magnética constante de 1600 rpm, até fusão dos componentes com posterior adição de Pluronic® F-127. Após fusão e mistura do surfactante, a fase aquosa pré-aquecida a 60 °C foi gotejada na fase oleosa com o auxílio de uma micropipeta. As formulações permaneceram em agitação constante de 1600 rpm por 15 minutos a temperatura de 60 °C. Após este período, a **F1** foi sonicada por dois minutos (Duty Cycle 90%, Output 4) no Ultrasonicador Sonifier 450 (**Branson** Ultrasonics Co., Danbury, CT); e mantida em repouso a temperatura ambiente para resfriamento. A formulação **F4** foi submetida a uma alta agitação de 10.000 rpm no Ultra-turrax T-25® por 5 minutos e posterior resfriamento da mesma a temperatura ambiente.

Nas formulações **F2** e **F3** a fase oleosa compostas por manteiga de murumuru, Cremophor 35 e 1,2- Propilenoglicol, fundidas a 60 °C com agitação magnética de 1600 rpm e posterior dispersão da fase aquosa na fase oleosa, mantendo em agitação por 15 minutos. **F2** foi submetida a agitação de 10.000 rpm por cinco minutos no Ultraturax T-25, enquanto **F3** foi sonicada pelo tempo de dois minutos (Duty Cycle 90%, Output 4) no Ultrasonicador Sonifier 450 (**Branson** Ultrasonics Co., Danbury, CT), após esses processos ambas as formulações permaneceram a temperatura ambiente para resfriamento.

Fármacos modelos como metronidazol e curcumina foram incorporados na fase oleosa das formulações, que apresentaram resultados satisfatórios, na concentração de 10 mg/g e 1 mg/g respectivamente, tendo-se então quatro formulações de trabalho: a) NLS vazia; b) NLS Met; c) NLS Curcumina; d) NLS Met+Cur.

4.2.2. Caracterização organoléptica das NLS

As características organolépticas foram determinadas pela observação da presença de grumos, separação de fases, solidificação, alteração da cor e fluidez; logo após a preparação de cada formulação e a longo prazo (ANVISA, 2007).

4.2.3. Caracterização Físico Química das NLS

4.2.3.1. Determinação de tamanho, índice de polidispersidade e carga de superfície (potencial zeta)

As formulações foram avaliadas em um equipamento ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA) e determinados o tamanho das partículas e índice de polidispersidade (PDI) por espalhamento dinâmico de luz (DLS); e a carga de superfície (potencial zeta) por mobilidade eletroforética. utilizando cubetas

de poliestireno (1cm²), com ângulo fixo de 90 graus. Para a análise, cada formulação foi diluída 1:100 com água ultrapura (v/v) e realizadas análises em triplicata.

4.2.3.2. Análise de rastreamento de nanopartículas (ARN)

O ensaio de ARN foi realizado no Laboratório de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern, UK), e as imagens capturadas foram analisadas utilizando o software NTA 2.0 NanoSight, para a determinação da concentração, distribuição e do tamanho médio das nanopartículas em suspensão. Para a análise de ARN, as amostras foram previamente diluídas em água deionizada a uma proporção de 1:100.000 e injetadas com seringas estéreis.

4.2.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para obtenção do tamanho médio e morfologia de nanopartículas. Para isso, alíquotas de cada amostra foram diluídas em água destilada (1:100 v/v). Posteriormente, 5 µL das formulações foram aplicadas no suporte de cobre (grid) de 400 mesh, revestido com Formvar 0,4% (m:v em clorofórmio), as amostras foram secas a temperatura ambiente. Após secagem, as amostras foram expostas a vapor de tetróxido de ósmio por 5 minutos. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011, operando a 100 kV, do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB-UnB). As micrografias também foram analisadas a fim de obter a frequência de distribuição de tamanho, com medição manual utilizando o *software ImageJ*.

4.2.4. Obtenção de géis mucoadesivos contendo NLS

Foram preparadas bases galênicas geleificantes de característica hidrofílica empregando-se como polímero o hidroxietilcelulose (Natrozol[®]250) e Carbômero (Carbopol[®]940) em diferentes concentrações comumente empregados na farmacotécnica de formas farmacêuticas semissólidas (DE MELLO, 2006). A composição do gel base de carbopol pode ser observado na Tabela 2.

Para o preparo das bases, foram pesados separadamente os polímeros hidroxietilcelulose (HEC) e Carbômero (Carbopol[®]940), propilenoglicol, nipagin, nipazol e água destilada q.s.p. Os conservantes (nipagin e nipazol) foram diluídos em água q.s.p (quantidade suficiente para preparo) e essa mistura foi levada a uma placa aquecedora sob temperatura de 55,0 ± 2,0° C, ajustando o pH para 6 com aproximadamente 2 ml NaOH 20% (p/v).

Tabela 2: Composição do gel base de carbopol.

Componentes	Concentração (%)
Carbopol	0,25
Propilenoglicol	2,5
Nipagin e Nipazol	0,1
EDTA	0,05
Água destilada q.s.p	50
Nanopartículas	5

A base de hidroxietilcelulose foi realizada em chapa aquecedora em temperatura de 55 a 70° C, seguido de agitação constante de 1600 rpm. Inicialmente, parte da água foi aquecida com adição lenta do polímero. Em seguida, foram adicionados os conservantes, propilenoglicol e mantida em agitação por 12 horas até completa homogeneização do sistema. Para o preparo da base de carbopol não foi necessário levar ao aquecimento, apenas a agitação constante. A composição do gel base de hidroxietilcelulose pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3: Composição do gel base de hidroxietilcelulose.

Componentes	Concentração (%)
Hidroxietilcelulose	0,25
Propilenoglicol	2,5
Nipagin e Nipazol	0,1
Água destilada q.s.p	50
Nanopartículas	5

Após 24 horas do preparo de todas as bases, foi realizada a incorporação de 5% de NLS com fármaco para o peso final de 50 g de gel, além disso foram também incorporados outros volumes de NLS (10, 15 e 20 ml) com o objetivo de verificar o limite de viscosidade dos géis com a adição de maior volume de amostra.

4.2.5. Estudo da estabilidade das NLS e dos géis

Após a determinação das formulações mais estáveis entre as 4 obtidas, de acordo com a Tabela 1, formulações de NLS contendo fármacos ou não (NLS vazia) e dos géis mucoadesivos contendo

NLS foram armazenadas em recipientes de vidro, protegidos da luz e: (i) mantidas a temperaturas específicas (estabilidade a longo prazo) e (ii) submetidas a ciclos de estresse térmico.

A estabilidade a longo prazo foi também avaliada após três meses de armazenamento a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e $5 \pm 2^\circ \text{C}$, na ausência ou presença de luz (ZAMARIOLI et al., 2015).

Para o teste de estresse térmico, as formulações foram submetidas a ciclos de estresse alternando 24 h na estufa a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e 24 h na geladeira a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, fechando um ciclo a cada 48 horas, totalizando seis ciclos completos. No final de cada ciclo, foram avaliadas as características organolépticas e físico-químicas das amostras; e aferido a faixa do pH de cada amostra com fita de medidor de pH (MACHEREY-NAGEL).

