



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE CARREADOR LIPÍDICO
NANOESTRUTURADO CONTENDO GORDURA DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)**

ANA PAULA BASTOS FERREIRA VIEIRA

BELÉM – PA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE CARREADOR LIPÍDICO
NANOESTRUTURADO CONTENDO GORDURA DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)**

Autor: Ana Paula Bastos Ferreira Vieira

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Junior

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

BELÉM – PA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde / UFPA

Vieira, Ana Paula Bastos Ferreira.

Simulação computacional de carreador lipídico nanoestruturado contendo gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ; orientador, José Otávio Carrera Silva Junior. - 2017.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2017.

1. Simulação. 2. Cupuaçu. 3. Nanotecnologia. I. Título.

CDD: 22. ed. : 620.5

Ana Paula Bastos Ferreira Vieira

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE CARREADOR LIPÍDICO
NANOESTRUTURADO CONTENDO GORDURA DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

Belém, 19 de Outubro de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Junior
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição
Universidade Federal de Goiás

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita bondade e amor para comigo e por sempre me proporcionar um renovo.

Ao meu principal incentivador meu esposo **Anderson Vieira**, que nunca me deixou desistir e sempre esteve ao meu lado.

À minha família pelo carinho, amor e compreensão em todos os momentos.

Ao meu orientador **Prof. José Otávio Carrera Silva Junior** pela oportunidade e compreensão.

A todos os meus colegas do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (Nanofarm) da Faculdade de Farmácia da UFPA pela amizade e pela ajuda nos momentos difíceis.

Agradeço a **Dra. Natália de Farias Silva** por acreditar no sucesso deste trabalho e na minha capacidade, quando nem mesmo eu acreditava.

Ao **Prof. Davi Brasil** pelo acolhimento, pela contribuição e pelo incentivo para a conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida.

RESUMO

VIEIRA, A.P.B.F. **Simulação computacional de carreador lipídico nanoestruturado contendo gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).** 2017. 91p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

A constante evolução dos sistemas de liberação controlada de fármacos impulsionou a busca de novas estratégias, para a obtenção de formulações potencialmente promissoras. A simulação computacional e a modelagem molecular podem fornecer efetivas contribuições para um design e avaliação de sistemas complexos, como nanocarreadores lipídicos contendo insumos naturais. Neste trabalho, um carreador lipídico nanoestruturado (CLN) foi proposto utilizando triacilgliceróis da gordura de cupuaçu e do ácido cáprico/caprílico, a cera de carnaúba, o tween 80[®], o pluronic[®] e um enantiômero do cetoconazol. Ensaios experimentais foram realizados para avaliar a cristalinidade e os eventos térmicos das misturas lipídicas, que demonstraram que a mistura M03 apresentou menor valor de entalpia (-15,17 J/g) e maior alargamento nos picos do difratograma, sugerindo estrutura de menor cristalinidade. Simulações computacionais foram realizadas para elucidar as estruturas 3D, estudar as propriedades moleculares e eletrostáticas, bem como as interações intermoleculares com o fármaco. A docagem molecular da M03 com o cetoconazol mostrou interação do tipo ligações de hidrogênio, com distância de ligação de 2,62 a 3,50Å e energia de afinidade -5,3 Kcal/mol. O modelo tridimensional do CLN mostrou boa distribuição das moléculas e após simulação de dinâmica molecular, o sistema se manteve estável (energia de -1895,47 KJ/mol), com interações do tipo ligação de hidrogênio moderada a fraca e distância de 2,45 a 3,50Å. Perfis RDF estabelecidos demonstram interações de forte intensidade entre o cetoconazol e o tween 80, entre a água e o pluronic, entre o pluronic e o SOO e entre o tween 80 e o SOO, todos com interações ocorridas no raio $\geq 2\text{\AA}$ de distância. Estes resultados podem ser utilizados como suporte para direcionar o desenvolvimento futuro de uma formulação de CLN, antecipando os testes experimentais e auxiliando na obtenção de formulações prósperas.

Palavras-chave: Simulação; Carreador lipídico; Docagem; Dinâmica.

ABSTRACT

VIEIRA, A.P.B.F. **Computational simulation of nanostructured lipid carrier content cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fat**. 2017. 91p. Dissertation of Master - Program for Post-graduate Pharmaceutical Sciences. Federal University of Pará, Belém, 2017.

The constant evolution of the drug delivery systems boosted the search for new strategies, to obtain potentially promising formulations. Computational simulation and molecular modeling can provide effective contributions to the design and evaluation of complex systems, such as lipid nanocarriers containing natural inputs. In this work, a nanostructured lipid carrier (NLC) was proposed using triacylglycerols of cupuaçu fat and capric/caprylic acid, carnauba wax, tween 80®, pluronic® and an enantiomer of ketoconazole. Experimental tests were carried out to evaluate the crystallinity and thermal events of the lipid mixtures, which demonstrated that the M03 mixture had a lower enthalpy value (-15,17 J/g) and greater widening of the diffractogram peaks, suggesting a lower crystallinity structure. Computational simulations were performed to elucidate 3D structures, to study molecular and electrostatic properties, as well as intermolecular interactions with the drug. The molecular docking of M03 with ketoconazole showed interaction of the hydrogen bond type, with bond distance of 2,62 to 3,50Å and affinity energy of -5,3 Kcal/mol. The three-dimensional CLN model showed good molecular distribution and after simulation of molecular dynamics, the system remained stable (energy -1895,47 KJ / mol), with moderate to weak hydrogen bonding interactions and a distance of 2,45 to 3,50Å. RDF profiles established demonstrate strong interactions between ketoconazole and tween 80, between water and pluronic, between pluronic and SOO, and between tween 80 and SOO, all interactions occurring within the radius $\geq 2\text{\AA}$ of distance. These results can be used as support to guide the future development of a CLN formulation, anticipating the experimental tests and helping to obtain thriving formulations.

Keywords: Simulation; Lipid nanocarriers; Docking; Dynamic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo de alguns sistemas de liberação nanoestruturados.....	19
Figura 2: Exemplo de distribuição de partículas suspensas e nanopartículas lipídicas..	21
Figura 3. Dois tipos básicos de nanopartículas lipídicas.	21
Figura 4. Formação de uma estrutura cristalina quase perfeita da NLS (à esquerda) e de uma estrutura com muitas imperfeições do CLN (à direita), ilustrando as respectivas matrizes lipídicas formadas nas nanopartículas.....	22
Figura 5. Cupuaçu com polpa (A), sementes (B) e gordura (C).	25
Figura 6. Carnaubeira (A) e a cera extraída das folhas (B).....	27
Figura 7. Enantiômeros do Cetoconazol.	30
Figura 8. Algumas formas farmacêuticas do cetoconazol para uso tópico.....	31
Figura 9. Estrutura tridimensional do SOS.	46
Figura 10. Estrutura tridimensional do SOO.....	46
Figura 11. Estrutura tridimensional da Cera.	46
Figura 12. Estrutura tridimensional do TAC.....	47
Figura 13. Estrutura tridimensional do tween 80.	47
Figura 14. Estrutura tridimensional do pluronic.	47
Figura 15. Estrutura tridimensional do Cetoconazol.....	47
Figura 16. Superfície do mapa de potencial eletrostático do SOS.	48
Figura 17. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o SOO.	48
Figura 18. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para a Cera.....	49
Figura 19. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o TAC.	49
Figura 20. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o pluronic.	49
Figura 21. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o tween 80..	50
Figura 22. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o cetoconazol.	50
Figura 23. Curvas DSC da gordura de cupuaçu e cera de carnaúba.....	53
Figura 24. Curvas DSC das misturas M01, M02 e M03.	54
Figura 25. Difratoograma da gordura de cupuaçu.....	56
Figura 26. Difratoograma da cera de carnaúba.....	56
Figura 27. Difratoograma das misturas lipídicas.	57
Figura 28. Proposta da mistura lipídica tridimensional.	59
Figura 29. Modelo tridimensional gerado após docking molecular com o cetoconazol.	61
Figura 30. Principais interações com o cetoconazol após docking molecular.....	61
Figura 31. Sistema CLN solvatado (superior) e não solvatado (inferior).	63
Figura 32. Sistema CLN após dinâmica molecular solvatado (superior) e não solvatado (inferior).....	64
Figura 33. Energia total do sistema.	65
Figura 34. <i>Snapshot</i> da relação do SOS (rosa) com o cetoconazol (verde) no CLN.	68

Figura 35. <i>Snapshot</i> da relação do SOO (verde claro) com o cetoconazol (verde) no CLN.	68
Figura 36. <i>Snapshot</i> da relação da cera (cinza) com o cetoconazol (verde) no CLN.	69
Figura 37. <i>Snapshot</i> da relação do TAC (amarelo) com o cetoconazol (verde) no CLN.	69
Figura 38. <i>Snapshot</i> da relação do tween 80 (azul) com o cetoconazol (verde) no CLN.	70
Figura 39. <i>Snapshot</i> da relação do pluronic (lilás) com o cetoconazol (verde) no CLN.	70
Figura 40. <i>Snapshot</i> das principais interações do SOS (rosa) com o cetoconazol (verde) no CLN.	71
Figura 41. <i>Snapshot</i> das principais interações do SOO (verde claro) com o cetoconazol (verde) no CLN.	71
Figura 42. <i>Snapshot</i> da principal interação da cera (cinza) com o cetoconazol (verde) no CLN.	72
Figura 43. <i>Snapshot</i> das principais interações do tween 80 (azul) com o cetoconazol (verde) no CLN.	72
Figura 44. <i>Snapshot</i> das principais interações do TAC (amarelo) com o cetoconazol (verde) no CLN.	73
Figura 45. Diagrama RDF do cetoconazol (CET) com os demais componentes do sistema CLN isento de água.	75
Figura 46. Diagrama RDF da água (SOL) com os demais componentes do sistema CLN.	75
Figura 47. Diagrama RDF do pluronic (PLU) com os demais componentes do sistema CLN.	76
Figura 48. Diagrama RDF do tween 80 (T80) com os demais componentes do sistema CLN.	76
Figura 49. Estimativa da distribuição dos compostos no sistema CLN após dinâmica molecular com base nos diagramas RDF.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de lipídeos sólidos e líquidos utilizados em nanopartículas lipídicas.	23
Tabela 2. Questões relevantes para o design do sistema de liberação de drogas que podem ser respondidas por simulação computacional.....	35
Tabela 3. Misturas lipídicas em diferentes proporções.	40
Tabela 4. Número de moléculas calculadas para cada mistura lipídica..	41
Tabela 5. Design da formulação de CLN para simulação.	43
Tabela 6. Estruturas representativas dos componentes do CLN.	44
Tabela 7. Energias após cálculos de otimização.....	45
Tabela 8. Orbitais HOMO e LUMO dos componentes do CLN.	52
Tabela 9. Temperatura de fusão, temperatura on-set e entalpia da cera de carnaúba, gordura de cupuaçu e das misturas.	54
Tabela 10. Principais interações entre o cetoconazol e os demais componentes do CLN após a dinâmica molecular.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
DRX	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
GC	Gordura de Cupuaçu
HOMO	Highest occupied molecular orbital
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MEP	Mapa do potencial eletroestático
NCBI	National center for biotechnology information
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
RDF	Radial Distribution Function
SOO	1-stearoyl-2,3-dioleoylglycerol
SOS	1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol
SUS	Saturated Unsaturated Saturated
TAC	Triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico
TFD	Teoria funcional de densidade

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
$\geq$	Maior ou igual
°C	Graus celsius
K	Graus Kelvin
g	Grama
Mol	Mol
J	Joule
N ₂	Nitrogênio
Kcal	Kilocaloria
Nm	Nanômetro
Å	Angstrom
ps	Pico-segundo
Θ	Theta

LISTA DE SOFTWARE

NOME	VERSÃO
CHEM DRAW ULTRA	12
CHEM 3D	12.2.0
UFSC CHIMERA	1.10.1
GAUSSIAN	09
SPARTAN EDUCATION	8
VISUAL MOLECULAR DINAMICS	-
GROMACS	5.0.4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Nanotecnologia e sistemas de liberação controlada	18
2.1.1 NANOPARTICULAS LIPIDICAS: NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	20
2.2 Gordura de cupuaçu.....	24
2.3 Cera de Carnaúba.....	26
2.4 Triacilglicerol de Ácido Cáprico e Caprílico (TAC)	27
2.5 Tensoativos.....	28
2.5.1 TWEEN 80.....	28
2.5.2 PLURONIC	29
2.6 Cetoconazol	29
2.7 Métodos computacionais e a modelagem molecular	31
2.7.1 ESTUDO COMPUTACIONAL DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA OU DDS (<i>Drug Delivery System</i>)	35
2.7.2 DOCAGEM MOLECULAR.....	37
2.7.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR (DM)	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material	39
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS OTIMIZADAS.....	39
4.2.2 SUPERFÍCIES DO MAPA DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO (MEP).....	40

4.2.3 DESIGN MISTURAS LIPÍDICAS.....	40
4.2.4 SELEÇÃO DA MISTURA LIPÍDICA.....	40
4.2.5 MODELO TRIDIMENSIONAL DA MISTURA LIPÍDICA.....	41
4.2.6 DOCAGEM MOLECULAR.....	42
4.2.7 DESIGN DO CLN	42
4.2.8 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DO CLN	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Estruturas otimizadas	44
5.2 Superfícies do mapa do potencial eletroestático	48
5.5 Modelo tridimensional da mistura lipídica	58
5.6 Incorporação do fármaco (Docking molecular)	60
5.7 Simulação de Dinâmica molecular (DM).....	62
5.8 Distribuição Radial (RDF)	74
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação controlada permitem a introdução de uma substância terapêutica, no organismo, melhorando a sua eficácia e segurança, devido a possibilidade de controlar a taxa, o tempo e o local de liberação do fármaco (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012). Os sistemas nanotecnológicos, principalmente nanopartículas lipídicas, são grandes atrativos para encapsulação de moléculas bioativas, pois apresentam alto grau de biocompatibilidade e versatilidade, além de seu tamanho reduzido que viabiliza a administração em diversas vias, em especial a via tópica, por isso são interessantes para fins farmacêuticos e cosméticos (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; DAS; NG; TAN, 2012).

As nanopartículas lipídicas são nanossistemas desenvolvidos para alcançar níveis mais elevados de biodisponibilidade, principalmente de compostos de baixa solubilidade em água (DAS; NG; TAN, 2012). Inicialmente foram desenvolvidas as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) com uma matriz lipofílica constituída de lipídeos sólidos, porém apresentavam uma encapsulação limitada de fármaco. Uma segunda geração foram os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), cuja matriz lipofílica é constituída por lipídeos sólidos e lipídeos líquidos o que gera imperfeições no ordenamento cristalino da matriz possibilitando maior encapsulação de fármacos e minimizando sua expulsão durante o armazenamento, que são as principais limitações da geração anterior de nanopartículas lipídicas (HOMMOSS, 2009; ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012; DAS; NG; TAN, 2012).

A maioria das formulações de CLN é estabilizada por meio de tensoativos ou por mistura de tensoativos, um hidrofílico e outro lipofílico, que reduzem a tensão interfacial do sistema, principalmente quando se deseja empregar métodos de preparação com alta energia. A mistura de tensoativos promove maior estabilidade à dispersão de nanopartículas em comparação ao uso de um tensoativo isolado (TAMJIDI et al., 2013), principalmente quando se deseja usar vários lipídeos. Os lipídeos da matriz lipofílica influenciam diretamente nas características mais relevantes de um CLN como a incorporação, a proteção e o perfil de liberação do fármaco encapsulado, por isso a seleção desses lipídeos deve ser criteriosa e bem específica, quanto à compatibilidade com o fármaco (HOMMOSS, 2009).

Diversos tipos de lipídios podem ser utilizados nas nanopartículas lipídicas, como triglicerídeos, ceramidas, ceras, ácidos e álcoois graxos, porém os produtos sintéticos estão sendo substituídos gradativamente por óleos e gorduras naturais, principalmente pela rica diversidade na composição química. Neste contexto, a biodiversidade amazônica vem recebendo destaque, principalmente na indústria farmacêutica e cosmética pela variedade de matérias-primas de origem natural e seus subprodutos como o cupuaçu, açaí, tucumã, buriti, andiroba, copaíba e outros com potencial aplicação para hidratantes, olés corporais, perfumes e uma variedade de formulações cosméticas e farmacêuticas (SOUTO et al., 2004; SEVERINO, 2012; TAMJIDI et al., 2013; BARBOSA, 2014).

A gordura de cupuaçu é um produto da biodiversidade amazônica, extraída das sementes. Estas sementes são subprodutos do processamento da polpa, e comumente eram dispensadas por não possuírem alto valor comercial na atividade do beneficiamento do fruto cupuaçu. No entanto, com a possibilidade crescente do uso da gordura no mercado farmacêutico, as indústrias e cooperativas de polpa começaram a beneficiar as sementes em maior quantidade. Portanto, o seu aproveitamento em formulações farmacêuticas é uma forma de valorizar e gerar renda, além de ser interessante estratégia para vencer o alto custo da logística (COHEN e JACKIX, 2009; MORAIS e GUTJAHR, 2009; TEIXEIRA, 2014).

A gordura do cupuaçu apresenta uma diversidade de compostos interessantes para aplicação tópica, tais como ácidos graxos saturados e insaturados como o ácido esteárico e oleico, aminoácidos e vitaminas, possui interessantes flavonoides como catequina, epicatequina e quercetina. Além de ser excelente emoliente, é um sólido macio e tem rápida fusão e absorção em contato com a pele. (DOS SANTOS et al., 2012; MORAIS e GUTJAHR, 2009; TEIXEIRA, 2014), e possui boa estabilidade quando associada a outros lipídeos como por exemplo a cera de carnaúba e o TACC, que juntos formam uma mistura sólida até a temperatura mínima de 40°C (SOUTO, 2013).

A gordura de cupuaçu já é bem aproveitada para o desenvolvimento de formulações cosméticas de nanossistemas (DOS SANTOS et al., 2012; SOUTO, 2013), no entanto em algumas associações pode apresentar limitações, como por exemplo liberação do fármaco em CLN (SOUTO, 2013), que demanda um estudo mais específico para a montagem desse sistema. Neste sentido, uma área promissora da pesquisa farmacêutica para a investigação é a modelagem molecular

e a simulação computacional. (MACHÁČKOVÁ; TOKARSKÝ; ČAPKOVÁ, 2013). A ascensão dessas tecnologias computacionais e o desenvolvimento de softwares sofisticados possibilitam investigar sistemas complexos, como sistemas CLN, de forma precisa e eficaz. Viabilizam também a redução da quantidade de testes experimentais preliminares e aumentam as possibilidades de direcionamento de estudo de composições promissoras, diminuindo o tempo na escolha da formulação ideal e os erros no planejamento do design experimental, assim como permitir a triagem de variáveis para prever as condições adequadas para mais experimentos. (RAMEZANPOUR et al., 2016).

As técnicas computacionais são importantes ferramentas para a otimização de sistemas já desenvolvidos, para o planejamento racional de novas formas farmacêuticas e para fornecer informações detalhadas de interações moleculares e outros fatores físico-químicos. (CARVALHO et al., 2003; SANT'ANNA, 2009; ANDRADE; TROSSINI; FERREIRA, 2010). Segundo a IUPAC, a modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação 3D (ANDRADE; TROSSINI; FERREIRA, 2010). Neste sentido, algumas técnicas da modelagem molecular têm dado grande contribuição como a docagem molecular, que envolve a busca de modos de interação entre duas moléculas, e a simulação de dinâmica molecular que através das propriedades de equilíbrio e dinâmica se conhece as interações dos sistemas moleculares (SHLICK, 2010; ROGNAN, 2011).

Neste trabalho, um modelo simulado de um carreador lipídico nanoestruturado foi proposto utilizando duas frações triglicerídicas da gordura de cupuaçu, a cera de carnaúba e o triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico como lipídeos, o tween 80® e o pluronic® como tensoativos e o cetoconazol como fármaco modelo. E através de softwares da modelagem molecular foi possível obter e visualizar as estruturas tridimensionais, estudar as propriedades moleculares e eletrostáticas e elucidar as interações com o fármaco e o comportamento dinâmico das moléculas. Os resultados deste estudo podem ser utilizados como suporte para direcionar o desenvolvimento futuro de formulações de CLN, antecipando os testes experimentais e auxiliando na obtenção de formulações prósperas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanotecnologia e sistemas de liberação controlada

O estudo da nanotecnologia teve seu marco inicial em 1959 quando o físico americano Richard Feynman afirmou que seria possível obter estruturas de dimensões manométricas e consequentemente a construção de materiais inexistentes na natureza. Com o avanço da microscopia eletrônica na década de 80, a previsão de Feynman tornou-se realidade e possibilitou análises mais minuciosas. Em 1992, Eric Drexler publicou sua tese de doutorado intitulada "*Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation*", que impulsionou a nanotecnologia na comunidade científica (DE MELO e PIMENTA, 2004; FAHNING e LOBÃO, 2011; MARTINS, 2009).

A nanotecnologia é uma inovação com potencial aplicação em diversas áreas do conhecimento, não possui uma tecnologia específica e sim interdisciplinar baseada na física, química, biologia, engenharias, computação e medicina, permitindo que vários campos façam seu uso. No Brasil, estudos relacionados à nanotecnologia vêm sendo incentivados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) desde 2001 com a criação de redes de pesquisa em Nanociência e Nanotecnologia, no entanto ainda caracteriza-se como um país em estágio intermediário de desenvolvimento tecnológico (FAHNING e LOBÃO, 2011; SANT'ANNA, ALENCAR e FERREIRA, 2013).

A indústria farmacêutica, fazendo uso das inovações tecnológicas utiliza a nanotecnologia e os nanomateriais para desenvolver sistemas de liberação controlada que são aqueles que têm como objetivo fornecer uma dose terapêutica de um fármaco para um local do corpo predeterminado, e manter a concentração desejada, de modo controlado em velocidade e tempo apropriado e evitar, a níveis plasmáticos, a problemática da toxicidade e/ou doses tóxicas. Desta forma, esse sistema permite que seja liberado gradativamente, a um ritmo ditado pelas necessidades do corpo, por um período específico de tratamento (ANSEL, POPOVICH e ALLEN JR., 2000; AZEVEDO, 2005; GENNARO, 2004).

Na linha do tempo dos sistemas de liberação dos fármacos (Figura 1) podemos observar os períodos em que foram criados os primeiros sistemas, que

continham ceras e polímeros hidrofóbicos. O ano de 1960 destaca-se pelo desenvolvimento da microencapsulação e pela criação dos lipossomas, que foram os primeiros sistemas de liberação de fármacos de base nanotecnológica, contendo camadas de fosfolipídeos, cujo núcleo é ideal para o carregamento de substâncias hidrofílicas, enquanto suas camadas lipídicas permitem substâncias lipofílicas e anfifílicas. Os anos seguintes aos de 1990 foram considerados os da “era moderna da tecnologia de liberação controlada” o qual se buscaram a otimização dos fármacos, e período em que se desenvolveram as nanopartículas lipídicas (GENNARO, 2004; MÜLLER et al., 2007; GASCO, 2007).

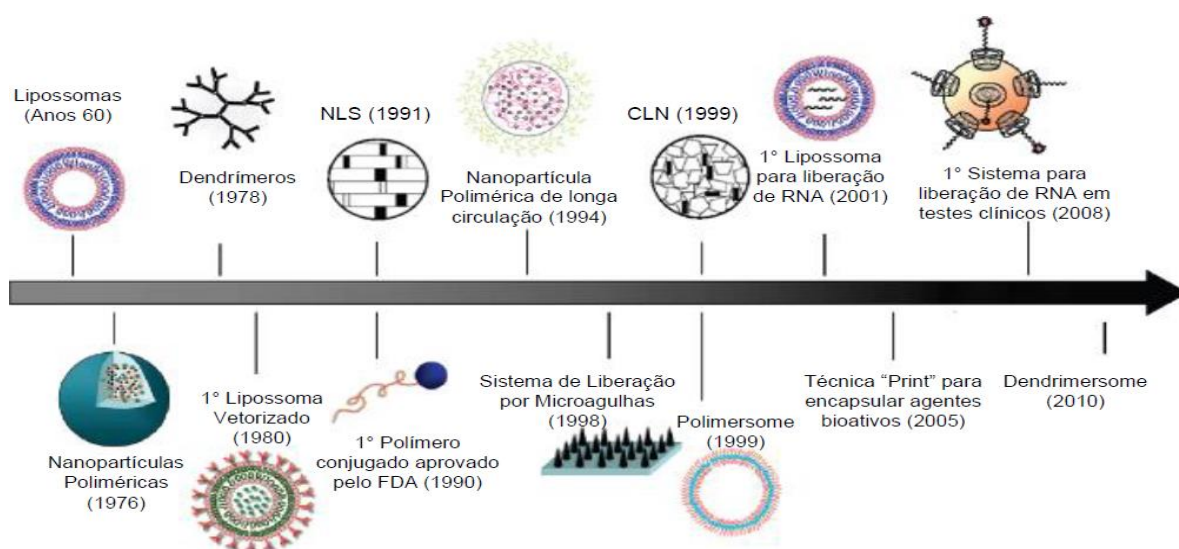


Figura 1. Linha do tempo de alguns sistemas de liberação nanoestruturados.

Fonte: SOUTO, 2013.

Desde então, na tentativa de aperfeiçoar o tratamento de diversas doenças, uma grande variedade de nanomateriais, tem sido investigada como veículos de agentes terapêuticos. Atualmente a nanotecnologia é uma das áreas mais inovadoras e perspectivas na medicina. A crescente demanda por alcançar níveis mais elevados de biodisponibilidade de moléculas "difíceis", resultou na introdução de novas tecnologias. Diferentes tipos de nanopartículas são desenvolvidos e muitas atraem a atenção comercial pelos seus benefícios para a saúde e pela otimização do efeito dos cosméticos na pele. Entre estes, destacam-se as nanopartículas lipídicas principalmente pela boa compatibilidade com a pele e um bom veículo para carrear fármacos lipofílicos (SHI et al., 2010; DOMINGO e SAURINA, 2012).

A utilização de nanossistemas tem como principais vantagens: a proteção do fármaco contra possíveis instabilidades no organismo e decomposição dos sensíveis, promovendo manutenção a níveis plasmáticos em concentração constante, a liberação progressiva e controlada do fármaco de acordo com o meio, a possibilidade de direcionamento a alvos específicos, a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos, a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e o aumento da adesão à terapia. Porém, algumas restrições que merecem destaque são devido à possibilidade de toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e o elevado custo de obtenção dos nanossistemas comparados às formulações convencionais (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002a; DAS, NG e TAN, 2012).

