

JESSIKA LAYANE DA CRUZ ROCHA

PESQUISA DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O TRATAMENTO DE
HEMANGIOMA INFANTIL

BRASÍLIA, 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JESSIKA LAYANE DA CRUZ ROCHA

PESQUISA DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O TRATAMENTO DE
HEMANGIOMA INFANTIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho

Co-orientadora: Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA

2022

JESSIKA LAYANE DA CRUZ ROCHA

PESQUISA DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O TRATAMENTO DE
HEMANGIOMA INFANTIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 26 de agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto
Universidade de Brasília

Dr. Breno Noronha Matos
Centro Universitário Euro Americano (UNIEURO)

Dr. Idejan Padilha Gross
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conduzir minha vida, por toda proteção, providência e por não me desamparar nos momentos de dificuldade.

À minha família, pessoas a quem serei sempre grata por estarem comigo na alegria e me ampararem nas intempéries. Agradeço especialmente à minha mãe Cida, fonte de amor, carinho e força e a minha irmã Érika, pelas orações, partilhas e companheirismo. Amo vocês!

Ao meu estimado orientador, Marcílio Cunha-Filho, pela oportunidade, paciência, por transferir tanto conhecimento e dedicar seu tempo a me orientar nesse trabalho.

À minha querida co-orientadora, Lívia Barreto, que muitas vezes foi um pouco mãe, me apoiando e incentivando quando nem eu mesma acreditava ser capaz.

Ao Dr. Idejan Gross e Dr. Breno Matos por gentilmente aceitarem o convite para avaliar e contribuir com esse trabalho.

Agradeço a todos os amigos que compõem o Laboratório de Tecnologias de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), pois se estou concluindo essa etapa da vida acadêmica é porque no nosso laboratório estamos sempre ajudando uns aos outros. Aos professores Guilherme Gelfuso e Tais Gratieri pelas ricas contribuições no desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao meu dileto irmão acadêmico Felipe de Queiroz Pires, que prontamente me ajudou desde o início do desenvolvimento de meus nanocarreadores até a escrita do nosso artigo. Devo a você, Felipe, muitos abraços e bolos de abacaxi.

Às minhas irmãs, amigas e companheiras Ana Luiza Lima, Ludmila Alvim, Seila Tolentino, Camila Cardoso e Luma Nogueira. Nossa amizade e parceria faz com que a caminhada seja mais leve e engraçada. Vocês fizeram com que a rotina de trabalho fosse prazerosa e transformaram muitos dias ruins em bons. Sou muito feliz por ter conhecido vocês!

E feliz daquele que no meio do percurso tem a sorte de encontrar pessoas de tão bom coração, eu encontrei! Até aqui a minha passagem pelo LTMAC me proporcionou amizades valiosas. Obrigada Natane Duarte, Wanessa Quintão, Breno Matos e Ricardo Nunes por toda ajuda, receptividade e gargalhadas.

Agradeço à professora Juliana Lott e a Thuany Alencar pela disposição em nos ajudar na condução dos ensaios em células. Essa colaboração enriqueceu bastante nosso estudo.

À Universidade de Brasília, por ser espaço de muito aprendizado e acolhida e ao CNPQ por fomentar e tornar possível o desenvolvimento desse trabalho.

*“Que a força do medo que tenho não
me impeça de ver o que anseio”
(Oswaldo Montenegro)*

RESUMO

O hemangioma infantil (HI) é classificado como um tumor benigno de células endoteliais e acomete uma considerável parcela da população de lactentes. Sua manifestação pode ocorrer de forma branda ou mais avançada e a depender da classificação da patologia deve-se utilizar o cloridrato de propranolol, tratamento de primeira escolha, para auxiliar na remissão do HI. No entanto, a terapia sistêmica utilizada nos pacientes infantis pode desencadear vários efeitos adversos nos mesmos, vislumbrando assim, a necessidade de desenvolver formulações tópicas com esse fármaco para reduzir ou até findar esses efeitos desagradáveis. Diante do problema exposto, o presente trabalho se justifica pela demanda de novas tecnologias para o manejo do HI que não apresente efeitos indesejados nos pacientes pediátricos. Para tanto, foi proposto um desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com diferentes tamanhos através de um modelo preditivo Box-Behnken utilizando a técnica de microemulsão. A compatibilidade entre os insumos envolvidos no processo produtivo foi estudada através da aplicação de análises termoquímicas associadas a planejamento experimental simplex centróide. Os CLNs foram caracterizados quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão (PDI), potencia zeta e eficiência de encapsulação (EE). O desempenho das nanodispersões foi avaliado de acordo com a cinética de liberação e perfil de permeação *in vitro* e estudos *in vitro* em células HBMEC foram conduzidos para avaliar o potencial inibitório do HI. Como resultados foram obtidos CLNs de 500 e 900nm, com PDI aceitável dada à dificuldade em obter esse tipo de formulação com baixos índices de polidispersão, e EE superior a 99,0%. Ambas formulações obtidas controlaram a liberação do PPL em 24 horas e se acumularem no tecido alvo para terapia tópica do HI. Além disso, resultados positivos de inibição da proliferação celular foram observados.

Palavras-chave: propranolol; hemangioma infantil; carreadores lipídicos nanoestruturados; desenho box-behnken.

ABSTRACT

Infantile hemangioma (HI) is classified as a benign tumor of endothelial cells and affects a considerable portion of the infant population. Its manifestation can occur in a mild or more advanced form and, depending on the classification of the pathology, propranolol hydrochloride, the first-choice treatment, should be used to assist in the remission of HI. However, systemic therapy used in pediatric patients can trigger several adverse effects in them, thus envisioning the need to develop topical formulations with this drug to reduce or even end these unpleasant effects. In view of the above problem, the present work is justified by the demand for new technologies for the management of HI that do not present unwanted effects in pediatric patients. Therefore, a development of nanostructured lipid carriers (NLC) with different sizes was proposed through a Box-Behnken predictive model using the microemulsion technique. Compatibility between the inputs involved in the production process was studied through the application of thermochemical analysis associated with centroid simplex experimental design. NLCs were characterized in terms of average size, polydispersity index (PDI), zeta potency and encapsulation efficiency (EE). Performance of nanodispersions was evaluated according to release kinetics and permeation profile in vitro and in vitro studies in HBMEC cells were conducted to evaluate the inhibitory potential of HI. As a result, NLCs of 500 and 900nm were obtained, with acceptable PDI given the difficulty in obtaining this type of formulation with low levels of polydispersion, and EE greater than 99.0%. Both formulations obtained controlled the release of PPL in 24 hours and its accumulation in the target tissue for topical therapy of HI. In addition, positive results of inhibition of cell proliferation were observed.

Keywords: propranolol; infantile hemangioma; nanostructured lipid carriers; box-behnken design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hemangioma infantil facial em lactente de seis semanas. Fonte: Hinen <i>et al.</i> (2020) (3).....	18
Figura 2 – Representação gráfica de vasos endoteliais nas fases de desenvolvimento do HI (aumento de 40X). Fonte: Adaptado de Greenberger e Bischoff (2013) (7).....	19
Figura 3 – Representação gráfica dos HI classificados como (i) localizados, (ii) segmentares, (iii) indefinidos e (iv) multifocais. Fonte: Adaptado de Chiller <i>et al.</i> (2002) e Léauté-Labrèze <i>et al.</i> (2017) (14,15)	21
Figura 4 – Representação gráfica de complicações ocasionadas por HI, em A, a visão do paciente foi comprometida e em B, ocorreu ulceração na pele. Fonte: Adaptado de Léauté-Labrèze <i>et al.</i> (2017) (15).....	22
Figura 5 – Representação gráfica da molécula estrutural e molecular de cloridrato de propranolol. Fonte: Adaptado de SCIFINDER (2022) (22).....	22
Figura 6 – Representação gráfica do medicamento Hemangeol®. Fonte: Pierre Fabre Pharmaceuticals (2019) (26).....	23
Figura 7 – Representação gráfica da célula do tipo Franz modificada utilizada nos ensaios de liberação e permeação cutânea e dos modelos de pele utilizadas no estudo do perfil de permeação.....	38
Figura 8 – Curvas de calorimetria de varredura diferencial de propranolol (PPL) como fornecido e suas misturas físicas com os compostos de nanopartículas (M1 a M16). A fusão do PPL é destacada na linha sombreada em azul. A fusão do ácido esteárico também é apontada pelos círculos laranja pontilhados. A variação da temperatura de fusão do PPL em cada uma das misturas é indicada pela linha pontilhada azul.....	42
Figura 9 – Superfícies de resposta da variação do pico de fusão do propranolol (PPL) (°C) obtidas a partir dos resultados de DSC de acordo com um desenho de mistura simplex centróide. (I) Superfície de resposta envolvendo ácido esteárico (AE), óleo essencial de Rosa rubiginosa (ORM) e lecitina de soja (LS); (II) Superfície de resposta envolvendo taurodeoxicolato de sódio (TAU), ORM e LS. As regiões roxas intensas representam composição com reduções mais acentuadas na fusão	

do PPL. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados.....	43
Figura 10 – Primeira derivada das curvas termogravimétricas do propranolol (PPL) e suas misturas físicas com os compostos das nanopartículas (M1 a M16). As etapas de perda de massa para cada amostra são delimitadas em linhas pontilhadas laranja juntamente com sua porcentagem de perda de massa. A região sombreada em azul indica o T_{peak} correspondente à decomposição do PPL.	45
Figura 11 – Superfícies de resposta da variação do pico de decomposição do propranolol (PPL) ($^{\circ}C$) obtidas a partir dos resultados de TGA de acordo com um desenho de mistura simplex centróide. (I) Superfície de resposta envolvendo ácido esteárico (AE), óleo essencial de Rosa rubiginosa (ORM) e lecitina de soja (LS); (II) Superfície de resposta envolvendo taurodeoxicolato de sódio (TAU), ORM e LS. As regiões roxas intensas representam composição com reduções mais acentuadas na decomposição de PPL. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados.....	46
Figura 12 – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do propranolol (PPL) fornecido e misturas físicas dos compostos das nanopartículas (M12, M14 e M15), antes e após um tratamento térmico. Os grupos funcionais do PPL em sua fórmula estrutural estão relacionados às bandas do espectro por cores. O coeficiente de correlação de espectro (r) foi calculado a partir da amostra não tratada e tratada.	
Figura 13 – Cromatogramas representativos do ensaio de seletividade: matéria-prima cloridrato de propranolol (PPL); PPL e extrato de pele remanescente; PPL e extrato de folículo piloso; PPL e extrato de estrato córneo. R: resolução; o tempo de retenção e concentração média do PPL com desvio padrão são mostrados para cada amostra.....	48
Figura 14 – Recuperação de cloridrato de propranolol (PPL) das camadas da pele (estrato córneo; folículo piloso e pele remanescente) em porcentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.	55
Figura 15 – Superfície de resposta da robustez em porcentagem considerando a área de respostas e tempo de retenção juntamente com as equações preditivas para cada resposta, o coeficiente de correlação (r^2) e a precisão adequada. As áreas verdes representam condições analíticas com menor mudança nessas respostas, enquanto as áreas vermelhas representam grande mudança. Temp: temperatura; FA: fase aquosa; F: fluxo.....	56

Figura 16 – Superfícies de resposta para tamanho de partícula do CLN carregado de PPL (nm) obtido pelo desenho Box-Behnken. (I) Superfície de resposta envolvendo rotação do Turrax e tempo de agitação do Turrax; (II) Superfície de resposta envolvendo rotação do Turrax e tempo de sonicação. As regiões alaranjadas intensas representam condições de produção com aumento mais acentuado no tamanho das partículas. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados. A: Rotação Turrax; B: Tempo de agitação Turrax; C: tempo de sonicação..... 59

Figura 17 – Superfícies de resposta para o índice de polidispersão do CLN carregado com PPL obtido pelo desenho Box-Behnken. (I) Superfície de resposta envolvendo rotação Turrax e tempo de agitação Turrax; (II) Superfície de resposta envolvendo rotação Turrax e tempo de sonicação. As regiões de laranja intenso representam condições de produção com aumento mais acentuado do índice de polidispersão. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados. A: Rotação Turrax; B: Tempo de agitação Turrax; C: tempo de sonicação..... 61

Figura 18 – Representação gráfica do tamanho médio dos CLN vazios e carregados ao longo de 90 dias, em temperaturas de armazenamento de 4, 25 e 40°C. Os quatro grupos analisados demonstraram tamanhos estatisticamente diferentes em todas as *temperaturas e *tempos do estudo. * $p < 0,0001$ 63

Figura 19 – Representação gráfica do PDI dos CLN vazios e carregados ao longo de 90 dias, em temperaturas de armazenamento de 4, 25 e 40°C. Os quatro grupos analisados demonstraram índices de dispersão estatisticamente diferentes em todas as *temperaturas e **tempos do estudo. * $p < 0,0001$; ** $p = 0,0014$ 64

Figura 20 – Representação gráfica do potencial zeta dos CLN vazios e carregados ao longo de 90 dias, em temperaturas de armazenamento de 4, 25 e 40°C. Os quatro grupos analisados demonstraram valor de potencial zeta estatisticamente diferentes em todas as *temperaturas e *tempos e do estudo. * $p < 0,0001$ 65

Figura 21 – Representação gráfica da cinética de liberação do PPL pela solução controle e pelos CLN – PPL..... 66

Figura 22 – Perfis de permeação do PPL através da solução controle e CLNs carregados nos diferentes modelos de pele suína, convencional (A) e com o folículo

ocluído (B). EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; EP: epiderme; SR: solução receptora..... 68

Figura 23 - Ensaio de viabilidade celular. Representação gráfica da metabolização do MTT por HBMECs tratados com PPL de 0 a 100 μM por 24 horas. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média e foram normalizados para a viabilidade apresentada pelos HBMECs não tratados. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA *two way*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos..... 69

Figura 24 - Ensaio de viabilidade/proliferação celular. Representação gráfica da metabolização do MTT por HBMECs tratados com PPL livre ou nanoformulado a 50 μM por 1, 3 e 6 dias. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média e foram normalizados para a viabilidade apresentada pelos HBMECs tratados com PPL 0 μM (controle) no dia 1. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA *two way*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos..... 70

Figura 25 - Ensaio de migração celular. Representação gráfica da inibição da migração de células HBMECs tratados com PPL livre ou nanoformulado a 50 μM . Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média e foram normalizados para a migração apresentada pelos HBMECs tratados com PPL 0 μM (controle) no tempo 0. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA *two way*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Complicações que podem acontecer em razão da presença de HI.....	20
Tabela 2 – Composição das amostras com base no desenho de mistura simplex centróide.....	28
Tabela 3 – Grupos experimentais dos ensaios in vitro em células HBMEC.....	39
Tabela 4 – Condições cromatográficas testadas na fase de desenvolvimento do método.....	50
Tabela 5 – Ensaio de precisão incluindo repetibilidade e precisão intermediária....	53
Tabela 6 – Coeficiente de solubilidade do cloridrato de propranolol em água e em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4).....	57
Tabela 7 – Avaliação do modelo preditivo baseado no Teste-1 (CLN 500 nm) e Teste-2 (CLN 900 nm).....	62
Tabela 8 – Adequação dos modelos de ajuste de cinética de liberação do controle e dos CLN – PPL considerando o melhor coeficiente de correlação (r^2).....	67

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AE	Ácido esteárico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN – PPL	Carreador lipídico nanoestruturado carregado com cloridrato de propranolol
CLN PPL – 500	Carreador lipídico nanoestruturado carregado com cloridrato de propranolol de tamanho médio de 500 nanômetros
CLN PPL – 900	Carreador lipídico nanoestruturado carregado com cloridrato de propranolol de tamanho médio de 900 nanômetros
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EE	Eficiência de encapsulação
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drugs Administration
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HBMEC	Células endoteliais microvasculares do cérebro humano
HI	Hemangioma infantil
LS	Lecitina de soja
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio
ORM	Óleo de rosa mosqueta (óleo essencial de <i>Rosa rubiginosa</i>)
PDI	Índice de polidispersividade
pH	Potencial hidrogeniônico
PPL	Cloridrato de propranolol
QbD	Quality by design
TAU	Taurodeoxicolato de sódio
TGA	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
PBS	Tampão fosfato salino

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	HEMANGIOMA INFANTIL (HI)	18
1.1.1	Etiopatogenia do HI	19
1.1.2	Classificações do HI	20
1.2	CLORIDRATO DE PROPRANOLOL (PPL)	22
1.3	CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN) E ESTRATÉGIAS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO	24
1.3.1	Nanocarreadores e sua versatilidade	24
1.3.2	Emprego do óleo de rosa mosqueta nas nanoformulações	25
1.3.3	Estratégias de Quality-by-Design (QbD)	25
2.	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	MATERIAIS	27
3.2	ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO	28
3.2.1	Desenho de mistura	28
3.2.2	Análise térmica	29
3.2.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	30
3.3	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PPL	30
3.3.1	Condições cromatográficas	30
3.3.2	Desenvolvimento do método	31
3.3.3	Linearidade	31
3.3.4	Seletividade	31
3.3.5	Precisão	32
3.3.6	Acurácia	33
3.3.7	Robustez	33
3.3.8	Limite de detecção e quantificação	33

3.4	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PPL	34
3.5	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PROPRANOLOL..	34
3.5.1	Obtenção de CLN carregado com PPL (CLN - PPL).....	34
3.5.2	Desenho experimental.....	35
3.5.3	Caracterização das nanodispersões	36
3.5.4	Determinação da eficiência de encapsulação (EE).....	36
3.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS CLN – PPL	37
3.7	ENSAIOS IN VITRO DE LIBERAÇÃO	37
3.8	ENSAIOS IN VITRO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	38
3.9	AVALIAÇÃO IN VITRO DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE LINHAGEM HBMEC.....	39
3.9.1	Determinação da viabilidade e proliferação celular – Ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) 40	
3.9.2	Análise de migração de HBMEC - Ensaio de raspagem in vitro	41
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO	42
4.1.1	Análise térmica	42
4.1.2	Ensaio de FTIR	48
4.2	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PPL	50
4.2.1	Desenvolvimento do método	50
4.2.2	Validação do método	51
4.3	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PPL	58
4.4	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PROPRANOLOL..	58
4.5	ENSAIO DE ESTABILIDADE DOS CLN – PPL.....	63
4.6	ENSAIO DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO PPL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS	68
4.7	ESTUDO IN VITRO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA DOS CLN – PPL	69

4.8	AVALIAÇÃO IN VITRO DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE LINHAGEM HBMEC.....	71
5.	CONCLUSÕES.....	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 HEMANGIOMA INFANTIL (HI)

O hemangioma constitui uma doença que acomete de 3 a 12% de recém-nascidos e trata-se do tumor vascular benigno mais frequente em pacientes infantis, podendo se desenvolver ainda nos primeiros dias de vida até as fases seguintes da infância, sendo assim, tal patologia possui caráter importante no cenário pediátrico (1).

Comumente o hemangioma é notado com o surgimento de uma lesão sobre a pele que pode ser lisa ou protuberante, com cor variando do rosa ao vermelho intenso (2) (Figura 1). Apesar de sua manifestação mais comum ser uma lesão na pele de forma bem visível, o hemangioma infantil (HI) também pode ocorrer em partes internas do corpo, como em mucosa oral e no fígado (4,5).



Figura 1 - Hemangioma infantil facial em lactente de seis semanas. Fonte: Hinen *et al.* (2020) (3).

O padrão evolutivo do HI apresenta três fases de desenvolvimento, a fase de proliferação ativa, a involutiva e a fase involuída. A primeira é extremamente angiogênica, nela acontece proliferação de um grande número de células

endoteliais. Na fase involutiva ocorre o início da regressão espontânea da angiogênese, diminuindo o tamanho da lesão. Por último, na fase involuída, é observado o completo desaparecimento da massa de tecidos moles (Figura 2) (1,6).

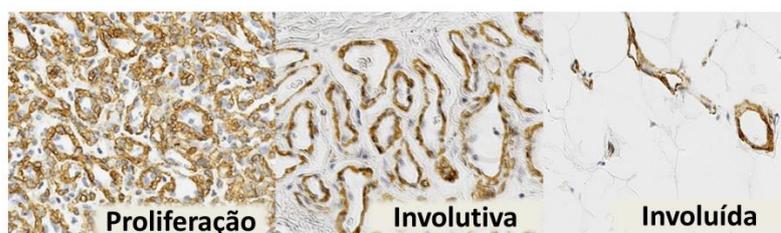


Figura 2 – Representação gráfica de vasos endoteliais nas fases de desenvolvimento do HI (aumento de 40X). Fonte: Adaptado de Greenberger e Bischoff (2013) (7).

1.1.1 Etiopatogenia do HI

Mesmo que não seja uma patologia descrita recentemente, as causas do HI ainda não foram bem elucidadas e a origem celular e os sinais biológicos para o crescimento descontrolado permanecem indefinidos, conhecimento que é muito importante para definir possíveis vias de tratamento para a doença, no entanto, várias teorias têm sido levantadas sobre a sua patogênese (8).

Harbi *et al.* (2016) mostraram em seu estudo que o HI se dá a partir de uma célula-tronco multipotente desregulada, levantaram ainda que no seu desenvolvimento há uma alta expressão de genes envolvidos na vasculogênese, angiogênese, tumorigênese e vias de sinalização associadas. Os autores ainda observaram um possível papel do sistema imunológico na gênese da doença em que o estágio inicial da proliferação do HI geralmente coincide com o início da maturação do sistema imunológico (entre os seis e doze meses de idade) (9).

Vários outros estudos inferiram que na fase proliferativa do HI ocorrem desequilíbrio dos fatores angiogênicos e aumento dos níveis de fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblastos e metaloproteinasas. Na fase de regressão, os níveis desses fatores diminuem (7,10).

1.1.2 Classificações do HI

As classificações clínicas dos hemangiomas foram inicialmente definidas a partir de suas características morfológicas e da localização anatômica. Posteriormente, a comunidade científica que estudava a patologia começou classificá-los também com base nas características celulares e histológicas (11).

Embora na maioria dos casos a doença tenha remissão sem a necessidade de tratamento, parte dessas lesões pode causar de comprometimentos estéticos até funcionais (Tabela 1), como compressão de estruturas vitais, dor por ulceração, complicações a nível vascular e cicatrizes. Esses tipos de casos requerem intervenção farmacológica em seu manejo ou até cirúrgicas (12,13).

Tabela 1 – Complicações que podem acontecer em razão da presença de HI.

Complicação	Localização e achados clínicos
Complicações com risco de vida	Obstrução de vias aéreas (HI subglótico)
	HI hepático com insuficiência cardíaca e/ou disfunção tireoidiana
Comprometimento funcional	HI periocular >1 cm
	HI envolvendo lábio ou cavidade oral
Ulceração	HI segmentar e superficial, HI no lábio, columela nasal, hélice superior da orelha, pescoço, área anogenital, axilas
Desfiguração	HI segmentar na face ou couro cabeludo

HI: hemangioma infantil.