4.2.6. Análise de Viscosidade

As viscosidades do gel de Carbopol® e Hidroxietilcelulose foram determinadas em um viscosímetro Brookfield modelo DV-E, utilizando os *spindles* B-LV-4 (64) e B-LV-5 (65) no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico e Cosmético da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Para o gel que apresentou características pré-estabelecidas, foi avaliado a viscosidade do gel com a adição de diferentes volumes de NLS (vazias e com fármaco): 5, 10, 15 e 20 ml, para q.s.p de 50 g de gel.

4.2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos géis mucoadesivos contendo NLS

A atividade antimicrobiana das NLS vazia, NLS Met, NLS Curcumina, NLS Met+Cur e dos géis contendo NLS com metronidazol, curcumina e com ambos os fármacos foram realizadas no Laboratório de Produtos Farmacêutico do departamento de Farmácia (LAPFAR) da Universidade de Brasília; e avaliados através do método de difusão em ágar, empregando poços utilizando a técnica de monocamada. Neste teste foram utilizados alguns microrganismos encontrados em afecções, como *Candida albicans* (ATCC 90028), *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Candida parapsilosis* doadas pelo Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, e *Staphylococcus aureus* (INCQS 00402) doada pela Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Em triplicatas de placa de Petri foram distribuídos 25 mL de meio Ágar Muller Hinton estéril (Kasvi) para as bactérias e Ágar sabouraud dextrose estéril (Kasvi) para levedura, e após solidificação do meio de cultura foi inoculado 0,3 mL de cada suspensão microbiana, previamente padronizada com escala de McFarland 1,0 ($3,8 \times 10^8$ UFC/mL) para bactérias e 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para levedura, e espalhada com o auxílio de um swab estéril. Foram perfurados poços com diâmetro de 6-

8 mm em pontos equidistantes no meio de cultivo solidificado, em seguida foi adicionado um volume de 100 µL das amostras de cada formulação.

As placas contendo os microrganismos foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor das amostras foram mensurados com auxílio de uma régua milimetrada. Foi calculado o desvio padrão das triplicatas.

4.2.8. Quantificação do Metronidazol e Curcumina (RAPALLI et al., 2020)

4.2.8.1. Curva de calibração - Metronidazol

Para a curva de calibração preparou-se uma solução estoque de metronidazol contendo PBS:MetOH 1:1 (v/v), na concentração de 10 mg/mL. A partir dessa solução estoque, foram preparadas diluições para a curva de calibração com as seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100; 120; 150; 180 e 200 µg/ml para metronidazol. As leituras para a construção da curva foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 330 nm.

4.2.8.2. Curva de calibração - Curcumina

Para a curva de calibração preparou-se uma solução estoque de curcumina contendo PBS:MetOH 1:1 (v/v), na concentração de 1 mg/mL. A partir dessa solução estoque, foram preparadas diluições para a curva de calibração com as seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 4 e 8 µg/ml para curcumina. As leituras para a construção da curva foram realizadas em espectrofotômetro lidas em fluorescência.

4.2.9. Eficiência de encapsulação

As nanopartículas contendo metronidazol e curcumina foram diluídas em clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v), em seguida submetendo a banho de ultrassom por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos com posterior coleta do sobrenadante; este foi então submetido mais uma vez a banho de ultrassom por 10 minutos a 40°C e centrifugado por 5 minutos a 20 °C a 2500 rpm (ARAUJO et al., 2020). Recolhido o sobrenadante e analisado em espectrofotômetro. A eficiência de encapsulação foi calculada com a seguinte equação:

$$EE\% = \text{concentração obtida} / \text{concentração teórica} \times 100$$

4.2.10. Estudo de liberação *in vitro* das formulações contendo metronidazol e curcumina

Com o objetivo de avaliar o perfil de liberação da metronidazol e curcumina encapsulados nas NLS, foi realizado pelo método de diálise descrito por Araujo 2020, com adaptações, utilizando membrana de diálise Spectra/Pro[®] com poros permeáveis por espécies de até 14kDa e como meios extratores para os fármacos composto de uma solução de PBS:MetOH 1:1. Os sacos de diálise foram preenchidos com 1 mL da formulação em estudo; para as NLS contendo metronidazol, a diálise foi realizada em 50 ml da solução extratora com agitação constante, enquanto os sacos contendo curcumina encapsulada foram mergulhados em 250 ml da solução extratora.

Alíquotas de 1 ml foram coletadas da solução extratora em intervalos de tempo pré-determinados de 0; 5; 10; 20; 30; 60 minutos; 2 horas; 4 horas; 6 horas; 8 horas; 1 dia; 3 dias; 6 dias e 8 dias, com reposição do mesmo volume imediatamente após cada coleta. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax M3 – Molecular Devices USA), de absorbância no comprimento de onda de 330 nm para metronidazol e de fluorescência para a curcumina com excitação de 420 nm e emissão a 520 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) do metronidazol e curcumina liberados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e Caracterização da NLS

Para a escolha da formulação destinada à encapsulação de metronidazol e curcumina, o primeiro passo para o desenvolvimento das NLS foi o estudo de compatibilidade entre os componentes e as técnicas utilizadas no processo. Os resultados iniciais obtidos variando as proporções dos componentes das formulações das NLS após o preparo, podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados de tamanho, PDI, potencial zeta e características organolépticas das nanopartículas.

Formulações	Tamanho (nm)/ SD	PDI/ SD	Carga Superfície (mV)/ SD	Características Macroscópicas
F1	172,3 ± 1,124	0,157 ± 0,007	-28 ± 1,5	Fluidez e homogeneidade
F2	-ND	-ND	-ND	Cremagem, separação de fases e presença de grumos
F3	- ND	- ND	- ND	Cremagem, separação de fases e presença de grumos
F4	- ND	- ND	- ND	Cremagem, separação de fases e presença de grumos

ND – Não Determinado

As amostras F2, F3 e F4 foram descartadas e não analisadas quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta por apresentarem características macroscópicas (Tabela 4) que provocaram a desestabilização do sistema proposto. Estes resultados indicam que a utilização do ultraturrax não promoveu uma homogeneização suficiente para manter a emulsão estável. O mesmo não ocorreu na utilização da sonda Ultrassônica para F1.

Os valores de tamanho e PDI obtidos na F1 (172,3 ± 1,124 nm e 0,157), demonstram que a alta energia fornecida ao sistema pela sonda ultrassônica promoveu uma melhor dispersão dos excipientes/componentes presentes na formulação pelo aumento da entropia, um vez que essa desordem energética possibilitou a reorganização estrutural dessa mistura mantendo a formulação estável na escala nanométrica, ou seja, sendo incapaz de reverter o processo organizacional do sistema proposto (NLS) (SAMIMI et al., 2019). Processo este não observado nas formulações 2, 3 e 4 onde

a desordem energética necessária para a estabilidade do sistema não foi obtida pelas misturas de fases e energias aplicadas (Tabela 4).