2.1.1 NANOPARTICULAS LIPIDICAS: NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

As nanopartículas lipídicas são carreadores coloidais cuja matriz lipídica consiste em uma mistura de lipídios sólidos ou de lipídios sólidos e líquidos. E combinam as vantagens dos sistemas de liberação tradicionais e superam as principais desvantagens dos mesmos, como o potencial de ser explorada para administração em diversas vias, a instabilidade física quando incorporado o fármaco o que é observado nas emulsões, a citotoxicidade e a inadequação de um método para produção em larga escala como alguns sistemas poliméricos apresentam. E este é um importante pré-requisito para a introdução no mercado farmacêutico, a possibilidade de produção de grande escala utilizando um método rentável e desenvolvendo produtos com uma qualidade aceitável pelas autoridades reguladoras (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; GUIMARÃES e RÉ, 2011).

A administração dérmica é uma via de intensa investigação, uma vez que a pele é uma estrutura complexa com a alternância de camadas hidrofílicas e lipofílicas difícil de superar, o que configura a principal vantagem das nanopartículas lipídicas frente a outras formas farmacêuticas, o tamanho reduzido. Como observado na Figura 2, um tamanho menor permite uma maior concentração de ativo e consequentemente uma maior biodisponibilidade, assim como promove rápida penetração e absorção e maior efeito oclusivo (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002a; KÜCHLER et al., 2009; TZACHEV e SVILENOV, 2013).

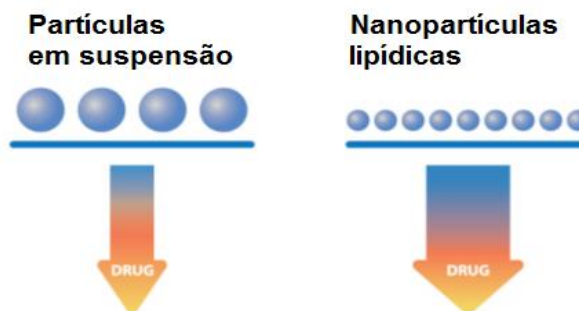


Figura 2: Exemplo de distribuição de partículas suspensas e nanopartículas lipídicas..
Fonte: TZACHEV e SVILENOV, 2013.

As nanopartículas lipídicas são divididas basicamente em dois tipos (Figura 3): nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Desenvolvidas em 1991, as NLS foram à primeira geração e são semelhantes às emulsões do tipo óleo/água, com diferença na fase interna que é composta de por lipídeo sólido à temperatura ambiente. Em 1999, os CLN foram introduzidos como uma segunda geração, com o intuito de minimizar as principais limitações das NLS, estes apresentam a matriz lipídica composta pela mistura de lipídeo sólido e lipídeo líquido, formando uma matriz homogênea e sólida a temperatura mínima de 40°C, para garantir que não ocorra a fusão dos lipídeos em temperatura ambiente e corporal (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002a; GUIMARÃES e RÉ, 2011; MEHANNA, MOTAWAA e SAMAHA, 2012).

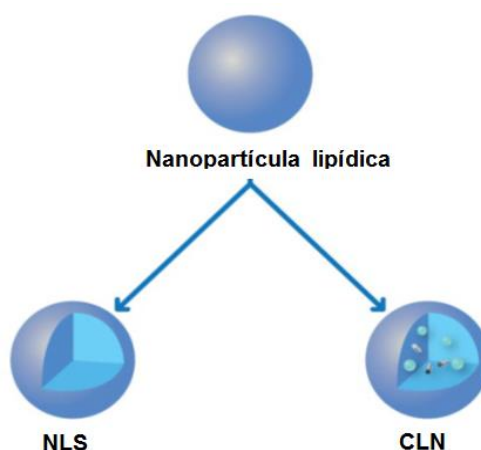


Figura 3. Dois tipos básicos de nanopartículas lipídicas. .
Fonte: TZACHEV e SVILENOV, 2013.

Os CLN apresentam uma matriz lipídica menos ordenada, isto devido à mistura de um lipídeo sólido com o lipídeo líquido, gerando imperfeições e

aglomerados amorfos (Figura 4), e consequentemente maiores quantidade de espaços para encapsular o ativo, superando a maior limitação das NLS que é a capacidade de carga limitada, uma vez que forma uma matriz de alta organização cristalina (Figura 4) e, por conseguinte a expulsão do fármaco em curto espaço de tempo, o que é minimizado nos CLN e por isso têm maior estabilidade durante o armazenamento; Os CLN superam ainda a problemática da utilização de grandes quantidades de água nas dispersões dos NLS (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002b; JOSHI e PATRAVALE, 2008; PARDEIKE, HOMMOSS e MÜLLER, 2009; OBEIDAT et al., 2010). A composição da matriz lipídica é o fator principal para a diferenciação do CLN e NLS.

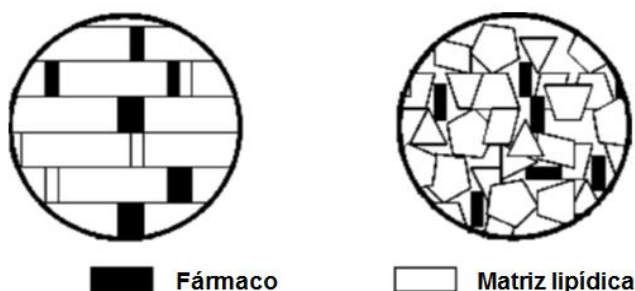


Figura 4. Formação de uma estrutura cristalina quase perfeita da NLS (à esquerda) e de uma estrutura com muitas imperfeições do CLN (à direita), ilustrando as respectivas matrizes lipídicas formadas nas nanopartículas.

Fonte: PARDEIKE, HOMMOSS e MÜELLER, 2009.

A composição da matriz lipídica é determinante para a estabilidade da nanopartícula carregada, já que tem a função principal de proteger o fármaco uma vez incorporado e também de liberar no local de ação desejado. Deste modo, a seleção dos componentes da mistura a ser utilizada é determinante para o êxito da formulação, principalmente, quanto às características físico-químicas que influenciam na estabilidade da preparação, na eficiência de incorporação, na proteção contra degradação de fármacos sensíveis a agentes externos (oxidação, hidrólise) e na liberação (KUMAR e RANDHAWA, 2013; TAMJIDI et al., 2013; HU et al., 2014).

Algumas questões devem ser avaliadas para a seleção dos componentes da mistura lipídica a ser utilizada na preparação de CLN, como a solubilidade do fármaco nos lipídios misturados, tamanho e conformação das cadeias lipídicas, biodegradabilidade e biocompatibilidade. É interessante buscar os lipídios sólidos e líquidos com tamanhos e conformações de cadeias lipídicas com natureza mais

heterogênea possível entre si com o objetivo de obter uma mistura com menor ordenamento cristalino (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002b; TAMJIDI et al., 2013).

A afinidade do fármaco pela matriz lipídica está intrinsicamente relacionada com a eficiência de incorporação do fármaco, bem com a capacidade de liberação e entrega. A proporção de lipídeos na mistura deve ser avaliada, pois elevadas concentrações de lipídeo líquido podem provocar saturação, causando um extravasamento do lipídeo líquido, e diminuição da temperatura de fusão da mistura para $\leq 40^{\circ}\text{C}$, o que não seria ideal para formular um CLN. Porém uma baixa concentração de lipídeo líquido e consequente elevação dos sólidos poderia levar a estrutura de maior cristalinidade, Dificultando a expulsão do ativo. Experimentos com análise térmica por DSC podem ser usados para estimar a cristalinidade da mistura (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002b; KASONGO et al., 2011).

A matriz lipídica pode ser formada por lipídeos naturais ou sintéticos biodegradáveis, podendo alcançar a concentração de até 40% na formulação. Acilgliceróis, ácidos e álcoois graxos, ceras, óleos e gorduras vegetais, estão entre os lipídeos mais utilizados. A Tabela 1 apresenta exemplos de alguns lipídeos sólidos e líquidos utilizados na obtenção de nanopartículas lipídicas nos últimos anos (DOS SANTOS et al., 2012).

Tabela 1. Exemplos de lipídeos sólidos e líquidos utilizados em nanopartículas lipídicas.

	Lipídeos	Referência
Sólidos	Álcool cetílico	Sanna; Caria; Mariani, 2010
	Ácido esteárico	Araujo et al., 2011; Fang; Saleh; Fang, 2013
	Ácido palmítico	Araujo et al., 2011
	Cera de carnaúba	Kheradmandnia et al., 2010
	Cera de abelha	Kheradmandnia et al., 2010
	Gordura de leite de cabra	Nnamani et al., 2014
	Manteiga de cupuaçu	Dos Santos et al., 2012
	Manteiga de cacau	Tan et al., 2010
Líquidos	Óleo de pinheiro	Averina et al., 2010
	Ácido oleico	Fang; Saleh; Fang, 2013
	Óleo de palma	Yang et al., 2014
	Óleo de castanha	Dos Santos et al., 2012
	Óleo de Argan	Hommos, 2009
	Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico	Zheng et al., 2013

Atualmente, os lipídeos naturais são comumente utilizados pela variedade de triglicerídeos e ácidos graxos que apresentam, pelas propriedades antioxidantes, emolientes, emulsificantes e hidratantes, por possuírem composição semelhante aos lipídeos naturalmente encontrados na pele humana e por serem fisiologicamente compatíveis com menor risco de toxicidade e por isso são altamente atrativos para uso em cosméticos (MEHNERT e MÄDER, 2001; PATIDAR et al., 2010; ATTAMA, MOMOH e BUILDERS, 2012).

2.2 Gordura de cupuaçu

O Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma das mais importantes árvores frutíferas da Amazônia brasileira e concentra sua maior produção nos estados do Pará e Maranhão. Seu cultivo desponta como uma das mais promissoras culturas para exploração comercial, tanto nacional como internacional, com grande potencial para o aproveitamento industrial. Seu fruto, o cupuaçu (Figura 5a), tem dimensões aproximadas de 12 a 15cm de comprimento e 10 a 12cm de diâmetro, peso médio de 1kg, 30% de polpa e em torno de 35 sementes (LANNES, MEDEIROS e GIOIELLI, 2004; COHEN e JACKIX, 2009).

As sementes (Figura 5b) constituem cerca de 20% em peso do fruto, com um teor elevado de gordura (cerca de 60%) e características químicas e botânicas que se assemelham aos da manteiga de cacau e com potenciais aplicações nas indústrias de cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentares. Apesar desde percentual, as sementes são consideradas produtos secundários, resíduos de atividade sendo praticamente descartadas durante o beneficiamento do fruto (DE AZEVEDO, KOPCAK e MOHAMED, 2003; CARVALHO, 2004).

A gordura de cupuaçu (Figura 5c) é extraída das sementes por processos físicos de prensagem hidráulica, para garantir a pureza e qualidade do produto final. Apresenta uma composição equilibrada de ácidos graxos saturados e insaturados, o que confere ao produto um baixo ponto de fusão e aspecto de um sólido macio que se funde rapidamente ao entrar em contato com a pele. O ácido graxo oleico, o esteárico, o palmítico e o araquídico, estão em maior quantidade totalizando mais de 90% da composição graxa, com a predominância do monoinsaturado oleico (cerca de 40%), que pode ser a causa da maciez. É composta basicamente de triglicerídeos e nessa fração a maior parte é do tipo SUS (Saturado, insaturado,

saturado) (GILABERT-ESCRIVÁ et al., 2002; COHEN e JACKIX, 2005; RUSCHEINSKY, 2005; QUAIST, 2008; MORAIS e GUTJAHR, 2009).

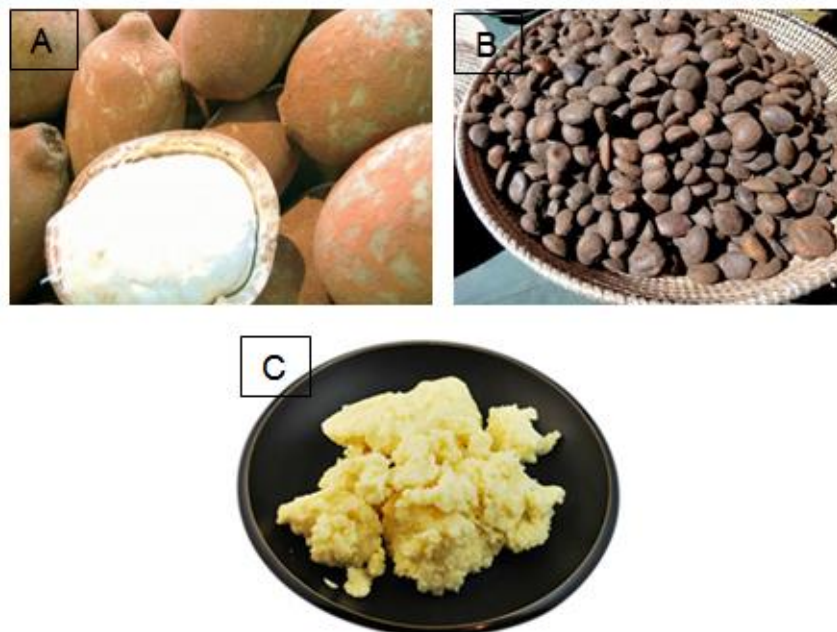


Figura 5. Cupuaçu com polpa (A), sementes (B) e gordura (C).

Fonte: www.suframa.com.br

Excelente emoliente, esta gordura possui alto poder de absorção de água, aproximadamente 240%, superior à da Lanolina atuando como seu substituto vegetal e com capacidade de auxiliar na estabilidade das emulsões. Contém fitoesteróis (especialmente beta-sitosterol) que atuam a nível celular regulando o equilíbrio hídrico e a atividade dos lipídeos da camada superficial da pele. O seu poder de absorção de água pode ser atribuído às pontes de hidrogênio formadas entre as moléculas de água e os fitoesteróis. Os fitoesteróis têm sido utilizados no tratamento de dermatites e afecções por estimular o processo de cicatrização e por isso esta gordura é comumente usada como calmante para irritações da pele como eczemas e dermatites (BOOCK, 2007; MORAIS e GUTJAHR, 2009; QUAIST, LUCAS e KIECKBUSCH, 2011; TEIXEIRA, 2014).

Neste trabalho, a gordura de cupuaçu representa o lipídeo sólido que constitui a matriz lipídica. O fato de apresentar uma temperatura de fusão relativamente baixa e próxima da temperatura corporal faz com que seja necessário o uso de um lipídeo sólido adicional (como a cera de carnaúba) para elevar a temperatura de fusão, que

em concentração adequada, vai viabilizar seu uso para formulações de nanocarreadores.

2.3 Cera de Carnaúba

A cera de carnaúba é um lipídeo sólido usado em formulações tópicas (Figura 6b) e é extraída das folhas da carnaubeira (*Copernicia prunifera*), uma palmeira brasileira que cresce principalmente na região nordeste (Figura 6a). A cera é obtida a partir do pó cerífero extraído das folhas, que é aquecido em um processo industrial de produção de cera seguido de várias etapas, com um produto final com quatro tipos (I, II, III e IV), que variam com a origem do pó cerífero e uma etapa de clarificação adicional (CARVALHO e GOMES, 2008; LACERDA, 2009).

Possui diversas aplicações industriais principalmente alimentícias, cosméticas e farmacêuticas por isso é o principal produto de interesse econômico da carnaubeira. No mercado é possível encontrar na composição de cera para piso, cera para automóveis, desmoldantes, na fabricação de doces e remédios, ceras para conservação de frutas, ceras para madeiras, ceras para processos de fundição, entre outras. Outra característica importante relatada é a fotoproteção, pois sua composição é rica em cinamatos, que em associação com protetores solares inorgânicos, resulta em uma dispersão estável e adequada para filtros solares contra raios UV (LACERDA, 2009; BALOGH, VELASCO e PEDRIALI, 2011; LACATUSU et al., 2014).

A cera de carnaúba é uma mistura complexa de ésteres de alto peso molecular de ácidos e álcoois. A porção ácida dos ésteres é uma mistura de ácidos graxos, e a de álcool é composta por álcoois simples de cadeia longa. Apresenta ponto de fusão entre 81 e 86°C e a cera natural com maior dureza e ponto de fusão, no entanto, proporciona baixa viscosidade quando fundida (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2009).



Figura 6. Carnaubeira (A) e a cera extraída das folhas (B).
Fonte: www.projetofeira3e.blogspot.com

2.4 Triacilglicerol de Ácido Cáprico e Caprílico (TAC)

O TAC é uma mistura de triglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia média, principalmente os ácidos cáprico (C10:0) e caprílico (C8:0). É um óleo incolor ou ligeiramente amarelado, inodoro e insípido que são produzidos a partir de óleos vegetais láuricos, tais como óleo de coco e de palmiste, por hidrólise seguida de fracionamento e destilação fracionada dos ácidos graxos livres e posterior reesterificação com glicerol, formando o TAC (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2009).

A estrutura química do TAC resulta em propriedades funcionais que são diferentes das propriedades dos óleos e gorduras convencionais e pode ser usado como um excelente substituto. Apresenta alta estabilidade oxidativa a temperatura elevada sendo também estável a temperatura menor que 0°C, maior solubilidade em água, baixa viscosidade, tem uma emoliência particularmente fina, altamente compatível com a pele, melhor espalhabilidade na pele, boa capacidade solvente e penetração cutânea, propriedades emulsificantes e cosméticas e boa compatibilidade. E por isso são usados em formulações orais, parentais e principalmente tópicas como cremes e loções base (uso farmacêutico e cosmético) hidratantes faciais e corporais para todos os tipos de pele, emulsões e outras (D'AGOSTINI, 2001; LI et al., 2015).

Neste trabalho, o TAC representa o lipídio líquido que é comumente usado em formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (ZHENG et al., 2013), visando principalmente a formação de matrizes lipídicas sólidas de menor ordenamento cristalino e com maior capacidade de encapsulamento de fármaco.

2.5 Tensoativos

A maioria das formulações de nanopartículas lipídicas são estabilizadas por meio de tensoativos, ou por combinação de tensoativos (ZHENG et al., 2013). Geralmente uma emulsão é composta por dois tensoativos, um hidrofílico e outro lipofílico, para aumentar a estabilidade, a dispersão de nanopartículas e impedir a coalescência da fase oleosa (MEHNERT; MÄDER, 2001; TAMJIDI et al., 2013).

Os tensoativos não iônicos, por não possuírem carga verdadeira, formam gotículas que não apresentam dupla camada elétrica. A estabilização das emulsões e dispersões com tensoativos não iônicos ocorre pelo impedimento estérico de suas moléculas, que apresentam partes polares normalmente muito longas. Normalmente, a melhor estabilização de uma emulsão se dá pelo uso dos dois efeitos de estabilização (eletrostático e estérico) conjuntamente, por causa disso é muito comum a utilização de misturas de tensoativos (DALVIN, 2011).

Os CLNs preparados com este tipo tensoativo possuem resistência a mudanças de pH e concentração de eletrólitos. Além de apresentar menor possibilidade de toxicidade e potencial de irritação, quando comparados com tensoativos iônicos (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012; TAMJIDI et al., 2013). Os tensoativos mais utilizados são: os Tweens, como o tween 80[®], e os Poloxamers, como poloxamer 188[®] ou pluronic[®] (MEHNERT; MÄDER, 2001).

2.5.1 TWEEN 80

O Polissorbato 80 ou Tween 80 (nome comercial) é um tensoativo não iônico sintético derivado de uma mistura parcial de ésteres de ácidos graxos, principalmente ácido oleico, com sorbitol e seus anidridos etoxilados com aproximadamente 20 moles de óxido de etileno para cada mol de sorbitol e anidrido de sorbitol, por isso é o monooleato de sorbitano polioxietileno 20 (THOMPSON e DAVIDOW, 2013). Sua porção hidrofílica consiste nos grupamentos hidroxílicos livres e óxidos de etileno e a parte lipofílica apresenta longas cadeias de ácidos e álcoois graxos. Os tensoativos não iônicos, em geral, são compostos neutros estáveis em uma ampla faixa de pH, são relativamente insensíveis à presença de alta concentração de eletrólitos, são estáveis ao aquecimento e podem ser misturados em várias proporções para formar tanto emulsões O/A quanto A/O. O

tween 80[®] é muito utilizado no preparo de formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, com funções solubilizante, emulsificante e estabilizante (KERWIN, 2008; ZHANG et al., 2012; THOMPSON e DAVIDOW, 2013).

2.5.2 PLURONIC

Poloxamer ou Pluronic (nome comercial) pertence a um grupo de tensoativos não iônicos com propriedades de detergência, dispersão, formação de espuma, solubilização, emulsificação e estabilização de emulsões, e ainda atua como intensificador de absorção da formulação por isso é considerado “excipiente funcional” (PATEL, PATEL e PATEL, 2009). Os poloxâmeros são caracterizados pela presença de copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, onde o segmento polioxietileno é hidrofílico e o segmento polioxipropileno é hidrofóbico. Todos os poloxâmeros são similares em composição, diferindo apenas na quantidade relativa de óxidos de propileno e etileno. (PATEL, PATEL e PATEL, 2009; ROWE; SHESKEY e OWEN, 2009). Apresenta vantagens como: estabilidade à altas temperaturas, baixa toxicidade e concede boa estabilidade a formulações de CLN, evitando a agregação das nanopartículas (HAN et al., 2008; TAMJIDI et al., 2013).

2.6 Cetoconazol

O cetoconazol foi o primeiro composto imidazólico disponível para o tratamento de micoses. Foi sintetizado em 1979, com amplo espectro de ação antifúngica e alguma atividade antibacteriana, utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e tópicas (GHANNOUM e RICE, 1999; RANG, DALE e RITTER, 2011). É um fármaco lipofílico e seu nome químico é *cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazolil-metil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, segundo a Farmacopéia Européia 5.0 de 2005 é um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, ligeiramente insolúvel em álcool e solúvel em metanol e cloreto de metileno, com ponto de fusão entre 148 a 152°C e peso molecular de 551,43 g/mol.

O cetoconazol contém dois centros quirais na sua molécula, portanto, ele pode formar quatro enantiômeros (2R,4S), (2S,4R), (2R,4R) e (2S,4S), conforme observado na figura 7. Porém, o cetoconazol terapeuticamente utilizado é uma

mistura racêmica constituída por dois enantiômeros *cis*, (2R, 4S)-(+)-CET e (2S, 4R)-(-)-CET (NOVOTNÁ, et al. 2014). Considerando o uso frequente de cetoconazol, sua estrutura quiral e numerosas interações medicamentosas, é importante estudar as interações enantioespecíficas, principalmente por que enantiômeros individuais do fármaco podem exibir comportamento cinético e dinâmico diferente. Estudos de atividades antifúngicas de *cis* enantiômeros de cetoconazol contra sete cepas de *Candida spp.* (NOVOTNÁ, et al. 2014) demonstraram que para cinco cepas o (2S, 4R) -(-)-CET foi cerca de sete vezes mais potente do que (2R, 4S) -(+)-CET, por isso parece ser um inibidor mais potente para as cepas testadas. Neste trabalho o enantiômero escolhido para ser representativo do cetoconazol no CLN foi o (2S, 4R) -(-)-CET.

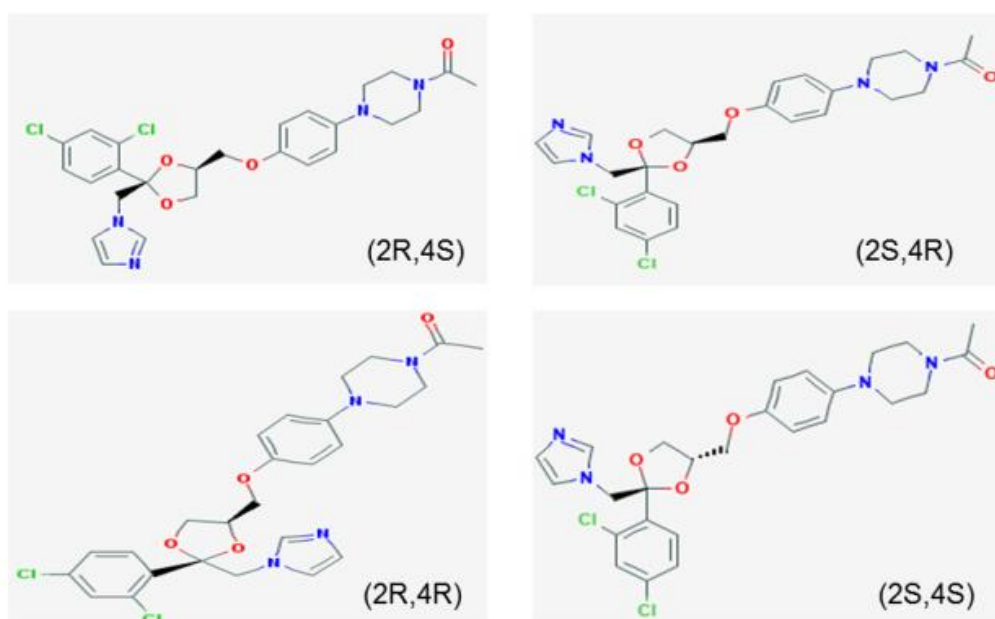


Figura 7. Enantiômeros do Cetoconazol.

Fonte: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

A aplicação tópica é considerada um excelente método de administração de agentes antifúngicos, do ponto de vista de segurança, sendo que sua eficácia terapêutica irá depender de sua concentração no sítio infectado. Um agente tópico ideal para infecções fúngicas superficiais deve ter um amplo espectro de atividade, ser eficaz em baixas concentrações, possibilitar esquemas de dosagem convenientes, ser bem tolerado, não ser sensibilizante, proporcionar altas taxas de

cura e baixa incidência de recidivas (PERARO, 2001; KUMAR, MURALIDHARAN e PARASURAMAN, 2014).

Várias formas farmacêuticas estão disponíveis no mercado, principalmente para o uso tópico (figura 8), porém comumente são relatadas reações adversas acentuadas como irritação, coceira, ardência, eritema, esfoliação e ressecamento da pele. Segundo as bulas dos medicamentos a posologia para uso tópico é de pelo menos quatro semanas dependendo do tipo de infecção. Deste modo, seu encapsulamento em CLN é uma estratégia importante para aumentar a biodisponibilidade do cetoconazol, diminuir a duração do tratamento e minimizar os efeitos adversos desagradáveis.



Figura 8. Algumas formas farmacêuticas do cetoconazol para uso tópico.
Fonte: www.google.com

2.7 Métodos computacionais e a modelagem molecular

Visando reduzir não somente os custos, mas também o tempo envolvido no processo, a ciência está constantemente investindo em novas tecnologias para melhorar a qualidade de compostos candidatos a fármacos. Paralelamente, avanços da biologia molecular, biologia estrutural e de técnicas de modelagem e simulação de sistemas via computador, tornaram mais fácil a obtenção de dados estruturais com alta resolução para muitos complexos macromolécula/ligante importantes, tornando o planejamento de novos medicamentos mais racional (LYNE, 2002; BLEICHER et al., 2003; BATTISTI, 2011).