Em 2002 Chiller *et al.* classificou o HI em quatro tipos, os localizados (i), segmentares (ii), indeterminados (iii) e multifocais (iv). As lesões localizadas foram caracterizadas por possuírem clara contenção espacial, geralmente com envolvimento de apenas um ou dois locais; as segmentares demonstraram localização linear e/ou geográfica em um espaço cutâneo específico; na categoria de lesões indeterminadas foram incluídos os casos de HI impossíveis de categorizar com segurança como localizados ou segmentares; as lesões multifocais foram definidas por presença de oito ou mais lesões não contíguas individuais de qualquer característica morfológica (Figura 2) (14).

Léauté-Labrèze et al. (2017) classificou os HI de forma semelhante à classificação descrita acima, contudo, por se tratar de um estudo mais atual, acrescentou importantes detalhes que levam a uma melhor compreensão da gravidade de acometimento do paciente pela patologia (15).

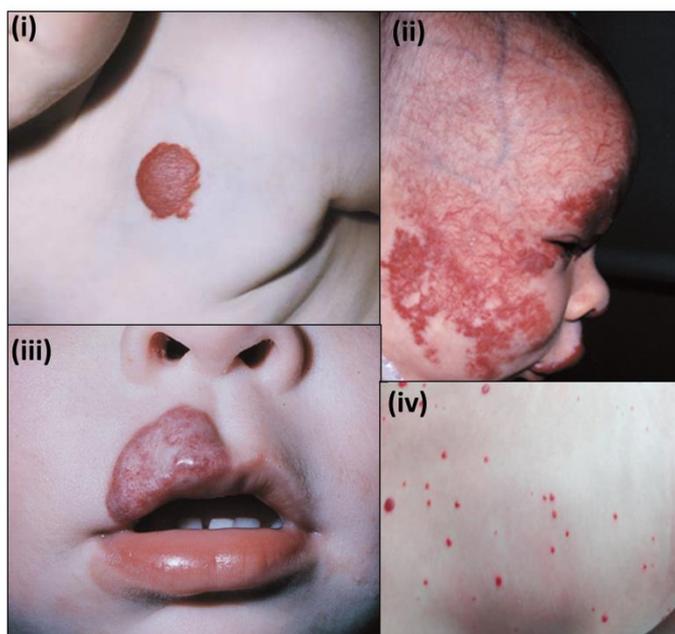


Figura 3 – Representação gráfica dos HI classificados como (i) localizados, (ii) segmentares, (iii) indefinidos e (iv) multifocais. Fonte: Adaptado de Chiller *et al.*(2002) e Léauté-Labrèze *et al.*(2017) (14,15).

Na maioria dos casos semelhantes aos representados na figura 2, terapias farmacológicas envolvendo β -bloqueadores ou corticosteroides de uso tópico, sistêmico ou injetável são suficientes para manejar o HI, a laserterapia também pode contribuir com a regressão da doença. Todavia nos casos de pacientes em que o HI apresenta riscos (Tabela 1) e ocasiona complicações (Figura 4) deve-se lançar mão de outras intervenções como a remoção cirúrgica do tumor (15,16).

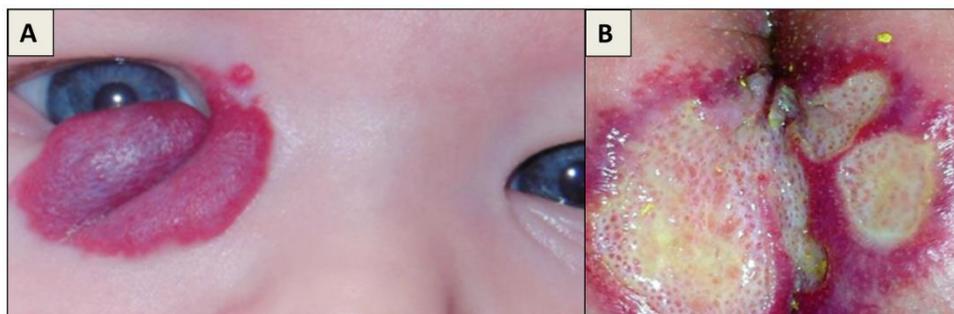


Figura 4 – Representação gráfica de complicações ocasionadas por HI, em A, a visão do paciente foi comprometida e em B, ocorreu ulceração na pele. Fonte: Adaptado de Léauté-Labrèze *et al.*(2017) (15).

1.2 CLORIDRATO DE PROPRANOLOL (PPL)

O PPL (Figura 5), fármaco antagonista dos receptores beta adrenérgicos descoberto nos anos 60 com finalidade de tratar cardiopatias, é também utilizado no controle de hipertensão e vem demonstrando, desde sua síntese, eficácia frente a várias outras patologias (17). Sua aplicação tem sido estudada no manejo de hemangiomas, inflamações, enxaqueca, ansiedade, também tem sido analisada sua ação coadjuvante no controle de hiperidrose, bem como seu efeito anestésico e analgésico. Em todos os casos, os estudos envolvendo o fármaco apresentam resultados promissores (18–21).

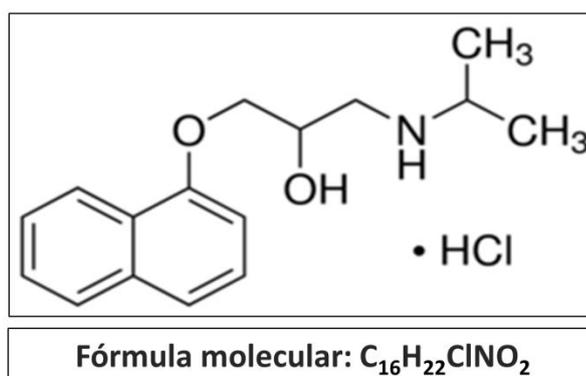


Figura 5 – Representação gráfica da molécula estrutural e molecular de cloridrato de propranolol. Fonte: Adaptado de SCIFINDER (2022) (22).

Caracterizado como um pó cristalino branco e inodoro, o PPL, apresenta termoestabilidade (fusão acima de 200°C), possui alta solubilidade em meios aquosos ($\log P = 2,58$) e é considerado uma base fraca ($pK_a=9,67$) (23).

Comumente administrado por via oral, o PPL sofre significativa metabolização hepática, resultando em uma biodisponibilidade de apenas 30%, o que se torna um problema tecnológico a ser resolvido (24). No caso do HI, isso se torna ainda mais necessário, pois o PPL administrado por via sistêmica constitui o único tratamento aprovado pelas principais agências regulatórias do mundo, como a agência americana Food and Drug Administration (FDA) e a europeia European Medicines Agency (EMA) (25).

A atividade desse fármaco em promover a regressão do hemangioma foi observada acidentalmente durante o tratamento de cardiopatias em crianças, o primeiro caso relatado foi um lactente de um mês de idade tratado com PPL para cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva que apresentou simultaneamente resolução de HI (26,27).



Figura 6 – Representação gráfica do medicamento Hemangeol®. Fonte: Pierre Fabre Pharmaceuticals (2019) (28).

O Hemangeol® é um medicamento apresentado na forma farmacêutica solução para administração oral, ele é constituído de PPL na concentração de 4,28

mg/mL e sua posologia é dependente do peso do paciente e do tipo de acometimento patológico (28,29).

Em razão do tratamento sistêmico, os pacientes infantis são bastante afetados pelos seus efeitos colaterais, que incluem hipoglicemia, insônia, diarreia e bradicardia (30,31). Portanto, o desenvolvimento de formulações para aplicação tópica de PPL pode superar as limitações do tratamento do hemangioma por via oral, otimizando resultados de eficácia e segurança (32).

O mecanismo terapêutico do PPL contra esta patologia envolve teorias relacionadas à vasoconstrição e apoptose de células endoteliais via sinalização de receptores β -adrenérgicos e via das caspases, além destas, a inibição da angiogênese através da modulação de fatores de crescimento vascular também tem sido sugerida como um provável mecanismo de ação do PPL (33).

1.3 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN) E ESTRATÉGIAS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO

1.3.1 Nanocarreadores e sua versatilidade

A formulação empregada na entrega de fármacos é decisiva para garantir o melhor tratamento das várias patologias existentes. As nanopartículas, dependendo de algumas características específicas, como tamanho, por exemplo, podem modular a liberação do fármaco e a penetração cutânea, visando o local de ação, seja local ou sistêmico (34). Além disso, seriam o veículo ideal para proteger um fármaco fotoinstável como o PPL (35,36).

Nanopartículas poliméricas foram descritas na literatura veiculando PPL para o tratamento tópico de hemangiomas. Nos resultados, quando comparados à solução medicamentosa, quase dobraram a penetração em ensaios *in vivo* na pele de ratos (1,91 vezes) (37).

Os CLNs são formados por uma combinação de lipídios sólidos e líquidos que proporcionam importantes benefícios para aplicação tópica. De acordo com as

características dos CLNs, é possível direcionar o fármaco para uma determinada região da pele, como folículos pilosos (FP) (38).

Alternativamente, sua penetração nas camadas mais profundas da pele pode ser potencializada, promovendo um efeito transdérmico (39). Essa versatilidade de CLNs pode ser uma escolha altamente recomendada para o PPL, já que ele possui um amplo espectro de ação terapêutica.

Além disso, os CLNs podem carregar altas concentrações de fármaco, controlar e direcionar a liberação de substâncias nas camadas da pele e são adequados para aplicação em pele danificada, uma vez que os lipídios são altamente biocompatíveis (40,41).

1.3.2 Emprego do óleo de rosa mosqueta nas nanoformulações

No desenvolvimento de CLNs, a literatura reporta com frequência que ácidos graxos isolados são a primeira escolha ao definir o lipídio líquido da formulação, são exemplos, o ácido oleico, ácido linolênico, ácido linoleico, ácido caprílico, entre outros (39). Com menos ocorrência, óleos essenciais de composição complexa são utilizados em nanocarreadores lipídicos. Nesses estudos, os achados demonstram que CLNs que levam óleos essenciais ao invés de ácidos graxos isolados, tendem a possuir um índice de polidispersão (PDI) mais elevado (42,43).

O óleo essencial de *Rosa rubiginosa* (ORM) foi selecionado como o lipídio líquido nesse estudo devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e indutoras da síntese de colágeno que podem contribuir para a ação terapêutica do PPL com vistas à aplicação tópica (44).

1.3.3 Estratégias de Quality-by-Design (QbD)

Apesar das diversas vantagens citadas anteriormente dos CLNs, o processo de produção desses sistemas lipídicos, geralmente empíricos, é fortemente afetado

por pequenas modificações na composição e no processo de fabricação, levando a resultados inesperados e falta de reprodutibilidade (45,46).

Para superar esses problemas, o emprego de estratégias de QbD podem aumentar a percepção das características que influenciam o produto final. A utilização de desenhos experimentais, por exemplo, permite obter modelos preditivos para controlar parâmetros críticos de produção que influenciam as características finais da formulação (47,48).

Notavelmente, os projetos Box-Behnken podem ser úteis em desenhos experimentais envolvendo a produção de CLN. Essa abordagem utiliza um desenho fatorial incompleto que promove combinações de variáveis contínuas em pontos médios do espaço amostral, obtendo equações preditivas sem grande complexidade e utilizando um menor tempo experimental (49,50).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo cloridrato de propranolol com aplicação tópica a fim de obter uma formulação alternativa ao tratamento por via oral de hemangiomas infantis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) seletivamente capaz de quantificar PPL em soluções metanólicas e extraído de pele suína;
- Desenvolver um modelo preditivo de superfície de resposta por meio de um projeto Box-Behnken capaz de direcionar quais mudanças no processo produtivo das nanoformulações irão influenciar em suas características de tamanho e PDI.

- Atestar a compatibilidade térmica e química dos insumos envolvidos no desenvolvimento das nanoformulações;
- Obter carreadores lipídicos nanoestruturados contendo PPL de tamanhos diferentes para avaliar possíveis diferenças no perfil de permeação cutânea passiva desencadeadas por essa característica;
- Caracterizar os CLN de acordo com tamanho médio, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação;
- Determinar *in vitro* a cinética de liberação do PPL pelas nanoformulações;
- Avaliar *in vitro* o perfil de permeação cutânea passiva dos CLN de tamanhos diferentes e estudar a influência do folículo piloso na permeação;
- Estudar *in vitro* a influência dos CLNs desenvolvidos na viabilidade, proliferação e migração celular utilizando células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O PPL (lote M160512, pureza > 99%) foi obtido da Changzhou Yabang Pharmaceutical (Jiangsu, China) e o seu respectivo padrão analítico (lote BCBV9430) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido fosfórico usado na preparação da fase móvel também foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e os solventes metanol e acetonitrila de grau analítico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os insumos usados no desenvolvimento das formulações taurodeoxicolato de sódio (TAU) e o ácido esteárico (AE) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A lecitina de soja S100 (LS) e o óleo essencial de *Rosa rubiginosa* (ORM) foram obtidos da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha) e Fagron (São Paulo, Brasil), respectivamente. A água ultrapurificada foi fornecida por um sistema Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). Fosfato de sódio dibásico e o fosfato de potássio monobásico utilizados na preparação de

tampão fosfato foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil) e da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), respectivamente. A membrana de acetato de celulose utilizada no ensaio de liberação foi adquirida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

No processo de *tape stripping* diferencial, foram usadas fita Scotch Book nº 845 adquirida da empresa 3M (St. Paul, Estados Unidos) e cola de cianoacrilato da Loctite-Henkel (Dublin, Irlanda). As peles das orelhas suínas foram obtidas do matadouro local Via Carnes (Formosa, Brasil).

Para os testes *in vitro* em células foi utilizada uma cultura de linhagem imortalizada de células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC) que foi gentilmente cedida pelo Dr. Enrique Arganaraz da Universidade de Brasília (Distrito Federal, Brasil). Meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e soro fetal bovino foram obtidos de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos). Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tampão fosfato salino (PBS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2 ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

3.2.1 Desenho de mistura

A compatibilidade entre o PPL e os excipientes selecionados para a produção dos CLN foi avaliada com base em um desenho de mistura simples centróide (51). A concentração de PPL nas misturas físicas foi fixada em 50% (p/p), enquanto a composição dos excipientes seguiu o projeto da mistura experimental, conforme descrito na Tabela 2. As respostas obtidas a partir da análise térmica e espectroscopia de infravermelho foram avaliadas usando o Design Expert Software 12.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EUA). Os dados foram analisados usando ANOVA *one-way*, e o modelo de melhor ajuste foi selecionado para cada resposta com base nos valores de *p*. Uma equação preditiva contendo apenas termos significativos, mas obedecendo à hierarquia do modelo, foi obtida a partir da análise de regressão múltipla.

Tabela 2 – Composição das amostras com base no desenho de mistura simplex centróide.

Misturas	PPL (%, p/p)	AE (%, p/p)	ORM (%, p/p)	LS (%, p/p)	TAU (%, p/p)
M1	50,00	25,00	-	25,00	-
M2	50,00	-	50,00	-	-
M3	50,00	-	25,00	-	25,00
M4	50,00	-	-	25,00	25,00
M5	50,00	6,25	6,25	31,25	6,25
M6	50,00	50,00	-	-	-
M7	50,00	-	-	50,00	-
M8	50,00	6,25	31,25	6,25	6,25
M9	50,00	-	-	-	50,00
M10	50,00	20,00	10,00	10,00	10,00
M11	50,00	-	25,00	-	25,00
M12	50,00	25,00	-	-	25,00
M13	50,00	25,00	25,00	-	-
M14	50,00	6,25	6,25	6,25	31,25
M15	50,00	31,25	6,25	6,25	6,25
M16	50,00	12,50	12,50	12,50	12,50

3.2.2 Análise térmica

Os ensaios de DSC foram conduzidos em equipamento DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão) usando cadinho de alumínio sob uma atmosfera controlada de nitrogênio de 50 mL/min⁻¹ e uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

As amostras foram analisadas na faixa de temperatura de 30 °C até a temperatura imediatamente anterior à decomposição da amostra (52). O T_{peak} de fusão do fármaco foi determinado, e o ΔT_{peak} , que foi obtido a partir da diferença entre o PPL fornecido e cada amostra, foi usado como uma resposta para o desenho da mistura.

As misturas (Tabela 2) foram analisadas em duplicata e todos os cálculos foram realizados no software TA-60 Shimadzu® (Kyoto, Japão).

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas usando um DTG-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão) sob a mesma atmosfera, fluxo de gás e taxa de aquecimento descritos nos ensaios de DSC. Aproximadamente 4 mg de amostra foram pesadas em um cadinho de platina e analisadas na faixa de temperatura de

30 a 500 °C. A primeira derivada da perda de massa foi representada a partir das curvas de TGA. A perda de massa para cada etapa de decomposição das amostras e o T_{peak} da primeira etapa de decomposição da amostra foram determinados. O ΔT_{peak} foi usado como uma resposta para o desenho de mistura calculado a partir da diferença entre o PPL fornecido e cada mistura.

3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um espectrômetro Bruker Vertex-70 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA) com acessório de refletância total atenuada na faixa de 4.000 - 400 cm^{-1} . O fármaco e os demais excipientes foram analisados individualmente e combinados nas misturas previamente planejadas (Tabela 2), antes e após a realização do tratamento térmico em mufla (Magnus, Belo Horizonte, Brasil) a 80 °C por 20 min. O software Essential FTIR (Operant LLC, Burke, VA, EUA) foi usado para avaliar o coeficiente de correlação (r) entre os espectros gerados a partir de amostras tratadas e não tratadas (53).

3.3 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PPL

3.3.1 Condições cromatográficas

Foi desenvolvido um método analítico baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – UV de fase reversa usando dois aparelhos diferentes LC-20AT e LC-20CE (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipados com uma coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). O volume de injeção foi de 10 μL e a detecção foi realizada a 290 nm.

3.3.2 Desenvolvimento do método

Soluções estoque (100,0 µg/mL) foram obtidas dissolvendo PPL em metanol. O desenvolvimento do método foi realizado utilizando uma solução de PPL na concentração nominal de 10,0 µg/mL em metanol. Diferentes parâmetros analíticos foram testados, como composição da fase móvel, taxa de fluxo e temperatura do forno. A adequação cromatográfica, ou seja, placas teóricas, fator de cauda, resolução (calculada com base no pico de contaminante mais próximo do pico do analito) e tempo de retenção foram avaliados de acordo com a Farmacopeia e calculados usando o software de solução Shimadzu LC (54).

3.3.3 Linearidade

Uma curva foi construída utilizando regressão linear de mínimos quadrados com base nas áreas do cromatograma com soluções de PPL sem contaminantes na faixa de 3 a 20 µg/mL em triplicata. Os coeficientes angulares e lineares da curva foram avaliados por meio de um teste t ($\alpha = 0,05$). Os resíduos foram calculados com base na diferença entre os valores teóricos e experimentais obtidos da curva (55).

3.3.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir de extratos das camadas cutâneas obtidos a partir da técnica de *tape stripping* diferencial (55).

Resumidamente, um pedaço de pele suína (de aproximadamente 2 cm²) foi fixado em um suporte, e o estrato córneo foi removido com 15 pedaços de fita adesiva. Em seguida, foi aplicada uma gota de cola de cianoacrilato na superfície da pele e colocada a fita adesiva. Após a secagem total da cola, a fita adesiva foi removida em um único movimento para a obtenção dos folículos capilares. Este

procedimento foi repetido para garantir que todos os folículos capilares fossem removidos. Por último, a pele remanescente foi cortada em pequenos pedaços.

Após esse processo, as diferentes camadas de pele foram colocadas em um frasco de vidro fechado separado com 5 mL de metanol. Os frascos foram submetidos a um processo de extração estática por 24h e seu conteúdo foi filtrado em membranas de nylon de 0,45 µm.

Uma solução de PPL na concentração nominal de 10,0 µg/mL em metanol contendo cada um dos extratos de contaminantes da pele (extrato córneo, folículos capilares ou pele remanescente) foi preparada e comparada a uma solução de PPL na mesma concentração sem contaminantes. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados da concentração do fármaco e do tempo de retenção foram analisados por teste t usando OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

Além de analisar a seletividade do método frente aos extratos de cada parte da pele, foi avaliada também sua seletividade em relação aos componentes dos CLN. Para isso, foram preparadas em triplicata, soluções metanólicas contendo todos os insumos utilizados no desenvolvimento dos CLN e o PPL na concentração nominal de 10,0 µg/mL.

3.3.5 Precisão

A precisão foi determinada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada com seis amostras na concentração nominal de PPL (10 µg/mL). A precisão intermediária foi avaliada segundo um planejamento fatorial completo 2³, no qual os fatores foram o dia da análise, o analista e o cromatógrafo, em triplicata, utilizando soluções de PPL na concentração nominal (56). A validação do modelo foi realizada por meio de análise de variância (53). Todos os cálculos foram realizados com o software Design-Expert[®] versão 11 (Stat-Ease, Minneapolis, Estados Unidos).

3.3.6 Acurácia

A acurácia desse método foi realizada considerando a recuperação do PPL das diferentes camadas da pele (estrato córneo, folículos capilares e pele remanescente) em triplicata. Resumidamente, 1 mL de PPL (10 µg/mL) em metanol foi adicionado a cada uma das camadas de pele obtidas seguindo a técnica de remoção de fita diferencial descrita em detalhes na seção 3.3.4. Após a evaporação do solvente, as amostras foram cortadas em pequenos pedaços, embebidas em 5 mL de metanol e mantidas em repouso por 24h em temperatura ambiente. Em seguida, foram filtrados e analisados pelo método de CLAE proposto. A recuperação do medicamento foi estimada com base na quantidade de PPL extraída de cada fração em relação ao PPL adicionado, em porcentagem.

3.3.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada aplicando variações em fatores selecionados de cerca de 5%, de acordo com um planejamento fatorial completo 2³. Os parâmetros de análise estudados incluíram temperatura do forno, porcentagem de solução aquosa de ácido fosfórico 0,01M na fase móvel e fluxo. Cada condição de análise foi realizada em triplicata. A análise estatística foi realizada conforme descrito anteriormente na seção 3.3.5, e todos os cálculos foram realizados usando o software Design-Expert® versão 11 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, Estados Unidos).

3.3.8 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para determinação de PPL foram calculados com base na inclinação (*S*) de uma curva de calibração obtida usando uma faixa de concentração próxima a esses limites (3,0 a 10,0 µg/mL) em triplicata

de acordo com as equações 1 e 2 (48). O desvio padrão residual de uma linha de regressão foi usado como o desvio padrão (σ).

$$\text{Limite de detecção} = 3.3 \sigma / S \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Limite de quantificação} = 10 \sigma / S \quad (\text{Equação 2})$$

3.4 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PPL

A determinação da solubilidade do PPL foi realizada em água mili-Q e em tampão fosfato pH 7,4 para garantir que a condição *sink* seja atendida nos ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea de acordo com metodologia aplicada por (57).