A carga de superfície, também conhecida como potencial zeta, é o potencial elétrico em um plano de cisalhamento e é considerado uma propriedade físico-química que pode ser utilizado como parâmetro de otimização de sistemas coloidais. De acordo com a literatura em valores iguais ou maiores que -30 a +30 mV indicam uma estabilidade adequada do sistema proposto, auxiliando na previsão da estabilidade física das formulações ao longo prazo, pois podem impedir a agregação das partículas com posterior aumento do tamanho levando a desestabilização da formulação (SUBRAMANIAM et al., 2020). Com isso, baseados em critérios de exclusão estes parâmetros foram adotados para o desenvolvimento de todas as NLS utilizadas neste estudo.

A técnica de inversão de fase pela utilização de temperatura– PIT é amplamente utilizada para a obtenção de sistemas coloidais nanométricos por baixa energia, baseado na capacidade que os tensoativos possuem de mudar a afinidade entre água e óleo com o auxílio da temperatura, ou seja, o tensoativo converte a emulsão do tipo o/a para o tipo a/o, tendo em vista que a lipofilicidade das moléculas dos compostos surfactantes aumenta quando ocorre um aumento de temperatura, se essa temperatura for ainda mais elevada, a afinidade entre os compostos torna-se ainda alta para estabilizar formulações emulsionadas do tipo a/o, evitando a aglomeração de partículas.

Outra técnica de obtenção também bastante utilizada é a de ultrasonicação e homogeneização de alto cisalhamento, que consiste em dispersar as partículas por meio de uma pressão mecânica acelerada em uma curta distância com alta velocidade e força, isso possibilita a formação de nanopartículas com tamanho reduzido (GANESAN & NARAYANASAMY, 2017).

Resultados similares foram obtidos por Shinde e colaboradores 2019, pela técnica de inversão de fases, onde obtiveram nanopartículas com metronidazol encapsulado com tamanho médio de 276 nm e um PDI de 0,3. Considerando os resultados iniciais de F1 como satisfatórios para o sistema proposto neste estudo, as formulações de NLS contendo metronidazol (NLS Met) e curcumina (NLS Curcumina) foram preparadas de forma análoga à formulação sem estes compostos (NLS Vazia) incorporando-os na fase oleosa de F1. Posteriormente as NLS Met e NLS Curcumina foram incorporadas nas fórmulas farmacêuticas gelificantes de carbopol e hidroxietilcelulose, formando géis com NLS.

A caracterização físico-química das NLS Met e NLS Curcumina demonstraram valores semelhantes apresentado por F1 (NLS Vazia), considerando as características de tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta como descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados de tamanho, PDI, potencial zeta e características organolépticas das nanopartículas.

Formulações	Tamanho (nm)/ SD	PDI/ SD	Carga Superfície (mV)/ SD	Características Macroscópicas
NLS vazia	172,3 ± 1,124	0,157 ± 0,007	-28 ± 1,5	Fluidez e homogeneidade
NLS Met	194,2 ± 2,207	0,227 ± 0,010	-28 ± 1,2	Fluidez e precipitação de Met
NLS Curcumina	192,9 ± 3,522	0,215 ± 0,011	-29 ± 0,4	Fluidez e homogeneidade
NLS Cur Met	201 ± 0,152	0,180 ± 0,011	-27 ± 0,2	Fluidez e precipitação de Met

Para uma aplicação tópica das NLS, as nanopartículas devem ter um tamanho adequado suficiente para que tanto a matriz quando o princípio ativo que está sendo carregado não seja absorvido a nível sistêmico, porém é necessária uma certa penetração no sistema córneo para que se tenha uma atividade terapêutica satisfatória. Um estudo realizado por Zamariol et al (2015) sobre testes de permeação usando células de difusão de Franz, mostram que nanopartículas com o diâmetro de $210,4 \pm 146,6$ nm aplicadas em pele de orelha de porco, foram incapazes de atravessar o extrato córneo sem ser absorvido a nível sistêmico, podendo evitar possíveis toxicidades ao organismo.

5.2. Análise de rastreamento de nanopartículas (ARN)

A determinação do tamanho das partículas é uma etapa importante para estudos de aplicação biológica podendo ser mensurado por técnicas como DLS e ARN, sendo o ARN uma análise complementar ao DLS. A ARN é uma técnica inovadora capaz de fornecer, além do tamanho das partículas e sua dispersão, a sua concentração em um volume conhecido em tempo real (FILIPE et al., 2010; DE MORAIS RIBEIRO et al., 2018).

Como pode ser observado na Tabela 6, as nanopartículas avaliadas apresentaram tamanho médio entre 124,6 e 152,4 nm. Quanto a concentração das nanopartículas, observou-se que todas as amostras demonstraram acordantes com os resultados do estudo de Ribeiro e colaboradores, 2018 no qual NLS apresentaram concentrações que variavam de $4,8 \pm 0,1 \times 10^{12}$.

Apesar de ser considerada uma técnica de caracterização relativamente nova, o ARN apresenta vantagens quando comparado a outras técnicas, como o MEV, MET e AFM, pois é mais rápida e robusta, permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras, que por serem analisadas em solução, não necessitam de secagem, além de ser um método preciso na determinação do tamanho de nanopartículas monodispersos e polidispersos.

A diferença dos tamanhos encontrados nas análises de DLS e ARN correspondem ao fato das distribuições obtidas pelo DLS serem maiores, pois considera a fração da maior população de partículas, enquanto o ARN considera o número total de partículas na amostra (CALDAS et al., 2020).

Tabela 6: Resultados obtidos após a caracterização coloidal por ARN.

Amostra	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)
NLS vazia	124,6 ± 2,5	1,75×10 ¹³
NLS Curcumina	152,4 ± 5,1	3,50×10 ¹²
NLS Met	140,8 ± 1,3	3,40 ×10 ¹³
NLS Cur Met	145,7 ± 0,9	5,42×10 ¹²

5.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Nesta técnica, é possível obter a morfologia e a distribuição da NLS, resultando em imagens de alta resolução, possibilitando também a obtenção do tamanho da partícula, deformação do sistema e possíveis dispersões de fármacos.

Este método é importante pois permite a averiguação do diâmetro real das nanopartículas, tendo em vista que o diâmetro hidrodinâmico, definido como o tamanho efetivo de uma partícula quando está dispersa em um líquido, depende das flutuações de intensidade da luz visível espalhada pelas partículas enquanto fazem movimentos brownianos aleatórios no líquido, ou seja, o tamanho real das partículas observadas em microscopias eletrônicas deve ser muito menor uma vez que, obrigatoriamente, as amostras necessitam de secagem para análise (KULKARNI, 2015).

Observando as micrografias obtidas por MET, é possível visualizar a formação das nanopartículas, com formatos esféricos e distribuição de tamanho variados (Figura 6). Os resultados das micrografias podem ser observados na figura 6, juntamente com as frequências de distribuição.