A modelagem molecular se desenvolve por meio do uso de modelos que possam quantificar e compreender determinados fenômenos. É uma área de conhecimento interdisciplinar, que trata da aplicação de modelos matemáticos para análise, entendimento e estudo de problemas científicos complexos, mediante a elaboração de códigos computacionais que descrevam os sistemas que se pretende estudar. Simulações precisas das propriedades dos sólidos e moléculas reais requerem uma excelente representação dos componentes de tais sistemas para que as predições possam ser feitas com razoável nível de confiabilidade (CARVALHO et al., 2003; SILVA, 2013).

Atualmente tem-se a aplicação de vários métodos de cálculos computacionais com diferentes fundamentos e níveis de teoria, como os métodos empíricos e semi-empíricos, o método *ab initio* e os métodos fundamentados na mecânica molecular (MORGON, 2001; SANT'ANNA, 2009).

Os métodos semi-empíricos se utilizam de resultados experimentais para a obtenção de parâmetros, ou seja, combinam a física teórica com experimentos. Iniciam a resolução da equação de Schrödinger e então introduzem algumas hipóteses visando aumentar a velocidade dos cálculos (BERGER, 2004). Os métodos *ab initio* se fundamentam da mecânica quântica, são puramente teóricos, que resolvem com maior aproximação a equação de Schrödinger.

A análise de qualquer sistema eletrônico tem sempre como ponto inicial a equação de Schrödinger (eq.1), essa equação mescla os princípios de Hamilton com a dualidade onda-partícula.

$$H\psi = E\psi \quad (\text{Eq.1})$$

Ψ é a função de onda que descreve o comportamento do sistema, E é o valor da energia que o sistema fornece quando o operador H é aplicado sobre a função de onda que descreve o sistema. H é o operador *Hamiltoniano* e contém os termos referentes ao movimento e interação das partículas do sistema (LEACH, 2001). Dentre os métodos *ab initio*, os mais usados são o Hartree-Fock (HF) e a Teoria do funcional de densidade (TFD). O Hartree-Fock é um método auto consistente ou SCF (*Self consistent field*) para a solução numérica da equação de Schrödinger, que relaciona a interação do elétron com o núcleo. A resolução do HF consiste em partir

de uma função de onda tentativa, submete-la ao operador de Fock, comparar a função de onda emergente com a anterior e testar a convergência da resposta. Essa função de onda tentativa consiste em um determinante de Slater (FREITAS, 2010).

O método TFD (*Density Functional theory*) utiliza as propriedades de densidade eletrônica da molécula, uma característica física de todas as moléculas, que é utilizada para descrever a complicada física por de trás das interações entre os elétrons, e, portanto, determinar exatamente tudo sobre o sistema (COHEN, MORI-SÁNCHEZ e YANG, 2012). Um funcional é definido como uma função da função, e a energia da molécula é o funcional da densidade eletrônica. Ao contrário da função de onda, que se torna significativamente mais complicada à medida que o número de elétrons aumenta, a determinação da densidade eletrônica é independente do número de elétrons (SHOLL e STECKEL, 2009).

Existem aproximadamente três tipos, ou categorias, de métodos funcionais de densidade. Os métodos de aproximação da densidade local (LDA), de Gradiente conjugado (GC) e os métodos híbridos. Os métodos híbridos são os métodos mais utilizados, principalmente o B3LYP, que é um funcional híbrido que contém em sua formulação, funcionais GGA (*Generalized Gradient Approximation*) de troca e correlação e que inclui uma contribuição vinda do método HF (MUSSO, UGLIENGO e SODUPE, 2011; HUANG e LEE, 2012; JIMENEZ-IZAL et al., 2012; NAZARPARVAR, ZAHEDI e KLEIN, 2012). Ele foi desenvolvido por Becke (indicado pela letra B), e um termo de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr (sigla LYP) e ainda possui três parâmetros empíricos escolhidos para otimizar sua performance (indicado pelo número 3). Também se utilizam de funções de base para descrever o termo radial de uma função de onda e fornecer ao método de cálculo os orbitais atômicos ideais para se realizar os cálculos (SHOLL e STECKEL, 2009; COHEN, MORI-SÁNCHEZ e YANG, 2012).

Existem dois tipos de funções de base, funções tipo Slater (STF) e funções tipo Gaussianas (GTF), originadas do princípio variacional, da aproximação de Born-Oppenheimer e da intuição química. Dentre as do tipo GFT tem-se a 6-31G(d,p) com duas funções de base (uma com três 3 primitivas e uma com 1 função primitiva) e polarização nos orbitais (d,p) (PEREIRA, 2008). Produzem melhores respostas em baixo tempo computacional por isso é uma boa escolha para sistemas com moléculas orgânicas (SHOLL e STECKEL, 2009; COHEN, MORI-SÁNCHEZ e YANG, 2012).

Os métodos TFD estão em vários pacotes de software, incluindo Gaussian, Gamess, HyperChem e Spartan. A vantagem mais significativa para os métodos TFD é um aumento significativo na precisão computacional sem o aumento adicional no tempo de computação (SHOLL e STECKEL, 2009).

Para sistemas de maior complexidade ou demasiadamente grandes para serem abordados pela mecânica quântica ou por métodos semiempíricos, utilizam-se métodos baseados na mecânica molecular (REBOREDO, 2012). Cálculos de mecânica molecular utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de Born-Oppenheimer, cujo formalismo matemático está baseado em um modelo de mecânica clássica de estrutura molecular (COELHO et al., 1999). Apresenta como principal vantagem a rapidez na avaliação de sistemas complexos, através da dinâmica do sistema aplicando as leis da mecânica newtoniana (MORGON, 2001).

O modelo da mecânica molecular considera as moléculas como uma coleção de átomos ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas. Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial (U) das contribuições estruturais, comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos diedros (φ) e interações não ligadas (d). O conjunto destas funções é conhecido como campo de força empírico. O campo de força representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas (Eq.2) (COELHO et al., 1999).

$$U = \sum U(r) + \sum U(\theta) + \sum U(\varphi) + \sum U(d) + \dots \quad (\text{Eq.2})$$

A superfície de Born-Oppenheimer, conhecida na mecânica molecular como superfície de energia potencial, é multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares. Esta superfície possui mínimos locais em relação a uma ou algumas conformações moleculares estáveis e, em uma primeira aproximação, a molécula é descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície potencial (COELHO et al., 1999; MORGON, 2001; REBOREDO, 2012).

2.7.1 ESTUDO COMPUTACIONAL DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA OU DDS (*Drug Delivery System*)

A modelagem computacional é uma excelente ferramenta para a elucidação das propriedades estruturais e dinâmicas de biomoléculas, principalmente sistemas de liberação de fármacos, e para o detalhamento em níveis atomísticos e/ou moleculares (KARPLUS; MCCAMMON, 2002). As simulações computacionais podem ser usadas para diversas abordagens para DDS's, como por exemplo, montagem do sistema, características estruturais e dinâmicas dos agregados formados, aspectos relacionados ao fármaco, e estabilidade e atuação dos DDS's nos alvos. Ainda pode ser usada para simular mudanças de condições ambientais, como pH, temperatura, concentração dos solutos, campos magnéticos externos, interações com outras biomoléculas e outras variáveis que podem afetar a eficiência do DDS. (RAMEZANPOUR et al., 2016). Na tabela 2, podem-se observar algumas variáveis que podem ser estudadas por simulação computacional.

Tabela 2. Questões relevantes para o design do sistema de liberação de drogas que podem ser respondidas por simulação computacional.

Etapas do DDS	Propriedades de interesse
Caracterização físico-química	Organização dos componentes (<i>Self-assembly</i>) Estrutura e dinâmica do complexo droga-DDS Carregamento da droga Distribuição da droga Interações DDS-droga Funcionalização Liberação da droga Agregação
Circulação	Interação com biomoléculas Estabilidade Interação com íons
Membrana-Célula	Interação com membrana Internalização celular Interação com proteínas de membrana
Intracellular	Dissociação drug-DDS Liberação da droga para o endossomo Interação com moléculas endógenas Translocação de núcleos

Fonte: Ramezanpour et al. (2016).

Diferentes tipos de DDS já foram estudados por simulação computacional, como os dendrímeros (ZHANG et al., 2014), os de base polimérica (GUO, QIU e

ZHOU, 2013), a base de peptídeos e ácidos nucleicos (TODOROVA et al., 2014), base de carbono (LAI e BARNARD, 2015), nanopartículas de ouro (BRANCOLINI et al., 2012) e os de base lipídica (SHINODA, DEVANE e KLEIN, 2012; MESSINA, BESADA-PORTO e RUSSO, 2014; RANJETH e ANUSUYA, 2015;). Recentemente os DDS de base lipídica, como lipossomas, micelas e nanopartículas lipídicas, têm atraído muita atenção, devido não somente a capacidade de encapsular e transportar fármacos e biomoléculas, mas também pela versatilidade das suas estruturas nas composições (RAMEZANPOUR et al., 2016).

Jämbeck et al. (2014) desenvolveram um sistema lipossoma carregado com um antitumoral fotoativo, hipericina, na tentativa de aumentar a acumulação do fármaco no local de aplicação, utilizando campo de força Martini. Propuseram um modelo atômico detalhado utilizando lipossomas DPPC, onde foi possível avaliar a distribuição e orientação do fármaco e explorar o impacto de sua introdução em um lipossoma em relação à estabilidade da molécula.

Ranjeth e Anusuya (2015) desenvolveram estruturas para entender o mecanismo de entrega de droga, com simulação computacional e o software packmol, usando nanopartículas poliméricas e drogas anti-câncer (anastrozol, ciclofosfamida, daunorubicina, ixabepilona e Docetaxel) docadas em seu interior. Segundo os autores, com este estudo foi possível obter previsão da ligação e a dinâmica entre a molécula de fármaco e o seu veículo.

Lee e Pastor (2011), simularam agregados como misturas de lipídeos e de lipídicos com polietilenoglicol (PEG) em diferentes tamanhos e concentrações usando campo de força Martini formando lipossomas e micelas para avaliar a organização dos componentes e o efeito da introdução do PEG quanto ao tamanho.

Dan (2014) estudou a liberação de materiais encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados, utilizando simulações de Monte Carlo, com conteúdo de fase sólida variável para avaliar a influência do ordenamento da matriz, a concentração da fase sólida e o tamanho dos domínios na taxa de liberação da nanopartícula. Dan (2015), também estudaram a liberação de compostos encapsulados em nano e microcápsulas, só que utilizando campos oscilantes, como eletrostática e ultrassom, para avaliar a taxa de liberação.

A crescente aplicação de simulações computacionais demonstra que os métodos computacionais são técnicas promissoras para o design e para a

otimização de DDS's e representam ainda uma grande contribuição para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.7.2 DOCAGEM MOLECULAR

Para se compreender a maioria dos mecanismos é necessário determinar o modo de interação entre macromoléculas ou entre uma macromolécula e uma pequena molécula ligante. É o que a docagem molecular faz, se dedica à previsão do modo de ligação e os detalhes do reconhecimento molecular proteína-proteína e receptor-ligante. O objetivo desta técnica pode ser dividida em duas partes principais: investigação e predição da conformação e orientação de uma molécula ligante no seu sítio de complexação; predição da afinidade em um complexo receptor-ligante, isto é, a energia livre de ligação. Para sistemas complexos, como os nanosistemas, é necessária a complementação da dinâmica molecular (GUIDO, ANDRICOPULO e OLIVA, 2010; VERLI, 2014).

O procedimento de *docking molecular* busca pela posição e orientação que maximiza essas interações intermoleculares. Assim, o ligante e o receptor formam um complexo por complementaridade estrutural e por estabilização energética. Um dos principais objetivos dos estudos na área de planejamento *in silico* de fármacos é prever a intensidade e a especificidade com que pequenas e médias moléculas, normalmente denominadas de ligantes se liguem ao sítio ativo de um receptor, modificando assim o seu ciclo bioquímico/farmacológico, através de modulação da sua resposta biológica (COHEN, 2010; TROTT; OLSON, 2010).

2.7.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR (DM)

A dinâmica molecular (DM) é fundamentada nos princípios da mecânica molecular e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo. A DM conceitua-se como uma técnica computacional a qual se determina os movimentos das partículas de quaisquer sistemas, e desse é conhecido o potencial de interação entre essas partículas e as equações que regem seu movimento (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Utilizam modelos atomísticos clássicos e seu método é baseado nas leis de movimento de Newton. O resultado é uma trajetória que especifica como as posições e as velocidades das partículas no

sistema variam com o tempo (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; ROSAS-GARCÍA; SÁENZ-TAVERA, 2012).

Nas simulações de DM têm-se vários tipos de campos de força. A descrição de campo de força é definida como um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas. A escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades que serão investigadas. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de força mais utilizados são: Charmm, Gromos, Amber, Opls, Cvff entre outros (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; ROSAS-GARCÍA; SÁENZ-TAVERA, 2012; DIPIKA, 2014).

Um dos softwares de simulação DM mais utilizados é o GROMACS (DIPIKA, 2014; ESWAR et al., 2007). Assim como o Amber e o Charmm, são adaptados à simulação de macromoléculas, com campos de força altamente otimizados (ROSAS-GARCÍA; SÁENZ-TAVERA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Simular um carreador lipídico nanoestruturado utilizando triacilgliceróis da gordura de cupuaçu, a cera de carnaúba e o triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico como lipídeos, o tween 80[®] e o pluronic[®] como tensoativos e um enatiômero do cetoconazol como fármaco modelo. E através de softwares da modelagem molecular estudar as propriedades moleculares e o comportamento dinâmico das moléculas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Tratar as estruturas tridimensionais separadamente
- ✓ Estudar as propriedades moleculares
- ✓ Analisar por DSC e DRX as misturas lipídicas
- ✓ Gerar uma mistura lipídica tridimensional
- ✓ Estudar o acoplamento da mistura lipídica com o fármaco
- ✓ Gerar modelo tridimensional do CLN
- ✓ Realizar Simulações de Dinâmica Molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- ✓ Cera de Carnaúba (GM ceras - Lote: 3211/12; São Paulo, Brasil)
- ✓ Cetoconazol
- ✓ Gordura de Cupuaçu (Amazon Oil - Lote: AMO 003-005/2016; Belém, Brasil)
- ✓ Tween 80[®]
- ✓ Pluronic[®]
- ✓ Triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico (Fagron - Lote: 1Y0275B; São Paulo, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS OTIMIZADAS

Inicialmente buscaram-se na literatura as estruturas majoritárias dos constituintes do nanocarreador, que compreende a matriz lipídica (composta por gordura de cupuaçu, cera de carnaúba e triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico), os tensoativos (Tween 80 e Pluronic) e o fármaco (cetoconazol), que foram estabelecidas como estruturas representativas dos mesmos nos sistemas simulados. Uma vez determinados os majoritários, as estruturas foram tratadas separadamente, algumas foram obtidas do NCBI (*National center for biotechnology information*), e outras geradas com CHEMDRAW ULTRA 12 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA).

Posteriormente foram geradas estruturas tridimensionais minimizadas, com o programa CHEM3D 12 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA). Com o programa UCSF CHIMERA foram obtidas as respectivas cargas e multiplicidades. Seguido de otimização das estruturas obtidas usando o método TFD com o funcional híbrido B3LYP e conjunto de bases 6-31G (d,p) calculadas no GAUSSIAN 09 (FRISCH, 2009; PLUMLEY e DANNENBERG, 2011). A visualização das estruturas foi feita com o programa VISUAL MOLECULAR DIMANYCS (VMD).

4.2.2 SUPERFÍCIES DO MAPA DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO (MEP)

As superfícies MEP foram calculadas para o estudo de padrões de reatividades moleculares. É uma ferramenta altamente informativa para a distribuição de cargas eletrônicas de uma dada molécula. As superfícies do MEP foram calculadas pelo método TFD com funcional híbrido e conjunto de bases B3LYP/6-31G (d,p) (PLUMLEY e DANNENBERG, 2011) no software SPARTAN STUDENT (ENGEL e REID, 2006).

4.2.3 DESIGN MISTURAS LIPÍDICAS

As proporções estabelecidas para três Pré-formulações de misturas lipídicas podem ser observadas na Tabela 3. Estabeleceu-se a relação gordura/cera 2:1 e a quantidade de TAC proporcional para 100% e em quantidades crescentes para as misturas. As três pré-formulações foram codificadas em M01, M02 e M03.

Tabela 3. Misturas lipídicas em diferentes proporções.

MISTURAS	CG (%)	CERA (%)	TAC (%)
M01	40	20	40
M02	30	15	55
M03	20	10	70

CG: gordura de cupuaçu/ Cera: cera de carnaúba/ TACC: triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico.

4.2.4 SELEÇÃO DA MISTURA LIPÍDICA

A seleção da mistura lipídica foi realizada a partir dos resultados experimentais de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Difração de raios-X (DRX) das amostras isoladas e das misturas.

Para a análise de DSC, a cera, a gordura e as três misturas lipídicas foram aquecidas até 100°C e mantidas nesta temperatura por 15 minutos, seguido de resfriamento em temperatura ambiente (SOUTO, MEHNERT e MÜLLER, 2006). Cerca de 2mg de cada amostra foi adicionada em cadinho de alumínio hermeticamente fechado e submetida à programação de aquecimento até 200°C,

taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera inerte de nitrogênio (N₂) e com fluxo de 50mL/min em calorímetro exploratório diferencial (DSC) Shimadzu® DSC-60 Plus (Quioto, Japão). Os dados obtidos foram tratados no software Shimadzu® TA-60WS (Quioto, Japão).

Para a análise por DRX a cera, a gordura e as três misturas lipídicas foram investigadas usando difratômetro D8 Advance, Bruker® (Ettlingen, Alemanha), com tubo de Cu, radiação Cu (K α = 1,540598 Å), faixa angular (2 θ) de 10-80, voltagem do tubo de 40kV, corrente do tubo de 40 mA, fenda divergente de 0,6mm, fenda soller de 2,5° e filtro k β de Ni. A coleta do difratograma foi realizada com passo angular de 0,02° e o tempo por passo 1s.

4.2.5 MODELO TRIDIMENSIONAL DA MISTURA LIPÍDICA

Para simular uma matriz lipídica tridimensional foi utilizado o número de moléculas respectivo à quantidade dos componentes da mistura lipídica selecionada. Foi necessário converter os percentuais estabelecidos na tabela 3 para número de moléculas (tabela 4) conforme frações estabelecidas para cada componente. O número de molécula de cada componente lipídico foi calculado utilizando uma equação (Eq.3) que descreve o número de moléculas obtido pela razão entre o produto da massa (g) e o número de avogrado, pela massa molar (g/mol). Foi elaborado apenas um modelo tridimensional, dentre as três misturas lipídicas, utilizando o PACKMOL SOFTWARE PACKAGE (MARTÍNEZ et al., 2009) com o modelo *Simple mixture* e caixa ortorrômbica de 70Å. A visualização do modelo gerado foi feita com o programa VISUAL MOLECULAR DIMANYCS (VMD).

Tabela 4. Número de moléculas calculadas para cada mistura lipídica..

	M01		M02		M03	
	%	Nm	%	Nm	%	Nm
SOO	40	16	30	12	20	8
SOS		11		8		5
CER	20	30	15	23	10	15
TAC	40	97	55	133	70	169

Nm: Número de moléculas/ SOO e SOS: Triacilgliceróis da gordura de cupuaçu/ CER: Cera de carnauba / TAC: Triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico.

$$n = \frac{m \times NA}{mm} \times 10^{-20} \quad (\text{Eq.3})$$

m = massa (g)
 NA = número de avogrado
 ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
 mm = massa molar (g/mol)
 10^{-20} = simplificação
 numérica

Fonte: Autor

4.2.6 DOCAGEM MOLECULAR

O cetoconazol foi incorporado a mistura tridimensional selecionada, para a docagem o cetoconazol foi estabelecido como ligante e a mistura lipídica o receptor. Foi realizada para mimetizar o processo físico de ligação e para este processo foi utilizado o software AUTODOCK 4.2 (SILVA et al., 2017), que é um programa para avaliação virtual de acoplamento molecular. Com precisão regular de no máximo 100 conformações por estrutura, cargas Kollman necessárias para o cálculo foram adicionadas, hidrogênios não polares suprimidos e as ligações rotacionais do ligante foram definidas automaticamente. As conformações foram classificadas utilizando a função scoring e o algoritmo Genético Lamarckiano. Após a localização dos possíveis locais de ligação, as conformações do complexo docado foram otimizadas utilizando o algoritmo steepest decent até a convergência, com um máximo de 20 iterações. As dimensões da caixa grid foram (X= 22 / Y= 14 / Z= 14).

4.2.7 DESIGN DO CLN

Para o design do CLN, inicialmente seguiu-se a relação 10% de lipídeos, 1% de tensoativos, 1% de fármaco e 88% de água (DOS SANTOS et al., 2012; SOUTO, 2013). Para simular o CLN tridimensional foi utilizado o número de moléculas, calculadas conforme (Eq. 3), respectivo às quantidade dos seus componentes. Conforme observado na tabela 5, em que se tem a gordura de cupuaçu (relativo aos triacilgliceróis), cera de carnaúba, triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico, pluronic, tween 80, cetoconazol e água.

Tabela 5. Design da formulação de CLN para simulação.

Componentes	Proporção em formulações CLN (%)	Nm
SOS	10	4
SOO		3
CER		7
TAC		85
PLU	0,5	18
T80	0,5	5
CET	1	11
ÁGUA	88	29416

Nm: Número de moléculas/ SOO e SOS: Triacilgliceróis da gordura de cupuaçu / CER: cera de carnaúba/ TAC Triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico / T80: tween 80/ PLU: pluronic/ CET: cetozonazol.

4.2.8 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DO CLN

Inicialmente foram geradas as topologias da base ATB (*Automated Topology Builder*) para poder gerar o sistema. O sistema foi minimizado para evitar choques estéreis ou geometria inadequada. Seguido de um processo de termalização, processo que consiste no aumento gradual da temperatura através de sucessivas simulações por dinâmica molecular em 10ps cada, considerando primeiramente as estruturas moleculares em 0K e aquecendo até 50K, em seguida aumentou-se a temperatura para 150K, e por fim foi alcançada a temperatura de interesse 298K. As coordenadas de cada átomo do sistema permaneceram fixas durante a termalização, com uma força constante de $1,0 \times 10^3 \text{ KJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$.

Os sistemas aquosos foram solvatados com moléculas explícitas de água através do modelo polarizante simples de carga pontual: Simple Point Charge (SPC/TIP3). Foi utilizado o algoritmo de Verlet-Verlet e ensemble canônico. As contribuições eletrostáticas de longo alcance foram tratadas por meio do Campo de reação (Reaction Field). Já as interações eletrostáticas e de van der Waals para tratar as interações de curto alcance ocorrem dentro de um raio de corte de 1,4nm, evitando a ocorrência de interações entre os átomos e suas próprias imagens virtuais replicadas tridimensionalmente pelas condições periódicas de contorno. A simulação foi realizada no tempo de 20ns. A simulação foi realizada utilizando o conjunto de parâmetros FF99S dentro do programa GROMACS (VAN DER SPOEL et al., 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estruturas otimizadas

A composição do CLN foi semelhante a um modelo já estudado por Souto (2013), diferenciando-se na proporção dos lipídeos, e para um estudo teórico deste sistema, inicialmente estabeleceram-se as estruturas representativas dos componentes do CLN conforme informações estruturais encontradas na literatura (tabela 6). Na composição triglicéridica da gordura de cupuaçu (GC) foi encontrado principalmente o triacilglicerol SOS (*1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol*) que corresponde a aproximadamente 30% e o triacilglicerol SOO (*1-stearoyl-2,3-dioleoylglycerol*) a 20%, ou seja, juntos totalizando cerca de 50% da GC, uma vez que a mesma é composta basicamente de triglicérides, pode-se afixar o SOS e o SOO como majoritários e representativos da gordura de cupuaçu.

Tabela 6. Estruturas representativas dos componentes do CLN.

Componentes	Majoritário/Representativo	Fórmula molecular	Referência
Gordura de cupuaçu	Triacilglicerol SOS	$C_{57}H_{108}O_6$	Luccas, 2001; Gilabert-Escrivá et al., 2002; Ruscheinsky, 2005; Quast, Luccas e Kieckbusch, 2011
	Triacilglicerol SOO	$C_{57}H_{106}O_6$	
Cera de carnaúba	Cerotato de mericila	$C_{56}H_{112}O_2$	Magalhães, 2007 Campbell e Farrell, 2012
TAC	Triacilglicerol de ácido cáprico/caprílico	$C_{29}H_{54}O_6$	Laudo de fabricação
Tween 80	Tween 80	$C_{32}H_{60}O_{10}$	Laudo de fabricação
Pluronic	Pluronic	$C_7H_{16}O_4$	Laudo de fabricação
Cetoconazol	cetoconazol	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$	Farmacopéia Européia 5.0

A cera de carnaúba é composta basicamente pelo cerotato de mericila (tabela 6), que é um éster simples formado pelo ácido cerótico e o álcool mericílico, por isso foi determinado como seu representativo. O TAC é sintetizado em ambiente industrial através de uma reação de esterificação utilizando os ácidos graxos cáprico e o caprílico, fracionados de outros óleos vegetais, com o glicerol para formar o triglicérido cuja fórmula molecular está na tabela 6. O pluronic, o tween 80 e o

cetoconazol também são sintetizados em laboratório e possuem as informações estruturais bem definidas nos laudos de fabricação (tabela 6).

As únicas estruturas obtidas do NCBI foram as do cetoconazol (Pubchem CID: 47576) e do Tween 80 (Pubchem CID: 528448). Todas as sete estruturas foram calculadas com método TFD com conjunto B3LYP 6-31G (d,p) e as energias de otimização (HF) obtidas estão na tabela 7, cuja unidade atômica de energia é o Hartree, que é igual ao valor absoluto da energia potencial do átomo de hidrogênio em seu estado fundamental ou estacionário. Pode-se dizer que os valores da tabela 7 representam a energia total resultante da aproximação de hartree (MONTE; VENTURA, 2011). A menor energia de otimização reflete na estabilidade, conforme tabela 7 o pluronic teve menor energia de otimização, portanto é o mais estável.

Tabela 7. Energias após cálculos de otimização.

Componentes	HF (Ha)*
SOS	-2688,7530
SOO	-2687,5192
Cera	-2352,1639
TAC	-1589,1225
Tween 80	-2007, 7782
Pluronic	-557, 2450
Cetoconazol	-2447,9286

*HF – Energia de otimização (Hartree).