Em tubos do tipo eppendorf foi adicionada uma quantidade em excesso do fármaco para cada um dos solventes, esses tubos foram submetidos à agitação com velocidade de 1000 rpm durante 48 horas, para cada solvente foi feita a análise em triplicata. Em seguida, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado e diluído para ser quantificado por CLAE.

3.5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PROPRANOLOL

3.5.1 Obtenção de CLN carregado com PPL (CLN - PPL)

O método de microemulsão foi utilizado para preparar os nanocarreadores lipídicos (58). Detalhadamente, uma fase lipídica contendo AE (750 mg) e ORM (750 mg) foi aquecida a 80 °C juntamente com LS (500 mg) e TAU (125 mg). Em seguida, o PPL (250 mg) foi adicionado à fase lipídica sob agitação magnética de 500 rpm

durante 5 minutos. Após esse procedimento, ainda sob as mesmas condições de agitação e temperatura, 500 μ L de água foram adicionados para obter uma microemulsão. Posteriormente, a microemulsão foi gotejada em 50 mL de solução tampão fosfato (0,2 M/L; pH 5,5) mantida em banho de gelo sob agitação vigorosa de um instrumento de dispersão de alto desempenho (Ultra-Turrax®, IKA-Werk GmbH & Co, Staufen, BW, Alemanha). Por fim, uma última etapa de homogeneização foi realizada utilizando um ultrassom (Sonics & Materials, Newtown, Estados Unidos) em banho de gelo, que é responsável por modificar as características de tamanho das duas dispersões de CLNs avaliadas neste estudo. A uma amplitude de 25 Hz, o CLN PPL - 500 foi agitado nesta fase durante 13,4 minutos e o CLN PPL - 900 durante 6 minutos.

3.5.2 Desenho experimental

O desenvolvimento do CLN - PPL foi realizado seguindo um desenho experimental utilizando o modelo preditivo Box-Behnken. Três variáveis críticas de fabricação foram selecionadas como fatores: a rotação do Ultra-Turrax® de 10.000 a 16.000 rpm; o tempo de agitação do Ultra-Turrax® de 10 a 30 min; e o tempo de sonicação de 0 a 15 min. Os experimentos foram planejados previamente com o software Design Expert versão 12 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EUA), resultando em 24 execuções.

Um modelo foi produzido para cada resposta (tamanho de médio de partícula e PDI) através de análise de regressão múltipla com base em ANOVA one-way ($p < 0,05$) (59). Os modelos preditivos obtidos para cada resposta foram integrados em um modelo otimizado, que poderia indicar as condições de produção do CLN - PPL com base nas características pretendidas da formulação. O modelo otimizado foi testado com duas formulações pretendidas usando três réplicas de fabricação.

A primeira nanoformulação foi definida para ter um tamanho médio de partícula de 500 nm, enquanto a segunda formulação deveria ter 900 nm. Em ambos os casos, a eficiência de aprisionamento deve ser superior a 90% e o índice de polidispersidade deve ter o menor valor possível.

3.5.3 Caracterização das nanodispersões

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersidade (Pdl) dos CLN – PPL em dispersão aquosa foram avaliados por espalhamento de luz dinâmico e o potencial zeta por mobilidade eletroforética. As nanopartículas foram diluídas em água Milli-Q (proporção 1: 100) e analisadas em triplicata no equipamento Zetasizer Nanoseries da empresa Malvern Instruments (Inglaterra) a 25 °C. O pH das dispersões foi medido usando um pHmetro modelo Digimed DM-22 da Digimed Analytica Ltda (São Paulo, Brasil).

3.5.4 Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação do fármaco pelo CLN - PPL foi determinada de acordo com a Equação 3. Para isso, as dispersões de CLN - PPL foram centrifugadas usando um filtro Vivaspin 2 MWCO 10.000 da fabricante Sartorius Lab Instruments GmbH & Co (Goettingen, Alemanha) por 20 minutos a uma rotação de 4.000 rpm em uma centrífuga Z 306 da Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen, Alemanha).

A quantidade do fármaco não aprisionado foi obtida pela determinação do PPL na fração filtrada (fármaco livre) e a quantidade total do fármaco na dispersão foi analisada por diluição em metanol. A quantificação do fármaco foi realizada usando o método analítico validado em CLAE descrito nesse trabalho. Uma solução do fármaco em tampão fosfato na mesma concentração da dispersão de CLN - PPL foi usada como controle de filtração.

$$EE (\% \text{ p/p}) = \frac{\text{Quantidade total do fármaco} - \text{fármaco livre}}{\text{Quantidade total do fármaco}} \times 100$$

(Equação 3)

3.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS CLN – PPL

Foi conduzido pelo período de 90 dias um estudo de estabilidade físico-químico do CLN vazio, do CLN PPL – 500 e do CLN PPL – 900 para avaliar o tempo em que as formulações mantêm suas características iniciais. O estudo foi conduzido de acordo com o Guia nº 28 de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (60).

Cada uma das amostras foram acondicionadas em ampolas âmbar hermeticamente seladas e submetidas a três diferentes condições de temperatura, sendo elas, geladeira (4 °C; ±2 °C), ambiente (25 °C; ±2 °C) e estufa (40 °C; ±2 °C). As formulações foram avaliadas quanto ao tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta e EE nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, em triplicata.

3.7 ENSAIOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO

O estudo *in vitro* da cinética de liberação promovida pelos CLN PPL – 500 e CLN PPL – 900 foi realizado utilizando células de difusão do tipo Franz modificadas em que entre o seu compartimento receptor e o compartimento doador foi alocada uma membrana de acetato de celulose (Figura 7).

No meio receptor foram adicionados 15 mL de tampão fosfato 0,2 M de pH 7,4 mantido a temperatura de 36 ± 2 °C sob agitação magnética e no meio doador foi acrescentado 500 µL das formulações. Uma solução de PPL (5 mg/mL) em tampão fosfato 0,2 M e de pH 5,5 foi utilizada como controle de liberação.

Durante o experimento foram realizadas coletas a cada hora até o final de 12 horas, após esse tempo realizou-se a última coleta em 24 horas. A cada coleta feita o meio receptor foi restituído e ao final do experimento as amostras coletadas foram quantificadas por CLAE.

3.8 ENSAIOS *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

O perfil de permeação cutânea dos CLN - PPL foi avaliado usando células de difusão do tipo Franz modificadas com a pele suína posicionada separando os compartimentos doador e receptor das células de difusão.

O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4), o qual foi magneticamente agitado e mantido a 36 ± 2 °C (61). O compartimento doador foi preenchido com 500 µL das formulações e da solução controle (PPL 5 mg/mL em tampão fosfato 0,2 M e de pH 5,5).

Após 12h, a pele foi removida das células de difusão e cuidadosamente limpa com papel absorvente e água. As camadas de pele foram separadas por *tape stripping* diferencial e submetidas ao processo de extração (conforme descrito na seção 3.3.6). Resumidamente, um pedaço de pele suína foi fixado a uma base e o estrato córneo foi removido com pedaços de fita adesiva. Em seguida, uma gota de cola de cianoacrilato foi aplicada na pele, um pedaço de fita adesiva foi fixado e após a cola estar completamente seca, a fita foi removida em um único movimento para obter os folículos pilosos, repetindo esta etapa se necessário para garantir que todos os folículos pilosos foram removidos. Por fim, a pele restante foi cortada em pequenos pedaços. As três frações de pele separadas foram então colocadas em um frasco de vidro fechado separado com 5 mL de metanol. Os frascos foram submetidos a um processo de extração por 24 horas e seu conteúdo foi filtrado através de membranas de nylon de 0,45 µm. A quantidade de fármaco recuperada em cada camada da pele e no meio receptor foi determinada por CLAE pelo método validado.

Além de conduzir o ensaio de permeação cutânea da forma convencional (pele intacta) como descrita acima, também foi estudado o perfil de permeação com os folículos pilosos ocluídos com o objetivo de conhecer o papel da via folicular na permeação do fármaco (Figura7), de acordo com Tolentino *et al.* (2020) (62). Nesse processo, o modelo de pele suína convencional foi substituído por um modelo em que a pele, até então convencional, tem os orifícios ocluídos por um esmalte com o auxílio de uma seringa de insulina. Para identificar os folículos pilosos na pele e garantir que a aplicação do esmalte estivesse correta foi utilizado um microscópio óptico (Laborana/SZ – SZT, China).

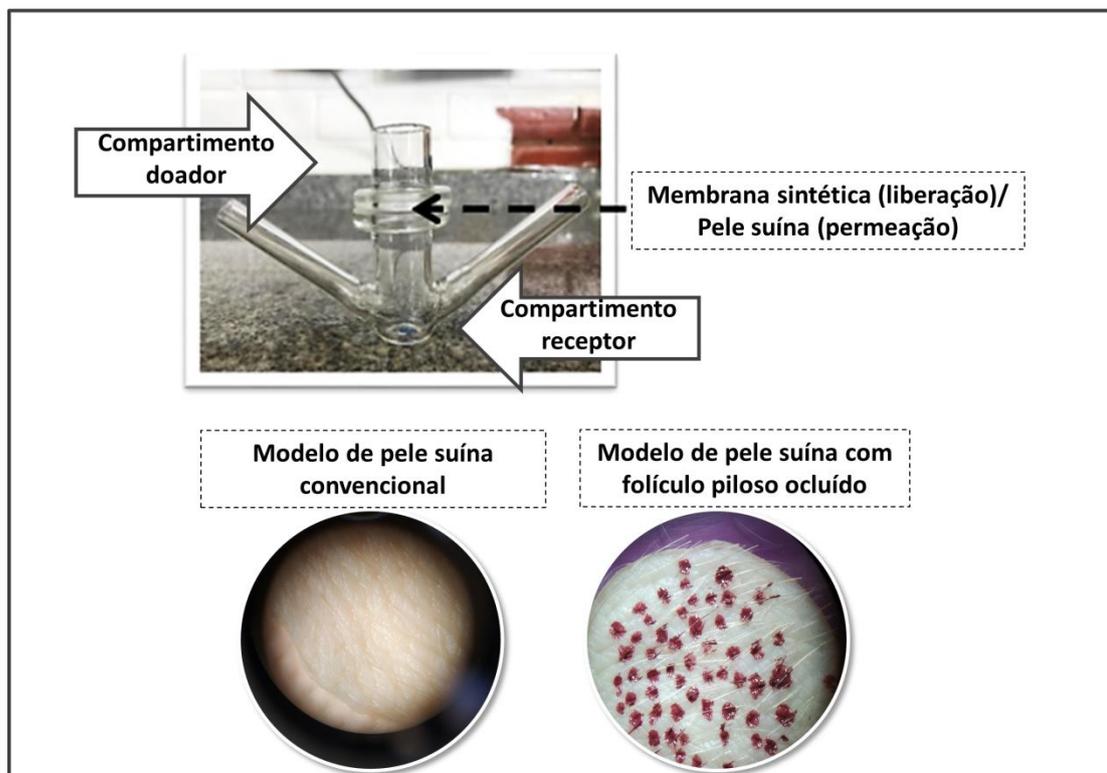


Figura 7 – Representação gráfica da célula do tipo Franz modificada utilizada nos ensaios de liberação e permeação cutânea e dos modelos de pele utilizadas no estudo do perfil de permeação.

3.9 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE LINHAGEM HBMEC

Uma linha celular imortalizada de células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC) descrita por Nikolskaia *et al.* (2006) (63) foi utilizada nos ensaios descritos abaixo. As células foram cultivadas usando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e mantido a 37 °C, em condições de 5% de gás carbônico (CO²) e 95% de umidade.

3.9.1 Determinação da viabilidade e proliferação celular – Ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT)

O ensaio de MTT foi realizado conforme descrito anteriormente por Alencar-Silva *et al.* (2019) (64) para avaliar a viabilidade e proliferação celular. Para a viabilidade celular, as células HBMEC foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços. Após incubação durante a noite para adesão celular, as células foram lavadas com PBS e 200 μ L de meio fresco contendo diferentes tratamentos foram adicionados aos poços, de acordo com os grupos experimentais da Tabela 3.

Tabela 3 – Grupos experimentais dos ensaios in vitro em células HBMEC.

Grupo	Descrição
I – Controle positivo	Composto por células mantidas em meio de cultivo de células basais durante todo o experimento.
II – Grupo PPL livre	Composto por células que foram tratadas com solução aquosa de PPL a 50 μ M.
III – Grupo CLN PPL - 500	Composto por células que foram tratados com nanopartículas de 500 nm contendo 50 μ M de PPL.
IV – Grupo CLN – 500	Composto por células que foram tratadas com nanopartículas vazias produzidas a partir dos mesmos parâmetros dos CLN PPL – 500 na mesma concentração do grupo III.
V – Grupo CLN PPL - 900	Composto por células que foram tratados com nanopartículas de 900 nm contendo 50 μ M de PPL.
VI – Grupo CLN – 900	Composto por células que foram tratadas com nanopartículas vazias produzidas a partir dos mesmos parâmetros dos CLN PPL – 900 na mesma concentração do grupo V.

Após uma incubação de 24h, as células foram lavadas novamente com PBS e meio fresco contendo 5 mg / mL de MTT foi adicionado nos poços. As placas foram então protegidas da luz e incubadas a 37 °C, 5% de CO² e 95% de umidade por 4 horas, após os cristais de formazan insolúveis serem dissolvidos usando DMSO e a absorbância da solução resultante foi quantificada em 595 nanômetros usando um espectrofotômetro de múltiplos poços (BioTek, PowerWave, VT, Estados Unidos).

Os dados foram normalizados para o grupo de controle de viabilidade positiva para análise estatística. O ensaio foi realizado em triplicado para cada tratamento.

Para a análise de proliferação celular, os mesmos procedimentos experimentais foram executados em 1, 3 e 6 dias de tratamento. Os dados foram normalizados para o grupo não tratado em cada momento experimental para análise estatística. O ensaio foi realizado em triplicata para cada tratamento.

3.9.2 Análise de migração de HBMEC - Ensaio de raspagem *in vitro*

A migração celular de HBMEC foi avaliada usando o ensaio de raspagem *in vitro*, que se baseia no princípio de que as células tendem a restabelecer uma monocamada de células confluentes após a criação de uma lacuna artificial (65). Resumidamente, as células HBMEC foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas até atingir 100% de confluência. Após, os poços foram riscados com uma ponta de pipeta de 200 μ L, as culturas foram lavadas para remover os resíduos celulares e receberam meio fresco contendo diferentes tratamentos, de acordo com os grupos experimentais descritos na Tabela 3.

A migração celular foi então avaliada durante 24 horas, usando o software ImageJ (Wayne Rasband, NIMH, Estados Unidos) para quantificar a quantidade de células que migraram para a área testada. O ensaio foi realizado em triplicata para cada tratamento.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os resultados da caracterização físico-química, liberação do fármaco e permeação cutânea dos CLNs foram analisados por ANOVA *one-way* e *two-way*, seguido de pós-teste de Tukey. Anteriormente, os dados foram avaliados quanto à distribuição normal. Para ensaios em células HBMEC, os experimentos foram realizados como 3 ou mais experimentos independentes, além das repetições

técnicas, detalhadas em cada ensaio. Todos os dados foram analisados usando ANOVA *one-way* e *two-way* com o software GraphPad Prism ® . Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

4.1.1 Análise térmica

Em formulações multicomponentes, como é o caso de CLN, as interações entre os excipientes podem desencadear eventos deletérios no fármaco. Nesse sentido, o uso de ferramentas sensíveis que possam identificar interações entre compostos, como a análise térmica associada ao uso de desenhos de misturas, pode ser capaz de avaliar as interações entre componentes em misturas complexas, o que é um avanço em relação aos protocolos tradicionais, antecipando riscos de estabilidade para o medicamento em um cenário mais realista (51,66). Para os CLN, tais testes são ainda mais críticos, pois o processo de produção desse sistema coloidal geralmente ocorre sob condições de estresse térmico e mecânico. De fato, altas temperaturas (80°C) e processos de mistura vigorosos foram necessários para produzir CLN carregando PPL.

Para a produção de CLN, foram selecionados o lipídio sólido AE e os tensoativos LS e TAU. Tais componentes têm demonstrado afinidade física e alta capacidade de interação com diferentes drogas (58,67).

De acordo com as análises de DSC (Figura 8), o PPL exibiu um pico endotérmico acentuado a 165 °C, consistente com sua fusão relatada (68,69). Com exceção da M2, que contém apenas a mistura binária de RO e fármaco, todas as outras misturas examinadas apresentaram redução na temperatura de fusão do fármaco, juntamente com diminuição da entalpia e alargamento do pico de fusão.

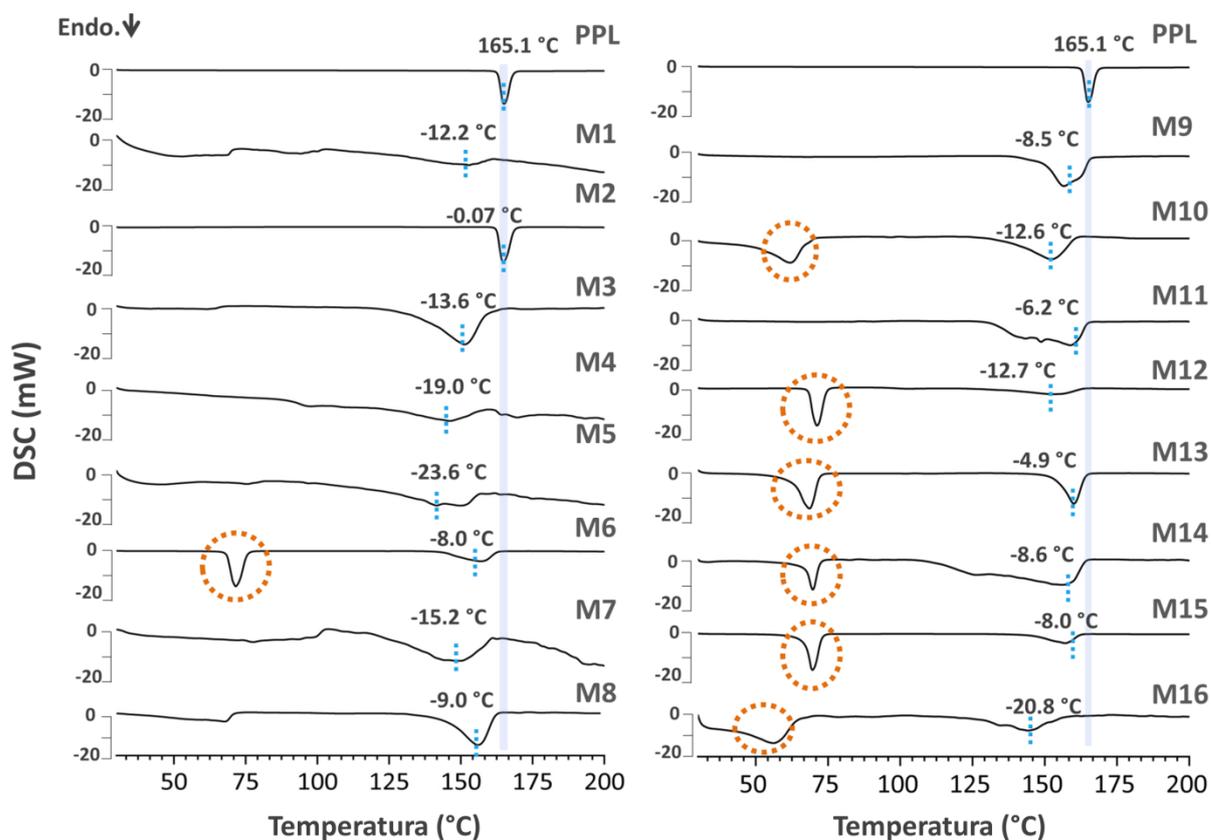


Figura 8 – Curvas de calorimetria de varredura diferencial de propranolol (PPL) como fornecido e suas misturas físicas com os compostos de nanopartículas (M1 a M16). A fusão do PPL é destacada na linha sombreada em azul. A fusão do ácido esteárico também é apontada pelos círculos laranja pontilhados. A variação da temperatura de fusão do PPL em cada uma das misturas é indicada pela linha pontilhada azul.

Notavelmente, uma antecipação da fusão em mais de 20 °C foi observada nas misturas mais complexas, como M5 e M6, que contêm todos os cinco excipientes juntos. Além disso, nas amostras M1, M6 e M10, que são compostas por altas concentrações de AE, a fusão do fármaco quase desapareceu, provavelmente devido à solubilização do PPL neste componente que funde em temperaturas mais baixas (círculo laranja pontilhado na Figura 8).

O modelo preditivo cúbico especial obtido a partir da variação do pico de fusão do PPL (ΔT_{peak}) revelou um ajuste estatisticamente adequado e alto poder preditivo (Figura 9). O ORM demonstrou ser o componente mais inerte na formulação, apresentando um valor de coeficiente próximo de zero na equação

preditiva. No entanto, sua mistura com LS apresentou alto sinergismo, potencializando a interação desses lipídios com a droga. De fato, o termo (ORM.LS) apresentou um alto coeficiente na equação preditiva, assim como os termos ternários que envolvem esses componentes e alguns dos tensoativos da formulação, resultando em regiões mais escuras da superfície de resposta (Figura 9). A característica anfifílica do fosfolípido LS explica sua forte interação com ORM e PPL, permitindo miscibilidade entre os três componentes (70).