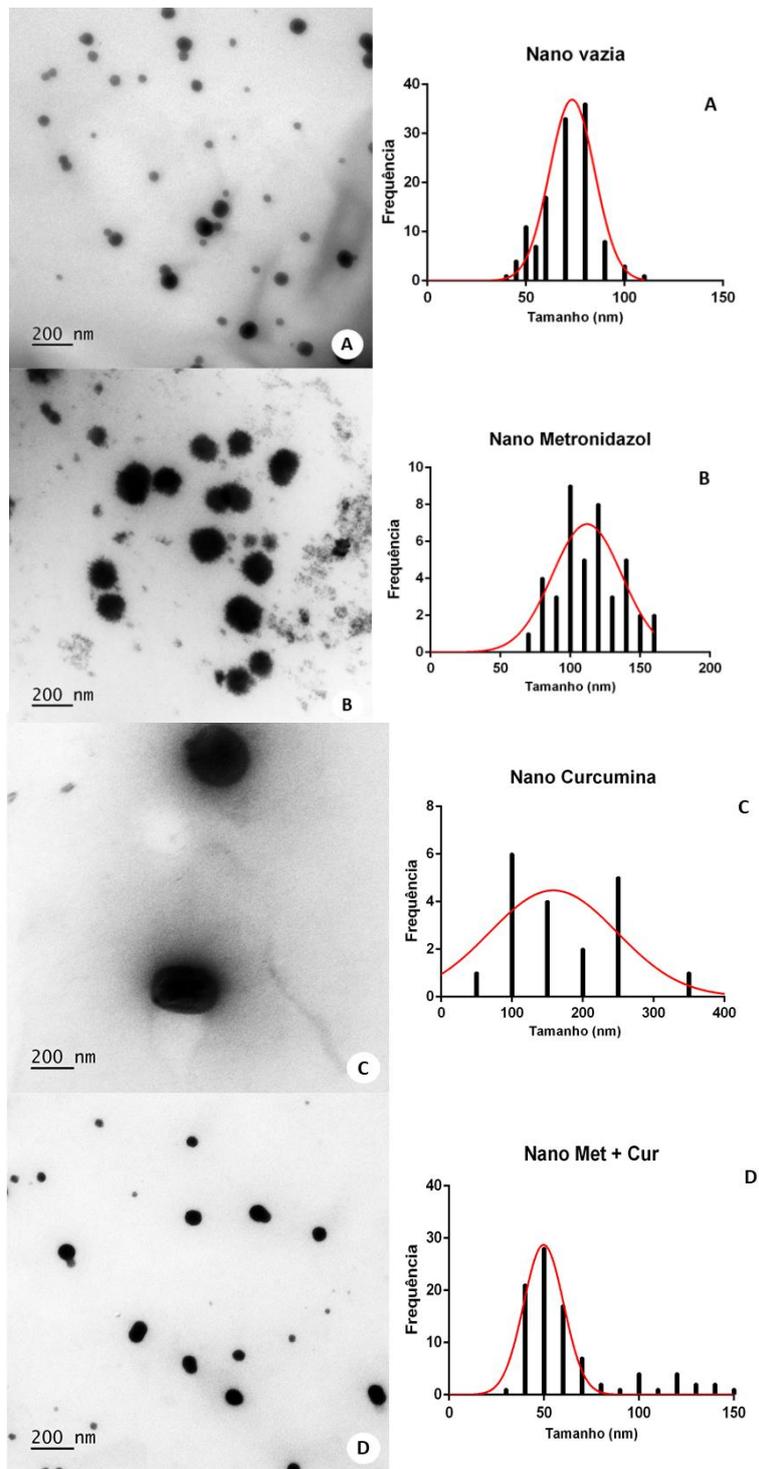


Figura 6: Micrografias tiradas em microscópio eletrônico de transmissão e Frequência de distribuição de nanopartículas baseado nas micrografias: (A) NLS-vazia; (B) NLS Met; (C) NLS Curcumina e (D) NLS Met+Cur.

5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos géis contendo NLS

No ensaio de monocamada, não foi observado inibição do crescimento fúngico de *C. albicans* para todas as amostras testadas. Para o teste frente a cepa *C. parapsilosis*, foi observado inibição do

crescimento fúngico na aplicação dos Gel sem NLS (47,2 mm), contendo NLS vazia (32 mm) e NLS Met+Cur (35 mm). Quanto ao teste frente a cepa *S. aureus* foi observado inibição do crescimento fúngico para as amostras de Gel NLS Met (15 mm) e Gel NLS Met+Cur (12 mm). Para *E. coli* foi observado halos de inibição nas amostras NLS Met (33,5 mm), NLS Met+Cur (32,5 mm), Gel NLS Met (33,5 mm) e Gel NLS Met+Cur (30 mm). O gel de Carbopol (Controle) não apresentou inibição de crescimento frente as outras cepas testadas. Os resultados podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) frente a *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*, *S. aureus* e *E. coli*; Controle (Gel de Carbopol); GN (Gel com NLS); GN met+cur (Gel com NLS metronidazol e curcumina); GN met (Gel com NLS mais metronidazol); N-m+c (NLS mais metronidazol e curcumina); N-met (NLS mais metronidazol) e N-cur (NLS curcumina).

Amostas	Microrganismos (<i>Halo de inibição – mm</i>)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>S. aureas</i>	<i>E. coli</i>
Controle	0 mm	47, 2 mm	0 mm	0 mm
NLS Vazia	0 mm	32 mm	0 mm	0 mm
NLS Met	0 mm	0 mm	0 mm	33,5 mm
NLS Cur	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
NLS M+C	0 mm	0 mm	0 mm	32,5 mm
GN Vazia	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
GN Met	0 mm	0 mm	15 mm	33,5 mm
GN Cur	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
GN M+C	0 mm	35 mm	12 mm	30 mm

Através da avaliação da atividade antimicrobiana foi possível demonstrar a difusão do fármaco para o meio. Desta forma, os resultados obtidos demonstram que os fármacos nanoencapsulados conseguem uma difusão na forma “livre” e incorporado ao gel de Carbopol, que obteve melhor performance na difusão dos fármacos, o que pode ser devido a sua alta viscosidade, impedindo sua rápida erosão no meio aquoso.

Estudos realizados por Pandit e colaboradores (2015), propõem que um dos mecanismos de ação antibacteriano, da curcumina encapsulada, refere-se ao grupo fenólico que interage com a camada externa de lipopolissacarídeo presente nas bactérias Gram-negativas, enfraquecendo e quebrando a parede celular bacteriana, resultando na morte da célula.

No mesmo estudo, os autores obtiveram um halo de inibição de 10 mm utilizando curcumina encapsulada por nanopartículas poliméricas contra *S. aureus*, e 20 mm de halo de inibição com nanopartículas incorporadas em uma base farmacêutica na forma de creme, considerando a amostra com melhor performance, quando comparado a ação de antibióticos comerciais como cloranfenicol (40 mm) para *S. aureus*, considerado Pandit 2015 como eficaz na inibição do crescimento, e 29 mm para *E. coli*.

5.5. Análise de Viscosidade do Géis

Formulações desenvolvidas para a liberação sustentada de fármacos de uso tópica devem apresentar características físicas específicas relativas a viscosidade como; a propriedade de fluxo do tipo pseudoplástico, pois deformam durante a aplicação facilitando o seu espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação; o que pode propiciar a adesão da formulação no local (NUNES et al., 2016).