O resultante da otimização de cada estrutura pode ser visualizado nas figuras 9, 10, 11, 12, 13,14 e 15 que são *snapshots* gerados no programa VISUAL MOLECULAR DIMANYCS (VMD). Cujos átomos em vermelho representam os oxigênios, em azul os nitrogênios, em branco os hidrogênios e em verde são os carbonos e os cloros (somente para o cetoconazol).

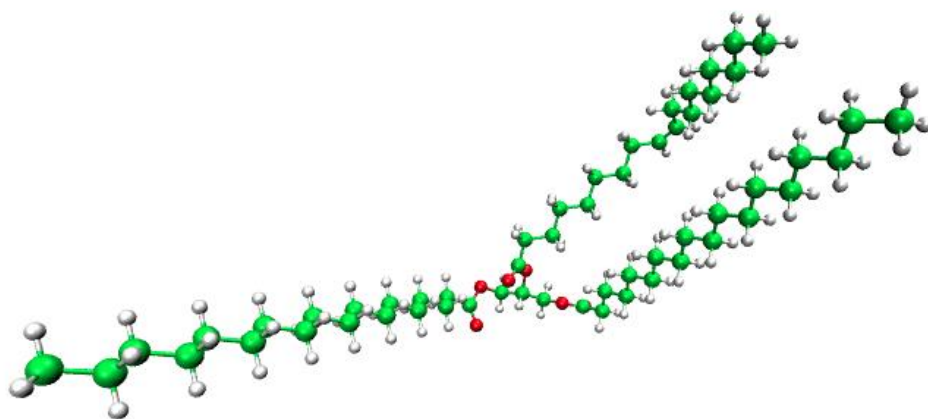


Figura 9. Estrutura tridimensional do SOS.
Fonte: Autor

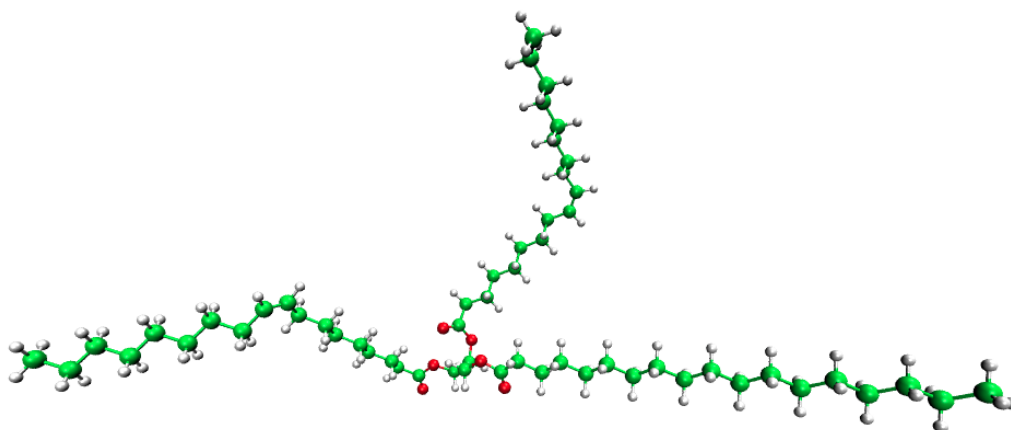


Figura 10. Estrutura tridimensional do SOO.
Fonte: Autor

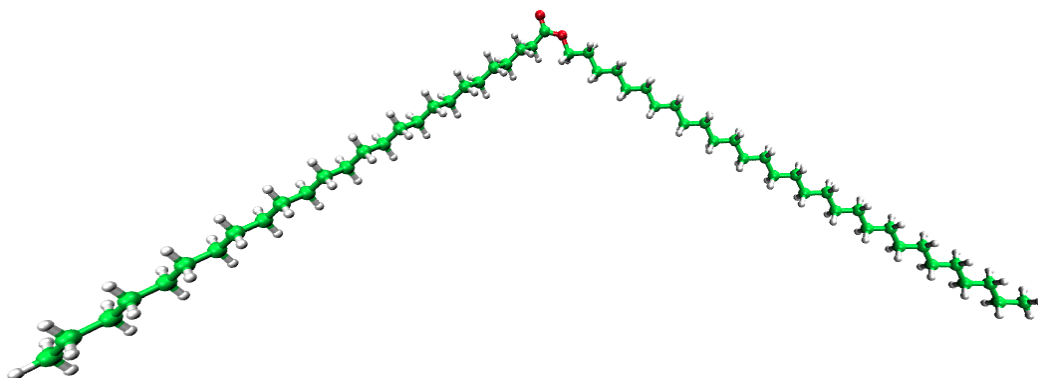


Figura 11. Estrutura tridimensional da Cera.
Fonte: Autor

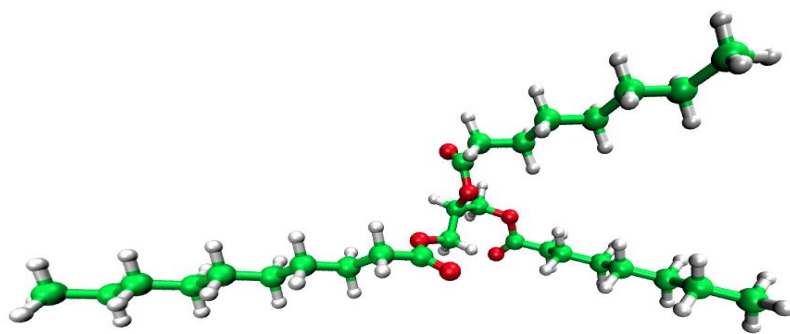


Figura 12. Estrutura tridimensional do TAC.
Fonte: Autor

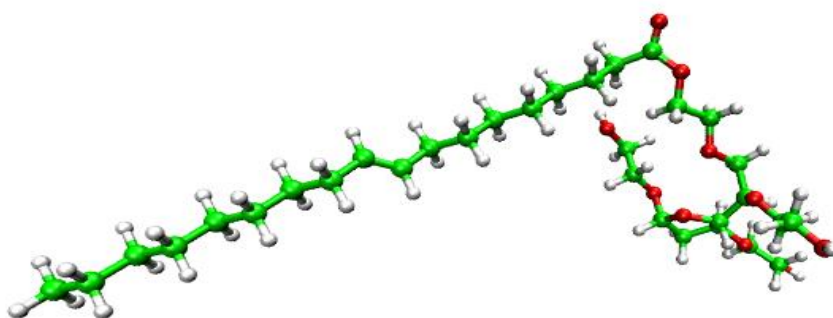


Figura 13. Estrutura tridimensional do tween 80.
Fonte: Autor

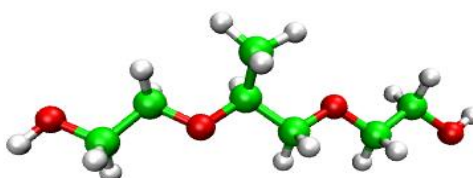


Figura 14. Estrutura tridimensional do pluronic.
Fonte: Autor

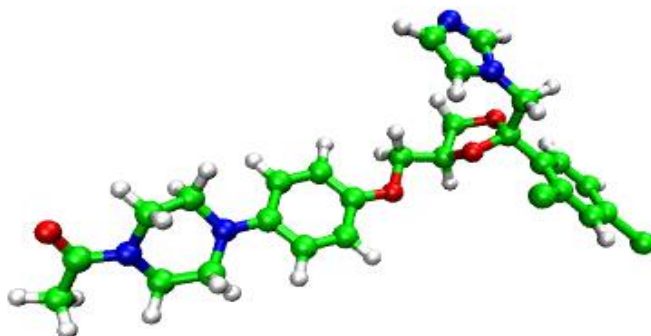


Figura 15. Estrutura tridimensional do Cetoconazol.
Fonte: Autor

5.2 Superfícies do mapa do potencial eletroestático

As Figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22 mostram as superfícies do mapa do potencial eletrostático (MEP) geradas e demonstram as regiões nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) que tendem para o vermelho, e as regiões eletrofílicas (potencial eletrostático positivo) tendendo para o azul. O espectro de cores do vermelho ao azul indica a tendência em relação à carga, da mais negativa para a menos negativa (ou positiva). A importância do estudo de MEP é conhecer a forma global da molécula e as regiões com maior afinidade para interações, e principalmente com o cetoconazol. As superfícies descreveram bem a distribuição de cargas.

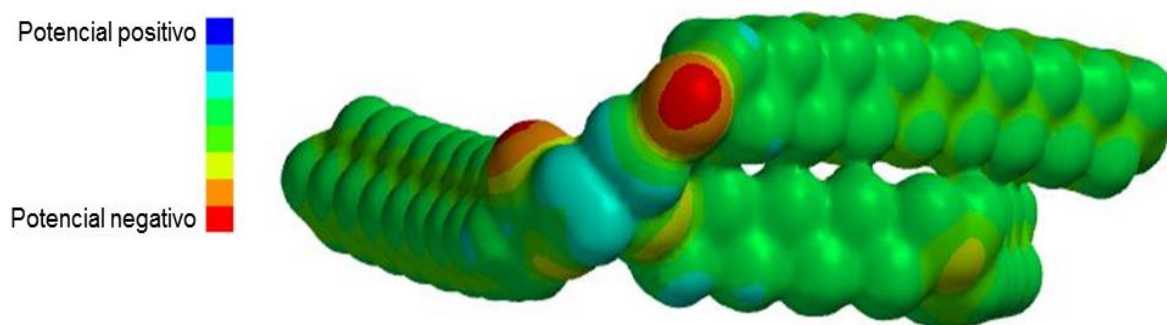


Figura 16. Superfície do mapa de potencial eletrostático do SOS.
Fonte: Autor

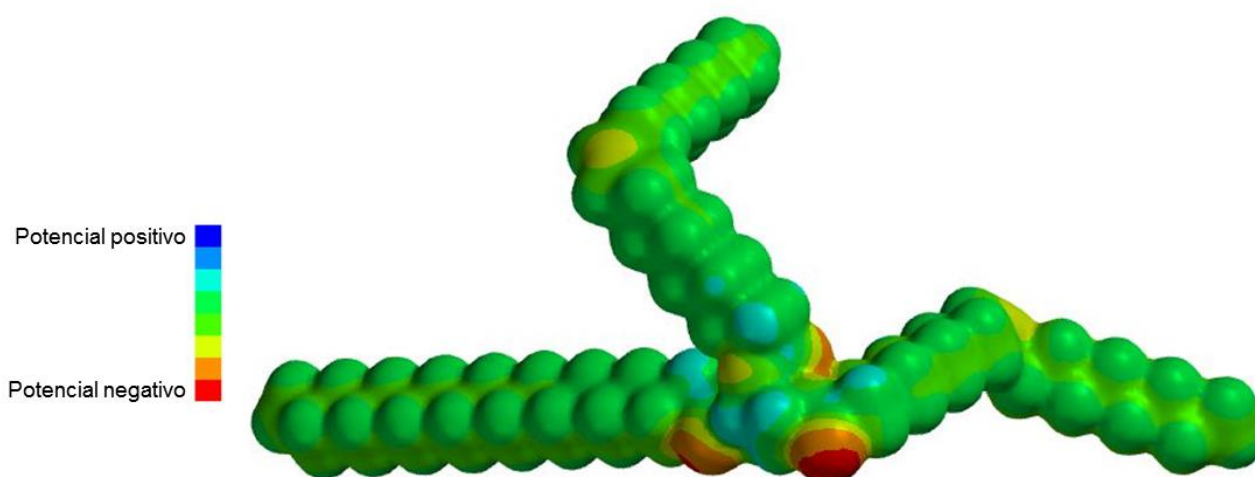


Figura 17. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o SOO.
Fonte: Autor

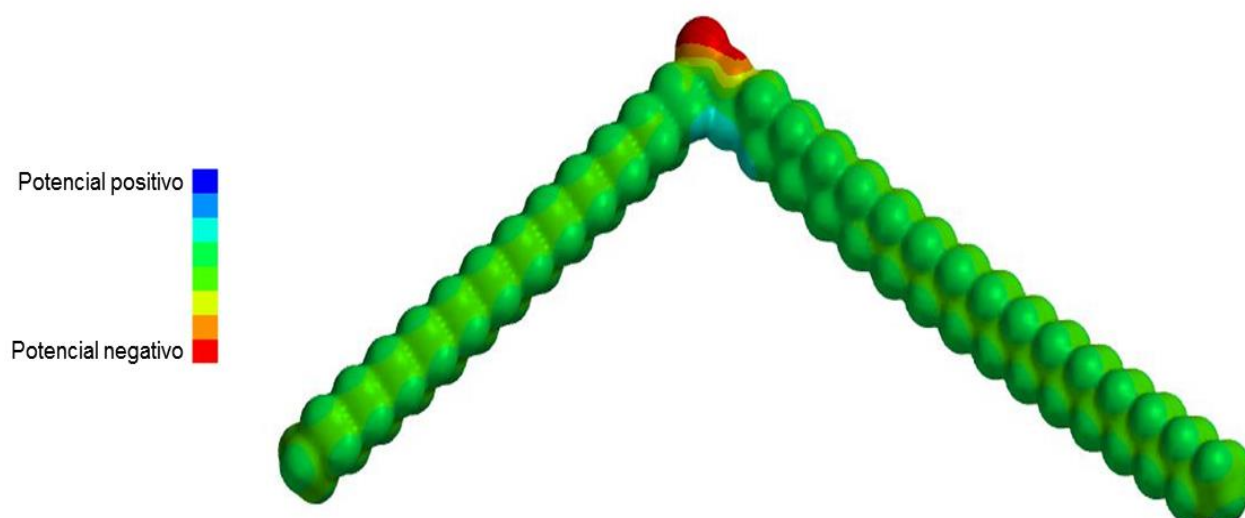


Figura 18. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para a Cera.
Fonte: Autor

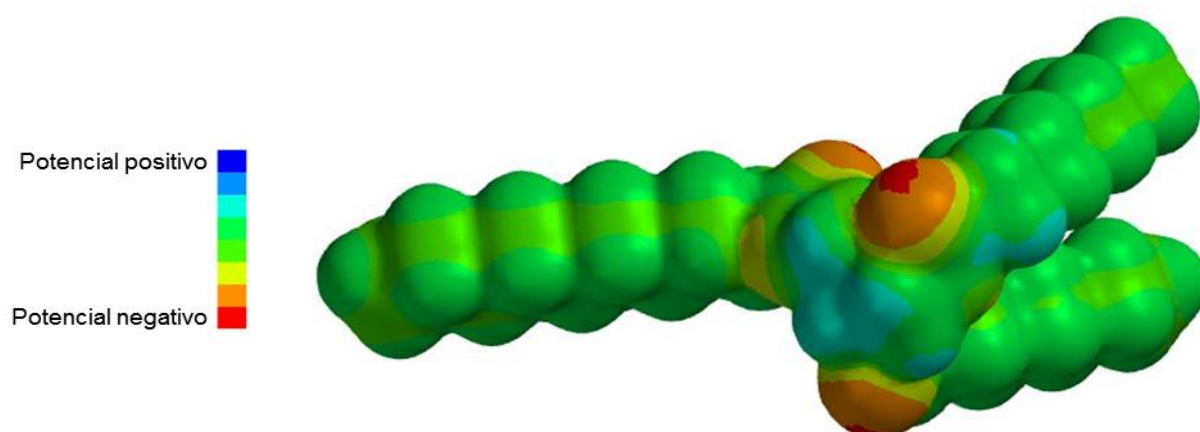


Figura 19. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o TAC.
Fonte: Autor

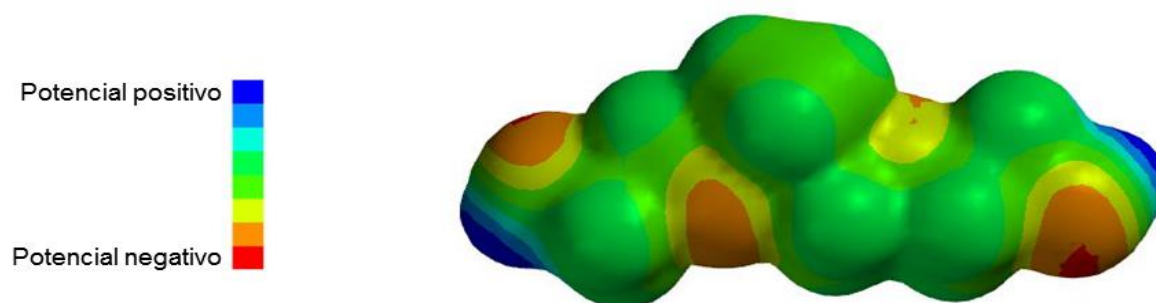


Figura 20. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o pluronic.
Fonte: Autor

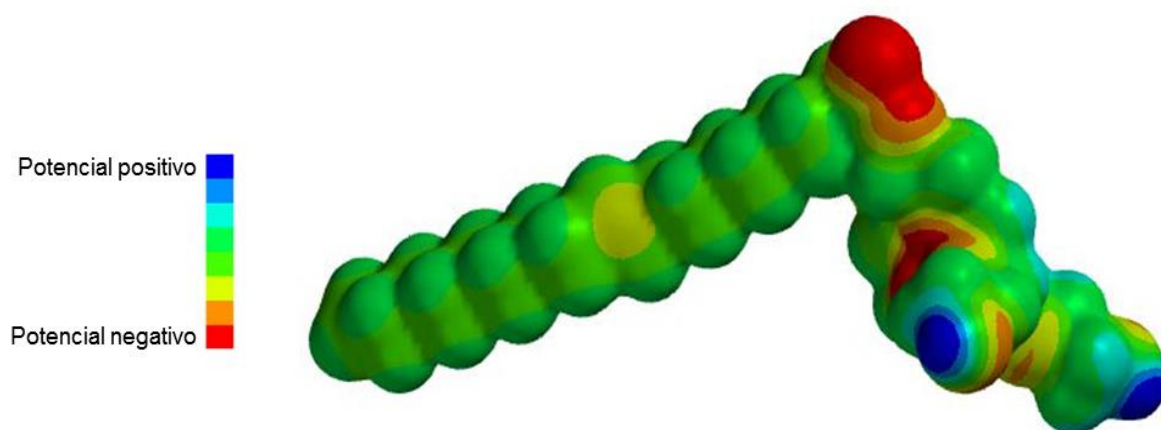


Figura 21. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o tween 80.
Fonte: Autor

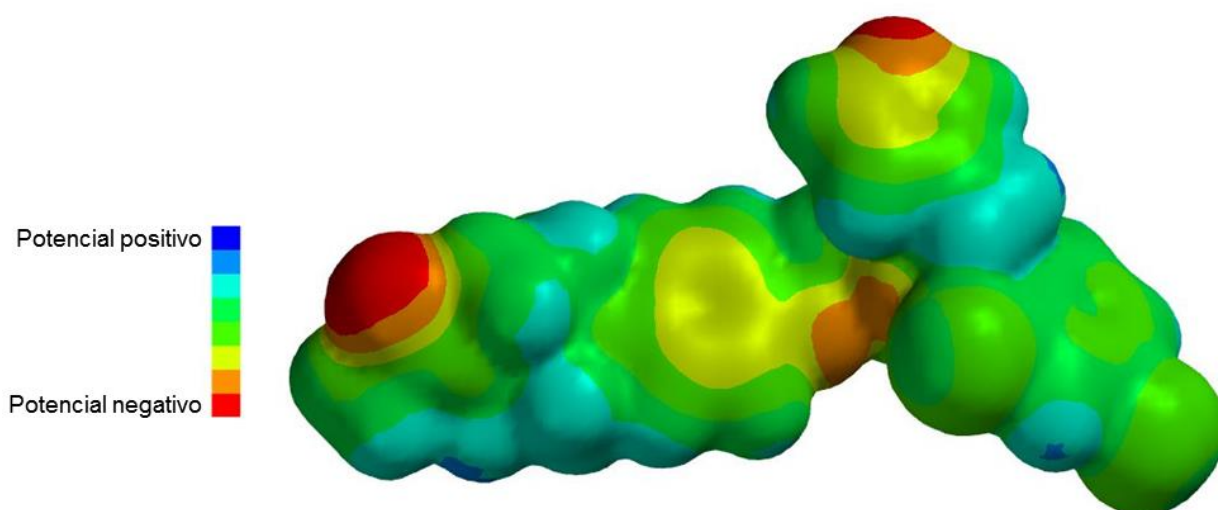


Figura 22. Superfície do mapa do potencial eletrostático gerado para o cetoconazol.
Fonte: Autor

Para o SOS e para o SOO, as superfícies do MEP mostraram regiões com potencial eletrostático negativo ao redor dos átomos de oxigênio dos grupos acilato (COO), mais intensamente na porção carboxílica, devido ao efeito retirador de elétrons do grupo carbonila, e na instauração da cadeia carbônica em que também são observadas regiões nucleofílicas que geram potenciais negativos. E potenciais eletrostáticos positivos em torno dos átomos de hidrogênio.

Na cera e no TACC, potenciais negativos são observados ao redor dos átomos de oxigênio dos grupos carboxílicos que formam a ligação éster da estrutura e potenciais positivos estão em torno dos hidrogênios ligados ao grupo acilato.

No tween 80, também são observadas regiões de potencial negativo ao redor dos átomos de oxigênio dos grupos acilato e na instauração, e potenciais positivos ao redor dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxílicos (OH). No Pluronic regiões de potencial negativo são observadas ao redor dos átomos de oxigênio, o átomo mais eletronegativo da estrutura e potenciais positivos ao redor dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxílicos (OH). No cetoconazol, potenciais negativos em torno do átomo de nitrogênio do anel imidazólico, do átomo de oxigênio da carbonila e no anel aromático. Potenciais positivos são observados ao redor de átomos de hidrogênios da estrutura.

Esses dados estão coerentes com os conceitos de mecanismos de reação, pois regiões nucleofílicas, rica em elétrons, geram potencial negativo e podem ser duplas ou triplas ligações, elementos eletronegativos e ainda anéis aromáticos pelo efeito ressonante. Deste modo, regiões mais negativas atraem espécies carregadas positivamente ou repelem carga negativa, e espécies menos negativas ou positivas atraem elétrons de outra molécula. Por isso que regiões nucleofílicas são mais suscetíveis a ataque por eletrófilos e as regiões eletrofílicas, de potencial positivo, apresentam maior suscetibilidade de sofrer ataque nucleofílico.

5.3 Orbitais HOMO e LUMO

A partir das otimizações das estruturas foi possível observar outras propriedades eletrônicas como os orbitais moleculares HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e o LUMO (orbital molecular não ocupado de menor energia) que estão expostos na tabela 8.

Os orbitais HOMO e LUMO são orbitais de fronteira e estão relacionados com a energia que ocupa o orbital molecular. Fornecem informações sobre caráter elétron/doador ou elétron/aceitador de um átomo e de um complexo formado pela transferência de cargas. A energia HOMO está relacionada a capacidade de doar elétrons, deste modo quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade de doar elétrons. A energia LUMO está relacionada com a capacidade de receber elétrons

de uma molécula, quanto menor a energia LUMO menor é a resistência de aceitar elétrons (CHENG et al., 2003; ARROIO, HONÓRIO e DA SILVA, 2010).

Conforme observado na tabela 8, o SOO e o cetoconazol possuem maiores valores de energia HOMO, portanto possuem átomos com alta capacidade de doar elétrons. O SOS e o cetoconazol apresentaram menores valores de energia LUMO, por isso pode inferir que os mesmos apresentam átomos aceptadores com menor resistência de aceitar elétrons.

Tabela 8. Orbitais HOMO e LUMO dos componentes do CLN.

Componentes	HOMO (Ha)*	LUMO (Ha)*	Gap (H-L)
SOS	-0,2321	-0,0583	0,1738
SOO	-0,1790	-0,0218	0,1572
Cera	-0,2552	0,0144	0,2696
TACC	-0,2662	0,0037	0,2699
Tween 80	-0,2339	0,0211	0,255
Pluronic	-0,2522	0,0616	0,3138
Cetoconazol	-0,1821	-0,0369	0,1452

*HF – Energia de otimização (Hartree).

O intervalo *Gap* (H-L) é obtido pela diferença entre as energias HOMO e LUMO e é um indicador da reatividade dos compostos. Moléculas com menores valores de *Gap* (H-L) são mais reativas e tem menor estabilidade (CHENG et al., 2003; ZHANG e MUSGRAVE, 2007). Conforme tabela 8, pode-se observar que os menores valores em módulo obtidos foram para o cetoconazol, SOO e SOS, deste modo, demonstram ser os compostos mais reativos.

5.4 Seleção das misturas Lipídicas

✓ Análise de DSC

As curvas obtidas da calorimetria exploratória diferencial (DSC), estão representados nas Figuras 23 e 24. Adicionalmente, a Tabela 9 exibe dados referentes a temperatura de fusão, temperatura *on-set* e entalpia obtido.

Observou-se na curva DSC da cera de caunaúba (figura 23) um evento endotérmico em 85,12°C relacionado à fusão, com extrapolação *on-set* de 83,38°C e entalpia de -174,01 J/g. Dados em conformidade com a literatura, pois outros estudos indicam uma temperatura de fusão entre 80 a 86°C (LACERDA, 2009; MILANOVIC et al., 2010; SOUTO, 2013).

A curva DSC da gordura de cupuaçu (figura 23), apresentou um evento endotérmico referente à fusão a 33,14°C com *on-set* de 27,89°C e entalpia de -72,2 J/g. Estes resultados estão semelhantes aos observados na literatura que varia de 30 a 38°C (GILABERT-ESCRIVÁ et al., 2002; LUCCAS e KIECKBUSCH, 2006; TEIXEIRA, 2014).

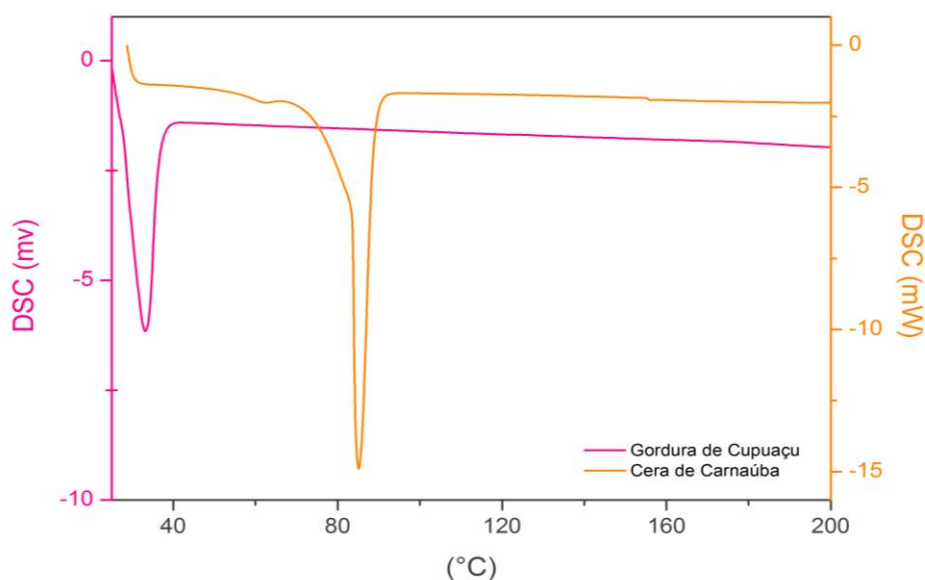


Figura 23. Curvas DSC da gordura de cupuaçu e cera de carnaúba.