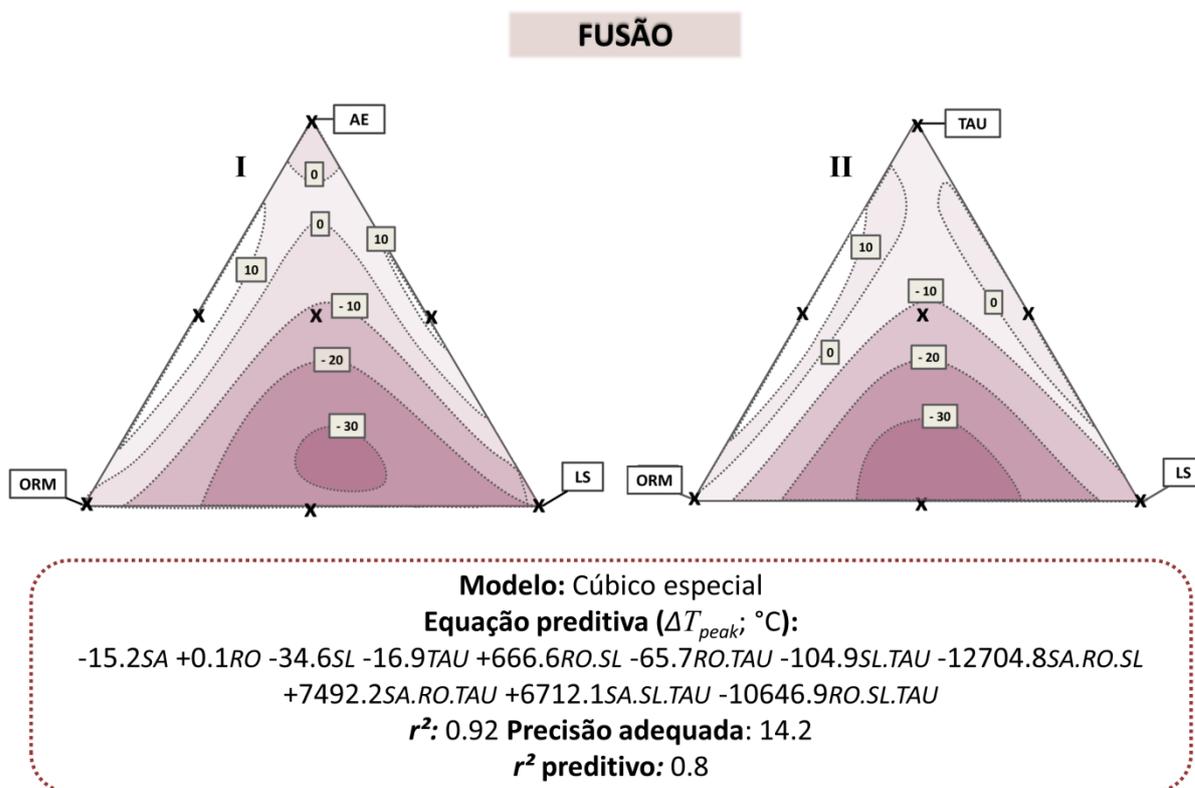


Figura 9 – Superfícies de resposta da variação do pico de fusão do propranolol (PPL) (°C) obtidas a partir dos resultados de DSC de acordo com um desenho de mistura simplex centróide. (I) Superfície de resposta envolvendo ácido esteárico (AE), óleo essencial de Rosa rubiginosa (ORM) e lecitina de soja (LS); (II) Superfície de resposta envolvendo taurodeoxicolato de sódio (TAU), ORM e LS. As regiões roxas intensas representam composição com reduções mais acentuadas na fusão do PPL. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados.

Tais sinais de forte interação entre os componentes lipídicos da formulação com PPL são desejáveis e podem contribuir para a obtenção de altos níveis de droga aprisionada em CLN. No entanto, também pode ser indicativo de instabilidade da amostra. Portanto, uma investigação mais aprofundada é altamente recomendada.

De acordo com os resultados de TGA, a maioria dos excipientes apresentou um perfil de decomposição térmica dentro da mesma faixa de temperatura do PPL (de 200 a 350 °C). A única exceção foi o ORM, que apresentou uma faixa de decomposição em temperaturas mais altas (330 a 500 °C). Assim, o evento de degradação do PPL nas várias misturas é mais ou menos afetado pela sua composição. De fato, o T_{peak} para a decomposição do fármaco, indicado pela linha azul sombreada na Figura 10, é deslocado em quase todas as misturas.

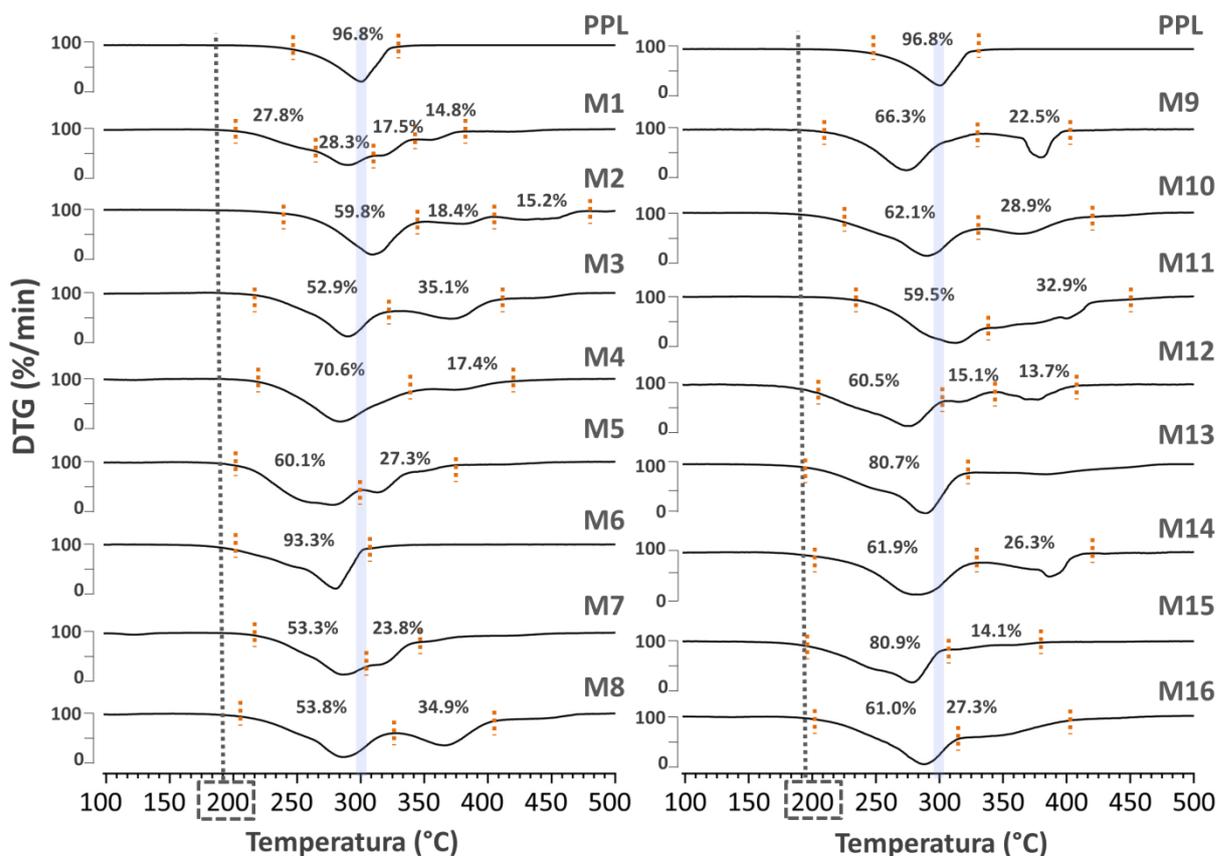


Figura 10 – Primeira derivada das curvas termogravimétricas do propranolol (PPL) e suas misturas físicas com os compostos das nanopartículas (M1 a M16). As etapas de perda de massa para cada amostra são delimitadas em linhas pontilhadas laranja juntamente com sua porcentagem de perda de massa. A região sombreada em azul indica o T_{peak} correspondente à decomposição do PPL.

Notavelmente, os intervalos de degradação das amostras em misturas contendo AE (M1, M5, M6, M8, M13, M14, M15 e M16) foram antecipados (Figura 10). AE apresenta uma decomposição de uma única etapa em um intervalo de temperatura antes do PPL, começando em 200 °C. Como resultado, em misturas contendo este componente, a decomposição da amostra começou em aproximadamente 200 °C (linha pontilhada preta na Figura 10) e não apresentou distinção clara do evento de degradação do fármaco.

A influência dos compostos da formulação na estabilidade das amostras pode ser medida mais claramente usando a superfície de resposta do desenho da mistura com base na redução do T_{peak} de decomposição do fármaco (Figura 11). Algumas misturas (nomeadamente, M5, M8 e M12) mostraram uma diminuição mais acentuada no T_{peak} correspondente ao evento de decomposição do PPL. Mais uma vez, a análise de regressão múltipla stepwise mostrou-se um método adequado para estimar a influência dos excipientes e suas interações na previsão da temperatura de degradação térmica antecipada do PPL, com índices estatísticos do modelo cúbico especial dentro dos parâmetros recomendados (Figura 11) (71).

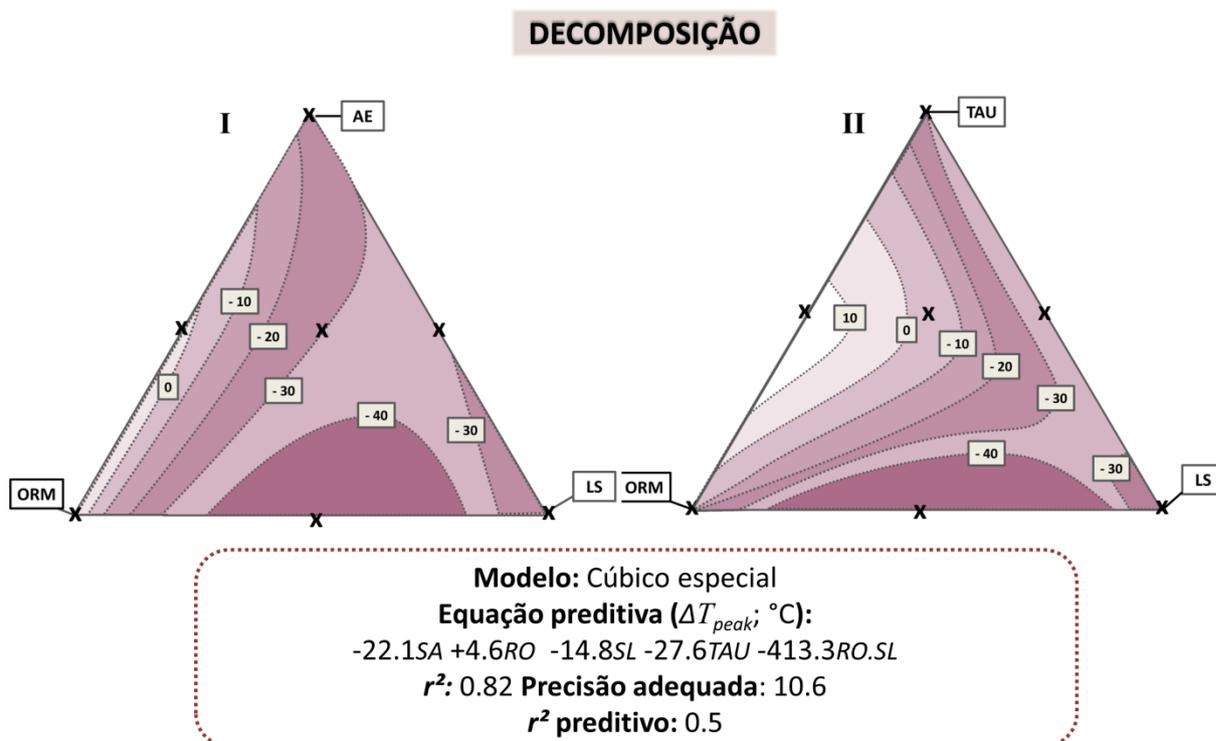


Figura 11 – Superfícies de resposta da variação do pico de decomposição do propranolol (PPL) (°C) obtidas a partir dos resultados de TGA de acordo com um desenho de mistura simplex centróide. (I) Superfície de resposta envolvendo ácido esteárico (AE), óleo essencial de Rosa rubiginosa (ORM) e lecitina de soja (LS); (II) Superfície de resposta envolvendo taurodeoxicolato de sódio (TAU), ORM e LS. As regiões roxas intensas representam composição com reduções mais acentuadas na decomposição de PPL. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados.

De fato, a perda de estabilidade da amostra é mais acentuada (áreas mais escuras na Figura 11) nas mesmas regiões da superfície de resposta onde houve maior interação térmica, conforme indicado pelos resultados de DSC. Curiosamente, ORM sozinho é inerte para PPL (coeficiente de equação preditiva tem um sinal positivo). No entanto, uma forte interação de ORM com LS causou uma redução acentuada no T_{peak} da decomposição do fármaco. De fato, em algumas misturas, houve redução do T_{peak} de até 30 °C.

LS e ORM são ácidos graxos conhecidos por serem instáveis em temperaturas elevadas (72). Além disso, estudos anteriores mostraram um efeito

catalítico do LS em drogas cristalinas, como PPL, afetando eventos de fusão e degradação (73,74). Portanto, as interações térmicas de LS e ORM observadas por DSC devem aumentar a solubilidade do PPL, o que conseqüentemente acelera os processos de degradação que muitas vezes são condicionados pela concentração do fármaco (72,75-78).

Curiosamente, a presença de TAU e AE demonstrou melhorar a compatibilidade entre PPL e os excipientes oleosos da nanoformulação. Além disso, o aumento da concentração de TAU e AE resultou em maior estabilidade térmica do PPL, contrariando a influência negativa dos componentes oleosos na estabilidade das misturas (Figura 11). Este efeito protetor foi descrito anteriormente para outras drogas (79,80) e pode estar relacionado à formação de uma mistura eutética entre PPL e tais materiais (81). De fato, os dados de DSC mostraram uma redução na fusão do fármaco.

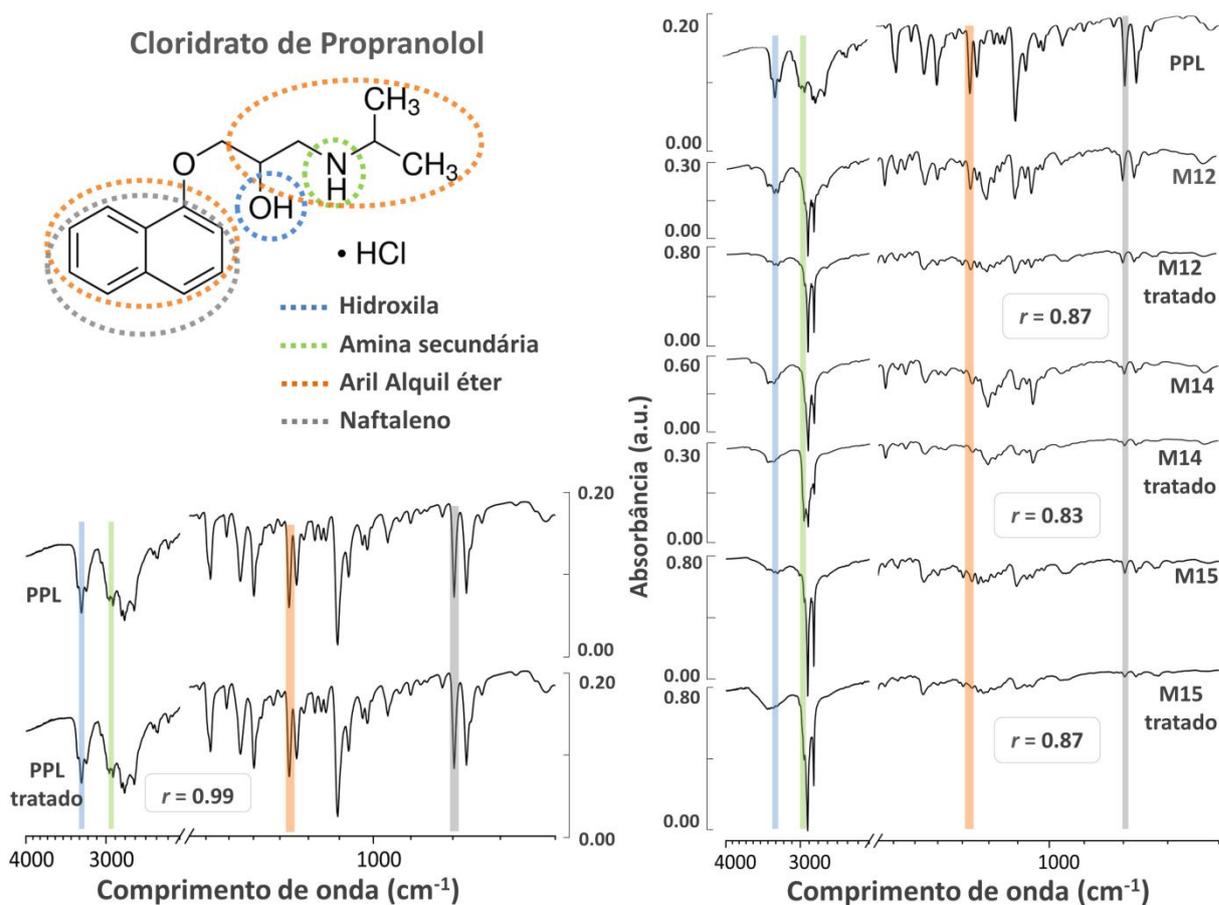
No entanto, a antecipação da temperatura de decomposição de algumas misturas ocorreu sempre acima de 200 °C, temperatura 2,4 vezes superior à temperatura máxima de fabricação do CLN que é de 80 °C (Figuras 10 e 11). Portanto, sugere-se que as condições de produção de CLN devem garantir a estabilidade da nanoformulação.

4.1.2 Ensaios de FTIR

Para garantir a estabilidade química das amostras em condições semelhantes às utilizadas na produção dos CLN, as misturas (Tabela 2) foram aquecidas por 20 minutos a 80 °C e posteriormente avaliadas por FTIR. Além disso, cada componente foi submetido individualmente ao mesmo tratamento, incluindo o PPL. Para os componentes isolados, observou-se alta similaridade entre os espectros das substâncias antes e após o estresse térmico ($r > 0,9$).

As misturas, por sua vez, apresentaram $r > 0,8$, excluindo a hipótese de decomposição química acentuada (79). Além disso, mesmo as misturas com menores valores de r (M12, M14 e M15), cujos espectros são mostrados na Figura 12, apresentaram perfis muito semelhantes entre as amostras tratadas e não

tratadas. De fato, as bandas de PPL correspondentes aos grupos hidroxila e amins secundárias, que apareceram em 3.275 e 2.970 cm^{-1} , respectivamente, são reconhecidas nessas misturas (Figura 5). Da mesma forma, as bandas de PPL relacionadas ao estiramento C-O-C do grupo aril-álquil éter em 1.267 cm^{-1} e do grupo naftaleno em 798 cm^{-1} também podem ser identificadas nos espectros de amostras não tratadas sem alterações (69,83).



Portanto, as pequenas diferenças observadas entre essas amostras estão relacionadas às intensidades das bandas de PPL e podem ser explicadas pela falta de homogeneização nas misturas (84,85). Esta evidência espectroscópica consolida

os dados térmicos discutidos acima e valida o uso dos materiais selecionados para produzir CLN carregado com PPL.

4.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PPL

4.2.1 Desenvolvimento do método

Com base nas características do PPL (uma molécula polar com vários grupos cromóforos, Figura 5) e na finalidade do método analítico (a quantificação de um analito em formulações farmacêuticas e em matriz biológica durante o ensaio cinético), a CLAE de fase reversa é a escolha mais óbvia para obter um método seletivo contra contaminantes da pele com eluição rápida do analito (86).

Apesar do isomerismo óptico do PPL, ambas as formas enantioméricas R e S apresentam interesse terapêutico (13,87) e exibem a mesma taxa de penetração na pele (88). Assim, o método proposto foi concebido para determinar estereoisômeros de PPL em conjunto a partir de uma mistura racêmica, que é a forma comercializada do medicamento. O desenvolvimento deste método foi realizado através de mudanças progressivas em parâmetros analíticos como temperatura do forno, vazão e, principalmente, composição da fase móvel. As condições testadas são mostradas na Tabela 4.

Os testes preliminares utilizando diferentes proporções de uma fase móvel contendo água/metanol/acetonitrila levaram à eluição ineficiente do PPL, conforme mostrado Tabela 4. Ácido fosfórico foi adicionado à fase aquosa para melhorar a adequação do método, estratégia especialmente útil na quantificação de moléculas básicas como o PPL (89). Ajustes na composição do solvente, temperatura do forno e vazão melhoraram a adequação cromatográfica, mas ainda havia dificuldade em alcançar uma resolução satisfatória (execuções 2-6, Tabela 4).

Uma mudança na composição da fase móvel foi realizada utilizando diferentes proporções de H_3PO_4 /acetonitrila. Essa estratégia permitiu maior mobilidade no tempo de retenção do PPL devido à alta afinidade do fármaco pela

acetonitrila, além de melhorar o desempenho do método (execuções 7-10, Tabela 4). Por fim, foi possível estabelecer uma condição para a análise de PPL com um pico bem definido e simétrico em cerca de 7 min, longe da eluição dos contaminantes da pele (execução 10, Tabela 4).

Tabela 4 – Condições cromatográficas testadas na fase de desenvolvimento do método.

	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Forno (°C)	Pratos teóricos	Fator de cauda	Resolução	Tempo de retenção (min)
1	H ₂ O:MeOH:ACN (30:35:35)	1,0	30	1542,3	3,5	1,916	2,1
2	H ₃ PO ₄ :MeOH:ACN (40:30:30)	1,0	35	1113,3	1,4	1,255	1,9
3	H ₃ PO ₄ :MeOH:ACN (65:5:30)	0,8	35	4065,4	3,7	1,000	2,1
4	H ₃ PO ₄ :MeOH:ACN (65:5:30)	0,8	35	611,7	2,5	1,055	5,2
5	H ₃ PO ₄ :MeOH:ACN (60:5:35)	0,8	35	601,3	1,6	1,028	2,8
6	H ₃ PO ₄ :MeOH:ACN (60:15:25)	0,8	35	921,7	1,7	0,451	4,3
7	H ₃ PO ₄ :ACN (65:35)	0,8	35	1812,0	2,2	0,391	3,3
8	H ₃ PO ₄ :ACN (68:32)	0,8	35	1559,0	2,3	5,133	4,3
9	H ₃ PO ₄ :ACN (78:22)	1,0	40	4576,0	1,1	14,696	12,1
10	H ₃ PO ₄ :ACN (75:25)	1,0	30	8160,0	1,3	26,487	7,1

MeOH: metanol; H₃PO₄: ácido fosfórico 0,01M; ACN: acetonitrila. Em negrito, os testes de adequação do cromatograma que atendem à especificação da farmacopeia americana.

4.2.2 Validação do método

A seletividade é um dos parâmetros críticos na validação de métodos bioanalíticos, pois demonstra que o método pode discriminar o analito na presença da matriz biológica, o que pode potencialmente dificultar o processo de separação e quantificação (56,90). O desenvolvimento do método foi direcionado para que a matriz cutânea pudesse ser eluída antes do analito. No entanto, foi necessário comprovar que a presença de contaminantes das camadas da pele não alteraria o desempenho do método.

Conforme mostrado na Figura 13, houve uma separação completa entre o analito e os contaminantes da pele. De fato, as interferências na pele eluíram nos primeiros minutos de execução sob essa condição de análise específica. A adequação do cromatograma permanece inalterada, com resolução superior ao limite mínimo de 2,0 (54). O tempo de retenção do PPL não se alterou com a presença dos contaminantes, eluindo em aproximadamente 7,2 min. Além disso, as concentrações de analitos encontradas nas soluções de PPL contendo cada um dos extratos das camadas da pele não diferiram da amostra de PPL sem contaminantes (teste t, $\alpha = 0,05$), comprovando que as interferências na pele não alteram a resposta do método na determinação de PPL.