Durante o estudo de viscosidade, os géis de Carbopol e Hidroxietilcelulose apresentaram uma relação não linear entre o gradiente de cisalhamento e os valores das viscosidades aparentes (Figura 7), caracterizando-os como fluídos não-newtoniano, seguido da redução da viscosidade com o aumento do gradiente de cisalhamento (velocidade de agitação), típico de sistemas pseudoplástico. Esse comportamento de fluxo é atribuído ao alinhamento das partículas assimétricas provocado pelo aumento da velocidade de cisalhamento, relacionado a redução da viscosidade dos sistemas (BRETAS; D'ÁVILA, 2010).

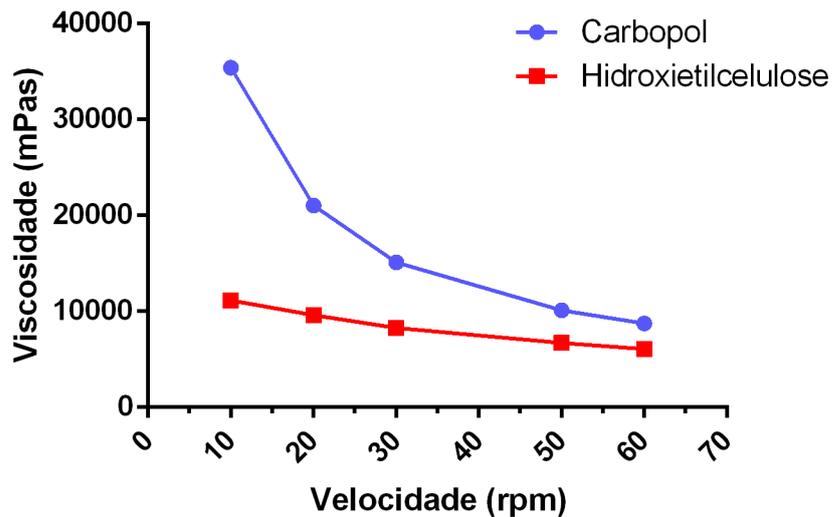


Figura 7: Viscosidade dos géis de Carbopol e Hidroxietilcelulose.

Ademais, o tipo de polímero, assim como a concentração deste na formulação, influenciou a característica de viscosidade do produto, sendo o gel com Carbopol o que apresentou maior valor de viscosidade aparente em detrimento do gel de hidroxietilcelulose. Desta forma, o gel de Carbopol foi utilizado para a obtenção das formulações posteriores (LEE et al., 2009; SUBRAMANIAM et al., 2020).

A viscosidade de uma suspensão pode sofrer alterações que estão ligadas diretamente as características físico química das nanopartículas, como tamanho, distribuição de tamanho, potencial zeta e a fração de volume máximo a ser adicionado, ou seja, para suspensões, o volume da fração e o volume máximo de fração a ser adicionado podem influenciar a viscosidade final da formulação (HILL & CARRINGTON, 2006; SUBRAMANIAM et al., 2020).

Com o objetivo de avaliar a relação entre o volume máximo de NLS incorporados na base gelificante de carbopol, o qual manteria a natureza côncava do reograma, inclinado em direção ao eixo da taxa de cisalhamento, mostrando se o gel permanece com o fluxo pseudoplástico; volumes extras de 5, 10, 15 e 20 ml das NLS (vazias e com metronidazol e/ou curcumina) foram adicionadas para um q.s.p de 50 g de gel, mantidas sob diferentes velocidades de agitação para a determinação da viscosidade. De acordo com a figura 8 podemos observar que em todos os volumes de NLS aplicados ocorreu uma relação entre aumento da velocidade de agitação e redução da viscosidade apesar da variação dos volumes de NLS adicionados, apenas o volume de 10 mL apresentou uma viscosidade maior que 15000 mPas em detrimento dos outros volumes analisados.

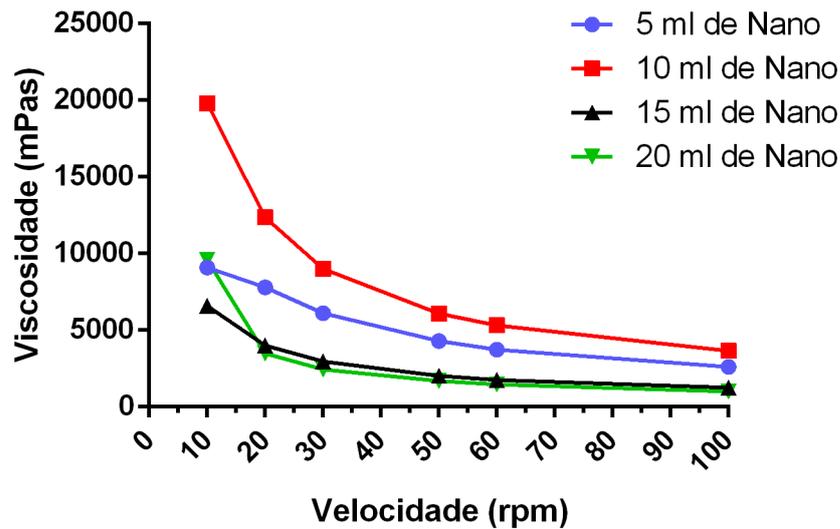


Figura 8: Viscosidade dos géis de Carbopol contendo diferentes volumes de NLS.

5.6. Estudo da estabilidade

Formulações estáveis são aquelas que possuem a capacidade de manter suas características físico-químicas inalteradas em relação aos critérios de estabilidade pré-estabelecido ao longo de um determinado tempo sob condições esperadas (MARÍN et al., 2017).

As formulações de NLS e NLS no gel de carbopol, permaneceram homogêneas, com cor brilhante, odor característico e ausência de separação de fases durante o estresse térmico a temperatura de 37° C e 5 °C, contudo apresentou separação de fases as formulações de NLS não incorporadas ao gel quando armazenado a temperatura de 37 °C depois de um mês de armazenamento. O pH permaneceu estável durante os ciclos, apresentando um pH de 5,0 para as NLS e de 4,0 para as NLS no gel, valores ideais e que se aproximam do pH de uma pele saudável que está faixa de 4 a 6 (ZAINAL et al., 2020).

Outro teste de estabilidade foi realizado por 90 dias, com amostras armazenadas a temperaturas de 5 ± 2 °C, na ausência ou na presença de luz. A avaliação organoléptica das amostras não mostrou mudanças significativas nas aparências e sem separação de fases. O pH não mudou significativamente após três meses, se comparado ao início dos testes.

5.7. Eficiência de encapsulação

Inicialmente, para a quantificação dos fármacos encapsulados, foram feitas duas curvas analíticas, uma para curcumina e outra metronidazol, aplicando o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados fazendo associação linear por meio do coeficiente de correlação e de

determinação (R^2). A equação da reta obtida da curva de curcumina foi $y = 11,938x + 3,1164$ e o coeficiente de correlação foi 0,9928. Para a curva de metronidazol, a equação da reta foi de $y = 0,0089x + 0,48$ e o coeficiente de correlação foi 0,9914. Como apresentado nas figuras 10 e 11 respectivamente. De acordo com o RDC N° 166 da ANVISA (2017), o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990, demonstrando uma ótima correlação nos resultados obtidos.