Fonte: Autor

As curvas DSC das misturas lipídicas apresentaram (figura 24) um evento endotérmico referente à fusão variando de 76,31 a 78,06°C, com extrapolação *on-set* de 65,39 a 68,45°C e entalpia de -15,17 a -21,74 J/g. Foi observado a diminuição da altura do pico e o alargamento do evento endotérmico em comparação a cera e gordura (figura 23), proporcional ao aumento da quantidade de TAC e diminuição da relação gordura/cera, o que resultou na diminuição dos valores correspondentes de entalpia. Todas as misturas apresentaram variações de entalpia menores do que qualquer material avaliado isoladamente (tabela 9).

Com os resultados da análise térmica (Tabela 9) e as curvas DSC (Figura 23 e 24) é possível indicar que houve interação entre gordura, a cera e o TAC bem como a formação de novas estruturas cristalinas. As misturas M02 e M03 apresentaram menores valores de entalpia e de temperatura de fusão, indicando que são as misturas de menor ordenamento cristalino.

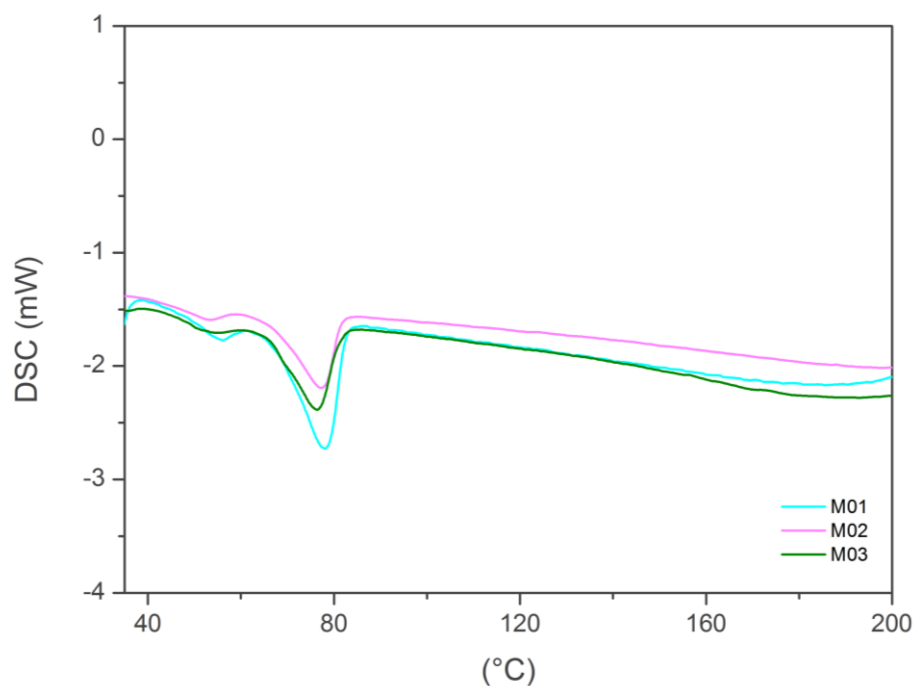


Figura 24. Curvas DSC das misturas M01, M02 e M03.

Fonte: Autor

Tabela 9. Temperatura de fusão, temperatura on-set e entalpia da cera de carnaúba, gordura de cupuaçu e das misturas.

COMPONENTES	Fusão (°C)	On-set (°C)	Entalpia (J/g)
M01	78,06	68,45	-21,74
M02	77,25	66,78	-17,75
M03	76,31	65,39	-15,17
GOR	33,14	27,89	-72,25
CER	85,12	83,38	-174,01

Yang et al. (2014) realizaram experimentos para avaliar o efeito dos óleos sobre o comportamento de cristalização das misturas e a estabilidade em CLN, utilizando a triesterina e quatro óleos: trioleína, tricaprilina, ácido oleico e

pentadecano. Através de perfis térmicos de DSC, sugeriram que a adição dos óleos acelerou a taxa de transformação polimórfica, ou seja, à medida que a concentração de óleo foi aumentada, a cristalização e a temperatura de fusão diminuíram e a taxa de transformação polimórfica aumentou sugerindo estruturas mais amorfas.

Zheng et al. (2013) realizaram experimentos para avaliar as influências de misturas de lipídeos (óleo de girassol hidrogenado, óleo de girassol saturado, óleo de colza hidrogenado, óleo de colza saturada, mistura de óleo de palma e estearina de palma, óleo de soja e triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico) e suas proporções na formação e propriedades de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) utilizando, dentre outras técnicas o DSC em que os resultados mostraram que ambas temperatura *on-set* e de fusão diminuíram, devido à adição do óleo líquido que permitiu o pico de fusão mais amplo e alargado, indicando uma cristalinidade reduzida de produtos.

Com os resultados obtidos pode-se afirmar que o TAC foi molecularmente disperso na matriz lipídica provocando uma redução na temperatura de fusão quando comparado com os lipídeos sólidos, assim como a entalpia isoladamente. Como o calor de fusão é inversamente proporcional à organização da estrutura cristalina, ou seja, quanto menor a entalpia menos organizada a estrutura cristalina (SEVERINO, 2012),

Pode-se inferir também que houve a ação sinérgica do TAC e da gordura de cupuaçu para gerar estruturas mais desordenadas, ou seja, que além do lipídeo líquido (TAC) a própria gordura possa ter gerado uma contribuição para a redução da entalpia, em relação aos materiais isolados. A cera de carnaúba teve influência direta no comportamento cristalino, pois quanto maior foi a quantidade de cera mais ordenadas foram as misturas (maior entalpia). Pode-se estimar que o TAC e a gordura tiveram efeito maximizador e a cera teve efeito minimizador na desordem cristalina das misturas.

✓ Análise de DRX

Os difratogramas da gordura, da cera e das misturas estão mostrados nas Figuras 25, 26 e 27 respectivamente. No difratograma da gordura (figura 25) foi observado um pico de curto de longa intensidade na faixa 2θ de 19.46° e vários picos de curto espaçamento e de média intensidade em 10.77 , 22.25 , 22.84 , 23.76 e

24.33°, que são característicos deste e estão de acordo com os valores encontrados por outros autores (SILVA et al., 2009; QUAST, LUCCAS e KIECKBUSCH, 2011).

A cera de carnaúba apresentou dois picos de alta intensidade na faixa 2 θ de 21.51° e outro em 23.82° (figura 26), característicos da cera de carnaúba e também encontrados por outros autores (VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006; LACERDA, 2009).

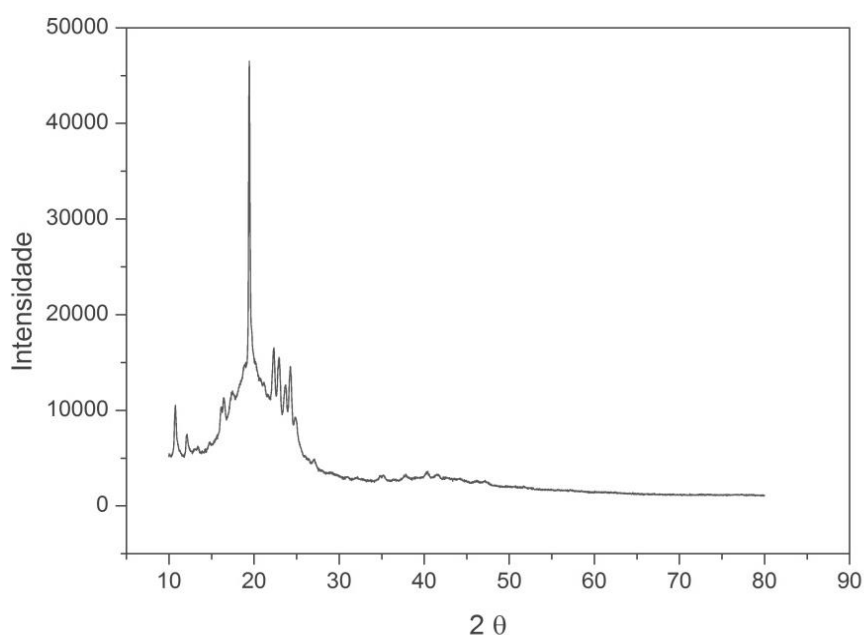


Figura 25. Difratograma da gordura de cupuaçu.

Fonte: Autor

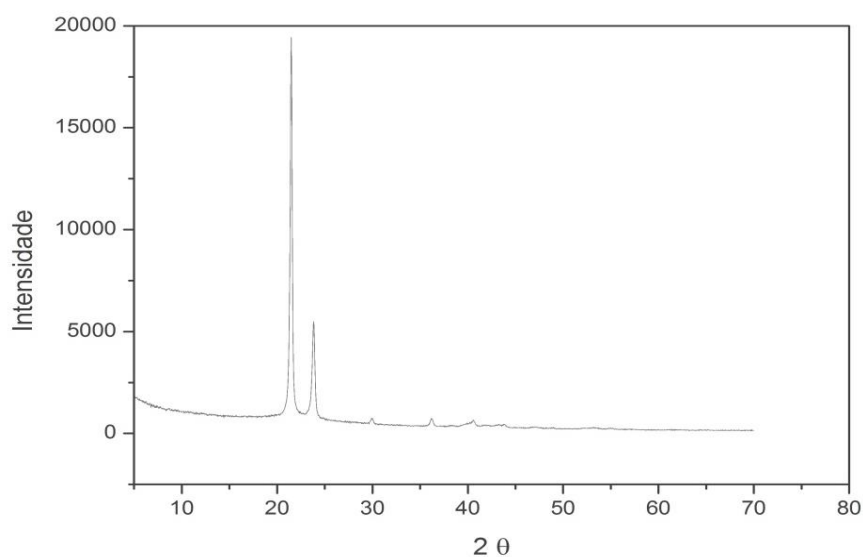


Figura 26. Difratograma da cera de carnaúba.

Fonte: Autor

Nos difratogramas das misturas (figura 27) é evidente uma modificação na intensidade dos picos. Para a mistura M01 foi observado dois picos de média intensidade na faixa 2θ de 19.51° e 23.86° e um de alta intensidade em 21.56° ; Na mistura M02 também foi observado dois picos de média intensidade em 19.45° e 23.97° e um de baixa intensidade em 21.56° ; Na mistura M03 na faixa 2θ de 22° já se observa um alargamento do pico, seguido de um de média intensidade em 21.54° e de baixa intensidade em 23.97° . Dentre os três o M03 apresentou picos de menor intensidade.

As alterações observadas nos difratogramas comparando a gordura, a cera e as misturas pode indicar que houve uma mudança polimórfica das misturas lipídicas formadas de modo a diminuir o ordenamento cristalino, principalmente na mistura M03. Com isso, pode-se dizer que a M03 pode sofrer amorfização após solidificação, portanto tende a um comportamento cristalino menos organizado no estado sólido. Esta é a mistura de maior interesse para produzir os CLN, pois a forma cristalina da matriz lipídica influencia diretamente no perfil de liberação de fármacos, pois em geral, matrizes lipídico-sólidas muito ordenadas apresentam menor taxa de difusão de substância ativa (ATTAMA, MOMOH e BUILDERS, 2012), e regiões amorfas facilitam a incorporação de fármacos.

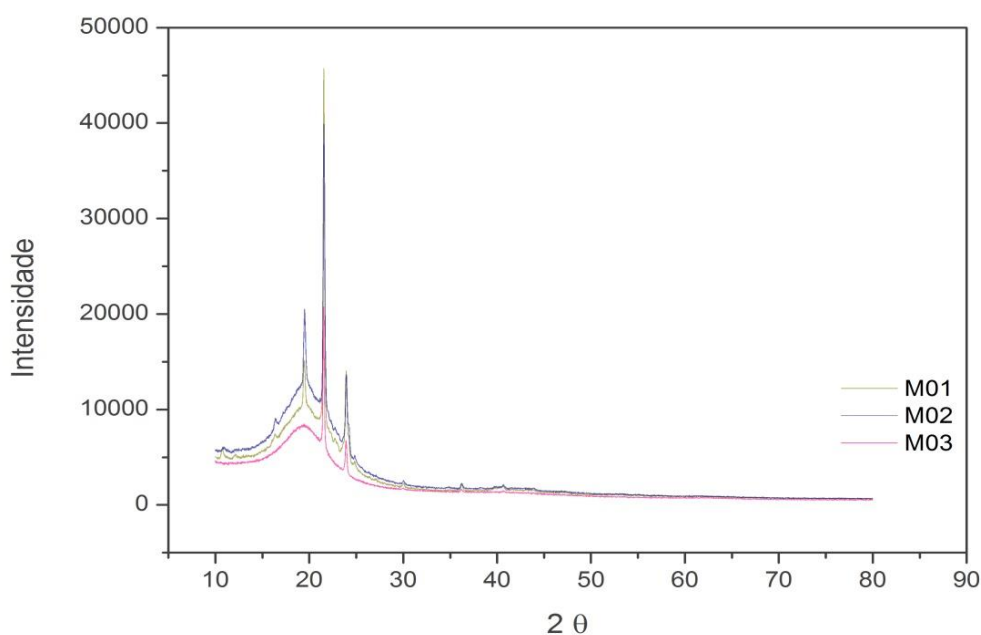


Figura 27. Difratograma das misturas lipídicas.

Fonte: Autor

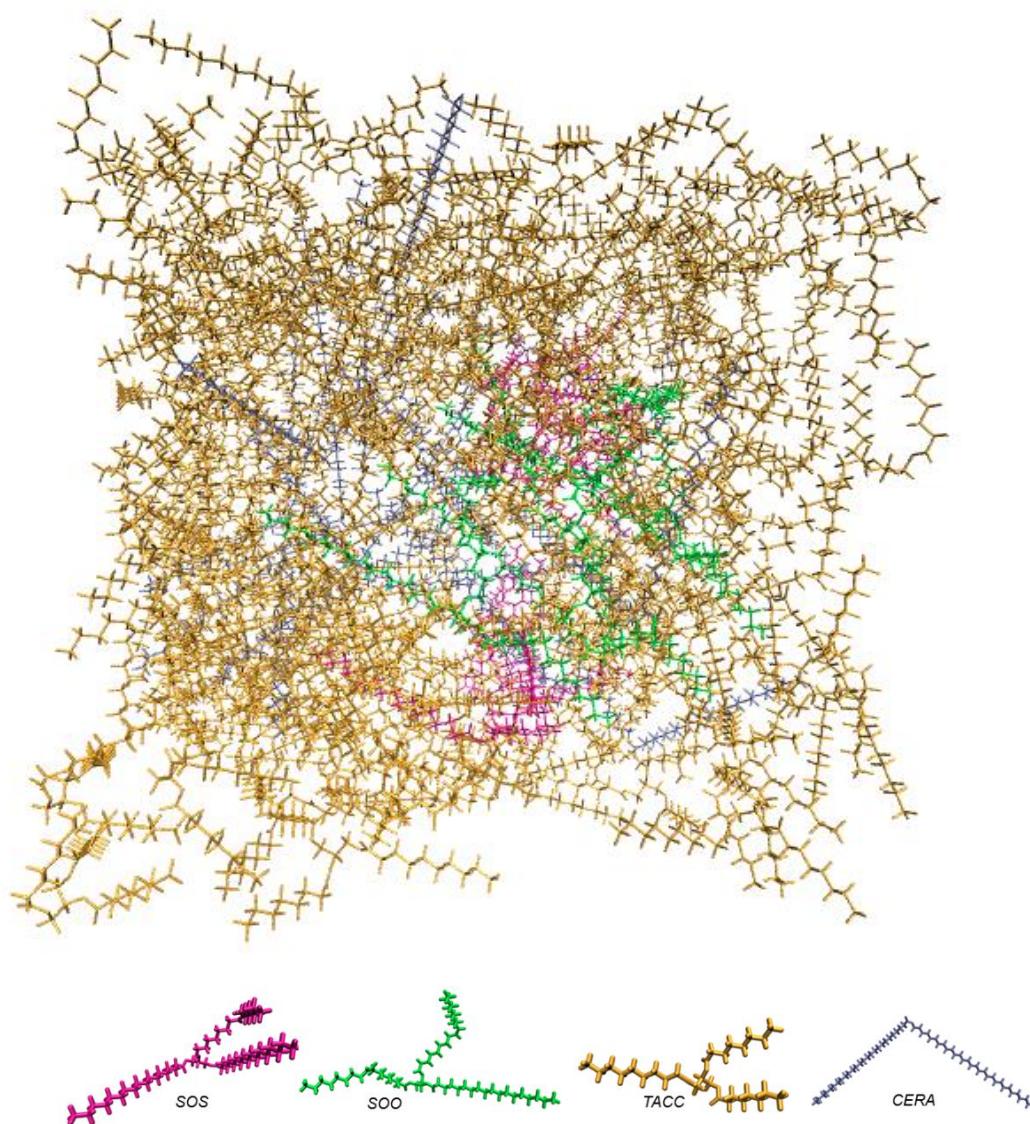
Lacerda (2009) também observou a diminuição de intensidade e alargamento de picos de DRX, como também a diminuição da temperatura de fusão obtida por DSC de misturas binárias de cera de carnaúba com lipídeo líquido, atribuindo a estes resultados a diminuição da organização das estruturas cristalinas das cadeias lipídicas das misturas binárias.

Os resultados de DRX corroboraram com os de DSC, em que demonstraram a mistura M03, como mais promissora para formular um CLN. Portanto esta foi a mistura selecionada para posteriores simulações computacionais.

5.5 Modelo tridimensional da mistura lipídica

O modelo tridimensional da mistura M03 foi gerado com o programa PACKMOL e visualizado no VMD (figura 28). O Packmol cria um modelo otimizado para posteriores estudos de docagem molecular e simulações de dinâmica molecular. O modelo gerado visa garantir que interações repulsivas de curto alcance não perturbem ou interfiram as simulações (MARTÍNEZ et al., 2009). Com o PACKMOL, o usuário pode compactar moléculas restritas a regiões do espaço cujas formas são definidas por formas geométricas.

Este programa utiliza um algoritmo de otimização para resolver o problema de empacotamento molecular e minimização do sistema. Nesta versão do programa o Gencan é utilizado. É um método iterativo que, a partir de uma aproximação inicial para (c, θ) computa, a cada passo, uma aproximação com menor valor de função. No limite, um minimizador local é obtido. Em cada iteração, o Gencan calcula uma direção no espaço (c, θ) com o objetivo da diminuição da função f (função objetiva). As direções são definidas de acordo com o paradigma newtoniano, o que significa que ele busca a melhor direção possível no caso de possuir uma função objetiva de uma estrutura simples (quadrática). O procedimento para encontrar um novo ponto ao longo desta direção usa interpolação sofisticada e técnicas de extrapolação que permitem obter eficiência e garantia da convergência final (MARTÍNEZ e MARTÍNEZ, 2003; MARTÍNEZ et al., 2009).



Legenda:

Figura 28. Proposta da mistura lipídica tridimensional.

Fonte: Autor

Este modelo utilizou estruturas já otimizadas e por isso demandou menor custo computacional. Analisando o modelo tridimensional gerado (figura 28) foi observado que o modelo de mistura, foi bastante satisfatório, pois não houve choque entre os componentes das misturas, as moléculas ficaram bem distribuídas no espaço da caixa, por isso foi possível criar as configurações iniciais adequadas. Essa disposição molecular é fundamental para gerar sistemas adequados para posteriores simulações computacionais, pois minimiza a possibilidade de desestabilização do sistema por causa de grandes interações repulsivas, este é um dos motivos de falha de simulações mais complexas como a dinâmica molecular (MARTÍNEZ et al., 2009).

5.6 Incorporação do fármaco (Docking molecular)

O software AUTODOCK foi usado para a predição da interação das misturas com o cetoconazol. Este software tem distribuição gratuita e já foi amplamente testado, mostrando-se bem sucedido em uma variedade de experimentos de docagem (AMARO, BARON e MCCAMMON, 2008; SILVA et al., 2017). Ele pode utilizar várias técnicas para a exploração conformacional do ligante combinando as vantagens de uma busca espacial completa e uma avaliação energética precisa.

A docagem molecular da mistura M03 foi realizada com o fármaco cetoconazol. Este sistema foi formado entre o SOS, SOO, TACC, cera e o cetoconazol. O modelo tridimensional gerado após docking e as iterações obtidas foram visualizadas individualmente para a seleção da melhor. Este modelo gerou vinte iterações, dentre as quais a selecionada apresentou melhor conformação, menor energia de afinidade de -5,3 Kcal/mol e maior estabilidade.

Na figura 29 tem-se o modelo tridimensional gerado no programa VMD e foi observado que as moléculas permaneceram bem distribuídas mesmo após a inclusão do fármaco. Em que se observa a distribuição do SOS (rosa), SOO (verde), cera (cinza) e TAC (amarelo) e o cetoconazol (verde) docado ao centro estabelecendo a matriz lipídica do CLN.

Na figura 30, tem-se as principais interações formadas entre o cetoconazol e os demais compostos da matriz lipídica com distância de ligação de até 3,5Å. As interações formadas foram do tipo ligação de hidrogênio com distâncias de ligação variando de 2,62 a 3,50Å que ocorreram principalmente entre o cetoconazol e o TAC e em menor proporção com a cera. Não foram observadas interações significativas entre o cetoconazol e o SOS e SOO.

Foi observada uma ligação de hidrogênio entre o O-benzeno 61 (ligado ao anel aromático) do cetoconazol e o hidrogênio do grupamento alquila do TAC (H-TAC129) com distância de 2,62 Å. Outra interação entre o O-benzeno 61 do cetoconazol e um hidrogênio de grupamento alquila do TAC (H-TAC105) foi observada com distância de 2,75Å relativa a uma ligação de hidrogênio. O O-alquila 59 do cetoconazol estabeleceu ligação de hidrogênio com o hidrogênio de grupamento alquila do TAC (H-TAC 96) com distância de 3,28Å. Um nitrogênio amino ligado ao anel aromático 55 interagiu com o hidrogênio alquila da cera (H-CER14) estabelecendo ligação de hidrogênio com distância de ligação de 3,50Å.

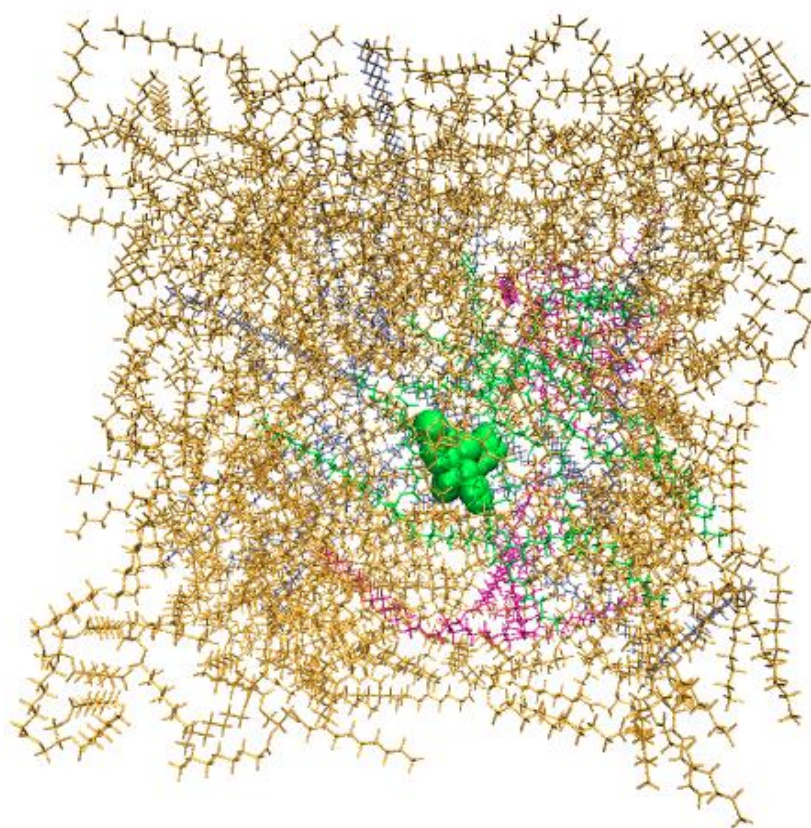


Figura 29. Modelo tridimensional gerado após docking molecular com o cetoconazol.
Fonte: Autor

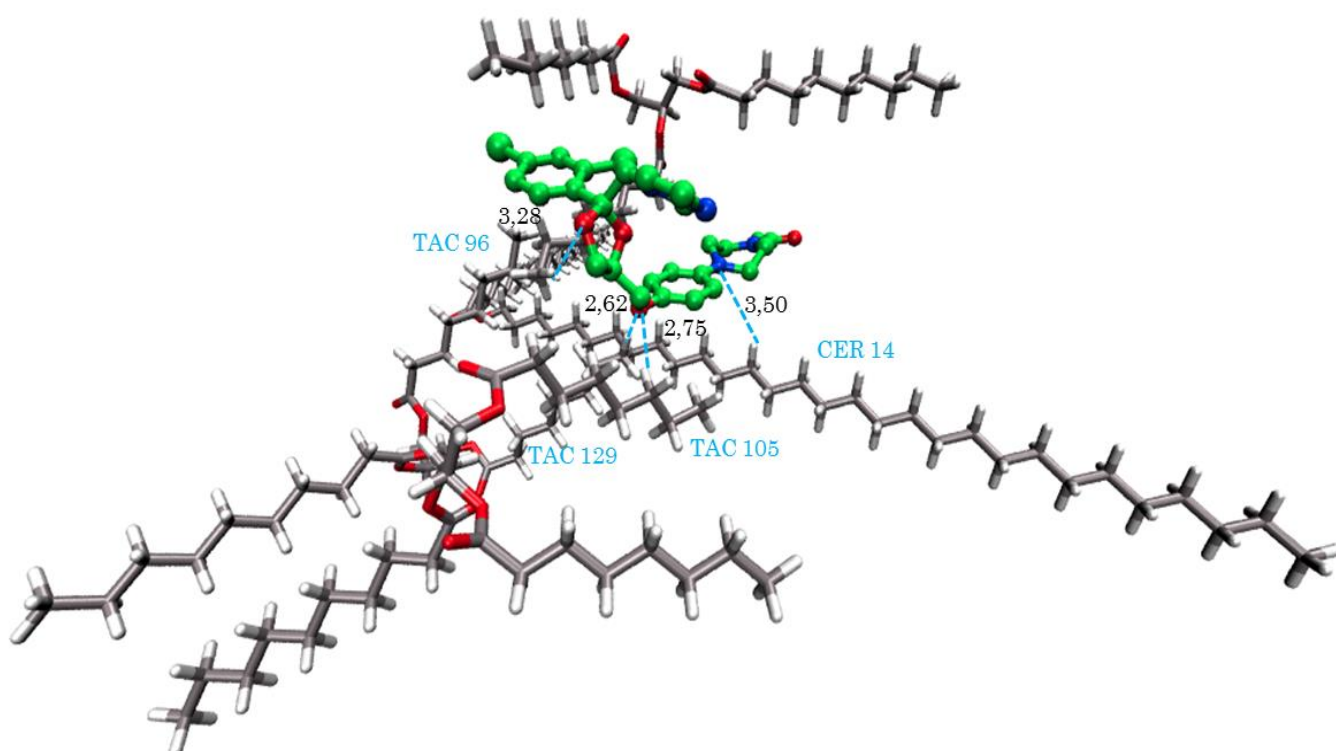


Figura 30. Principais interações com o cetoconazol após docking molecular..
Fonte: Autor.