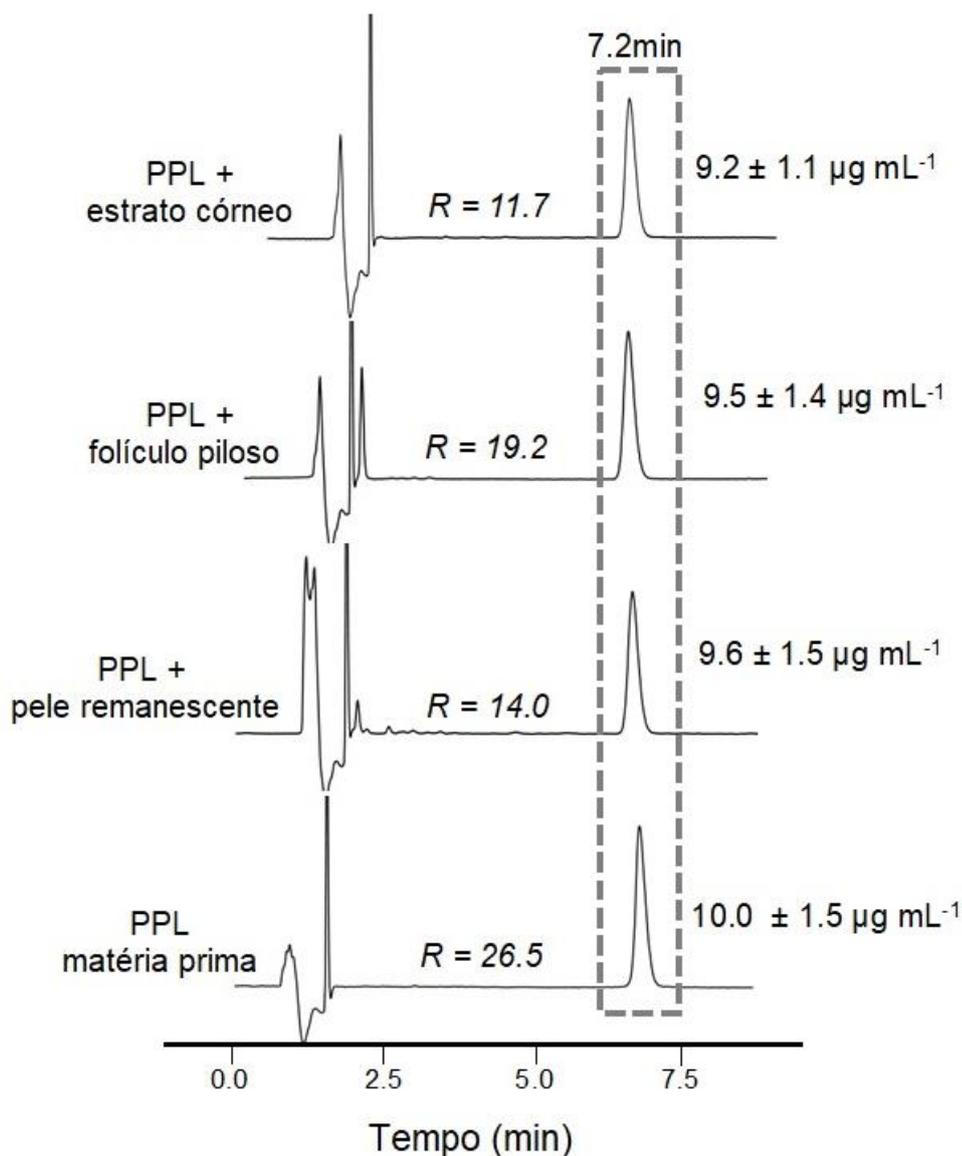


Figura 13 – Cromatogramas representativos do ensaio de seletividade: matéria-prima cloridrato de propranolol (PPL); PPL e extrato de pele remanescente; PPL e extrato de folículo piloso; PPN e extrato de estrato córneo. R: resolução; o tempo de retenção e concentração média de droga com desvio padrão são mostrados para cada amostra.

Nenhuma matriz efetivada foi observada com nenhum dos interferentes das camadas da pele, permitindo a elaboração de curvas de calibração sem adição de contaminantes. A linearidade do método foi verificada em uma ampla faixa de concentrações (de 3 a 20 µg/mL), conforme recomendado para métodos analíticos utilizados em testes de desempenho cinético (91). Mesmo assim, foi encontrada uma alta correlação entre as áreas de pico e as concentrações de PPL, com

coeficiente de correlação (r) de 0,9990, atendendo aos requisitos dos protocolos de validação (48). A regressão linear deu origem à equação da curva: $y = 11.195x - 11.811$, onde y é a área do pico e x é a concentração do fármaco em $\mu\text{g/mL}$. A linearidade do método também atendeu a outros requisitos estatísticos como coeficiente angular diferente de zero (intervalo de confiança de 10.255 a 12.086), curva passando pela origem das coordenadas (intervalo de confiança de 20.411 a 1.474) e variância dos resíduos com distribuição aleatória dos dados sem tendência (90).

Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,5 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em métodos analíticos usados em estudos cinéticos, como neste caso, a capacidade de medir pequenas quantidades de fármaco é essencial para monitorar sua penetração na pele nos minutos iniciais de permeação ou quando o fármaco penetra muito pouco em uma determinada camada da pele (55).

A avaliação da precisão do método nas mesmas condições de operação e em curto período (repetibilidade) apresentou um coeficiente de variação em torno de 3% (Tabela 5). Além disso, a soma dos erros associados a todas as variações estudadas na precisão intermediária (analista, dia de análise e aparelho de cromatografia) culminou em um desvio padrão global inferior a 5% (Tabela 5). Além disso, a determinação desse parâmetro em um planejamento fatorial permitiu identificar quais fatores são responsáveis pela variabilidade do método.

Tabela 5 - Ensaio de precisão incluindo repetibilidade e precisão intermediária.

Repetibilidade		Média		CV			
		10.8		2.9			
Precisão intermediária	Analista 1	Dia 1		Dia 2		CV geral 4.5	
		Média	CV	Média	CV		
	Equipamento 1	10.7	3.2	10.9	2.0		
	Equipamento 2	10.9	5.4	11.2	0.7		
	Analista 2	Equipamento 1	10.2	4.8	11.1		1.0
	Equipamento 2	10.5	6.9	11.3	2.0		
ANOVA	Modelo		Analista	Dia	Equipamento		
	<i>p</i> -valor		0.011	0.555	0.002	0.210	
	R^2		0.418				
	Precisão adequada		5.40				

Os valores são apresentados como média em $\mu\text{g/mL}$ e seu correspondente coeficiente de variação (CV). Parâmetros estatísticos do modelo linear obtidos a partir de ANOVA são apresentados.

Os dados de precisão intermediária permitiram obter um modelo significativo considerando as variáveis estudadas utilizando ANOVA one-way ($p = 0,0113$). Com efeito, a avaliação estatística dos fatores envolvidos permitiu apontar a variação do dia de análise, como principal responsável pela variabilidade do método ($p = 0,0022$). A variação no dia da análise pressupõe o possível acúmulo de diferentes erros aleatórios como oscilações de corrente elétrica, mudanças na temperatura ambiente, entre outros, que causam pequenas flutuações na resposta do método analítico, porém ainda dentro de limites aceitáveis (90). Ressalte-se também que o método foi preciso e mostrou-se praticamente insensível a mudanças no analista ou mesmo no equipamento (fatores não significativos, Tabela 5).

Um dos desafios mais difíceis para os métodos bioanalíticos é recuperar o analito de matrizes biológicas (92). De fato, vários contaminantes estão presentes nas diferentes camadas da pele. Em particular, o estrato córneo é formado por uma matriz lipídica complexa contendo colesterol, ácidos graxos livres de cadeia longa e várias classes de ceramidas que podem potencialmente interagir com o fármaco ou desencadear sua decomposição químico-enzimática (93).

Nesta determinação, uma questão metodológica é introduzir o analito na matriz biológica em quantidade conhecida para simular sua penetração em diferentes camadas da pele por mecanismos fisiológicos. De fato, há uma grande variação biológica dessas matrizes e a recuperação direta do fármaco dos tecidos é difícil de operar. Assim, o uso de matrizes de camadas de pele enriquecidas com o analito é o procedimento recomendado pelas diretrizes de saúde e foi adotado neste estudo (90,94,95).

As condições de extração utilizadas neste método foram otimizadas e permitiram a recuperação do PPL em quantidades superiores a 90% em todas as camadas da pele (Figura 14). Os resultados estão dentro dos limites considerados aceitáveis para métodos bioanalíticos (90). Além disso, considerando o desafio analítico, os resultados de recuperação alcançados por este método são superiores a outros métodos analíticos desenvolvidos para quantificação de fármacos em pele publicados por nosso grupo de pesquisa e por outros (96,97).

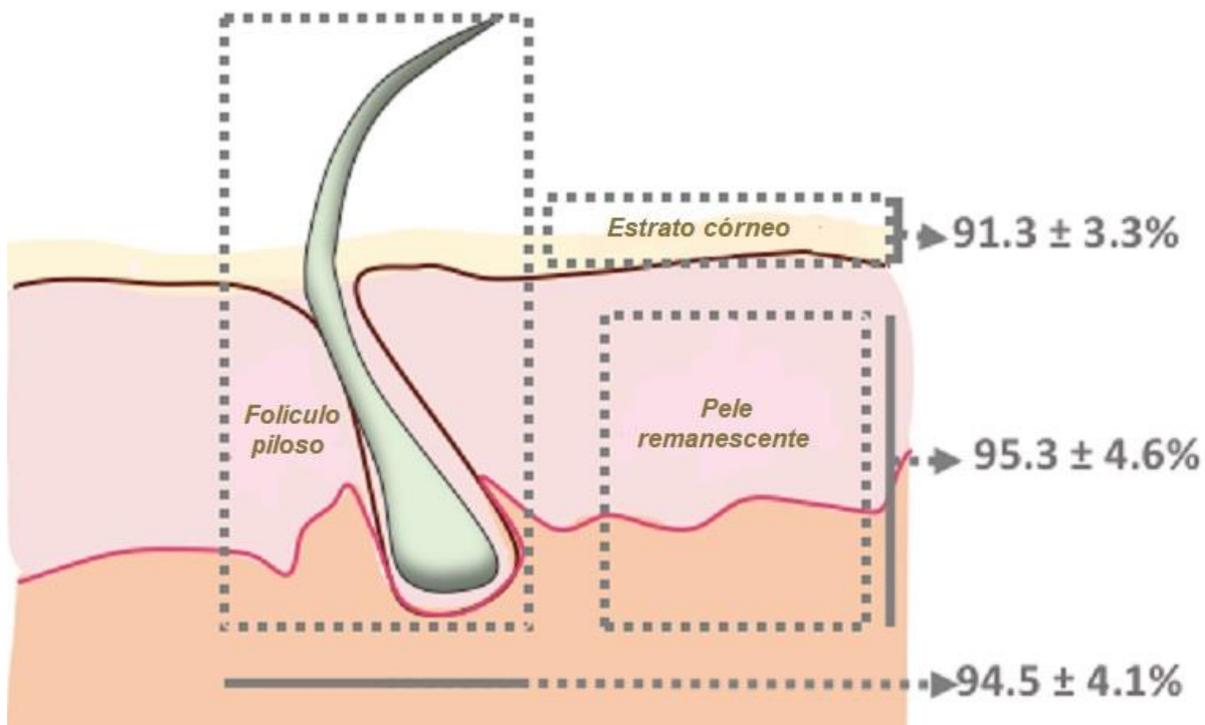


Figura 14 – Recuperação de cloridrato de propranolol (PPL) das camadas da pele (estrato córneo; folículo piloso e pele remanescente) em porcentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Por fim, a robustez do método desenvolvido foi posta à prova avaliando sua capacidade de suportar variações de fatores ambientais ou externos ao protocolo de trabalho. Para avaliar essas variações de forma integrada, foi realizado um planejamento fatorial completo em fatores selecionados nos quais foram deliberadamente inseridas alterações experimentais, simulando pequenas flutuações nos parâmetros de trabalho estabelecidos para o método.

Em todas as combinações avaliadas, a adequação do método permaneceu adequada com flutuações mínimas no fator de cauda, placas teóricas ou medidas de resolução.

Para a resposta da concentração de PPL, as variações na temperatura do forno e na composição da fase móvel não foram significativas ($p = 0,585$ e $p = 0,951$, respectivamente). Esta resposta foi ajustada a um modelo linear em que praticamente toda a sua variação experimental está relacionada a variações de fluxo ($p < 0,0001$). Mesmo considerando toda a taxa de fluxo testada, de 0,95 a 1,05

mL/min, as variações de concentração, conforme pode ser observada na superfície de resposta, foram inferiores a 5% (Figura 15).

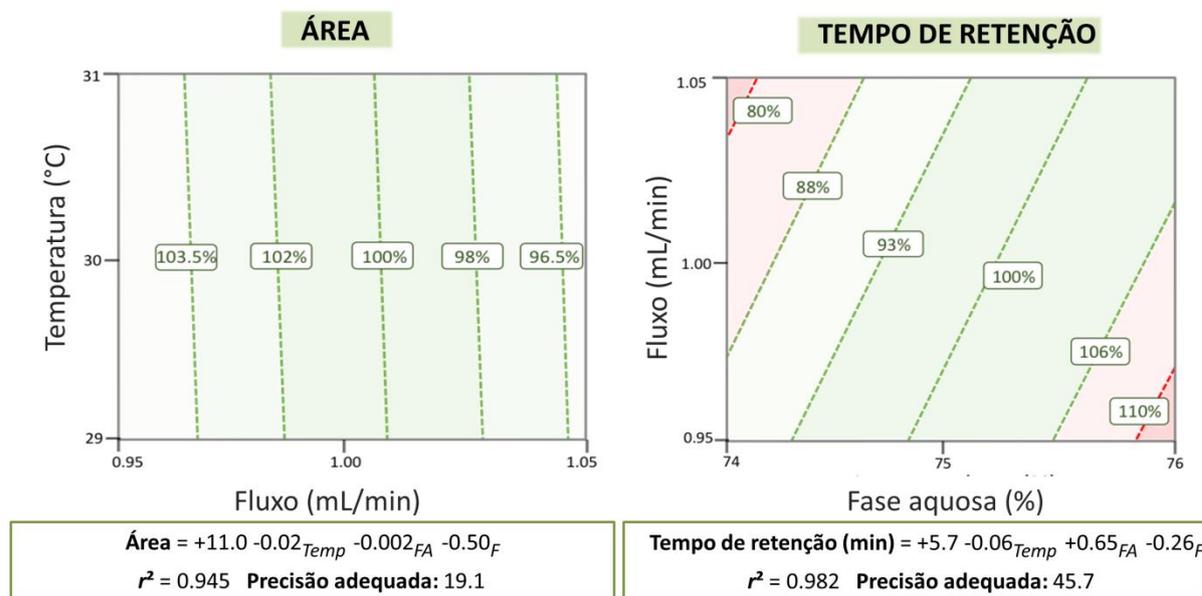


Figura 15 – Superfície de resposta da robustez em porcentagem considerando a área de respostas e tempo de retenção juntamente com as equações preditivas para cada resposta, o coeficiente de correlação (r^2) e a precisão adequada. As áreas verdes representam condições analíticas com menor mudança nessas respostas, enquanto as áreas vermelhas representam grande mudança.

Temp: temperatura; **FA:** fase aquosa; **F:** fluxo.

O tempo de retenção, como esperado, sofreu interferência significativa da composição da fase móvel e fluxo ($p < 0,0001$). A temperatura do forno, por sua vez, em pequenas variações, não é capaz de modificar essa resposta ($p = 0,012$). Sob certas condições de análise, alterações no fluxo e na composição da fase móvel podem levar a alterações no tempo de retenção de mais de 15% (Figura 15). O aumento da proporção da fase orgânica (acetonitrila) na qual o analito é altamente solúvel, combinado com o aumento do fluxo, acelera a eluição do PPL. Apesar disso, considerando a ampla margem de separação do PPL dos interferentes da pele, há relativa segurança analítica independente dos deslocamentos observados no pico do PPL. Assim, o método mostrou-se robusto nas condições experimentais avaliadas, mesmo quando ocorrem oscilações simultâneas em parâmetros críticos do método.

4.3 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PPL

A determinação da solubilidade de substâncias em meios nos quais elas serão quantificadas, principalmente para ensaios de liberação de substâncias, é extremamente relevante para que a condição *sink* seja assegurada na solução. A condição *sink*, de acordo com Siepmann e Siepmann (2020) (98) está relacionada com a concentração máxima de fármaco em um sistema em que tal concentração não exceda 10% da solubilidade real do fármaco. Se atendida essa condição obtém-se um sistema ideal para estudos de cinética de liberação e permeação cutânea.

A literatura descreve o PPL como um fármaco altamente hidrossolúvel, possuindo uma solubilidade em água de 97,9 g/L (99). Ainda que esse valor tenha sido descrito, foi realizado o ensaio de solubilidade para atestar tal resultado, sendo que o PPL demonstrou-se ainda mais solúvel que o valor anteriormente descrito (Tabela 6).

Tabela 6 – Coeficiente de solubilidade do cloridrato de propranolol em água e em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4).

Solvente	Solubilidade em 48 horas (g/L) ± DP
Água	121,03 ± 2,16
Tampão fosfato	154,87 ± 3,83

DP: desvio padrão.

4.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PROPRANOLOL

As propriedades físico-químicas dos sistemas de entrega de drogas nanoparticuladas, como tamanho de partícula, carga de superfície ou pH, são cruciais para seu desempenho biofarmacêutico, principalmente em relação às

habilidades de direcionamento e penetração celular (100,101). Assim, um controle não empírico dessas propriedades é essencial para alcançar uma resposta terapêutica adequada. Para isso, as variáveis de fabricação relatadas na literatura como importantes para as características de CLN produzido seguindo a técnica de microemulsão, que incluiu rotação de Turrax, tempo de agitação de Turrax e tempo de sonicação, foram testadas aqui de acordo com o planejamento fatorial de Box-Behnken para o desenvolvimento de CLN - PPL carregado (102-104).

As variações realizadas dentro do delineamento experimental resultaram em praticamente nenhuma diferença nas respostas de EE, potencial zeta e pH. De fato, todas as medidas de EE apresentaram valores superiores a 98%. Este resultado era esperado dada a alta solubilidade do PPL na mistura lipídica, conforme visto nas análises térmicas apresentadas anteriormente. Além disso, o pH das dispersões coloidais ficou em torno de 5,5, valor próximo ao pH fisiológico da pele (105). Além disso, a carga superficial das partículas carregadas permaneceu neutra, com valores de potencial zeta variando de -5 mV a -10 mV.

Mudanças marcantes foram observadas no tamanho das partículas e PDI dos CLN variando os parâmetros de produção. Dessa forma, os modelos preditivos foram calculados com base nessas respostas.

As equações preditivas para tamanho de partícula e PDI se ajustam aos modelos quadrático e linear, respectivamente. Além disso, ambos os modelos apresentaram correlação ajustada próxima de 1 e precisão adequada superior a 5, indicando discriminação aceitável do modelo (71,106).

O tamanho da partícula e sua dispersão são as variáveis mais críticas a serem controladas na produção de CLN, uma vez que estão diretamente relacionadas ao desempenho biológico (107). Em formulações tópicas, por exemplo, observou-se que nanopartículas em torno de 200 nm podem se acumular nos folículos pilosos, enquanto partículas maiores têm maior probabilidade de manter a concentração do fármaco nas camadas mais superficiais da pele, e nanopartículas menores têm maior probabilidade de penetrar nas reentrâncias do estrato córneo, dando origem a um possível efeito sistêmico (108-110).

Normalmente, CLN tem um tamanho de partícula na faixa de 100 a 1000 nm (47). Aqui, o tamanho de partícula do CLN carregado com PPL é afetado principalmente pelo tempo de rotação e agitação do sistema durante a etapa do Turrax. De fato, foi possível obter CLN carregado com PPL de 500 nm a 1500 nm

apenas movendo-se entre os eixos desses parâmetros (Figura 16-I). O aumento do tempo de rotação ou agitação do equipamento aumenta o tamanho das partículas, como evidenciado pelo sinal positivo e pelo alto valor dos coeficientes para esses fatores na equação preditiva mostrada na Figura 16. Também foi observada uma forte interação entre esses fatores, indicado pela equação preditiva (valor alto do coeficiente do fator AB), o que significa que é possível potencializar o aumento do tamanho das partículas de CLN movendo esses parâmetros juntos.