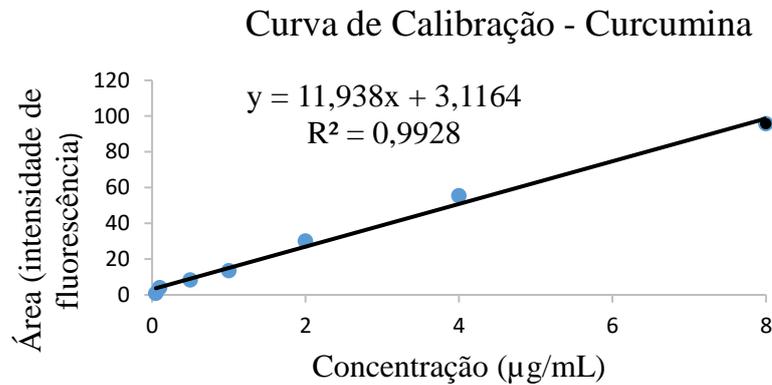


Figura 9: Curva de calibração de curcumina obtido por espectrofotômetro.

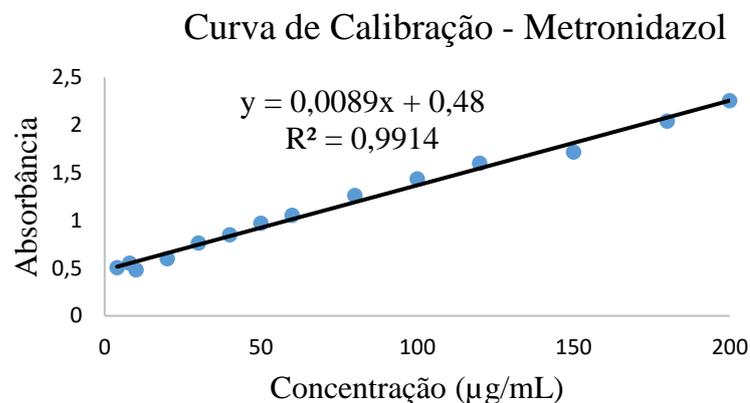


Figura 10: Curva de calibração de metronidazol obtido por espectrofotômetro.

A eficiência de encapsulação (EE) é definida como a porcentagem de drogas ou moléculas bioativas encapsuladas na matriz de sistemas nanoestruturados em referência a quantidade total de fármaco adicionado na formulação. A EE é um parâmetro de caracterização crucial usado na avaliação da qualidade das formulações durante o processo de armazenamento. A imprecisão da EE pode ser um fator determinante na triagem de formulações para aplicações clínicas, podendo ter uma dosagem incorreta e indesejada com efeitos colaterais pertinentes devido as ações de liberação prolongada e farmacológica dessas nanoestruturas quando em interação com o organismo.

O processo de quebra das nanoestruturas para a separação completa de fármaco livre é dificilmente alcançado devido as características físico-químicas que estes materiais possuem, como tamanho pequeno, baixa densidade, e alto consumo de energia para uma separação satisfatória. No entanto, existem vários métodos de quebra das nanoestruturas, como ultrafiltração, centrifugação, cromatografia e banho de ultrassom.

A eficiência de encapsulação estimada foi de 98,4% demonstrando um alto grau de aprisionamento de drogas, corroborando com os resultados encontrados por Rohini e colaboradores, que obtiveram uma eficiência de 90,86% em nanopartículas lipídicas.

5.8. Perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas lipídicas sólidas contendo metronidazol e curcumina

As análises de liberação de metronidazol e curcumina nanoencapsulados foram realizadas pelo método de diálise, utilizando como meio extrator PBS:MetOH 1:1 para os dois fármacos. Os testes de quantificação de curcumina e metronidazol nos meios extratores foram avaliados nos períodos de 0 min; 5 min; 10 min; 20 min; 30 min; 1 hora; 1 hora e meia; 4 horas; 6 horas; 8 horas; 24 horas; 72 horas; 6 dias e 8 dias. As porcentagens de liberação do acúmulo de metronidazol e curcumina nas NLS foram: 71% em 3 dias para NLS Curcumina; 100% em 6 horas para NLS Met; os resultados obtidos estão presentes figura 12. Durante o período de diálise, pode-se observar visivelmente uma mudança na coloração do meio extrator, não apresentando sedimentação no saco de diálise.

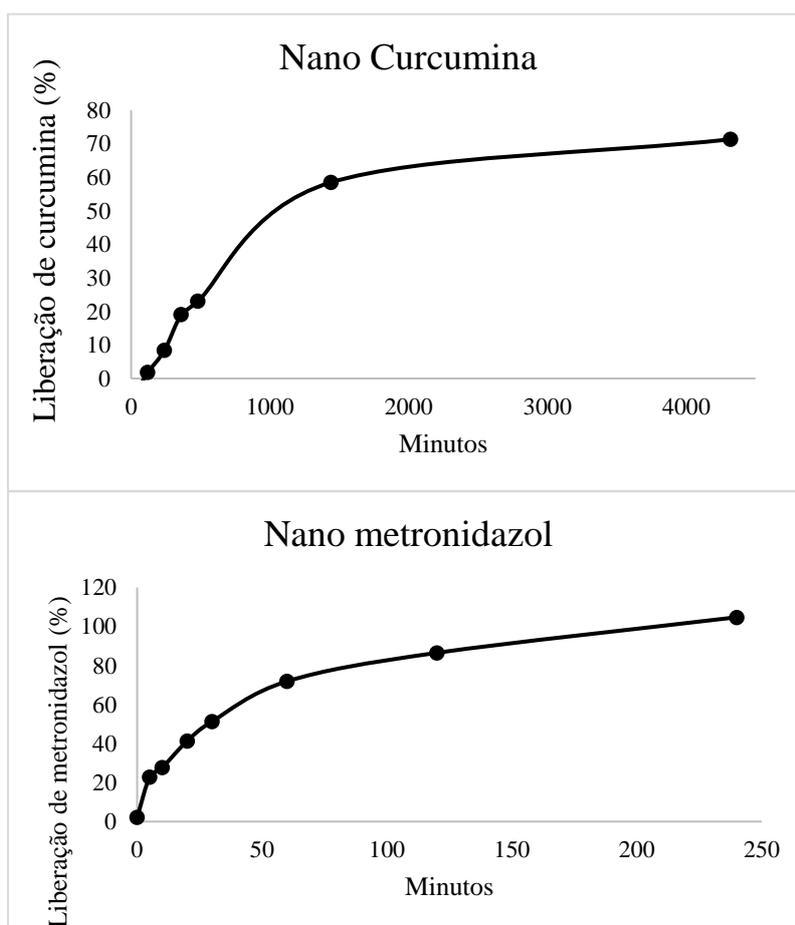


Figura 11: Perfil de liberação de curcumina e metronidazol nanoencapsulados obtido pelo método de diálise.

O processo de liberação de um ativo a partir de uma nanopartícula é bastante complexo, pois pode ser afetado por fatores como a degradação da matriz lipídica, afinidade entre o fármaco e matriz coloidal como também a cristalinidade do fármaco. Diante da característica lipofílica da curcumina, este fármaco apresenta elevada afinidade pela matriz lipídica, que é corroborado pela eficiência de encapsulação, e pela menor taxa de liberação da curcumina nas nanopartículas em comparação com a curcumina livre.