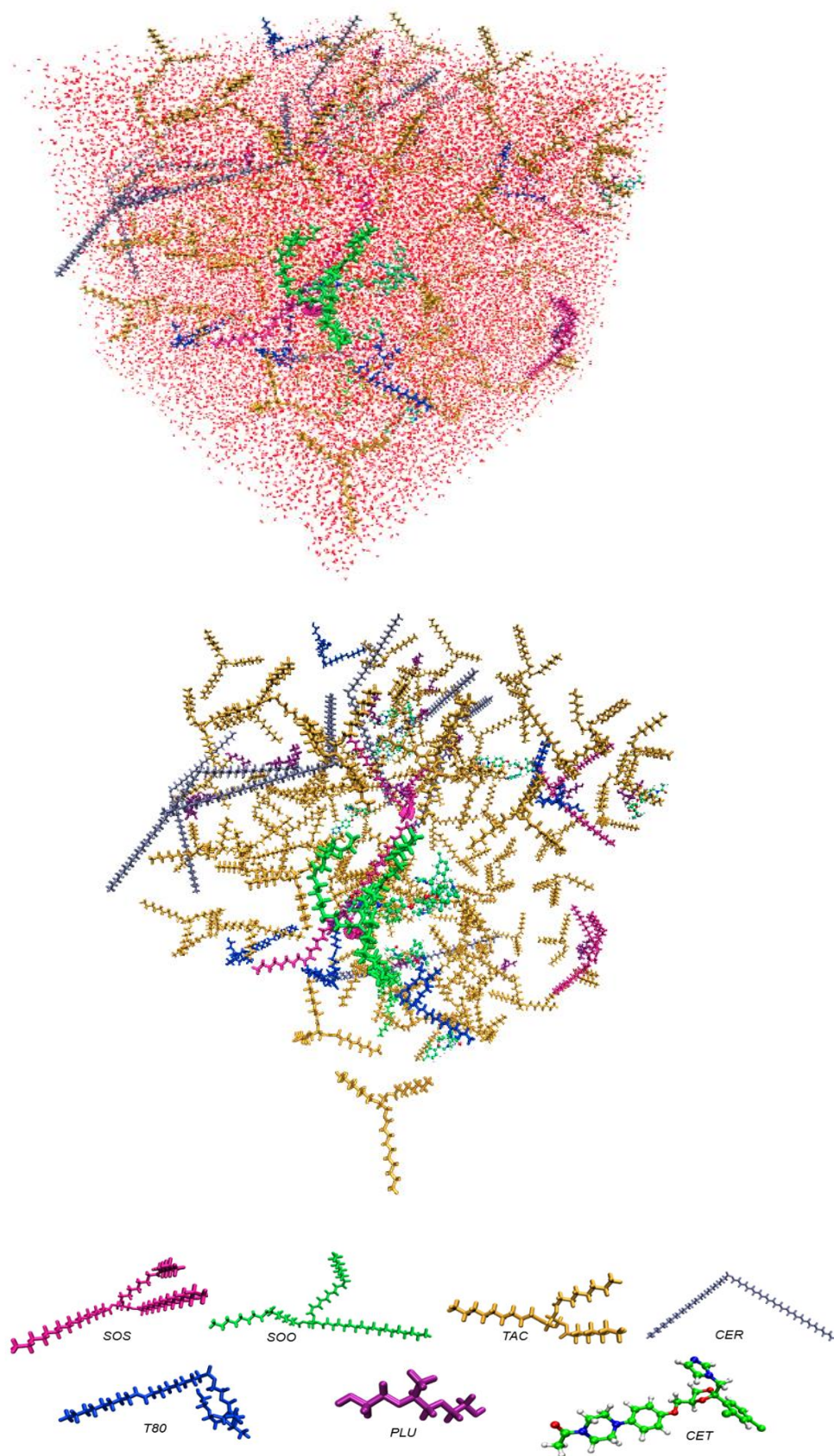
5.7 Simulação de Dinâmica molecular (DM)

Inicialmente um modelo tridimensional do CLN foi gerado com auxílio do software GROMACS, utilizando caixa ortorrômbica de 120Å conforme quantidades estabelecidas na tabela 5 e os compostos utilizados foram o SOS, SOO, cera, TACC, tween 80, pluronic, cetoconazol e água. A visualização do sistema inicial gerado foi feito no programa VMD cujo *snapshot* está representado na figura 31.

Antes da dinâmica molecular foi necessário realizar a minimização da energia do sistema gerado e a termalização (aquecimento gradual) para estabelecer as condições iniciais adequadas para uma simulação de DM. Deste modo, esses são os primeiros passos de uma DM e se denomina de “período de equilíbrio” (ou inicialização), que é variável e finaliza quando se alcança o equilíbrio termodinâmico (NAMBA, SILVA e SILVA, 2008).

Após a dinâmica molecular de 20ns observou-se que o sistema se estabilizou de tal forma que seus compostos se aglomeraram tendendo a um formato esférico (figura 32), semelhante às gotículas da fase oleosa quando dispersas na fase aquosa, estabilizadas por tensoativos, em emulsões de nanopartículas lipídicas (SOUTO et al., 2011; BRUXEL et al., 2012). A energia total do sistema foi de -1895,47 KJ/mol, densidade de 0,9765 kg/m³ e diâmetro médio de 10nm (dimensão relativa à figura 32, sistema não solvatado). A energia total se manteve estável durante a simulação (figura 33) e pode-se dizer que o sistema se manteve estável. A avaliação da flutuação da energia é um parâmetro de grande importância para indicar a consistência e a qualidade das simulações de DM realizadas, por isso é uma das primeiras análises a serem feitas após dinâmica para verificar o equilíbrio termodinâmico alcançado durante a simulação (REBOREDO, 2012).

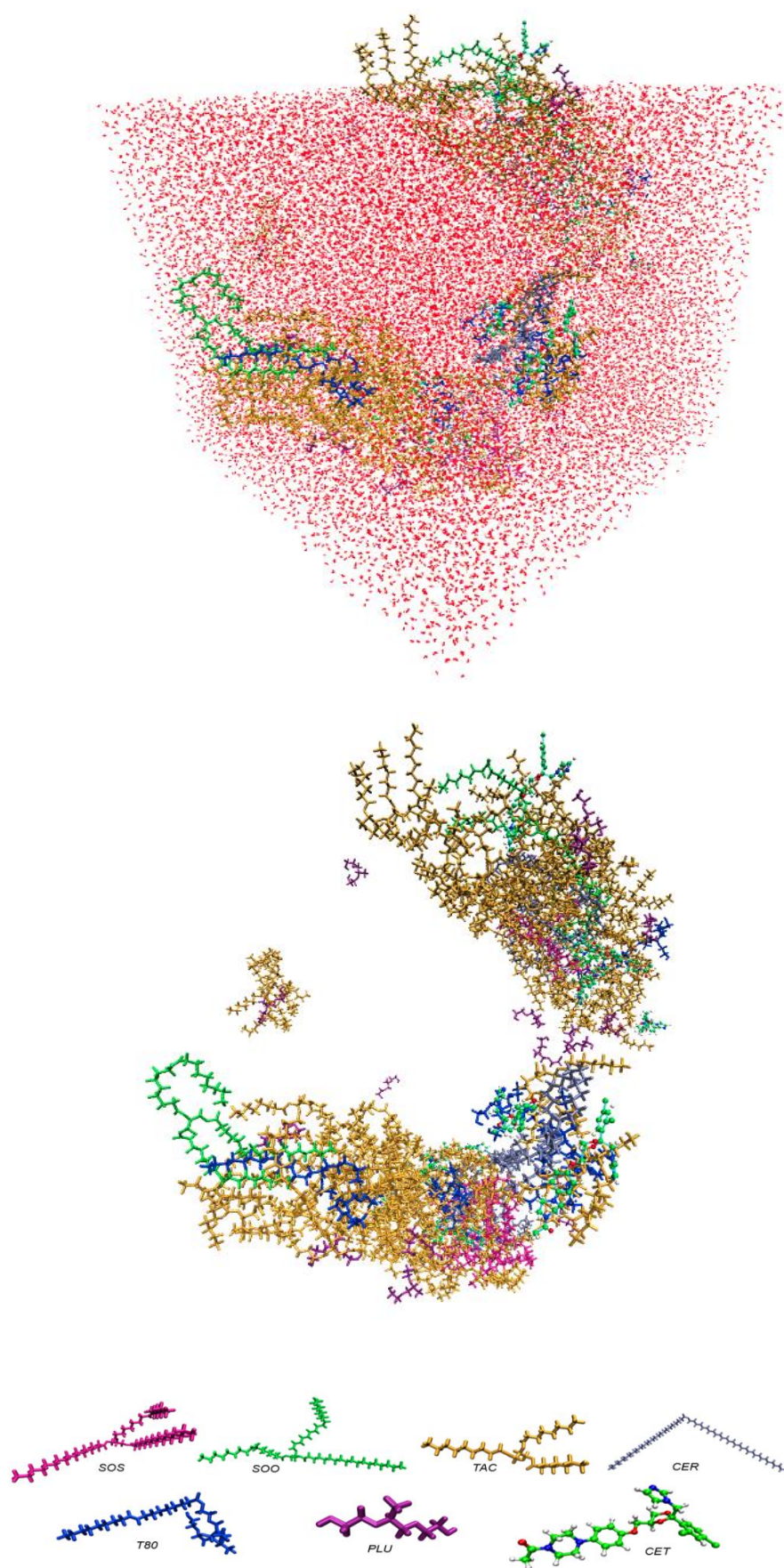
As simulações de dinâmica molecular são ferramentas importantes para a compreensão da estrutura e função das macromoléculas biológicas, uma vez que os átomos e/ou moléculas podem interagir por um período de tempo através de aproximações baseadas nas equações de movimento de Newton que descrevem a mecânica molecular (KARPLUS e MCCAMMON, 2002; LIAO et al., 2011). É uma técnica computacional amplamente utilizada para o estudo de macromolécula biológica e foi muito útil para investigar o comportamento dinâmico do CLN gerado.



Legenda:

Figura 31. Sistema CLN solvatado (superior) e não solvatado (inferior).

Fonte: Autor



Legenda:

Figura 32. Sistema CLN após dinâmica molecular solvatado (superior) e não solvatado (inferior).
Fonte: Autor

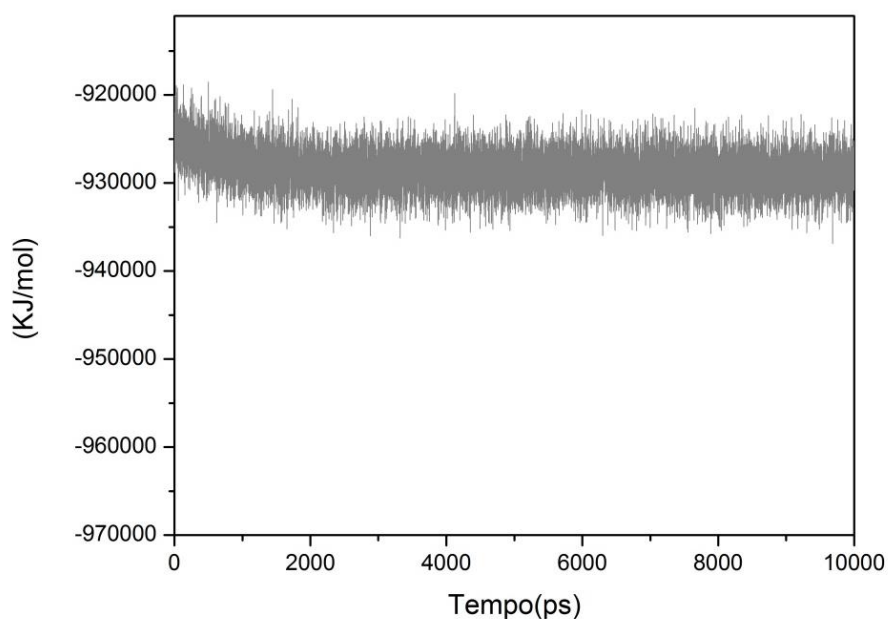


Figura 33. Energia total do sistema.
Fonte: Autor

Após simulações de DM as interações com o cetoconazol observadas foram do tipo ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio são um das mais importantes interações existentes nos sistemas biológicos, sendo responsáveis pela manutenção das conformações bioativas de macromoléculas, e são geralmente formadas entre heteroátomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio, flúor, e o átomo de hidrogênio. (FABIOLA et al., 2002; CHANG, 2009; GLOWACKI et al., 2013). Muitos processos biológicos estão diretamente relacionados com a solubilidade das substâncias, e estas com a formação de ligações, por isso as ligações de hidrogênio estão entre as mais relevantes (MARTINS, LOPES e ANDRADE, 2013).

As ligações de hidrogênio podem ser classificadas como fortes, moderadas e fracas conforme critérios variados, dentre os quais, pode-se destacar a distância de ligação de doador-receptor. Ligações de hidrogênio com distâncias entre 2,2-2,5Å são consideradas fortes, as de 2,5-3,2Å são moderadas e de 3,2-4,0Å são consideradas fracas (JEFFREY e SAENGER, 1991). Deste modo foi estabelecido como principal critério para as interações de interesse, ligações de hidrogênio em que a distância entre átomo doador de hidrogênio e o átomo receptor fossem $\leq 3,5\text{\AA}$.

Na tabela 10 têm-se as principais interações que ocorreram entre o cetoconazol e os demais componentes do CLN com suas respectivas distâncias de

ligação e forças de ligação. As figuras 34, 35, 36, 37, 38 e 39 representam uma visão geral da relação entre o SOS, SOO, Cera, TAC, tween80 e pluronic com o cetoconazol. As figuras 40, 41, 42, 43 e 44 são as principais interações encontradas entre o cetoconazol e dos demais componentes do CLN com distância até 3,5Å, conforme critério estabelecido. Não foram observadas ligações de hidrogênio entre o cetoconazol e o pluronic.

Entre o cetoconazol e o SOS foram observadas ligações de hidrogênio formadas entre o nitrogênio do anel imidazólico do cetoconazol (N-CET131) e o hidrogênio de um grupamento alquila do SOS (H-SOS4) com distância de ligação de 3,09Å. Outra também com o nitrogênio do anel imidazólico de cetoconazol (N-CET 132) e um hidrogênio do grupamento alquila do SOS (H-SOS2) com distância de ligação de 3,17Å. Entre o O-alquila do cetoconazol (O-CET124) e o e o hidrogênio de um grupamento alquila do SOS (H-SOS) foi estabelecido com distância de ligação de 3,50Å.

Entre o SOO e o cetoconazol as ligações de hidrogênio tiveram distâncias de 2,82Å entre oxigênio do grupo acilo (COO) do SOO (O-SOO5) e o hidrogênio de um grupamento alquila do cetoconazol (H-CET125); Com 3,42Å foi estabelecido entre o N-ligado ao benzeno do cetoconazol (N-CET125) e o hidrogênio do grupamento alquila do SOO (H-SOO5); E com 3,40Å a ligação foi estabelecida entre oxigênio do grupo acilo (COO) do SOO (O-SOO5) e o hidrogênio de um grupamento alquila do cetoconazol (H-CET125).

Entre a cera e o cetoconazol foi observada apenas uma ligação de hidrogênio formada entre o oxigênio de carbonila do cetoconazol (O-CET125) e hidrogênio do grupamento alquila da cera (H-CER10). Já com o tween 80 (T8015) o cetoconazol (CET127) estabeleceu ligações de hidrogênio de 3,08Å entre um oxigênio do grupo acilo e hidrogênio do anel aromático, outra de 3,19Å entre oxigênio ligado ao benzeno e o hidrogênio de um grupamento alquila; E com outra molécula de cetoconazol (CET131) teve distância de 3,25Å entre N-benzeno (ligado ao benzeno) e o hidrogênio de grupamento alquila do tween 80.

Já com o TAC foram observadas mais interações em relação às demais, um total de quatorze interações com o cetoconazol. Uma primeira ligação de hidrogênio foi observada em 2,57Å entre o O-alquila do cetoconazol (O-CET130) e o hidrogênio alquila do TAC (H-TAC61), nessas mesmas moléculas foi observada outra entre o N-alquila do anel imidazólico e hidrogênio de um grupamento alquila de 3,40Å. Entre o

N-alquila do anel imidazólico (N-CET127) e H-alquila (H-TAC 56) de 3,40Å, outra de 3,23Å entre O-alquila (O-CET127) e H-alquila (H-TAC 58), entre o mesmo átomo do cetoconazol O-alquila (O-CET127) e H-alquila (H-TAC 62) de 3,38Å, e uma de 3,43Å entre o O-benzeno (O-CET127) e hidrogênio (H-TAC 62). Outras ligações de hidrogênio foram observadas entre O-acilo (O-TAC 121) e H-cicloalquila (H-CET 131) de 3,20Å, entre O-acilo (O-TAC 88) e hidrogênio de grupo alquila (H-CET131) de 2,74Å e entre o O-benzeno (O-CET131) e hidrogênio de grupo alquila (H-TAC 63) de 3,43Å.

Outras também foram observadas com distância de 2,82Å entre o O-benzeno (O-CET 128) e H-alquila (H-TAC 117), de 2,96Å entre O-acilo (O-TAC 117) e H-alquila (H-CET 128), entre O-acilo (O-TAC51) e hidrogênio (H-CET 123) de 2,69Å, outra de 2,45Å entre o N-alquila do anel imidazólico (N-CET129) e um hidrogênio alquila (H-TAC 116) e uma de 2,95Å entre o oxigênio da carbonila que forma o grupo acilo do cetoconazol (O-CET 129) e o hidrogênio alquila (H-TAC 76).

Tabela 10. Principais interações entre o cetoconazol e os demais componentes do CLN após a dinâmica molecular.

	Interações	Distância (Å)	Força relativa
SOS	SOS 4 (H) : (N) CET 131	3,09	Moderada
	SOS 2 (H) : (N) CET 132	3,17	Moderada
	SOS 2 (H) : (O) CET 124	3,50	Fraca
SOO	SOO 5 (O) : (H) CET 125	2,82	Moderada
	SOO 5 (O) : (H) CET 125	3,40	Fraca
	SOO 5 (H) : (N) CET 125	3,42	Fraca
CERA	CER 10 (H) : (O) CET 125	3,30	Fraca
TAC	TAC 61 (H) : (O) CET 130	2,57	Moderada
	TAC 61 (H) : (N) CET 130	3,40	Fraca
	TAC 58 (H) : (O) CET 127	3,43	Fraca
	TAC 58 (H) : (O) CET 127	3,23	Fraca
	TAC 62 (H) : (O) CET 127	3,38	Fraca
	TAC 63 (H) : (O) CET 131	3,43	Fraca
	TAC 88 (O) : (H) CET 131	2,74	Moderada
	TAC 56 (H) : (N) CET 127	3,40	Fraca
	TAC 121 (O) : (H) CET 131	3,20	Fraca
	TAC 117 (O) : (H) CET 128	2,96	Moderada
	TAC 117 (H) : (O) CET 128	2,82	Moderada
	TAC 51 (O) : (H) CET 123	2,69	Moderada
	TAC 76 (H) : (O) CET 129	2,95	Moderada
	TAC 116 (H) : (N) CET 129	2,45	Forte
TWEEN 80	T80 15 (H) : (O) CET 127	3,19	Moderada
	T80 15 (O) : (H) CET 127	3,08	Moderada
	T80 15 (H) : (N) CET 131	3,25	Fraca

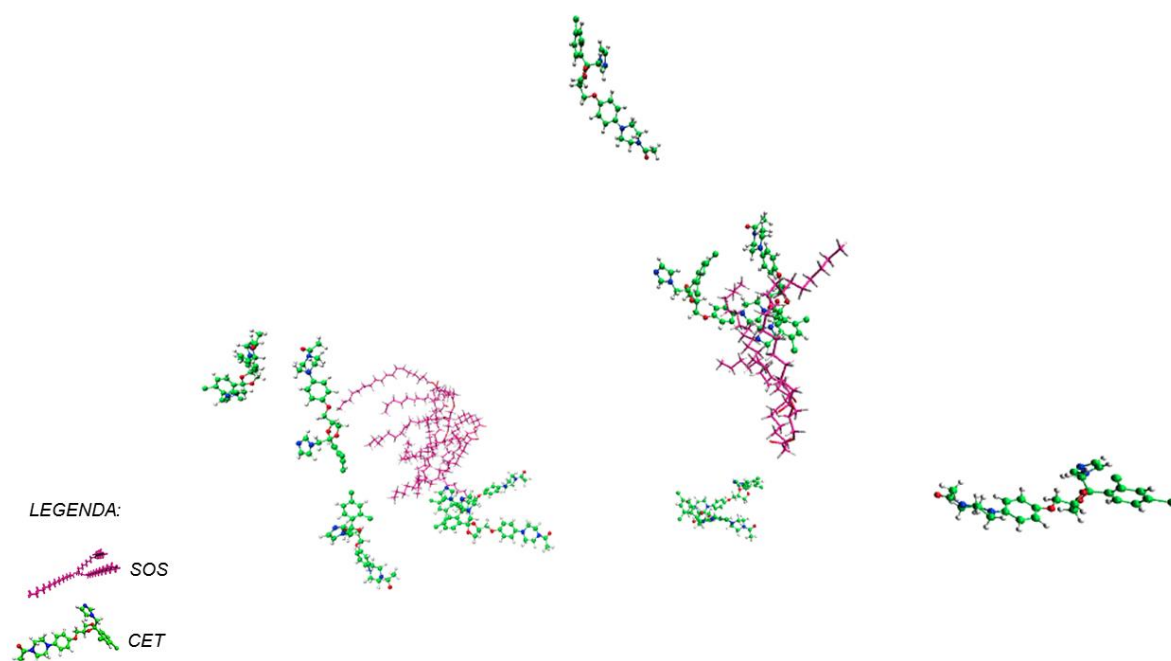


Figura 34. *Snapshot* da relação do SOS (rosa) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

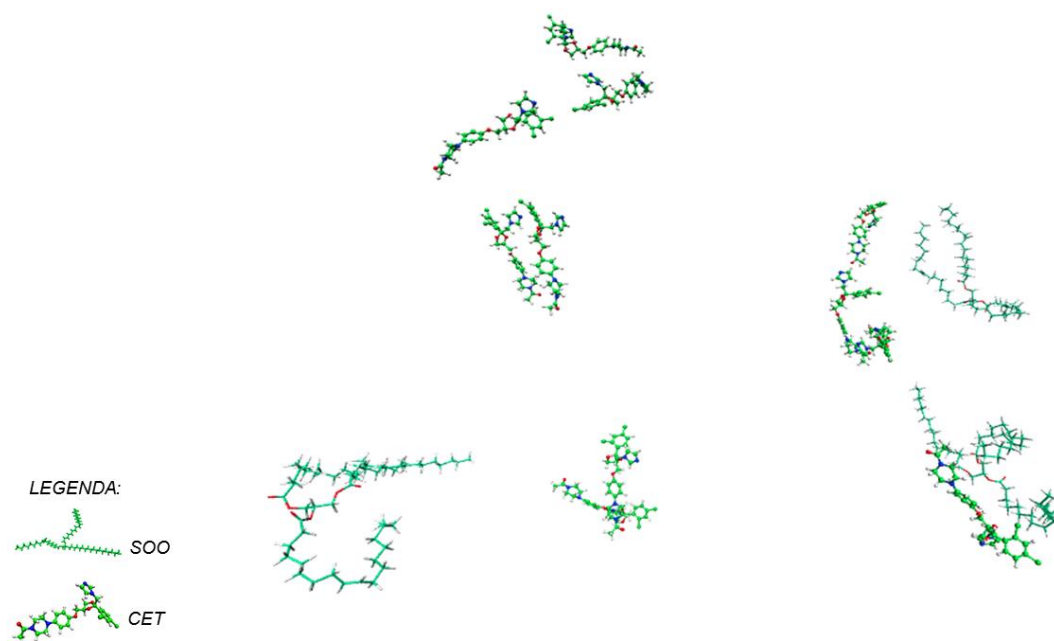


Figura 35. *Snapshot* da relação do SOO (verde claro) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