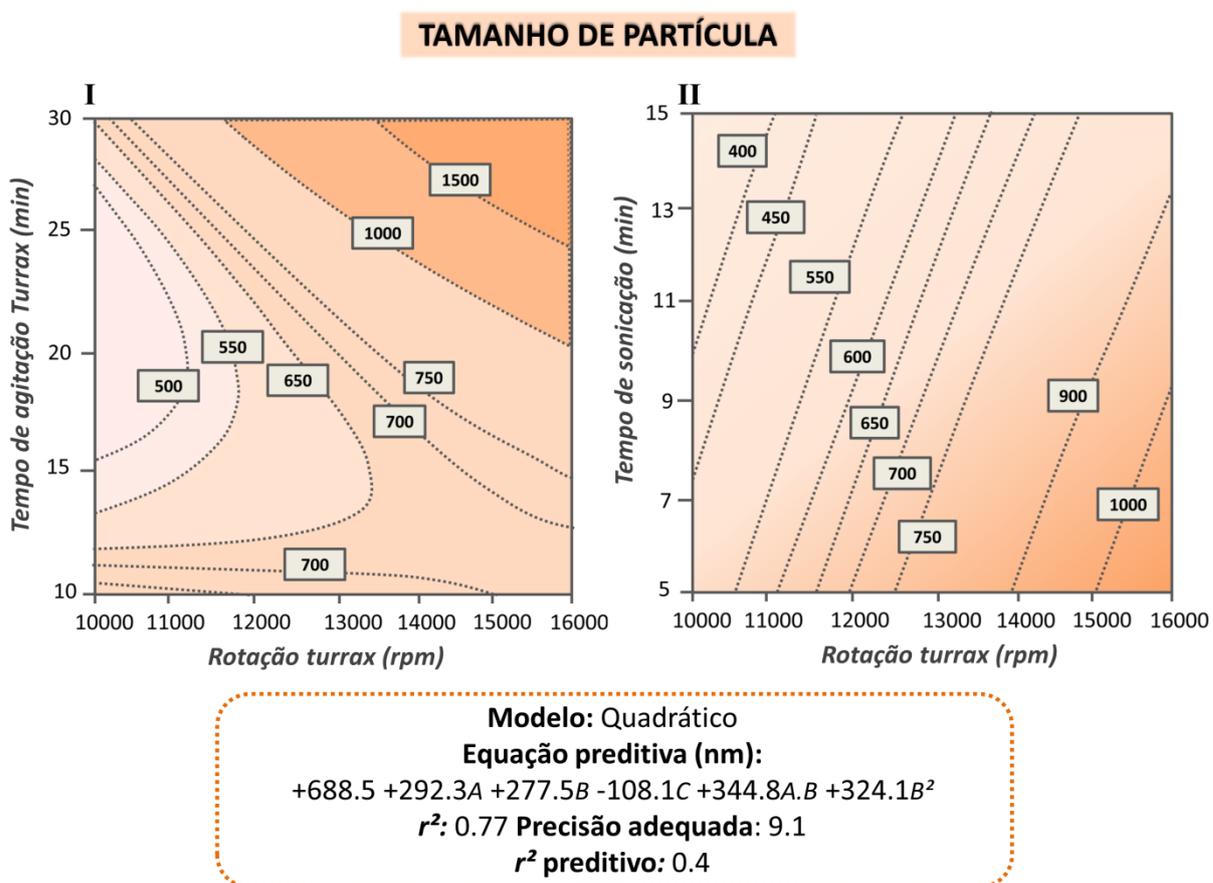


Figura 16 - Superfícies de resposta para tamanho de partícula do CLN carregado de PPL (nm) obtido pelo desenho Box-Behnken. (I) Superfície de resposta envolvendo rotação do Turrax e tempo de agitação do Turrax; (II) Superfície de resposta envolvendo rotação do Turrax e tempo de sonicação. As regiões alaranjadas intensas representam condições de produção com aumento mais acentuado no tamanho das partículas. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados. A: Rotação Turrax; B: Tempo de agitação Turrax; C: tempo de sonicação.

No método de microemulsão aqui utilizado para preparar o CLN, uma microemulsão é previamente formada a partir dos lipídios fundidos e a ultra-agitação realizada pelo Turrax sob banho de gelo tem a finalidade de acelerar a recristalização dos lipídios, dando origem a nanopartículas sólidas. Assim, o aumento dos parâmetros de ultra-agitação provoca um aumento na mobilidade dos lipídios, que pode sofrer uma expansão volumétrica, tendo como efeito o aumento do tamanho das partículas, conforme observado.

O tempo de sonicação, por outro lado, tem menor influência no tamanho das partículas (Figura 16-II), deduzido pelo menor valor do coeficiente na equação preditiva, que neste caso também teve sinal negativo (Figura 16), o que também indica que o aumento desse fator causa uma diminuição no tamanho das partículas. Esta menor influência proporcionada pela sonicação no tamanho das partículas acontece porque esse processo promove apenas uma homogeneização final do sistema já formado, tendo menos impacto na conformação lipídica.

Também foi possível modelar a resposta do tamanho de partícula da dispersão de CLN carregado com PPL através de medições de PDI. Este parâmetro de produção apresenta um grau crítico na preparação de CLN que rotineiramente apresenta altos valores de dispersão (111).

O fator mais relevante que contribuiu para um alto peso no aumento do PDI foi o tempo de agitação no Turrax, observado pelo alto valor positivo do coeficiente na equação preditiva mostrada na Figura 17. De fato, esse fator apresentou um coeficiente sete vezes maior que os coeficientes obtidos dos demais parâmetros. Conseqüentemente, movendo-se no eixo do tempo de agitação, o PDI apresentou valores de 0,465 a 1. Conforme discutido anteriormente, o aumento da mobilidade lipídica causado pelo processo de alta energia é responsável pelo aumento do tamanho das partículas na dispersão. As regiões mais claras das superfícies de resposta mostradas na Figura 17 apontaram as condições de fabricação para atingir valores de PDI mais baixos obtidos com rotação moderada e tempo de agitação reduzido do Turrax.

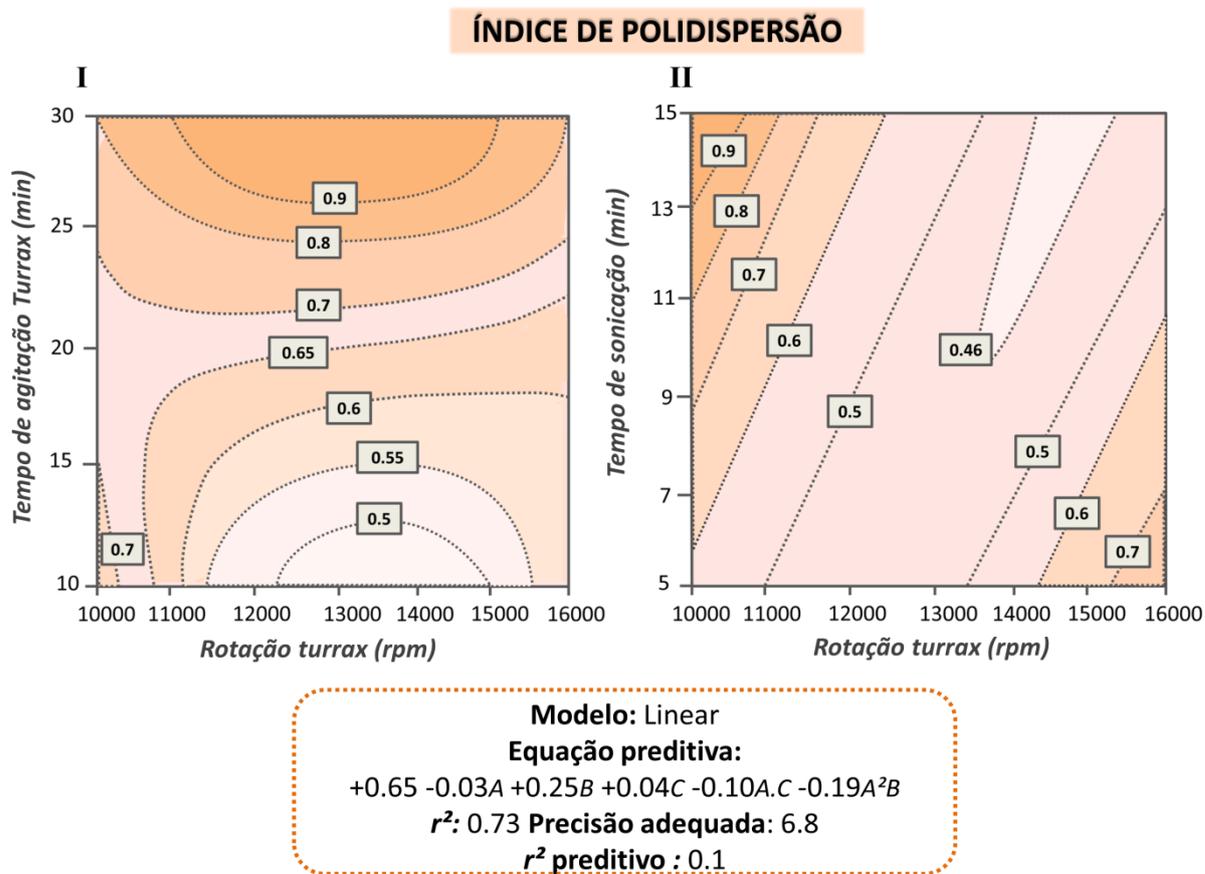


Figura 17 - Superfícies de resposta para o índice de polidispersão do CLN carregado com PPL obtido pelo desenho Box-Behnken. (I) Superfície de resposta envolvendo rotação Turrax e tempo de agitação Turrax; (II) Superfície de resposta envolvendo rotação Turrax e tempo de sonicação. As regiões de laranja intenso representam condições de produção com aumento mais acentuado do índice de polidispersão. A equação preditiva e os parâmetros do modelo r^2 e precisão adequada também são mostrados. A: Rotação Turrax; B: Tempo de agitação Turrax; C: tempo de sonicação.

Por fim, para integrar as respostas experimentais, foi concebido um modelo otimizado para indicar as condições de produção de CLN mais adequadas de acordo com as características da formulação destinada a atender uma demanda específica. Este modelo foi testado simulando dois tipos de CLN carregados com PPL, o Teste-1 contendo partículas de 500 nm e o Teste-2 com tamanho de partícula de 900 nm, ambos com o menor PDI possível, conforme especificado na Tabela 7. O modelo encontrou CLN com as características requeridas, ou seja, com tamanho de partícula conforme previsto e PDI de 0,575 e 0,524 para Teste-1 e Teste-2, respectivamente.

Tabela 7 - Avaliação do modelo preditivo baseado no Teste-1 (CLN 500 nm) e Teste-2 (CLN 900 nm).

Teste-1				
	Condições selecionadas	Previsão do modelo	Experimental \pm DP	95% IC
Tamanho de partícula (nm)	500	500,0	569,37 \pm 87,32	Atendido
PDI	Mínimo	0,575	0,565 \pm 0,10	Atendido
Teste-2				
Tamanho de partícula (nm)	900	900,0	823,93 \pm 58,00	Atendido
PDI	Mínimo	0,524	0,533 \pm 0,08	Atendido

DP: desvio padrão; IC: interval de confiança.

Os CLN produzidos foram comparados com as características teóricas. As respostas moduladas obtidas pelo modelo otimizado apresentaram tamanho médio de partícula de $569,37 \pm 87,32$ nm e $823,93 \pm 58,00$ nm para Teste-1 e Teste-2, respectivamente. Ambos os valores estavam próximos da previsão teórica dentro do intervalo de confiança de 95%. Além disso, os resultados do PDI também ficaram muito próximos da predição, apresentando valores médios de $0,565 \pm 0,10$ para o Teste-1 e $0,533 \pm 0,08$ para o Teste-2. Tais resultados comprovaram a capacidade de previsão do modelo otimizado, demonstrando que é possível ajustar as condições de produção para atingir as características desejadas do CLN - PPL.

4.5 ENSAIO DE ESTABILIDADE DOS CLN – PPL

A avaliação da estabilidade dos CLNs vazios e carregados em diferentes tempos e temperaturas possibilitou conhecer o tempo em que as nanopartículas lipídicas produzidas mantiveram as características iniciais de produção. É sabido que CLNs são sensíveis a temperaturas mais altas (109) e, no caso das CLNs desenvolvidas nesse estudo, o perfil foi repetido, sendo que tanto as

nanoformulações vazias (CLN – 500 e CLN – 900) como as nanoformulações carregadas (CLN PPL – 500 e CLN PPL – 900) mantiveram suas características iniciais de tamanho médio (Figura 18) apenas na temperatura de armazenamento de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (geladeira). O diâmetro das CLNs vazias mostrou-se muito menor em relação às CLNs carregadas, tal diferença provavelmente está ligada à quantidade de PPL adicionada à dispersão de NLC (5 mg/mL), pois um estudo recente observou o mesmo fato, como a concentração de uma droga hidrofílica como PPL foi aumentada na formulação, seu tamanho também aumentou (112).

Como seria de esperar, em condições de temperatura mais elevadas (temperatura ambiente e forno), os CLNs apresentaram alterações relevantes no tamanho das partículas e PDI já nos primeiros dias do estudo. Nessas condições, a mobilidade lipídica leva à agregação das partículas, conforme observado pelo aumento progressivo do tamanho das partículas ao longo do tempo. Embora essa instabilidade também tenha ocorrido com as partículas livres de PPL, nos CLNs carregados com PPL, esse efeito foi mais intenso, produzindo partículas maiores que 1.500 nm à temperatura ambiente e maiores que 3.000 nm a 40°C . Possivelmente, a carga superficial de partículas livres de fármaco (-30 a -45 mV) torna esses sistemas menos suscetíveis ao colapso devido à repulsão eletrostática.

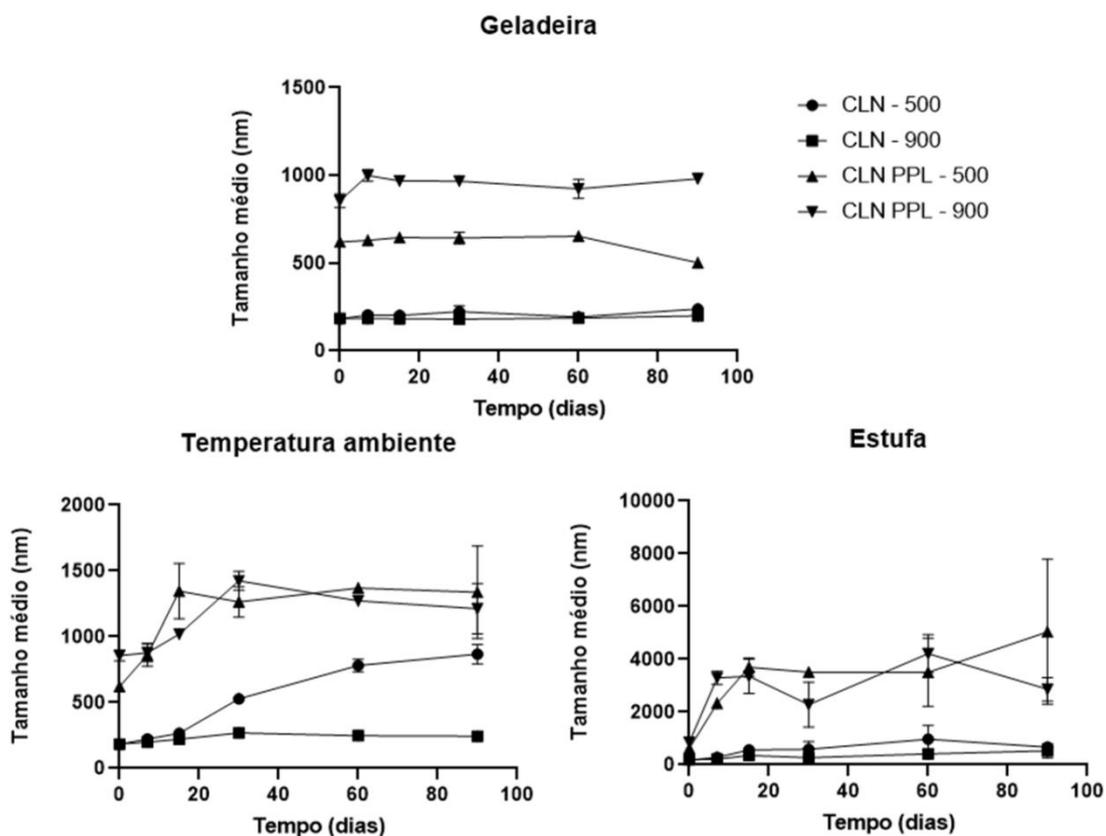


Figura 18 – Representação gráfica do tamanho médio dos CLN vazios e carregados ao longo de 90 dias, em temperatura de armazenamento de 4, 25 e 40 °C. Os quatro grupos analisados demonstraram tamanhos estatisticamente diferentes em todas as *temperaturas e *tempos do estudo. * $p < 0,0001$.

Mudanças oscilatórias no PDI foram observadas para todas as amostras e em todas as temperaturas de armazenamento, sendo essas mudanças estatisticamente significantes, ainda assim, foi na temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (geladeira) que ao final do estudo as nanodispersões apresentaram padrões semelhantes aos do dia 0.

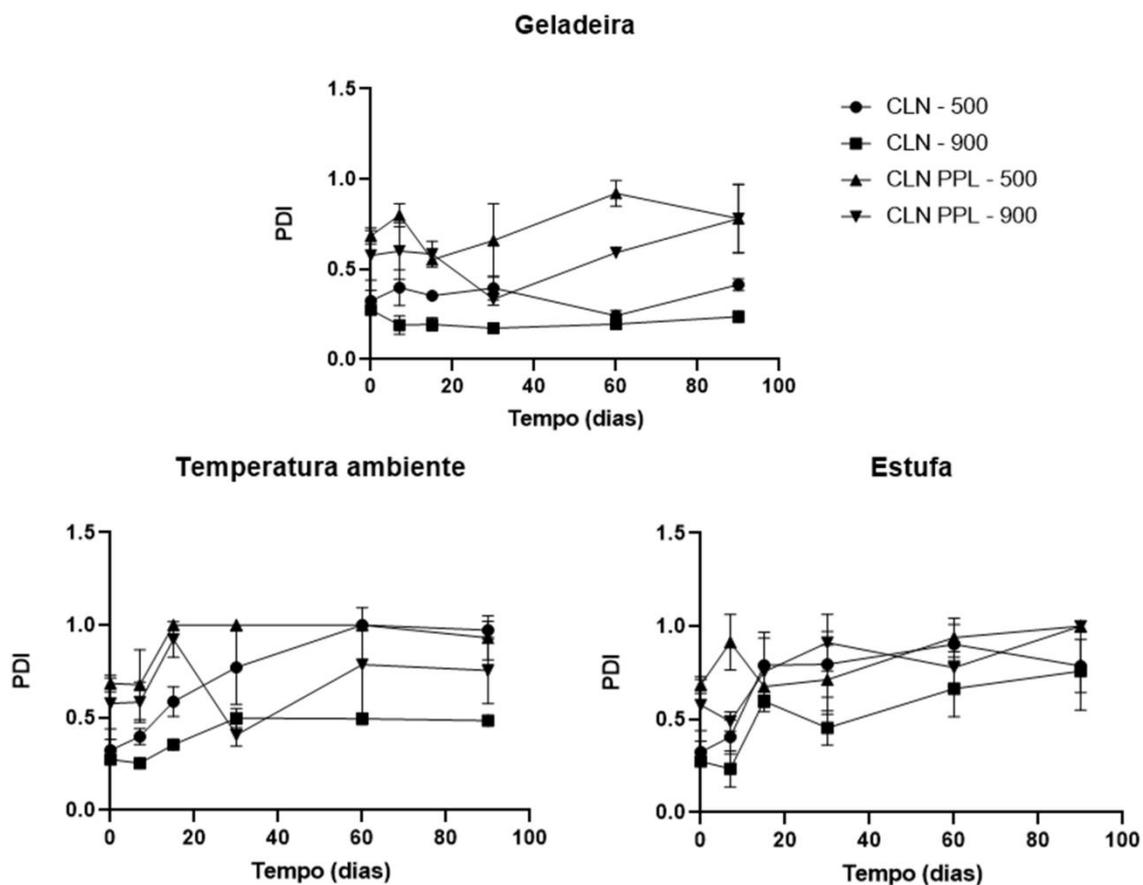


Figura 19 – Representação gráfica do PDI dos CLN vazios e carregados ao longo de 90 dias, em temperaturas de armazenamento de 4, 25 e 40°C. Os quatro grupos analisados demonstraram índices de dispersão estatisticamente diferentes em todas as *temperaturas e **tempos do estudo. * $p < 0,0001$; ** $p = 0,0014$.

Nas análises de potencial zeta observou-se logo no início do ensaio uma diferença relevante entre os CLNs vazios e carregados. Nota-se que (Figura 20) os CLNs vazios possuem carga superficial entre -30 e -45 mV, enquanto àquelas que veiculam o PPL reduzem sua carga consideravelmente, na faixa de -8 a -14 mV. Esse perfil se mantém até o final dos 90 dias, podendo inferir que o aprisionamento do PPL leva os CLNs a se tornarem fisicamente instáveis. A carga dos CLNs carregados pode ter sofrido neutralidade devido à característica fracamente básica do PPL. Apesar de afetar a carga superficial dos CLNs, a adição de PPL não afetou o pH da dispersão, provavelmente porque o solvente era uma solução tampão.

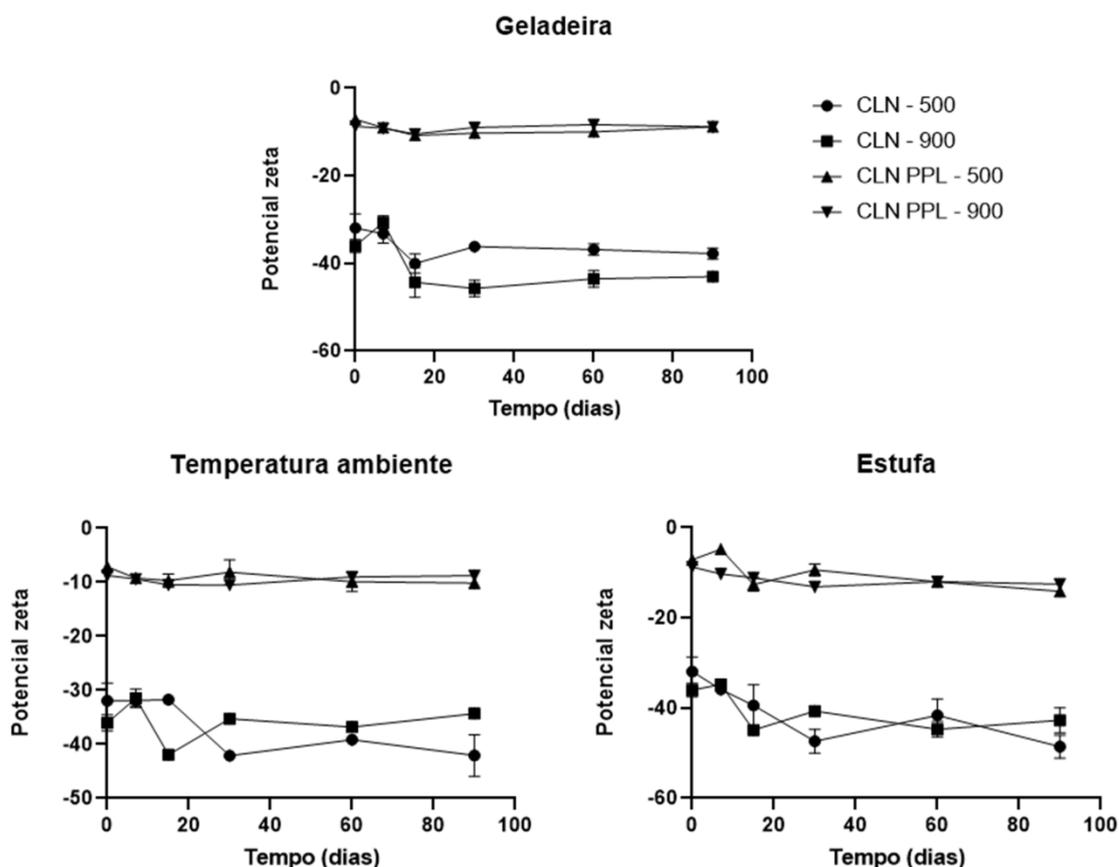


Figura 20 – Representação gráfica do potencial zeta dos CLN vazios e carregados ao longo de 90 dias, em temperaturas de armazenamento de 4, 25 e 40°C. Os quatro grupos analisados demonstraram valor de potencial zeta estatisticamente diferentes em todas as *temperaturas e *tempos e do estudo. * $p < 0,0001$.