Essa taxa de liberação pode ser vantajosa para a aplicação pretendida, reforçando a possibilidade de utilização das NLS como um sistema reservatório para a liberação sustentada da curcumina no tecido epitelial (SAMIMI et al., 2019).

O metronidazol é um medicamento hidrofílico comumente utilizado como agente de primeira linha no tratamento de infecções bacterianas, porém por apresentar perfil de solubilidade diferente da matriz nanoparticulada, seu aprisionamento pode ser impedido. No entanto, em estudos realizados por Shinde e colaboradores 2019, foi observado que o controle dos parâmetros da formulação (tipos e concentrações de lipídios e surfactantes), e outros parâmetros de qualidade podem ser otimizados para uma boa encapsulação do metronidazol. O Polissorbato 80 é um grande exemplo disso, sendo capaz de solubilizar o metronidazol devido a presença de múltiplos grupos funcionais polares, como também o Tween 20, utilizado na preparação das nanopartículas deste trabalho. O uso de co-surfactantes também auxilia na solubilização de compostos hidrofílicos.

A alta liberação inicial do metronidazol nos primeiros minutos pode estar atribuído a quantidade de fármaco adsorvido na superfície da nanopartícula lipídica, por estar presente na fase aquosa do tensoativo que envolve as nanoestruturas, como também pode ser devido a uma quantidade da droga não encapsulada (SHINDE et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

Diante do exposto, os resultados obtidos com o presente trabalho permitiram concluir que:

- Para as composições testadas, a mistura de Tween 20 com Pluronic F-127 e o método PIT com o uso da ultrasonicação foi o método que obteve a formação de sistema nanoparticulado;

- A manteiga de murumuru apresentou-se como uma matéria-prima com propriedades físico-químicas promissoras para a obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas;
- A incorporação dos fármacos favoreceu a formação de NLS com tamanho adequado para aplicação tópica;
- As NLS baseadas em murumuru apresentaram resultados satisfatórios quanto ao tamanho PDI e potencial zeta, homogeneidade e estabilidade físico-química do sistema;
- As micrografias obtidas por MET permitiram observar que as NLS apresentam morfologia esférica;
- No ensaio antimicrobiano as formulações gel de Carbopol com as NLS permitiu maior difusão dos fármacos para o meio;
- No estudo de viscosidade o gel de Carbopol com NLS apresentou alta viscosidade e comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico requerido para uma fácil aplicação tópica;
- A eficiência de encapsulação das amostras apresentou alto grau de aprisionamento de fármaco;
- As NLS apresentaram capacidade de retenção de fármaco diante do estudo de liberação;

Em vista disso, esses sistemas são candidatos para o desenvolvimento futuro de um sistema de liberação sustentada de fármacos para aplicação tópica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, B. (2017). *Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166.*
- Araujo, V. H. S., da Silva, P. B., Szlachetka, I. O., da Silva, S. W., Fonseca-Santos, B., Chorilli, M., Ganassin, R., de Oliveira, G. R. T., da Rocha, M. C. O., & Fernandes, R. P. (2020). The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 602, 125070.
- Barata, G. (2005). Sobram razões para transformar biodiversidade em produtos. *Inovação Uniemp*, 1(3), 38–39.
- Bretas, R. E. S., & d'Ávila, M. A. (2010). Princípios fundamentais de reologia de polímeros. *Reologia de Polímeros Fundidos (Cap. 1). São Carlos: EDUFSCar.*
- Chau, C.-F., Wu, S.-H., & Yen, G.-C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 269–280.
- Alauzet, C., Lozniewski, A., & Marchandin, H. (2019). Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review. *Anaerobe*, 55, 40–53.

- Bezerra, V. S. (2012). Considerações sobre a palmeira murumuruzeiro (*Astrocaryum murumuru* Mart.). *Embrapa Amapá-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Caldas, B. S., Lazarin-Bidóia, D., Nakamura, C. V., Halila, S., Borsali, R., & Muniz, E. C. (2020). Drug carrier systems made from self-assembled glyco-nanoparticles of maltoheptaose-b-polyisoprene enhanced the distribution and activity of curcumin against cancer cells. *Journal of Molecular Liquids*, 309, 113022.
- Chen, Y.-C., Liu, D.-Z., Liu, J.-J., Chang, T.-W., Ho, H.-O., & Sheu, M.-T. (2012). Development of terbinafine solid lipid nanoparticles as a topical delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4409.
- Chhikara, B. S. (2017). Current trends in nanomedicine and nanobiotechnology research. *Journal of Materials NanoScience*, 4(1), 19–24.
- de Ávila Leripio, A., & Leripio, D. C. (2015). CADEIAS PRODUTIVAS SUSTENTÁVEIS. *MIX Sustentável*, 1(1), 142–159.
- De Jesus, M. B., & Zuhorn, I. S. (2015). Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. *Journal of Controlled Release*, 201, 1–13.
- De Mello, D. R. (n.d.). *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDC Nº. 214, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2006*.
- de Moraes Ribeiro, L. N., Couto, V. M., Fraceto, L. F., & De Paula, E. (2018). Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8.
- de Santana Lopes, A., Pacheco, T. G., da Silva, O. N., Cruz, L. M., Balsanelli, E., de Souza, E. M., de Oliveira Pedrosa, F., & Rogalski, M. (2019). The plastomes of *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. and *A. murumuru* Mart. show a flip-flop recombination between two short inverted repeats. *Planta*, 250(4), 1229–1246.
- do Nascimento, J. F., Ferreira, E. J. L., Carvalho, A. L., & Regiani, A. M. (2007). Parâmetros Biométricos dos Cachos, Frutos e Sementes da Palmeira Murmuru (*Astrocaryum ulei* Burret.) encontrada na Região de Porto Acre, Acre. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S1), 90–92.
- Dubey, A., Prabhu, P., & Kamath, J. V. (2012). Nano Structured lipid carriers: A Novel Topical drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research*, 4(2), 705–714.
- Ensign, L. M., Cone, R., & Hanes, J. (2012). Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(6), 557–570.
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(1), 1–14.
- Faria-Tischer, P. C. S., & Tischer, C. A. (2012). Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para

- biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, 1(1), 32–53.
- Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine*, 14(1), 93–126.
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796–810.
- Ganesan, P., & Narayanasamy, D. (2017). Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6, 37–56.
- Helgason, T., Awad, T. S., Kristbergsson, K., McClements, D. J., & Weiss, J. (2009). Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science*, 334(1), 75–81.
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*, 6(10), 92.
- Hill, A., & Carrington, S. (2006). Understanding the links between rheology and particle parameters. *American Laboratory*, 38(21), 22.
- Hou, D., Xie, C., Huang, K., & Zhu, C. (2003). The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24(10), 1781–1785.
- Jebors, S., Leydier, A., Wu, Q., Bertino Ghera, B., Malbouyre, M., & Coleman, A. W. (2010). Solid lipid nanoparticles (SLNs) derived from para-acyl-calix [9]-arene: preparation and stability. *Journal of Microencapsulation*, 27(7), 561–571.
- Jaiswal, P., Gidwani, B., & Vyas, A. (2016). Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 27–40.
- Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2010). Effect of Coumarate 3-hydroxylase Down regulation on lignin structure. *Nanomed. N. Engl. J. Med*, 363, 2434–2443.
- Kulkarni, S. K., & Kulkarni, S. K. (2015). *Nanotechnology: principles and practices*. Springer.
- Kumar, A., Naik, P. K., Pradhan, D., Ghosh, G., & Rath, G. (2020). Mucoadhesive formulations: innovations, merits, drawbacks, and future outlook. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1–18.
- Lee, C. H., Moturi, V., & Lee, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, 136(2), 88–98.