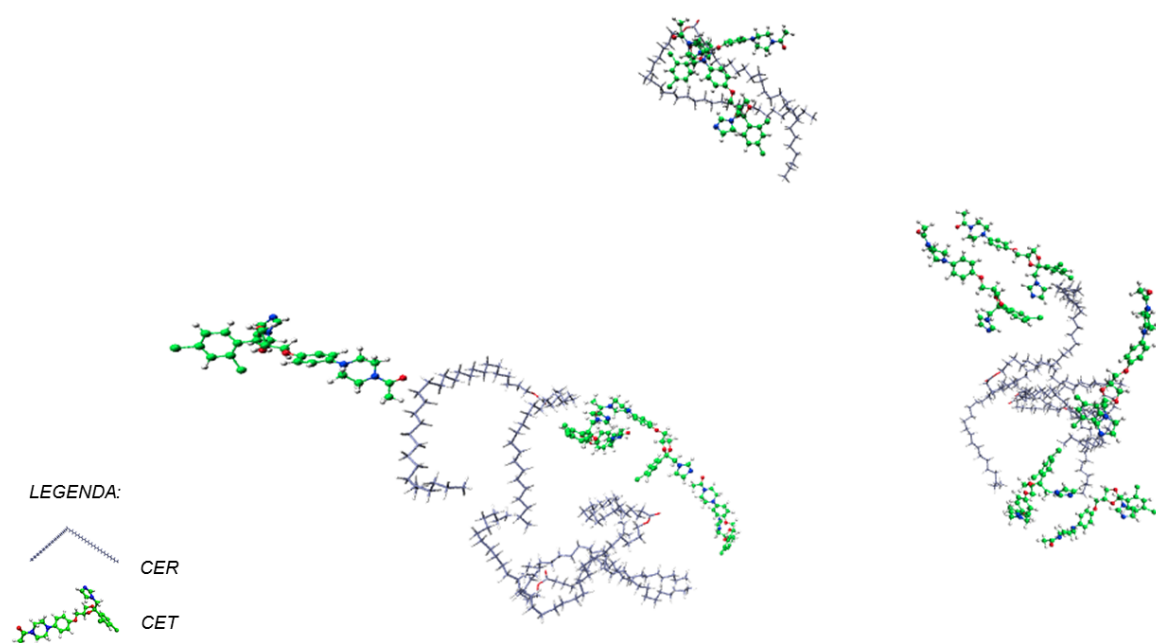


Figura 36. *Snapshot* da relação da cera (cinza) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

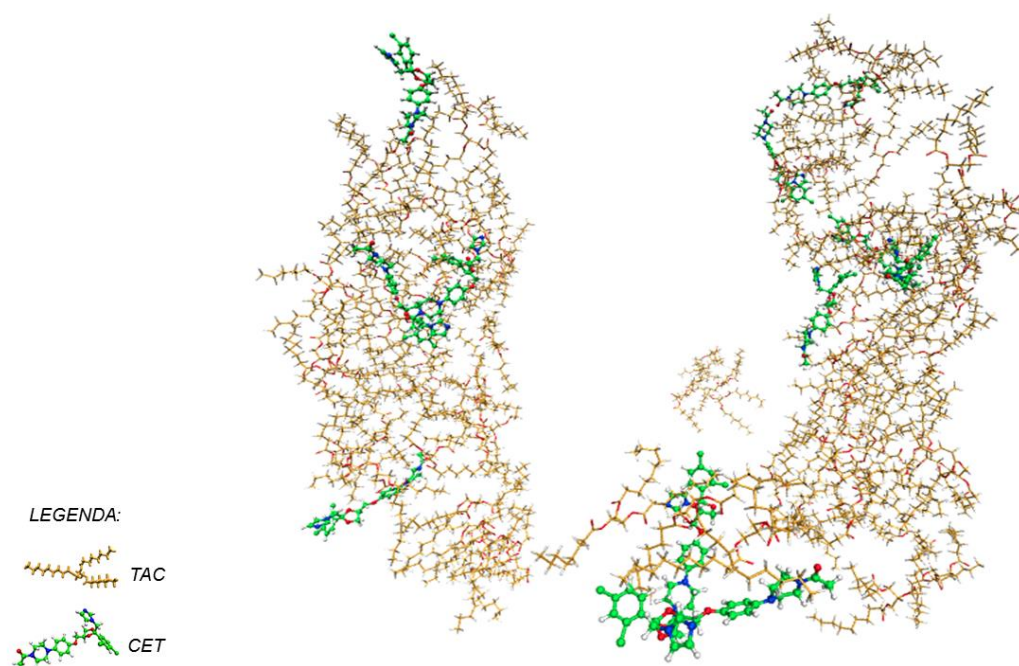


Figura 37. *Snapshot* da relação do TAC (amarelo) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

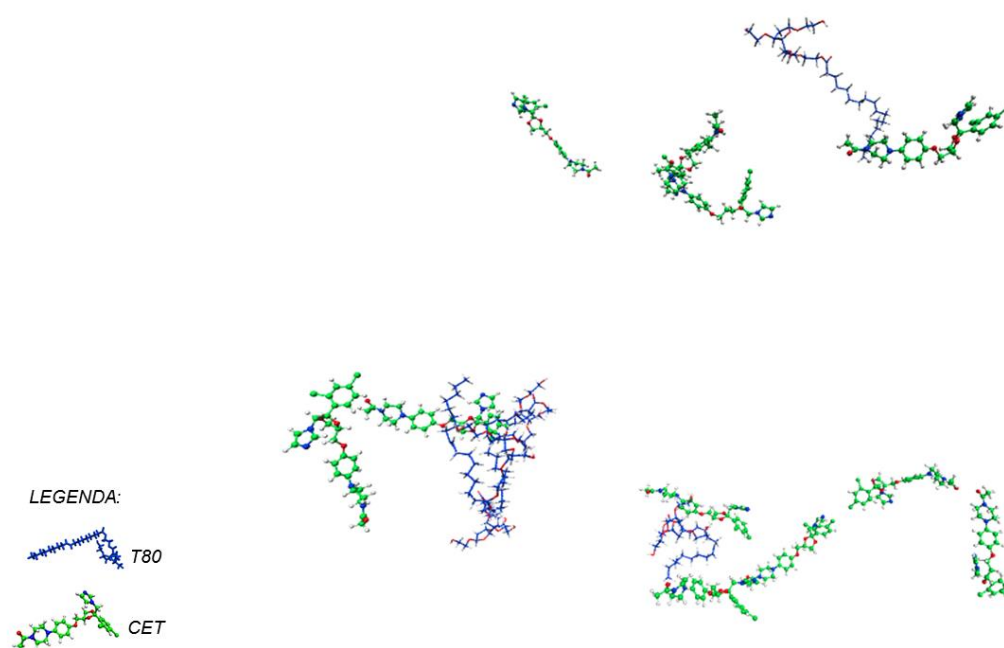


Figura 38. *Snapshot* da relação do tween 80 (azul) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

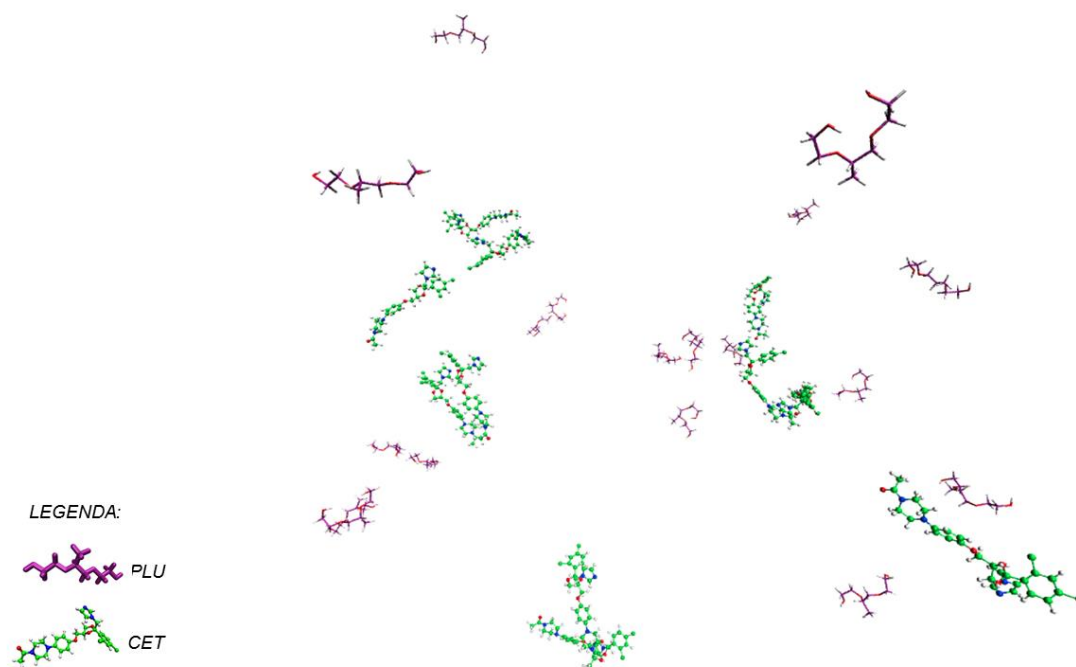


Figura 39. *Snapshot* da relação do pluronic (lilás) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

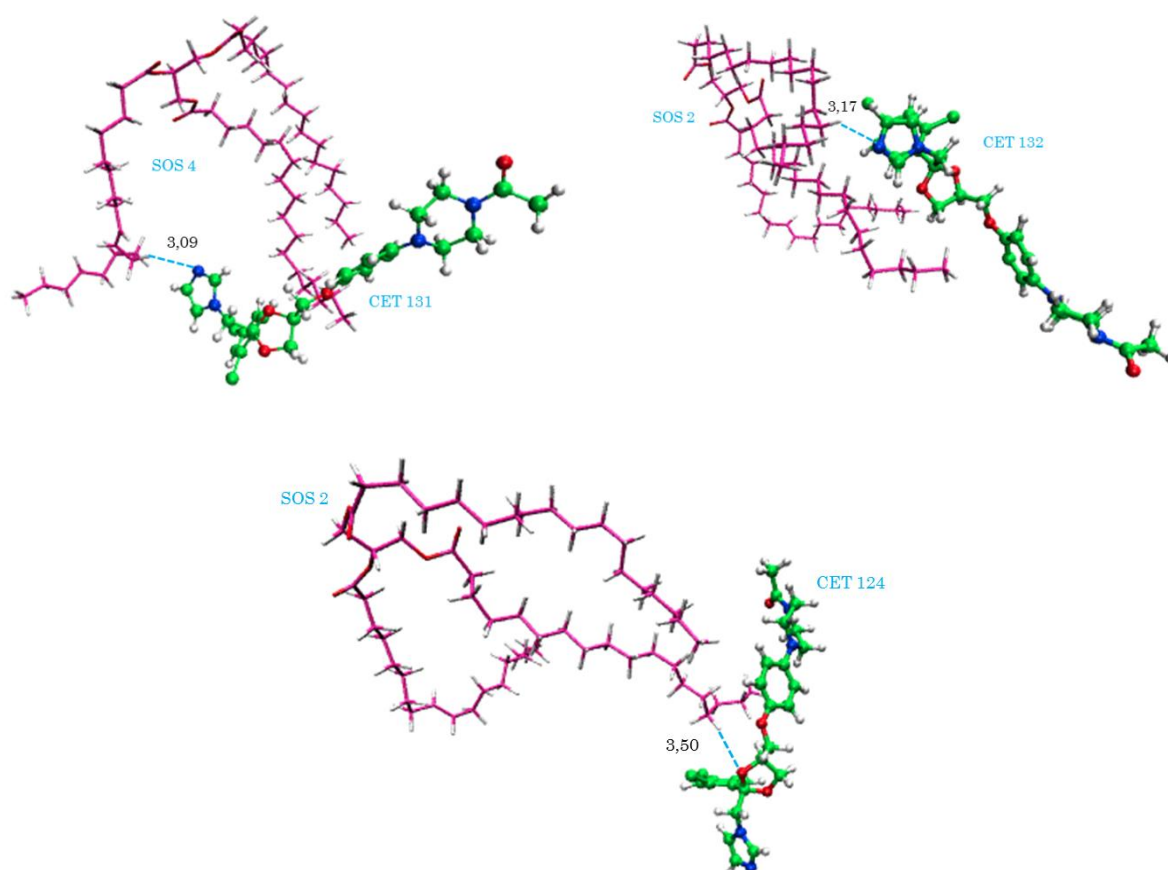


Figura 40. Snapshot das principais interações do SOS (rosa) com o cetozonazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

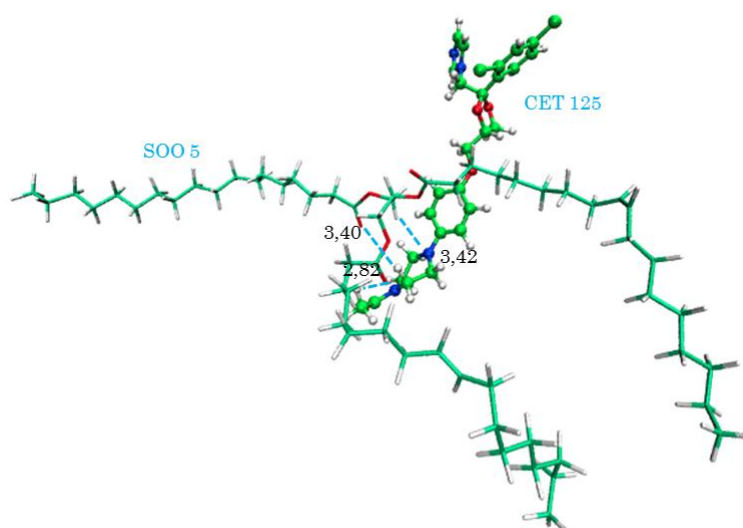


Figura 41. Snapshot das principais interações do SOO (verde claro) com o cetozonazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

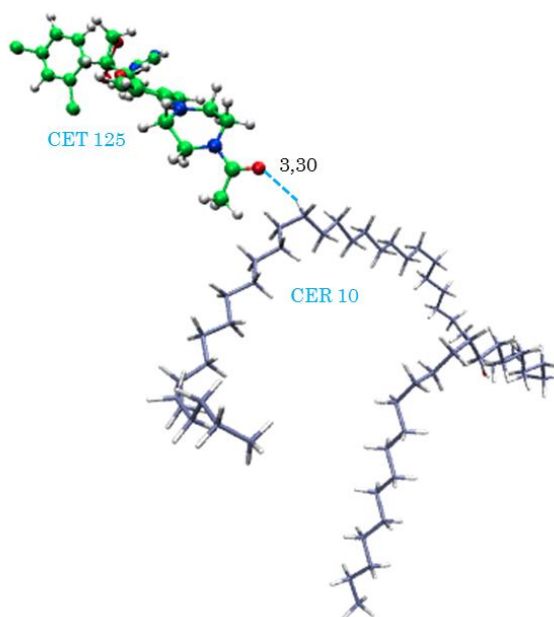


Figura 42. *Snapshot* da principal interação da cera (cinza) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

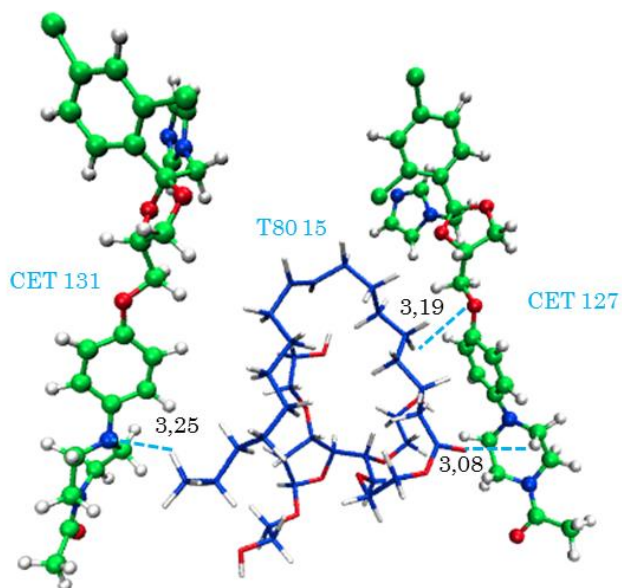


Figura 43. *Snapshot* das principais interações do tween 80 (azul) com o cetoconazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

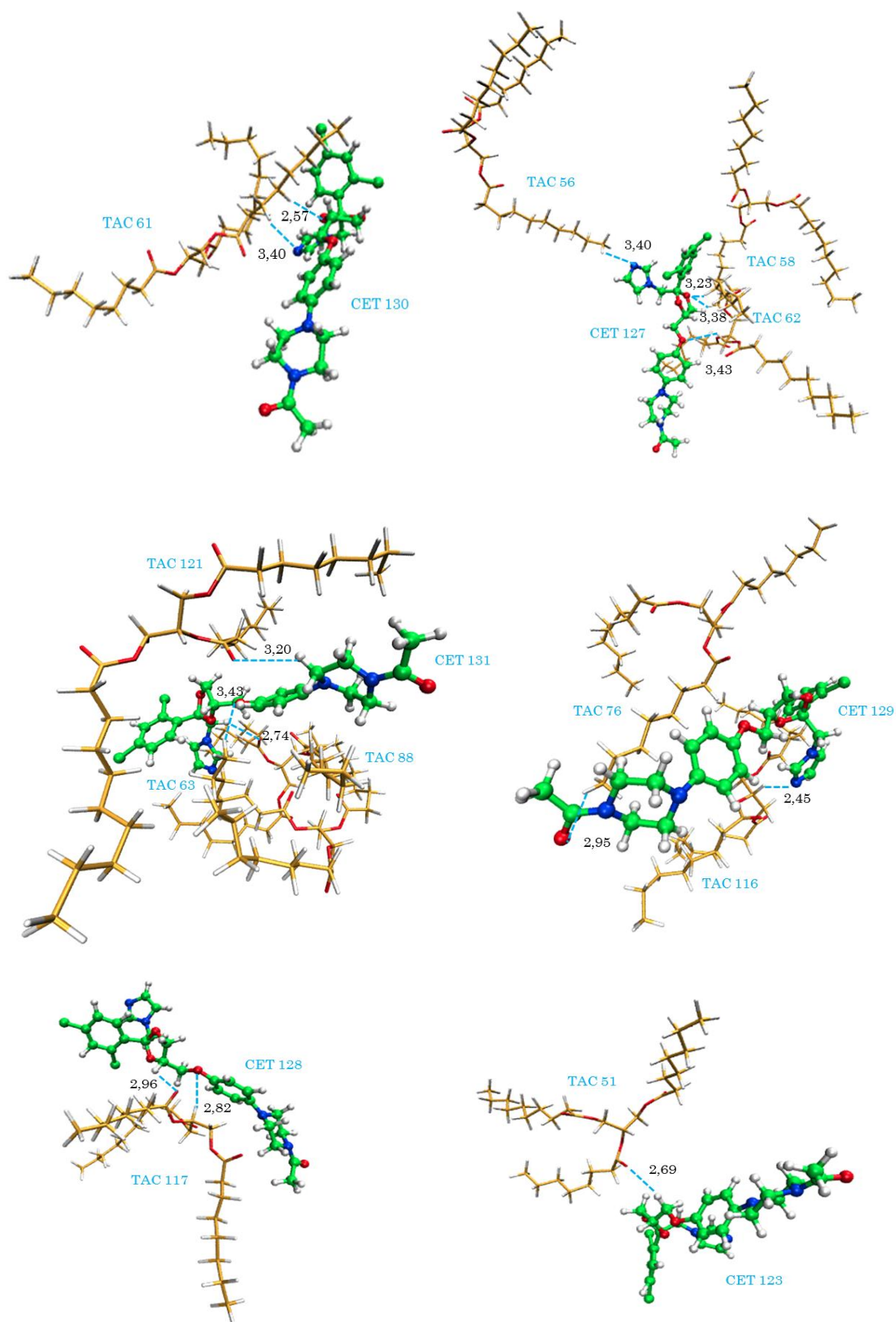


Figura 44. Snapshot das principais interações do TAC (amarelo) com o cetozonazol (verde) no CLN.
Fonte: Autor

5.8 Distribuição Radial (RDF)

Além das interações foi obtido após a dinâmica molécula um importante parâmetro para avaliar a distribuição e as interações com outras moléculas nos sistemas estudados, a função da distribuição radial ou RDF. O RDF representa a probabilidade de se encontrar um átomo ou molécula em uma concha esférica a certa distância (r) de um átomo ou molécula de referência. O RDF, $g(r)$, fornece uma estimativa de conformação espacial de átomos e/ou moléculas em relação a um focal e demonstra um ordenamento em longo alcance na estrutura ou sistema (RAZMIMANESH, AMJAD-IRANAGH e MODARRESS, 2015).

Na figura 45 tem-se o diagrama RDF com o cetoconazol como molécula de referência e relacionado com SOS (SOS), SOO (SOO), cera (CER), TAC (TAC) e tween 80 (T80) em sistema insento de moléculas de água, calculado com distância de até $3,5\text{\AA}$ da molécula referência. Não foram observadas interações com o pluronic. Em torno de $2\text{\AA}$ foi observado um pico bem definido e discreto com a cera, registrando sua primeira interação de menor distância. Seguido de picos bem definidos e discretos em torno de 2 a $2,5\text{\AA}$ de interação com o tween 80, SOO, SOS e TAC. O perfil RDF do cetoconazol mostrou que as interações com picos de maior intensidade ocorreram com moléculas de tween 80 sugerindo maior proximidade e/ou afinidade deste. De modo geral foram observadas interações a partir de aproximadamente $2,0\text{\AA}$ de distância.

Na figura 46 tem-se o diagrama RDF em que a água (SOL) é a molécula de referência em relação ao cetoconazol (CET), SOS (SOS), SOO (SOO), cera (CER), TAC (TAC), tween 80 (T80) e pluronic (PLU), calculado com distância de até $3,5\text{\AA}$. Picos bem definidos e discretos foram observados na distância em torno de $2,0\text{\AA}$ em relação ao Pluronic e $2,5\text{\AA}$ em relação ao tween 80. Foram observadas que curvas de maior intensidade foram obtidas pela interação com o pluronic, que pode sugerir moléculas do mesmo com caráter mais hidrofílico nesta distância. Pois em ambientes aquosos, em que se tem a água como referência, os picos mais altos sugerem maior caráter hidrofílico e os mais baixos sugerem maior quantidade de regiões hidrofóbicas (WANG et al., 2013).

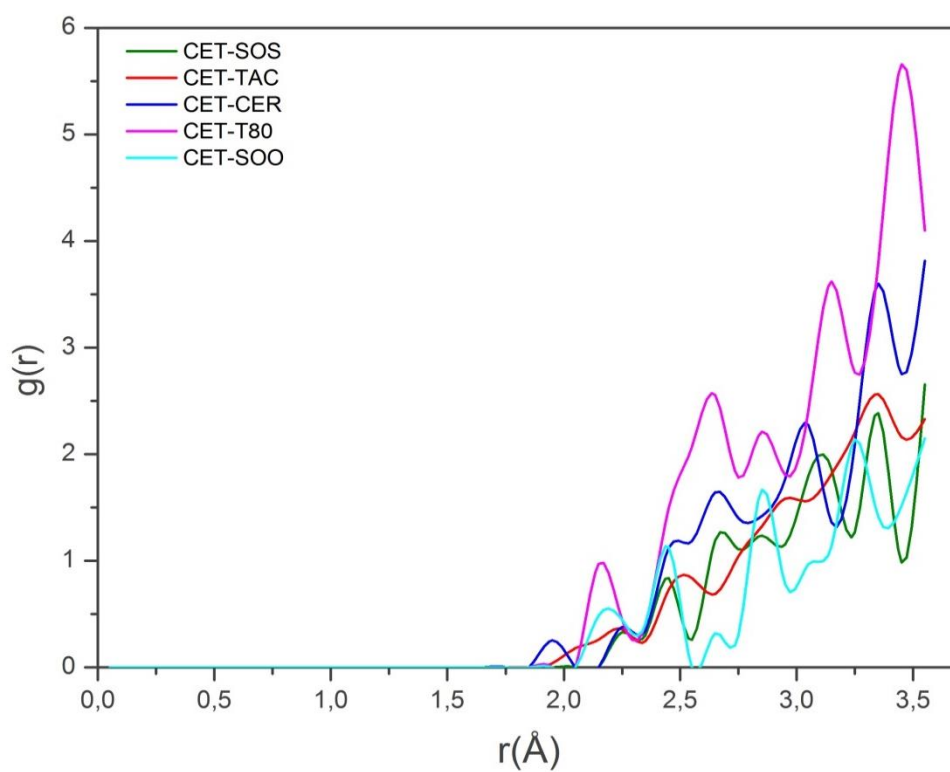


Figura 45. Diagrama RDF do cetoconazol (CET) com os demais componentes do sistema CLN isento de água.

Fonte: Autor

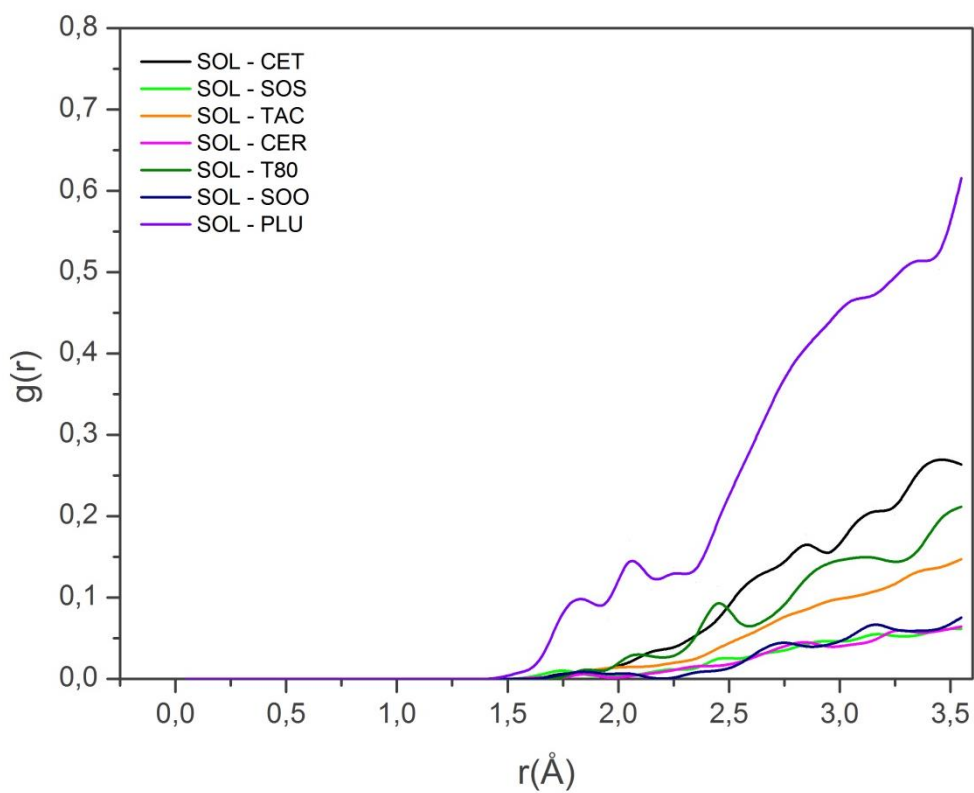


Figura 46. Diagrama RDF da água (SOL) com os demais componentes do sistema CLN.