O aprisionamento do PPL pelos CLN PPL – 500 e CLN PPL – 900 no dia 0 superou a porcentagem de 99,0% e essa porcentagem foi mantida até o final dos 90 dias de estudo.

A estabilidade dos CLNs é um dos aspectos reconhecidamente delicados desse tipo de nanopartícula. Sua constituição lipídica, geralmente rica em ácidos graxos, torna tais sistemas muito sensíveis às condições de armazenamento, especialmente à temperatura (113).

A condição de armazenamento em geladeira (4 °C), por outro lado, preservou as características físicas das formulações ao longo dos 3 meses de ensaio. De fato, todos os sistemas apresentaram pequenas oscilações no tamanho das partículas, PDI e potencial zeta em todos os sistemas avaliados.

4.6 ENSAIO DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO PPL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

O estudo da cinética de liberação de PPL pela solução controle e pelas nanodispersões demonstrou que os CLNs desempenham um papel de controle de liberação efetivo. A solução controle por volta de cinco horas de ensaio liberou 92,02% de PPL enquanto que os CLNs de ambos tamanhos, ao final de 24 horas de experimento mantiveram a liberação do PPL em aproximadamente 57,0% (Figura 21).

A comparação estatística feita entre o CLN PPL – 500 e o CLN PPL – 900 demonstrou que a diferença entre os tamanhos médios de partícula nesse experimento não influenciou na cinética de liberação do fármaco ($p=0,9488$).

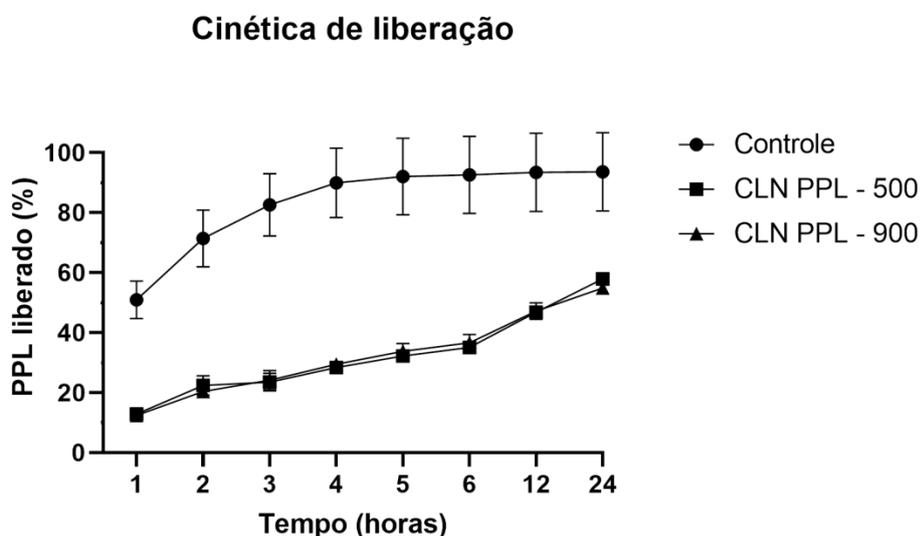


Figura 21 – Representação gráfica da cinética de liberação do PPL pela solução controle e pelos CLN – PPL.

A liberação do fármaco de formulação à base de nanopartículas depende de vários fatores, incluindo composição da nanoestrutura, pH do meio, temperatura e

solubilidade do fármaco. No caso das CLNs desenvolvidas nesse estudo o maior controle de liberação do PPL se dá provavelmente pelo lipídio sólido AE, que forma uma espécie de casca em volta do lipídio líquido (34,39).

A análise de regressão linear baseada no método de regressão dos mínimos quadrados foi empregada para estudar a linearidade dos modelos cinéticos (Tabela 8) (114). O CLN PPL – 500 foi ajustado para uma liberação de fármaco de primeira ordem, de modo que a taxa de liberação dependia diretamente da concentração do fármaco (115). Enquanto no CLN PPL – 900 o modelo Weibull foi o que melhor se ajustou, indicando que o sistema liberou o composto ativo de acordo com a difusão Fickiana, processo dependente do tempo de relaxação do polímero (116).

Tabela 8 – Adequação dos modelos de ajuste de cinética de liberação do controle e dos CLN – PPL considerando o melhor coeficiente de correlação (r^2).

Ajuste de modelos de cinética de liberação (r^2)					
Amostra	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi	Weibull	Hixon-Crowell
CONTROLE	0,5281	0,8990	0,6647	0,9490	0,7432
CLN PPL - 500	0,9332	0,9791	0,9288	0,9470	0,9470
CLN PPL - 900	0,9016	0,9651	0,9675	0,9909	0,9562

4.7 ESTUDO *IN VITRO* DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA DOS CLN – PPL

Os estudos de permeação realizados mostraram que os CLNs carregados com PPL foram capazes de controlar a penetração do fármaco em todas as camadas da pele, em comparação com o controle da solução de PPL (Figura 22), corroborando os resultados do estudo de liberação do fármaco. De fato, a diferença do fármaco permeado em 12 horas chega a 68% no caso da epiderme.

Estudos de permeação cutânea mostraram que os nanocarreadores lipídicos apresentaram alta afinidade pela epiderme (EP). No caso dessa camada de pele em um modelo de pele intacta (Figura 22), a quantidade permeada de CLN PPL - 500 foi de $19,53 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mostrando uma maior concentração de PPL depositada nessa fração da pele em relação à CLN PPL - 900 que depositou $12,66 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

($p < 0,001$). Este resultado era esperado dada a maior superfície de contato do NLC de menor diâmetro para interagir com a pele (116).

Os folículos pilosos (FP) são anexos importantes da pele. Diante de um estudo de permeação de fármacos desse tipo, avaliar a influência dessa estrutura capilar no perfil de permeação pode esclarecer como ela atua na via de liberação de fármacos. Quando a formulação é uma composição lipídica, como é o caso dos CLNs, estudar como ela se comporta na presença de FP é essencial, pois o sebo presente nesta estrutura deve ter afinidade com a formulação (39,117). No modelo de permeação com o folículo ocluído, a concentração de PPL aumentou na epiderme em relação ao modelo convencional. Esse evento pode ter ocorrido porque, como a via folicular estava fechada, a quantidade de fármaco que poderia ser depositada nesse anexo de pele foi utilizada na epiderme por não ter via de acesso para o FP.

É importante ressaltar que nenhum PPL quantificado foi encontrado a partir de CLNs no meio receptor, mesmo quando foram usados modelos de pele com folículos ocluídos, em contraste com a solução de PPL em que uma permeação de $43,40 \pm 5,87 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $30,66 \pm 3,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram observados na pele não tratada e na pele com folículos ocluídos, respectivamente. Esses resultados demonstram o potencial das CLNs como veículo essencial para manter o efeito tópico da PPL, evitando sua absorção sistêmica, o que leva a efeitos adversos que se pretende evitar (Figura 22).

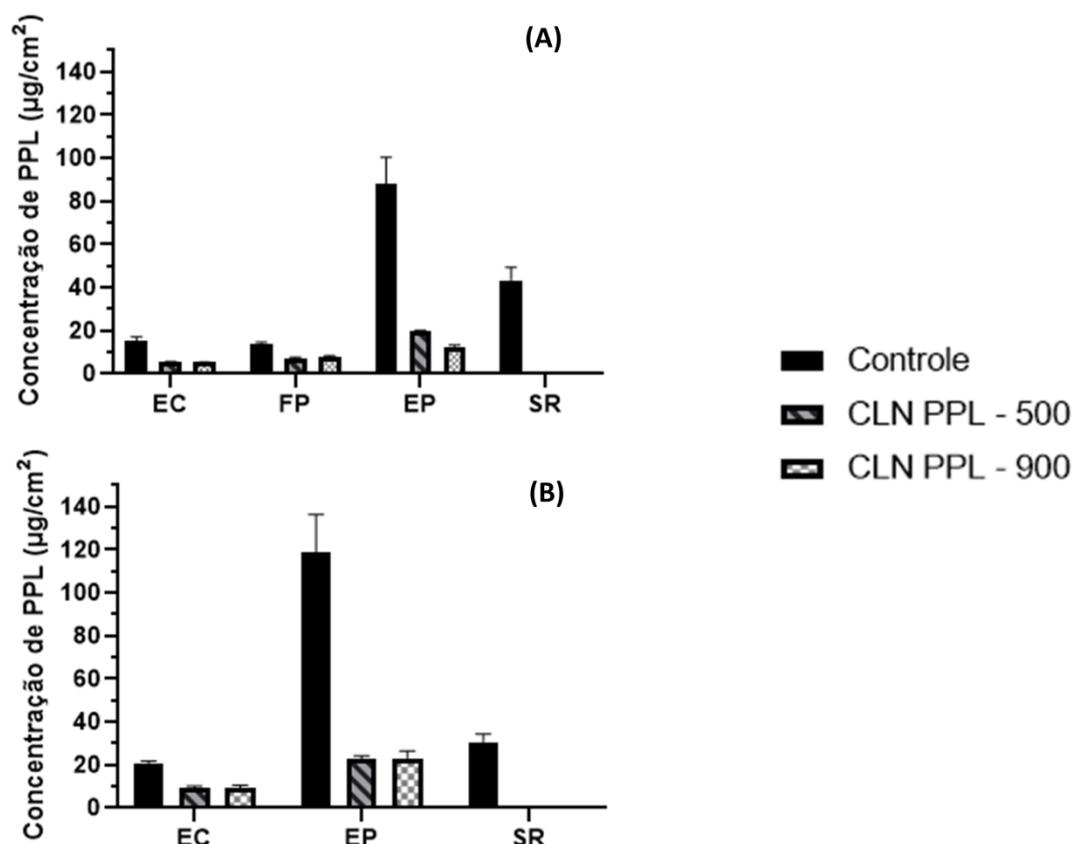


Figura 22 – Perfis de permeação do PPL através da solução controle e CLNs carregados nos diferentes modelos de pele suína, convencional (A) e com o folículo ocluído (B). EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; EP: epiderme; SR: solução receptora.

4.8 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS DE LINHAGEM HBMEC

Para validar os sistemas de nanoformulação desenvolvidos, experimentos *in vitro* baseados em HBMECs foram realizados. Apesar de constituir uma linhagem celular humana imortalizada, a literatura relata o uso do HBMEC para avaliar os efeitos do propranolol sobre o hemangioma, com observações relevantes decorrentes de tal modelo experimental (118).

Dada a toxicidade bem documentada do PPL sobre as células endoteliais, incluindo HBMEC, na literatura (119,120). Testamos se a etapa de nanoformulação alteraria o perfil de toxicidade da droga para essas células. Para tanto, os HBMECs foram tratados com o PPL livre ou suas versões nanoformuladas, bem como com as nanopartículas vazias, como controle, por 24 horas.

A viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, indicou que a estratégia de nanoformulação proposta no presente estudo não comprometeu a toxicidade do fármaco em relação às células endoteliais (Figura 23). É importante ressaltar que as nanopartículas vazias não exerceram qualquer toxicidade significativa para as células.

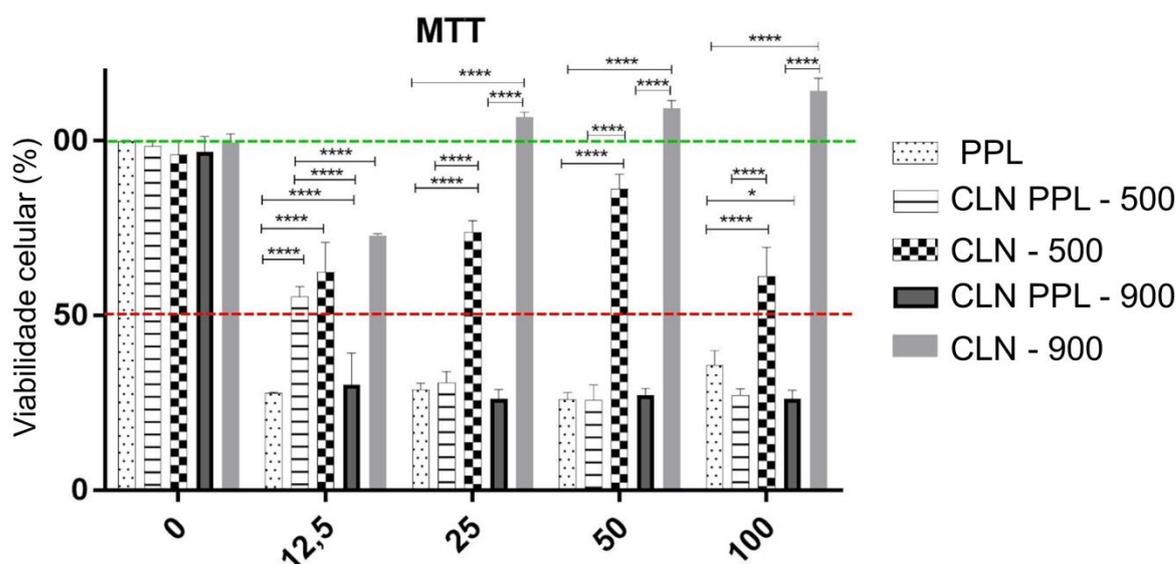


Figura 23 - Ensaio de viabilidade celular. Representação gráfica da metabolização do MTT por HBMECs tratados com PPL de 0 a 100 µM por 24 horas. A linha verde indica 100% de viabilidade celular e a linha vermelha indica 50% da viabilidade comprometida pelo efeito dos tratamentos. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média e foram normalizados para a viabilidade apresentada pelos HBMECs não tratados. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA two way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos.

Os efeitos do propranolol sobre o hemangioma não estão relacionados apenas a um efeito tóxico direto do fármaco sobre as células endoteliais, mas também a um efeito mais prolongado de inibição da proliferação celular. Portanto, além da viabilidade das células, também tratamos as células com 50 µM de PPL livre ou nanoformulação e monitoramos a viabilidade/proliferação celular por um período de tempo mais longo, a fim de avaliar indiretamente esse comportamento. Curiosamente, enquanto as nanopartículas vazias suportavam a proliferação celular, as nanopartículas carregando PPL inibiam significativamente a proliferação celular,

semelhante ao composto livre (Figura 24). Também digno de nota, enquanto o PPL livre inibiu significativamente a proliferação celular a partir do dia 1, o composto nanoformulado apenas induziu uma redução significativa na proliferação celular no dia 6, possivelmente indicando um efeito retardado, como esperado em sistemas de liberação controlada.

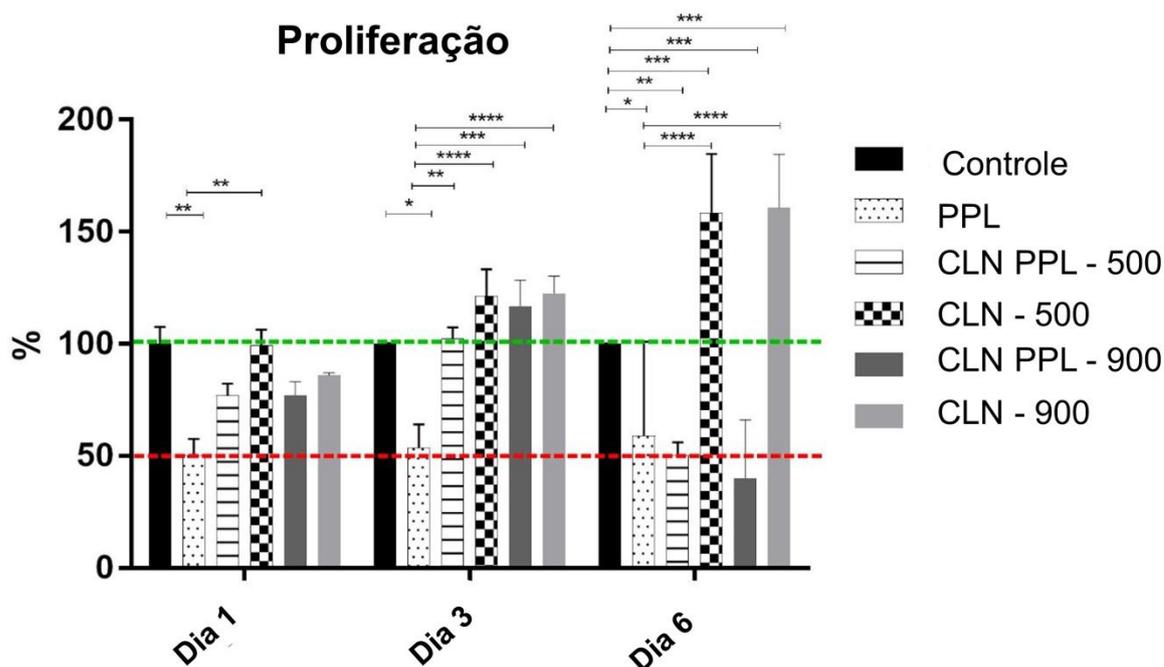


Figura 24 - Ensaio de viabilidade/proliferação celular. Representação gráfica da metabolização do MTT por HBMECs tratados com PPL livre ou nanoformulado a 50 μ M por 1, 3 e 6 dias. A linha verde indica 100% de proliferação de HBMEC e a linha vermelha indica 50% de proliferação comprometida pelo efeito dos tratamentos. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média e foram normalizados para a viabilidade apresentada pelos HBMECs tratados com PPL 0 μ M (controle) no dia 1. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA two way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos.

Finalmente, a migração celular, que é outro evento relevante para a evolução do hemangioma e que é inibido pelo PPL, também foi monitorada em células tratadas com 50 μ M do PPL livre ou nanoformulado (119). Em comparação com as células não tratadas, que foram mantidas em meio de cultura celular, as células tratadas com PPL livre apresentaram uma migração significativamente menor em 12 e 24hs de observação. Curiosamente, as nanopartículas vazias também inibiram a

migração de células endoteliais e as nanopartículas de 900 nm contendo propranolol apresentaram o maior efeito de inibição da migração celular, possivelmente devido a efeitos sinérgicos ou complementares entre o fármaco e os compostos da formulação.

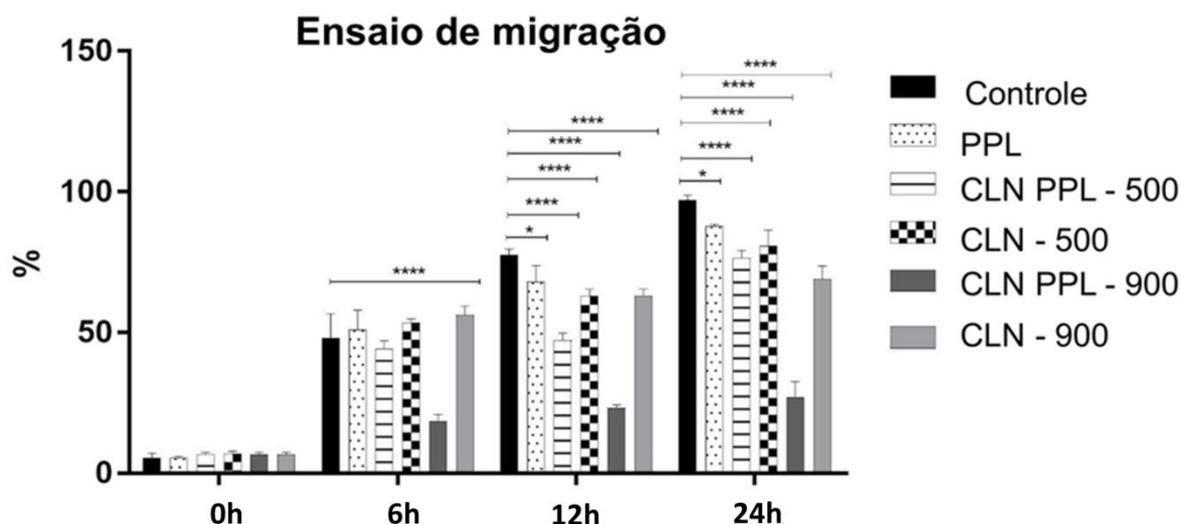


Figura 25 - Ensaio de migração celular. Representação gráfica da inibição da migração de células HBMECs tratados com PPL livre ou nanoformulado a 50 μ M. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média e foram normalizados para a migração apresentada pelos HBMECs tratados com PPL 0 μ M (controle) no tempo 0. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA two way. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ entre os grupos.

Apesar da falta de uma compreensão completa sobre o mecanismo de ação do PPL sobre as células endoteliais neste momento, tem sido demonstrado que os efeitos da droga alteram a expressão gênica celular, influenciando a expressão e função de proliferação celular e genes reguladores da apoptose celular (120).

Semelhante a observações anteriores feitas com diferentes preparações de células endoteliais, o propranolol livre exerceu efeitos tóxicos, antiproliferativos e antimigratórios significativos sobre HBMECs (118). Além disso, nossos dados mostram que a estratégia de formulação aqui proposta não comprometeu a eficácia do medicamento, ao mesmo tempo em que oferece benefícios em relação à estabilidade e garantia de liberação prolongada.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de uma formulação tópica que veicule PPL demonstrou ser importante diante da sua necessidade no tratamento de pacientes infantis diagnosticados com HI. Nesse contexto, o fármaco incorporado a um carreador lipídico nanoestruturado resultou em performances muito positivas.

A composição da formulação pretendida é crucial para as características que a formulação irá apresentar. Os componentes determinados nesse estudo demonstraram compatibilidade físico-química através dos ensaios de análise térmica empregando modelo de superfície de resposta, bem como as análises de espectrofotometria por FTIR.

As características de tamanho de superfície e PDI foram atendidas obedecendo ao modelo preditivo desenvolvido por um desenho Box-Behnken, demonstrando este, ter sido eficiente e intrínseco o modelo para a fabricação e controle de tamanho e PDI pretendidos. EE acima de 99,0 % e pH em torno de 5,5 também foram valores favoráveis para aplicação tópica dos CLNs.