- Leitsch, D. (2019). A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology*, *146*(9), 1167–1178.
- Lima, R. P., da Luz, P. T. S., Braga, M., dos Santos Batista, P. R., da Costa, C. E. F., Zamian, J. R., do Nascimento, L. A. S., & da Rocha Filho, G. N. (2017). Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) butter and oils of buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze) can be used for biodiesel production: Physico-chemical properties and thermal and kinetic studies. *Industrial Crops and Products*, *97*, 536–544.
- Lingayat, V. J., Zarekar, N. S., & Shendge, R. S. (2017). Solid lipid nanoparticles: a review. *Nanoscience and Nanotechnology Research*, *2*, 67–72.
- Löfmark, S., Edlund, C., & Nord, C. E. (2010). Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(Supplement_1), S16–S23.
- Lourenço, A. R. N. (2013). *Administração tópica de fármacos: das restrições aos desafios*.
- Marín, R. R. R., Babick, F., & Hillemann, L. (2017). Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles—practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *532*, 516–521.
- Menezes, B. P. De. (2012). *Consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e composição bromatológica da torta de murumuru (Astrocaryum murumuru var. murumuru Mart.), na alimentação de ruminantes*.
- Mirzaei, H., Shakeri, A., Rashidi, B., Jalili, A., Banikazemi, Z., & Sahebkar, A. (2017). Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *85*, 102–112.
- Moody, M. L. (2010). Topical medications in the treatment of pain. *Pain Medicine News*, p15-20.
- Morais, J. M. de. (2008). *Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino*. Universidade de São Paulo.
- Mukherjee, S., Ray, S., & Thakur, R. S. (2009). Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *71*(4), 349.
- Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *50*(1), 161–177.
- Neves, M. C. T., Lopes, A., de Oliveira, M. C. J., Iamaguti, P. S., Lira, T. A. M., Moreti, T. C. F., de Lima, L. P., & Koike, G. H. A. (2018). Effects of Murumuru ('*Astrocaryum murumuru*' Mart.) and soybean biodiesel blends on tractor performance and smoke density. *Australian Journal of Crop Science*, *12*(6), 878.
- Nunes, K. M., Teixeira, C. C. C., Kaminski, R. C. K., Sarmiento, V. H. V, Couto, R. O., Pulcinelli,

- S. H., & Freitas, O. (2016). The Monoglyceride Content Affects the Self-Assembly Behavior, Rheological Properties, Syringeability, and Mucoadhesion of In Situ–Gelling Liquid Crystalline Phase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(8), 2355–2364.
- Paliwal, R., Paliwal, S. R., Kenwat, R., Kurmi, B. Das, & Sahu, M. K. (2020). Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *30*(3), 179–194.
- Pandit, R. S., Gaikwad, S. C., Agarkar, G. A., Gade, A. K., & Rai, M. (2015). Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. *3 Biotech*, *5*(6), 991–997.
- Rapalli, V. K., Kaul, V., Gorantla, S., Waghule, T., Dubey, S. K., Pandey, M. M., & Singhvi, G. (2020). UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: method development, in-vitro and ex-vivo applications in topical delivery. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *224*, 117392.
- Rauf, A., Imran, M., Orhan, I. E., & Bawazeer, S. (2018). Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *74*, 33–45.
- Rezaie, F., Momeni-Moghaddam, M., & Naderi-Meshkin, H. (2019). Regeneration and repair of skin wounds: various strategies for treatment. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, *18*(3), 247–261.
- Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, *35*(7), 583–592.
- Rossan, M. R. (2011). *Preparação e caracterização de micro e nanopartículas lipídicas sólidas para aplicação em cosméticos*.
- Salamat-Miller, N., Chittchang, M., & Johnston, T. P. (2005). The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(11), 1666–1691.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *3*(1), 20–31.
- Salehi, B., Stojanović-Radić, Z., Matejić, J., Sharifi-Rad, M., Kumar, N. V. A., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *163*, 527–545.
- Samimi, S., Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., & Dorkoosh, F. (2019). Lipid-based nanoparticles for drug delivery systems. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery* (pp. 47–76). Elsevier.
- Sanitária, A. N. de V. (2007). *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos*. Anvisa Brasília.

- Sharma, D., Sharma, N., Pathak, M., Agrawala, P. K., Basu, M., & Ojha, H. (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems: challenges and opportunities. In *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (pp. 39–79). Elsevier.
- Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Letters*, *10*(9), 3223–3230.
- Shinde, U. A., Parmar, S. J., & Easwaran, S. (2019). Metronidazole-loaded nanostructured lipid carriers to improve skin deposition and retention in the treatment of rosacea. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *45*(7), 1039–1051.
- Singla, V., Saini, S., Joshi, B., & Rana, A. C. (2012). Emulgel: A new platform for topical drug delivery. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *3*(1), 485–498.
- Subramaniam, B., Siddik, Z. H., & Nagoor, N. H. (2020). Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *Journal of Nanoparticle Research*, *22*, 1–29.
- Tan, A., Chawla, R., Natasha, G., Mahdibeiraghdar, S., Jeyaraj, R., Rajadas, J., Hamblin, M. R., & Seifalian, A. M. (2016). Nanotechnology and regenerative therapeutics in plastic surgery: the next frontier. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, *69*(1), 1–13.
- Ubando, A. T., Felix, C. B., & Chen, W.-H. (2020). Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. *Bioresource Technology*, *299*, 122585.
- Vieira, S. P. P. (2013). *Promoção da absorção cutânea de fármacos: estado da arte*. [sn].
- Zainal, H., Jamil, A., Md Nor, N., & Tang, M. M. (2020). Skin pH mapping and its relationship with transepidermal water loss, hydration and disease severity in adult patients with atopic dermatitis. *Skin Research and Technology*, *26*(1), 91–98.
- Zamarioli, C. M., Martins, R. M., Carvalho, E. C., & Freitas, L. A. P. (2015). Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): development of topical delivery formulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *25*(1), 53–60.
- Zarrintaj, P., Moghaddam, A. S., Manouchehri, S., Atoufi, Z., Amiri, A., Amirkhani, M. A., Nilforoushzadeh, M. A., Saeb, M. R., Hamblin, M. R., & Mozafari, M. (2017). Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine*, *12*(19), 2403–2422.
- Zheng, Y., Ouyang, W.-Q., Wei, Y.-P., Syed, S. F., Hao, C.-S., Wang, B.-Z., & Shang, Y.-H. (2016). effects of carbopol® 934 proportion on nanoemulsion gel for topical and transdermal drug delivery: a skin permeation study. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 5971.
- Wang, J., Wang, H., Zhu, R., Liu, Q., Fei, J., & Wang, S. (2015). Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. *Biomaterials*, *53*, 475–483.