As nanoformulações promoveram liberação controlada do fármaco e direcionamento tópico, além de demonstrarem resultados positivos de inibição de proliferação celular frente às células HBMEC, tornando a tecnologia obtida nesse estudo, uma alternativa para o tratamento dessa patologia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sun Y, Qiu F, Hu C, Guo Y, Lei S. Hemangioma Endothelial Cells and Hemangioma Stem Cells in Infantile Hemangioma. *Ann Plast Surg.* 2022;88(2):244-249.
2. Pahl KS, McLean TW. Infantile Hemangioma: A Current Review. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2021;1-9.
3. Hinen HB, Boccuto L, Trenor CC, Wine Lee L. Childhood Vascular Tumors. *Front Pediatr.* 2020;8:573023.
4. Zhu Z, Cai P, Zhu J, Chen J, Wu B, Gu Z, et al. Neonatal giant hepatic hemangioma: A case report. *Medicine.* 2018;97(42):e12863.
5. Cawthorn TR, Fraulin FOG, Harrop AR. Infantile Hemangiomas of the Lip: Complications and Need for Surgical Intervention. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2019;7(6):e2308.
6. Gorincour G, Kokta V, Rypens F, Garel L, Powell J, Dubois J. Imaging characteristics of two subtypes of congenital hemangiomas: rapidly involuting congenital hemangiomas and non-involuting congenital hemangiomas. *Pediatr Radiol.* 2005;35(12):1178–85.
7. Greenberger S, Bischoff J. Pathogenesis of infantile haemangioma. *Br J Dermatol.* 2013;169(1):12–9.
8. Mabeta P. Oncosuppressors and Oncogenes: Role in Haemangioma Genesis and Potential for Therapeutic Targeting. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1192.
9. Harbi S, Wang R, Gregory M, Hanson N, Kobylarz K, Ryan K, et al. Infantile Hemangioma Originates From A Dysregulated But Not Fully Transformed Multipotent Stem Cell. *Sci Rep.* 2016;6(1):35811.
10. Marler JJ, Fishman SJ, Kilroy SM, Fang J, Upton J, Mulliken JB, et al. Increased Expression of Urinary Matrix Metalloproteinases Parallels the Extent and Activity of Vascular Anomalies. *Pediatrics.* 2005;116(1):38–45.
11. Kleiman A, Keats EC, Chan NG, Khan ZA. Evolution of hemangioma endothelium. *Exp Mol Pathol.* 2012;93(2):264–72.
12. Harter N, Mancini AJ. Diagnosis and Management of Infantile Hemangiomas in the Neonate. *Pediatr Clin N.* 2019;66: 437–459.

13. Sasaki M, North PE, Elsey J, Bublely J, Rao S, Jung Y, et al. Propranolol exhibits activity against hemangiomas independent of beta blockade. *NPJ Precis Oncol.* 2019;3(1):1–9.
14. Chiller KG, Passaro D, Frieden IJ. Hemangiomas of Infancy: Clinical Characteristics, Morphologic Subtypes, and Their Relationship to Race, Ethnicity, and Sex. *Archives of Dermatology.* 2002;138(12):1567–76.
15. Christine Léauté-Labrèze C, Harper JI, Hoeger PH. Infantile hemangioma. *The Lancet.* 2017;390(10089):58–94.
16. Jung HL. Update on infantile hemangioma. *Clin Exp Pediatr.* 2021;64(11):559-572.
17. Srinivasan A. Propranolol: A 50-year historical perspective. *Ann Indian Acad Neurol.* 2019;22(1):21–21.
18. Zanela T, Santos-Oliveira R, Betzler de Oliveira de Siqueira L, Cardoso V da S, de Freitas ZMF, Barros R de C da SA, et al. Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:2827–37.
19. Zanelatto F, Dias E, Teixeira J, Sartori C, Parada C, Tambeli C. Anti-inflammatory effects of propranolol in the temporomandibular joint of female rats and its contribution to antinociceptive action. *Eur J Pain.* 2018;22(3):572–82.
20. Heaton LJ, McNeil DW, Milgrom P. Propranolol and d-cycloserine as adjunctive medications in reducing dental fear in sedation practice. *SAAD Dig.* 2010;26:27–35.
21. Gregoriou S, Sidiropoulou P, Kontochristopoulos G, Rigopoulos D. Management Strategies Of Palmar Hyperhidrosis: Challenges And Solutions. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2019;12:733–44.
22. SCIFINDER. Sem título [Internet]. Disponível em: <https://scifinder.cas.org>.
23. Propranolol hydrochloride [Internet]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propranolol-hydrochloride>.
24. Namdeo A, Jain NK. Liquid crystalline pharmacogel based enhanced transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *J Control Release.* 2002;82(2):223–36.

25. Socchi F, Bigorre M, Normandin M, et al. Hemangioma in infantile haemangioma: A paediatric post-marketing surveillance drug study. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(4):1970-1980.
26. Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*. 2008 Jun 12;358(24):2649–51.
27. Tiemann L, Hein S. Infantile Hemangioma: A Review of Current Pharmacotherapy Treatment and Practice Pearls. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2020;25(7):586–99.
28. Pierre Fabre Pharmaceuticals. Hemangeol [Internet]. Disponible em: <https://www.hemangeol.com/hcp/>
29. Johansen ML, Mahendran G, Lawley LP. Is prolonged monitoring necessary? An updated approach to infantile hemangioma treatment with oral propranolol. *Pediatr Dermatol*. 2021;38(4):800–805.
30. Padula C, Nicoli S, Pescina S, Santi P. The Influence of Formulation and Excipients on Propranolol Skin Permeation and Retention. *BioMed Research International*. 2018;2018:1–7.
31. Frongia G, Byeon J-O, Mehrabi A, Günther P. Recurrence rate of infantile hemangioma after oral propranolol therapy. *Eur J Pediatr*. 2021;180(2):585–90.
32. Kelchen MN, Brogden NK. In Vitro Skin Retention and Drug Permeation through Intact and Microneedle Pretreated Skin after Application of Propranolol Loaded Microemulsions. *Pharm Res*. 2018;35(12):228.
33. Kum JJ, Khan ZA. Mechanisms of propranolol action in infantile hemangioma. *Dermatoendocrinol*. 2015 Jan 26;6(1):e979699.
34. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm. J*. 2018;26(1):64.
35. Al Shaker HA, Qinna NA, Badr M, Al Omari MMH, Idkaidek N, Matalka KZ, et al. Glucosamine modulates propranolol pharmacokinetics via intestinal permeability in rats. *Eur J Pharm Sci*. 2017;105:137–43.
36. Uwai K, Tani M, Ohtake Y, Abe S, Maruko A, Chiba T, et al. Photodegradation products of propranolol: The structures and pharmacological studies. *Life Sciences*. 2005;78(4):357–65.

37. Khalil RM, Arini SKE, AbouSamra MM, Zaki HS, El-Gazaerly ON, Elbary AA. Development of Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Promoting Topical Delivery of Propranolol Hydrochloride: Design, Optimization and In-Vivo Evaluation. *JPharmSci.* 2021;110(3):1337–48.
38. Pereira MN, Tolentino S, Pires FQ, et al. Nanostructured lipid carriers for hair follicle-targeted delivery of clindamycin and rifampicin to hidradenitis suppurativa treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021;197:111448.
39. Souto EB, Baldim I, Oliveira WP, Rao R, Yadav N, Gama FM, et al. SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020;17(3):357–77.
40. Bhise K, Kashaw SK, Sau S, Iyer AK. Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach. *Int J Pharm.* 2017;526(1–2):506–15.
41. Moghddam SMM, Ahad A, Aqil M, Imam SS, Sultana Y. Optimization of nanostructured lipid carriers for topical delivery of nimesulide using Box–Behnken design approach. *Artif Cells Nanomed.* 2017;45(3):617–24.
42. Vieira R, Severino P, Nalone LA, Souto SB, Silva AM, Lucarini M, et al. Sucupira Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Lipid Screening, Factorial Design, Release Profile, and Cytotoxicity. *Molecules.* 2020;25(3):685.
43. Bashiri S, Ghanbarzadeh B, Ayaseh A, Dehghannya J, Ehsani A, Ozyurt H. Essential oil-loaded nanostructured lipid carriers: The effects of liquid lipid type on the physicochemical properties in beverage models. *Food Biosci.* 2020;35:100526.
44. Phetcharat L, Wongsuphasawat K, Winther K. The effectiveness of a standardized rose hip powder, containing seeds and shells of *Rosa canina*, on cell longevity, skin wrinkles, moisture, and elasticity. *Clin Interv Aging.* 2015;10:1849–1856.
45. Rouco H, Diaz-Rodriguez P, Rama-Molinos S, Remuñán-López C, Landin M. Delimiting the knowledge space and the design space of nanostructured lipid carriers through Artificial Intelligence tools. *Int J Pharm.* 2018;553(1):522–30.
46. Subramaniam B, Siddik ZH, Nagoor NH. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *J Nanopart Res.* 2020;22(6):141.

47. Cunha S, Costa CP, Moreira JN, Sousa Lobo JM, Silva AC. Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review. *Nanomed.: Nanotechnol Biol Med.* 2020;28:102206.
48. ICH. Guidance for Industry Q9 Quality Risk Management Guidance for Industry Q9 Quality Risk Management. In: *International Conference on Harmonization.* 2006;1-21.
49. Czyrski A, Sznura J. The application of Box-Behnken-Design in the optimization of HPLC separation of fluoroquinolones. *Sci Rep.* 2019;9:19458.
50. González-Fernández FM, Bianchera A, Gasco P, Nicoli S, Pescina S. Lipid-Based Nanocarriers for Ophthalmic Administration: Towards Experimental Design Implementation. *Pharmaceutics.* 2021;13:447.
51. Pires FQ, Angelo T, Silva JKR, Sá-Barreto LCL, Lima EM, Gelfuso GM, et al. Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;137:196–203.
52. Cunha-Filho MSS, Martínez-Pacheco R, Landín M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral β -lapachone by solvent change precipitation of microparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69(3):871–7.
53. Malaquias LFB, Schulte HL, Chaker JA, Karan K, Durig T, Marreto RN, Gratieri T, Gelfuso GM, Cunha-Filho M. Hot Melt Extrudates Formulated Using Design Space: One Simple Process for Both Palatability and Dissolution Rate Improvement. *J Pharm Sci.* 2018;107:286–296.
54. USP 36. *United States Pharmacopeia, 36th ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville.* 2013.
55. Ângelo T, Pires FQ, Gelfuso GM, da Silva JK, Gratieri T, Cunha-Filho M. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1022:81–86.
56. Gui L, Li L, Dong LH, Xiang SS, Zhai JP, Ge ZQ. Method development and validation of LC-MS/MS-based assay for the simultaneous quantitation of trastuzumab and pertuzumab in cynomolgus monkey serum and its application in pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2020;e4903.
57. Colombo M, Staufenbiel S, Rühl E, Bodmeier R. In situ determination of the saturation solubility of nanocrystals of poorly soluble drugs for dermal application. *Int J Pharm.* 2017;521(1–2):156–66.

58. Pires FQ, da Silva JKR, Sa-Barreto LL, Gratieri T, Gelfuso GM, Cunha-Filho M. Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;182:110382.
59. Naik J, Desai S, Ramani V. Application of Augmented Simplex Centroid Design for Optimization of HPLC Mobile Phase for Estimation of Curcumin and Piperine. *Indian J Pharm Educ*. 2021;55:1164–72.
60. ANVISA. Guia de Estudos de Estabilidade [Internet]. 2019:1–49. Disponível em: http://www.engenews.com.br/GUIA_E_1.PDF.pdf.
61. Turner R, Wevrett SR, Edmunds S, Brown M, Atkinson R, Shea T. Validation of an analytical method to quantify the permeation and penetration of flurbiprofen into human pharynx tissue. *Biomed Chromatogr*. 2019;33(8):e4499.
62. Tolentino S, Pereira M, Sousa M, Cunha-Filho M, Gelfuso GM, Gratieri T. The influence of sebaceous content on the performance of nanosystems designed for the treatment of follicular diseases. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;59:101895.
63. Nikolskaia OV, de A Lima APC, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Fukuma T, Scharfstein J, et al. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2739–47.
64. Alencar-Silva T, Zonari A, Foyt D, Mylieneth G, Robert P, Saldanha-Araújo F, Campos D, Franco OL, Carvalho JL. IDR-1018 Induces Cell Proliferation, Migration, and Reparative Gene Expression in 2D Culture and 3D Human Skin Equivalents. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(11):2018–30.
65. Liang CC, Park A, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2:329–333.
66. Lima SGB, Pinho LAG, Pereira MN, Gratieri T, Sá-Barreto LL, Gelfuso GM, Cunha-Filho M. Preformulation studies of finasteride to design matrix systems for topical delivery. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;161:273–279.
67. Khater D, Nsairat H, Odeh F, Saleh M, Jaber A, Alshaer W, et al. Design, Preparation, and Characterization of Effective Dermal and Transdermal Lipid Nanoparticles: A Review. *Cosmetics*. 2021;8(2):39.

68. Ambrozini B, Cervini P, Cavalheiro E. Thermal behavior of the β -blocker propranolol. *J Therm Anal Calorim.* 2016;123:1013–1017.
69. Jovanović M, Tomić N, Cvijić S, Stojanović D, Ibrić S, Uskoković P. Mucoadhesive Gelatin Buccal Films with Propranolol Hydrochloride: Evaluation of Mechanical, Mucoadhesive, and Biopharmaceutical Properties. *Pharmaceutics.* 2021;13:273.
70. Drescher S, Hoogevest P. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2020;12:1235.
71. Pires FQ, Alves-Silva I, Pinho LAG, Chaker JA, Sa-Barreto LL, Gelfuso GM, Gratieri T, Cunha-Filho M. Predictive models of FDM 3D printing using experimental design based on pharmaceutical requirements for tablet production. *Int J Pharm.* 2020;588:119728.
72. Grajzer M, Prescha A, Korzonek K, Dziadas M, Kulma A, Grajeta H. Characteristics of rose hip (*Rosa canina* L.) cold-pressed oil and its oxidative stability studied by the differential scanning calorimetry method. *Food Chem.* 2015;188:459–466.
73. Merino D, Alvarez VA. Thermal degradation of poly (ϵ -caprolactone) nanocomposites with soy lecithin-modified bentonite fillers. *Thermochim Acta.* 2020;689:178638.
74. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Vieira J. Characterization of melting properties in dark chocolates from varying particle size distribution and composition using differential scanning calorimetry. *Food Res Int.* 2008;41(7):751–7.
75. Charuwat P, Boardman G, Bott C, Novak JT. Thermal Degradation of Long Chain Fatty Acids. *Water Environ. Res.* 2018;90:278–287.
76. Sono R. New Development of Functionality in Phospholipid and Glycolipid. *Oleosience.* 2019;19:423–427.
77. Czajkowska-Kośnik A, Szymańska E, Czarnomysy R, Jacyna J, et al. Nanostructured Lipid Carriers Engineered as Topical Delivery of Etodolac: Optimization and Cytotoxicity Studies. *Materials.* 2021;14:596.
78. Pires FQ, Pinho LA, Freire DO, Silva ICR, et al. Thermal analysis used to guide the production of thymol and *Lippia origanoides* essential oil inclusion complexes with cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim.* 2019;137:543–553.

79. Arana L, Salado C, Vega S, Aizpurua-Olaizola O, Arada I de la, Suarez T, et al. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2015;135:18–26.
80. Zhang N, Yuan Y, Du Y, et al. Preparation and properties of palmitic-stearic acid eutectic mixture/expanded graphite composite as phase change material for energy storage. *Energy*. 2014;78:950–6.
81. Ma G, Han L, Sun J, Jia Y. Thermal properties and reliability of eutectic mixture of stearic acid-acetamide as phase change material for latent heat storage. *J Chem Thermodyn*. 2017;106:178–186.
82. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med*. 2018;18:91–93.
83. S. Salehi S, S. Boddohi S. Design and optimization of kollicoat® IR based mucoadhesive buccal film for co-delivery of rizatriptan benzoate and propranolol hydrochloride. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;97:230–244.
84. Mayerhöfer TG, Popp J. Beyond Beer's Law: Spectral Mixing Rules. *Appl Spectrosc*. 2020;74:1287–1294.
85. Mayerhöfer TG. Modelling IR-spectra of single-phase polycrystalline materials with random orientation—a unified approach. *Vib Spectrosc*. 2004;35:67–76.
86. Gouveia F, Bicker J, Santos J, Rocha M, Alves G, Falcão A, Fortuna A. Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *J Pharm Biomed*. 2020;181:113109.
87. Suedee R, Brain KR, Heard CM. Differential permeation of propranolol enantiomers across human skin in vitro from formulations containing an enantioselective excipient. *Chirality*. 1999;11(9):680–3.
88. Heard CM, Watkinson AC, Brain KR, Hadgraft J. (1993). In vitro skin penetration of propranolol enantiomers. *Int J Pharm*. 1993;90(3):5–8.
89. McCalley DV. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. *J Chromatogr A*. 2000;902(2):311–21.
90. FDA. Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry. 2018.
91. Pinho LA, Sá-Barreto LC, Infante CM, Cunha-Filho MS. Simultaneous determination of benzimidazole and itraconazole using spectrophotometry

- applied to the analysis of mixture: a tool for quality control in the development of formulations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;159:48–52.
92. Zilfidou E, Kabir A, Furton KG, Samanidou V. An improved fabric phase sorptive extraction method for the determination of five selected antidepressant drug residues in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with diode array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019;1125:121720.
 93. Barba C, Alonso C, Martí M, Carrer V, Yousef I, Coderch L. Selective modification of skin barrier lipids. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;172:94–102.
 94. Nuland M, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Bioanalytical LC–MS/MS validation of therapeutic drug monitoring assays in oncology. *Biomed Chromatogr.* 2020;34(1):e4623.
 95. Chen Z, Gao Y, Zhong D. Technologies to improve the sensitivity of existing chromatographic methods used for bioanalytical studies. *Biomed Chromatogr.* 2020;34(3):e4798.
 96. Ângelo T, Cunha-Filho MSS, Gelfuso GM, Gratieri T. Chromatographic method for clobetasol propionate determination in hair follicles and in different skin layers. *Biomed Chromatogr.* 2017;31(2).
 97. Reis TA, Jaculi AE, Alves R da C, Gratieri T, Azevedo RB, Joanitti GA, et al. Simple and Selective HPLC-UV/Vis Bioanalytical Method to Determine Aluminum Phthalocyanine Chloride in Skin Permeation Studies. Voelkel A, editor. *J Anal Methods Chem.* 2018;2018:7423764.
 98. Siepmann J, Siepmann F. Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. *Int J Pharm.* 2020;577:119009.
 99. Bialek K, Wojnarowska Z, Twamley B, Tajber L. Characterisation and fundamental insight into the formation of new solid state, multicomponent systems of propranolol. *Int J Pharm.* 2021;602:120605.
 100. Bawazeer S, El-Telbany DFA, Al-Sawahli MM, Zayed G, Keed AAA, Abdelaziz AE, et al. Effect of nanostructured lipid carriers on transdermal delivery of tenoxicam in irradiated rats. *Drug Deliv.* 2020;27(1):1218–30.
 101. Adib ZM, Ghanbarzadeh S, Kouhsoltani M, Khosroshahi AY, Hamishehkar H. The Effect of Particle Size on the Deposition of Solid Lipid Nanoparticles in Different Skin Layers: A Histological Study. *Adv Pharm Bull.* 2016;6(1):31–6.

102. Shimojo AAM, Fernandes ARV, Ferreira NRE, Sanchez-Lopez E, Santana MHA, Souto EB. Evaluation of the Influence of Process Parameters on the Properties of Resveratrol-Loaded NLC Using 22 Full Factorial Design. *Antioxidants*. 2019;8(8):272.
103. Saez V, Souza IDL, Mansur CRE. Lipid nanoparticles (SLN & NLC) for delivery of vitamin E: a comprehensive review. *Int J Cosmet Sci*. 2018;40(2):103–16.
104. Lasoń E, Sikora E, Ogonowski J. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(4):773–7.
105. Prakash C, Bhargava P, Tiwari S, Majumdar B, Bhargava RK. Skin Surface pH in Acne Vulgaris: Insights from an Observational Study and Review of the Literature. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2017;10(7):33–9.
106. Venkatachalam M, Shum-Chéong-Sing A, Caro Y, Dufossé L, Fouillaud M. OVAT Analysis and Response Surface Methodology Based on Nutrient Sources for Optimization of Pigment Production in the Marine-Derived Fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548 Submerged Fermentation. *Marine Drugs*. 2021;19(5).
107. Bahari L, Hamishehkar H. The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. *Adv Pharm Bull*. 2016;6(2):143–51.
108. Santos GA, Angelo T, Andrade LM, Silva SMM, Magalhães PO, Cunha-Filho M, et al. The role of formulation and follicular pathway in voriconazole cutaneous delivery from liposomes and nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;170:341–6.
109. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Potential of Nanoparticles as Permeation Enhancers and Targeted Delivery Options for Skin: Advantages and Disadvantages. *Drug Des Devel*. 2020;14:3271.
110. Cardoso CO, Tolentino S, Gratieri T, Cunha-Filho M, Lopez RFV, Gelfuso GM. Topical Treatment for Scarring and Non-Scarring Alopecia: An Overview of the Current Evidence. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021;14:485.
111. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the

- Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2).
112. Varela-Fernández R, García-Otero X, Díaz-Tomé V, Regueiro U, López-López M, González-Barcia M, et al. Lactoferrin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) as a new formulation for optimized ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2022 Mar 1;172:144–56.
 113. Kelidari HR, Saeedi M, Akbari J, Morteza-semnani K, Valizadeh H, Maniruzzaman M, et al. Development and Optimisation of Spironolactone Nanoparticles for Enhanced Dissolution Rates and Stability. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(5):1469–74.
 114. Wojcik-Pastuszka D, Krzak J, Macikowski B, Berkowski R, Osiński B, Musiał W. Evaluation of the Release Kinetics of a Pharmacologically Active Substance from Model Intra-Articular Implants Replacing the Cruciate Ligaments of the Knee. *Materials (Basel)*. 2019;12(8):1202.
 115. Cunha-Filho M, Simões DF, Pires FQ, Rocha JL, Freire DO, Silva ICR, et al. The utility of thermal analysis in the preformulation and development of an antifungal nail lacquer containing thymol. *J Therm Anal Calorim*. 2020.
 116. Kobryń J, Sowa S, Gasztych M, Dryś A, Musiał W. Influence of Hydrophilic Polymers on the Factor in Weibull Equation Applied to the Release Kinetics of a Biologically Active Complex of *Aesculus hippocastanum*. *International Journal of Polymer Science*. 2017; 29;2017:e3486384.
 117. Xiang H, Xu S, Li J, Pan S, Miao X. Particle Size Effect of Curcumin Nanocrystals on Transdermal and Transfollicular Penetration by Hyaluronic Acid-Dissolving Microneedle Delivery. *Pharmaceutics*. 2022 Feb;15(2):206.
 118. Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, Moundjian R, Béliveau R. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res*. 2009;60(5):438-445.
 119. Wong A, Hardy KL, Kitajewski AM, Shawber CJ, Kitajewski JK, Wu JK. Propranolol accelerates adipogenesis in hemangioma stem cells and causes apoptosis of hemangioma endothelial cells. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(5):1012-1021.
 120. Montoya A, Varela-Ramirez A, Dickerson E, et al. The beta adrenergic receptor antagonist propranolol alters mitogenic and apoptotic signaling in late stage breast cancer. *Biomed J*. 2019;42(3):155-165.