Fonte: Autor

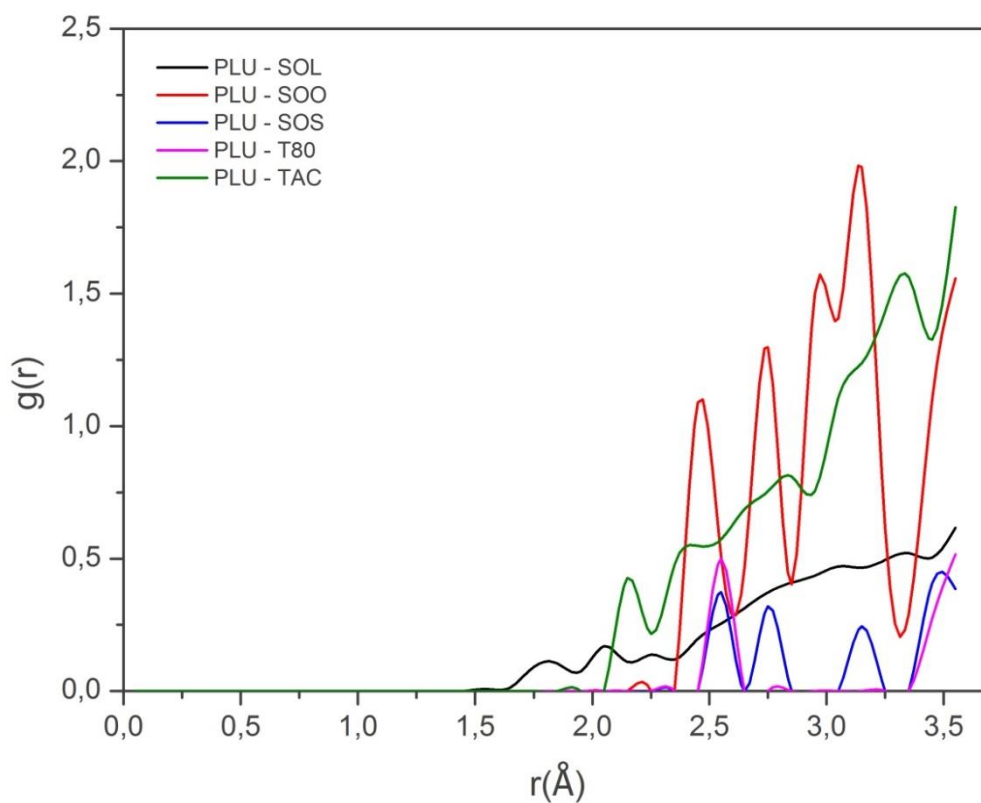


Figura 47. Diagrama RDF do pluronic (PLU) com os demais componentes do sistema CLN.
Fonte: Autor

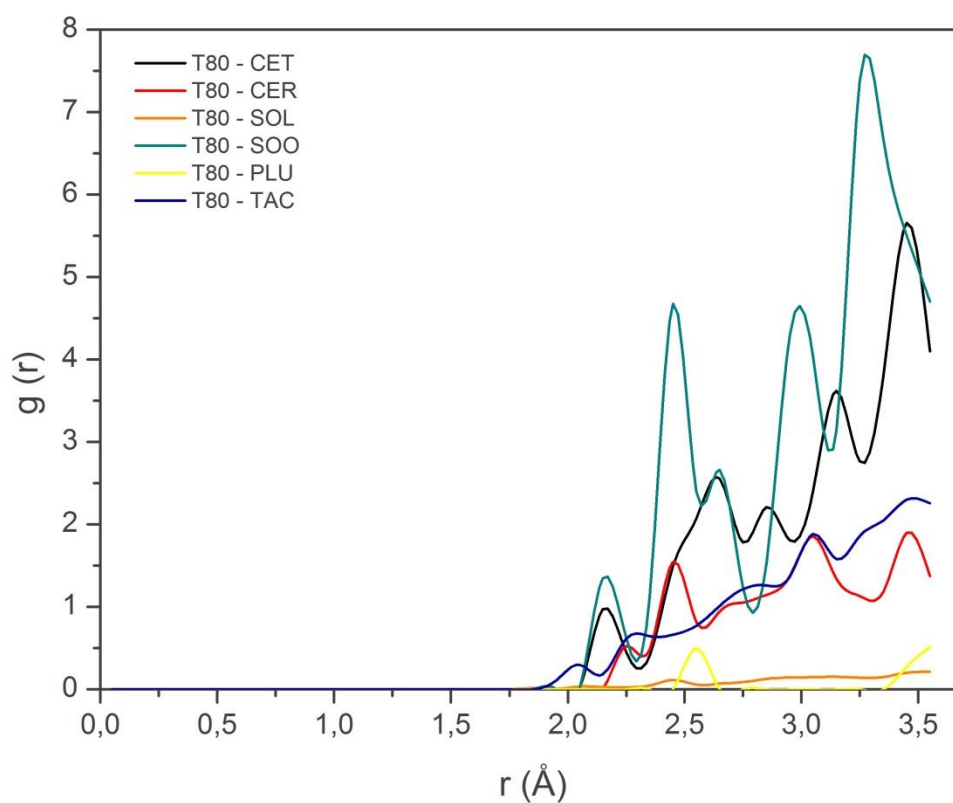


Figura 48. Diagrama RDF do tween 80 (T80) com os demais componentes do sistema CLN.
Fonte: Autor

Na figura 47 tem-se o diagrama RDF em que o pluronic (PLU) é a molécula de referência em relação ao SOS (SOS), SOO (SOO), TAC (TAC), tween 80 (T80) e água (SOL), calculado com distância de até 3,5Å. Não foram obtidas interações com a cera e com o cetoconazol. Um pico discreto com a água foi observado em torno de 1,75Å, seguido de pico bem definido de média intensidade em torno de 2,25Å, tem-se um pico bem definido e de média intensidade com o TAC e em torno de 2,5Å e outros picos bem definidos de alta intensidade com o SOO e de média intensidade com o Tween 80 e SOS. De modo geral, interações de maior intensidade ocorreram em relação ao SOO, sugerindo a existência de moléculas deste com maior afinidade ao pluronic.

Na figura 48 tem-se o diagrama RDF em que o tween 80 (T80) é a molécula de referência em relação ao cetoconazol (CET), cera, (CER), SOO (SOO), TAC (TAC), pluronic (PLU) e água (SOL). Foi observado o primeiro pico bem definido e de baixa intensidade em torno de 2,0Å devido interação com TAC, em torno de 2,25Å tem-se o primeiro pico de interação de média intensidade com o Cetoconazol e com o SOO e na faixa de 2,5Å também foram observados picos de média intensidade de interação com a cera e outro bem discreto com o pluronic. A interação com a água foi relativamente insignificativa. De modo geral, o tween 80 teve interações mais fortes com o SOO e com o cetoconazol.

O RDF pode fornecer uma visão sobre como os átomos estão localizados, em que a posição do primeiro pico no diagrama RDF representa a distância mais próxima entre os dois átomos e a probabilidade de um átomo aparecerem a essa distância seria demonstrado pela primeira altura do pico (RAZMIMANESH, AMJAD-IRANAGH e MODARRESS, 2015). Deste modo, com os perfis RDF's obtidos pode-se estimar a conformação espacial e a disposição relativa às moléculas no CLN. A figura 49 fornece uma proposta para descrever o ambiente em torno do cetoconazol e na interface dos tensoativos, em que se tem o compostos hidrofílicos mais afastados do fármaco e os lipofílicos mais próximos e na região intermediária o SOS, SOO, TAC e tween80.

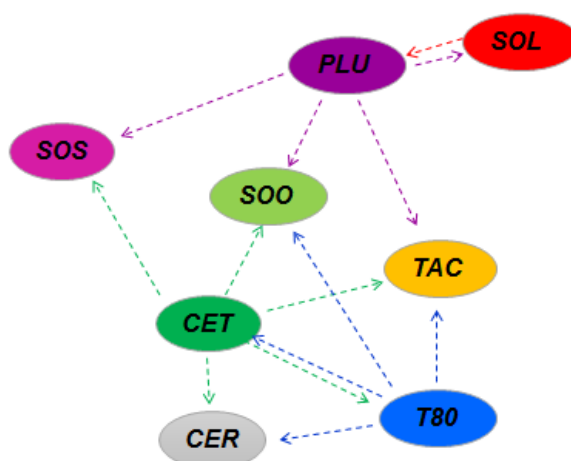


Figura 49. Estimativa da distribuição dos compostos no sistema CLN após dinâmica molecular com base nos diagramas RDF.

Fonte: Autor

Avaliar as interações após a dinâmica molecular pode fornecer importantes informações para a compreensão do sistema CLN montado. As ligações de hidrogênio estão entre as interações responsáveis pelo ordenamento cristalino de um sistema, as forças de atração que unem os átomos em uma rede cristalina são diretamente proporcionais ao ordenamento cristalino, ou seja quanto mais forte as ligações, mais coesos estão os átomos da rede e maior o ordenamento cristalino (KLEIN e DUTROW, 2009), o que poderia influenciar diretamente na taxa liberação e difusão do fármaco encapsulado em nanopartículas (ATTAMA, MOMOH e BUILDERS, 2012) em comparação a um sistema experimental.

O encapsulamento do fármaco, a permeabilidade no alvo e a liberação do ativo (WINIWARTER et al., 2003; DESAI, RAUB e BLANCO, 2012; WANG et al., 2013) são parâmetros que tem influência da ligação de hidrogênio e da sua força relativa. Wang et al. (2011) desenvolveram micelas de copolímero para encapsular doxorrubicina e observou que as ligações de hidrogênio contribuíram para a liberação rápida da droga.

Para o sistema CLN obtido houve a predominância de ligações de hidrogênio moderadas a fracas, o que pode sugerir que o sistema proposto neste trabalho apresenta estrutura de menor ordenamento cristalino e com regiões amorfas. Deste modo, pode-se sugerir uma boa condição para a difusão do cetoconazol.

6. CONCLUSÃO

Foi possível obter sete estruturas tridimensionais otimizadas e superfícies do mapa do potencial eletrostático descreveram bem a distribuição das cargas nas moléculas com potenciais eletrostáticos positivos ao redor, principalmente, de átomos de hidrogênio e potenciais eletrostáticos negativos ao redor de átomos mais eletronegativos. As energias HOMO, LUMO e o intervalo *Gap* (H-L) demonstraram respectivamente, que o SOO e o cetoconazol contém átomos com maior capacidade doadora de elétrons, o SOS e cetoconazol apresentam átomos mais aceitadores de elétrons e as moléculas mais reativas são o TACC e o pluronic.

O modelo tridimensional da mistura lipídica gerado teve moléculas que permaneceram bem distribuídas e sem possíveis desestabilizações, mesmo a pós a inclusão do fármaco. A partir dos estudos de Docagem Molecular e Dinâmica Molecular foi gerado um modelo satisfatório do CLN contendo o fármaco cetoconazol. Este sistema se manteve estável durante toda simulação de dinâmica molecular e ao término foram observadas interações de ligações de hidrogênio de forças relativas predominantemente moderadas e fracas. Estas interações pode sugerir que este CLN, nas proporções estudadas de seus componentes, não limite a difusão do fármaco, porém estudos computacionais adicionais e mais aprofundados são necessários para inferir com exatidão o comportamento do cetoconazol.

Este modelo tridimensional do CLN pode ser usado para estudo computacional dos demais estágios de desenvolvimento a avaliação de sistema de liberação controlada de fármacos lipofílicos, bem como auxiliar em um planejamento experimental de formulações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, R. E.; BARON, R.; MCCAMMON, J. A. An improved relaxed complex scheme for receptor flexibility in computer-aided drug design. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 22, n. 9, p. 693–705, 2008.
- ANDRADE, C. H.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. MODELAGEM MOLECULAR NO ENSINO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 1, p. 23, 2010.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier editora, 2000.
- ARAUJO, J.; NIKOLIC, S.; EGEA, M.A.; SOUTO, E.B.; GARCIA, M.L. Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery to the posterior segment of the eye. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 150–157, 2011.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades Química-Quânticas Empregadas em Estudos das Relações Estrutura-Atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- ATTAMA, A. A.; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**, p. 107–140, 2012.
- AVERINA, E. S.; SEEWALD, G.; MULLER, R.H.; RADNA, L.D.; POPOV, D.V. Nanostructured lipid carriers (NLC) on the basis of Siberian pine (*Pinus sibirica*) seed oil. **Pharmazie**, v. 65, n. 1, p. 25–31, 2010.
- AZEVEDO, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, conseqüências e perspectivas**. Tese de Doutorado—Campinas: Universidade Estadual de campinas, 2005.
- BALOGH, T.; VELASCO, M.; PEDRIALI, C. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.
- BARBOSA, C. **Da floresta às prateleiras: o protagonismo da biodiversidade vegetal da Amazônia**. Disponível em: <<http://www.fucapi.br/tec/2014/03/31/da-floresta-as-prateleiras-o-protagonismo-da-biodiversidade-vegetal-da-amazonia/>>.
- BATTISTI, M. V. **A química feita no computador: Metodologia, tempo de processamento, termoquímica**. 1 ed. São Paulo: Biblioteca 24 horas, 2011.
- BERGER, R. Computational Chemistry. Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics. By Errol G. Lewars. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 38, p. 4979–4980, 2004.

BLEICHER, K. H.; BÖHM, H.J.; MÜLLER, K.; ALANINE, A. A guide to drug discovery: Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 369–378, 2003.

BOOCK, K. P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacao*)**. Tese de doutorado- São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.

BRANCOLINI, G. et al. Docking of Ubiquitin to Gold Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 11, p. 9863–9878, 2012.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsions as parenteral drug delivery systems. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CAMPEBELL, M. K.; FARRELL, S. O. Lipids and proteins are associated in biological membranes. **Biochemistry**, Chapter 8 p. 197–198, 2012.

CARVALHO, A. V. **Extração, concentração e caracterização físico-química e funcional das proteínas de semente de cupuaçu**. Tese de doutorado - Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CARVALHO, F. P. A. DE; GOMES, J. M. A. Eco-eficiência na produção de cera de Carnaúba no município de Campo Maior, Piauí, 2004. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 2, p. 421–453, 2008.

CARVALHO, I. PUPO, M.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.

CHANG, R. **Química Geral**. 4ed. AMGH Editora, 2009.

CHENG, Z. TSAI, T.; HUANG, Z.; FANG, J. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorganic Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 149–162, 2003.

COELHO, L. W. et al. APLICAÇÃO DE MECÂNICA MOLECULAR EM QUÍMICA INORGÂNICA. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 396–404, 1999.

COHEN, A. J.; MORI-SÁNCHEZ, P.; YANG, W. Challenges for Density Functional Theory. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 1, p. 289–320, 2012.

COHEN, E. M. L. **um estudo do efeito da flexibilidade explícita da enzima InhA de *M. tuberculosis* na dogame molecular dos inibidores etionamida, triclosano e isoniazida-pentacionoferrato II**. Dissertação de mestrado - Rio Grande do Sul: Pontifícia Universidade católica do Rio Grande do Sul, 2010.

COHEN, K. DE O.; JACKIX, M. DE N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 25, n. 1, p. 182–190, 2005.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. DE N. H. **Características químicas e físicas da gordura de cupuaçu e manteiga de cacau**. 1 ed. Distrito Federal : Embrapa (DF), 2009.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa**. Tese de Doutorado - São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001.

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, propriedades e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2011.

DAN, N. Nanostructured Lipid Carriers: Effect of Solid Phase Fraction and Distribution on the Release of Encapsulated Materials. **Langmuir**, v. 30, n. 46, p. 13809–13814, 2014.

DAN, N. Compound release from core–shell carriers triggered by oscillating fields: Monte Carlo simulations. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 80–86, 2015.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012.

DE AZEVEDO, A. A.; KOPCAK, U.; MOHAMED, R. Extraction of fat from fermented Cupuaçu seeds with supercritical solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, n. 2, p. 223–237, 2003.

DE MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Revista parcerias estratégicas**, p. 9–22, 2004.

DESAI, P. V.; RAUB, T. J.; BLANCO, M.-J. How hydrogen bonds impact P-glycoprotein transport and permeability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p. 6540–6548, 2012.

DIPIKA, R. A Review of Computational Tools for Designing Drugs Used by General Practitioners. **Journal of General Practice**, 2014.

DOMINGO, C.; SAURINA, J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 8–22, 2012.

DOS SANTOS, G. S. et al. Desenvolvimento e caracterização da nanopartículas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388–1394, 2012.

ENGEL, T.; REID, P. **Quantum Chemistry and Spectroscopy with Spartan Student Physical Chemistry Software**. 1 ed. San Francisco: Prentice Hall, 2006.

ESWAR, N. WEEB, B.; MARTIM-RENO, M.; MADHUSUDHAN, M.S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Protein Science**, v. 2, Unit 2.9, 2007.

FABIOLA, F. BERTRAM, R.; KOROSTELEV, A.; CHAPMAN, M. An improved hydrogen bond potential: Impact on medium resolution protein structures. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 11, n. 6, p. 1415–1423, 2002.

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B. **Nanotecnologia aplicada a fármacos**. Trabalho de Conclusão de Curso - Vitória (ES): Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, 2011.

FANG, C.-L.; SALEH, A. A.-S.; FANG, J.-Y. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41–54, 2013.

FREITAS, A. C. DE. **Aplicação de métodos de mecânica quântica no estudo do termocromismo de alcóxidos de vanádio (IV) em solução**. Dissertação de mestrado—Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2010.

FRISCH, M. J. **Gaussian 09, Revision E01**. Gaussian, Wallingford: Fraunhofer Institut Chemische Technologie, 2009.

GASCO, M. R. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 377–378, 2007.

GENNARO, A. R. **A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2004.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–17, 1999.

GILABERT-ESCRIVÁ, M. V. et al. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian Theobroma species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1425–1431, 2002.

GLOWACKI, E. D. et al. Hydrogen-bonds in molecular solids – from biological systems to organic electronics. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 31, p. 3742–3753, 2013.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUIMARÃES, K. L.; RÉ, M. I. Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC). **Nanocosmetics and Nanomedicines**, p. 101–122, 2011.

GUO, H.; QIU, X.; ZHOU, J. Self-assembled core-shell and Janus microphase separated structures of polymer blends in aqueous solution. **The Journal of Chemical Physics**, v. 139, n. 8, p. 84-97, 2013.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1, p. 210–216, 2008.

HOMMOSS, A. **Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations**. Doctor Thesis - Berlin: Freie Universität Berlin, 2009.

HU, X.; ZHANG, Y.; YANG, J.; WAN, H. Influence of liquid lipid content on the properties of puerarin-loaded lipid nanoparticles. **Journal of the Chinese Advanced Materials Society**, v. 2, n. 1, p. 9–19, 2014.

HUANG, Y.-W.; LEE, S.-L. The B3LYP and BMK studies of CO adsorption on Pt(111): An insight through the chemical bonding analysis. **Chemical Physics Letters**, v. 530, p. 64–70, 2012.

JÄMBECK, J. P. M. et al. Molecular dynamics studies of Liposomes as carriers for photosensitizing drugs: Development, validation, and simulations with a coarse-grained model. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, n. 1, p. 5–13, 2014.

JEFFREY, G. A.; SAENGER, W. **Hydrogen Bonding in Biological Structures**. 2. ed. Editora Springer Science & Business Media, 1991.

JIMENEZ-IZAL, E.; CHIATTI, F.; CORNO, M.; RIMOLA, A.; UGLIEN, P. Glycine Adsorption at Nonstoichiometric (010) Hydroxyapatite Surfaces: A B3LYP Study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 27, p. 14561–14567, 2012.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1–2, p. 124–132, 2008.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.

KASONGO, K. W. et al. Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 12, p. 5185–96, 2011.

KERWIN, B. A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2924–2935, 2008.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 753–759, 2010.

KLEIN, C.; DUTROW, B. **Manual de Ciência dos Minerais**. 23 ed. Bookman Editora, 2009.

KÜCHLER, S.; RADOWSKI, M.; BLASCHKE, T.; DATHE, M.; PLENDL, J.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTING, M.; KRAMER, K. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 243–250, 2009.

KUMAR, J.; MURALIDHARAN, S.; PARASURAMAN, S. Antifungal Agents: New Approach for Novel Delivery Systems. **J. Pharm. Sci. & Res**, v. 6, n. 5, p. 229–235, 2014.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles. **Materials science & engineering Materials for biological applications**, v. 33, n. 4, p. 1842–52, 2013.

LACATUSU, I.; NICULAE, G.; BADEA, N.; STAN, R.; POPA, O.; OPREA, O.; MEGHEA, A. Design of soft lipid nanocarriers based on bioactive vegetable oils with multiple health benefits. **Chemical Engineering Journal**, v. 246, p. 311–321, 2014.

LACERDA, S. DE P. **Carreador Lipídico Nanoestruturado à base de cera de carnaúba: desenvolvimento, caracterização e uso na encapsulação de Benzofenona-3**. Dissertação de Mestrado - Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

LAI, L.; BARNARD, A. S. Functionalized Nanodiamonds for Biological and Medical Applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 2, p. 989–999, 2015.

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L.; GIOIELLI, L. A. Rheological properties of cupuassu and cocoa fats. **Grasas y Aceites**, v. 55, p. 115–121, 2004.

LEACH, A. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2 edition, New York: Pearson, 2001.

LEE, H.; PASTOR, R. W. Coarse-Grained Model for PEGylated Lipids: Effect of PEGylation on the Size and Shape of Self-Assembled Structures. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 24, p. 7830–7837, 2011.

LI, R. SABIR, J.S.M.; BAESHEN, N.; AKOH, C. Enzymatic Synthesis of Refined Olive Oil-Based Structured Lipid Containing Omega -3 and -6 Fatty Acids for Potential Application in Infant Formula. **Journal of food science**, v. 80, n. 11, p. H2578-84, 2015.

LIAO, C. et al. Software and resources for computational medicinal chemistry. **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 8, p. 1057–1085, 2011.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau pára uso na fabricação de chocolate**. Tese de Doutorado - Campinas: Universidade Estadual de campinas, 2001.

LUCCAS, V.; KIECKBUSCH, T. G. Estudo Comparativo do Polimorfismo da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 1, p. 63–68, 2006.

LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug discovery today**, v. 7, n. 20, p. 1047–55, 2002.

MACHÁČKOVÁ, M.; TOKARSKÝ, J.; ČAPKOVÁ, P. A simple molecular modeling method for the characterization of polymeric drug carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 316–322, 2013.

MAGALHÃES, M. **Tudo que você faz tem a ver com a química**. 1 ed. São Paulo: Livraria da física, 2007.

MARTÍNEZ, J. M.; MARTÍNEZ, L. Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 819–825, 2003.

MARTÍNEZ, L.; ANDRADE, R.; BIRGIN, E.G.; MARTÍNEZ, J.M. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 13, p. 2157–2164, 2009.

MARTINS, P. Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável. **Estud. Soc.**, v. 17, n. 34, p. 293–311, 2009.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. Organic compound solubility. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.

MEHANNA, M.; MOTAWAA, A.; SAMAHA, M. Pharmaceutical Particulate Lipid - Based Carriers. **National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 10–22, 2012.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, 2001.

MESSINA, P. V.; BESADA-PORTO, J. M.; RUSSO, J. M. Self-assembly drugs: from micelles to nanomedicine. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 555–571, 2014.

MILANOVIC, J.; MILANOVIC, V.; LEVIC, S.; RAJIC, N.; NEDOVIC, V.; BURGASKI, B. Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax. **Sensors**, v.10, n. 1, p. 901–912, 2010.

MONTE, S. A. DO; VENTURA, E. The importance of Hartree's method in teaching quantum chemistry. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 527–534, 2011.

MORAIS, L. R. B.; GUTJAHR, E. **Química de oleaginosas: Valorização da biodiversidade amazônica**. 1 ed. Brasília: Embrapa (DF), 2012.

MORGON, N. H. Computação em Química teórica: Informações técnicas. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 676–682, 2001.

MÜLLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522–530, 2007.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131–S155, 2002b.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 121–128, 2002.

MUSSO, F.; UGLIENGO, P.; SODUPE, M. Do H-bond features of silica surfaces affect the H₂O and NH₃ adsorption Insights from periodic B3LYP calculations. **The Journal of Physical Chemistry. A**, v. 115, n. 41, p. 11221–11228, 2011.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. P. DA. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, dez. 2008.

NAZARPARVAR, E.; ZAHEDI, M.; KLEIN, E. Density Functional Theory (B3LYP) Study of Substituent Effects on O–H Bond Dissociation Enthalpies of trans-Resveratrol Derivatives and the Role of Intramolecular Hydrogen Bonds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 22, p. 10093–10104, 2012.

NNAMANI, P. O.; HANSEN, S.; WINDBERGS, M.; LEHR, C. Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 208–217, 2014.

NOVOTNÁ, A. et al. Dual effects of ketoconazole cis-enantiomers on CYP3A4 in human hepatocytes and HepG2 Cells. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. 111–286, 2014.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R.; KECK, C. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 56–67, 2010.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170–184, 2009.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299–303, 2009.

PATIDAR, A.; THAKUR, D.; KUMAR, P.; VERMA, J. A review on novel lipid based nanocarriers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 30–35, 2010.

PERARO, A. C. **Estabilidade Física e metodologia analítica para formulações farmacêuticas contendo cetoconazol**. Dissertação de Mestrado - São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001.

PEREIRA, A. M. **Estudo *ab-initio* e DFT das Nitrosaminas**. Dissertação de mestrado—Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 2008.

PLUMLEY, J. A.; DANNENBERG, J. J. A Comparison of the Behavior of Functional/Basis Set Combinations for Hydrogen-Bonding in the Water Dimer with Emphasis on Basis Set Superposition Error. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1519–1527, 2011.

QUAST, L. B. **Estudo do efeito da adição de gorduras alternativas na cristalização da manteiga de cacau**. Tese de Doutorado - Campinas: Universidade Estadual de campinas, 2008.

QUAST, L. B.; LUCCAS, V.; KIECKBUSCH, T. G. Physical properties of pre-crystallized mixtures of cocoa butter and cupuassu fat. **Grasas y Aceites**, v. 62, n. 1, p. 62–67, 2011.

RAMEZANPOUR, M.; LEUNG, S.S.W.; DELGADO-MAGEN, K.H.; BASHE, B.Y.M.; THEWALT, J.; TIELEM, D.P. Computational and experimental approaches for investigating nanoparticle-based drug delivery systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1858, n. 7, Part B, p. 1688–1709, 2016.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara Koogan, 2011.

RANJETH, B.; ANUSUYA, T. Simulation and Modeling of Micelle as Nano-Drug Carrier for targeting of anticancer drugs. **International journal of chem tech research**, v. 7, n. 2, p. 700–705, 2015.

RAZMIMANESH, F.; AMJAD-IRANAGH, S.; MODARRESS, H. Molecular dynamics simulation study of chitosan and gemcitabine as a drug delivery system. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, n. 7, p. 165, 2015.

REBOREDO, B. M. **Modelagem molecular aplicada ao estudo de ligantes candidatos a fármacos com atividades antileishmaniais**. Dissertação de mestrado—Campo Grande (MS): Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2012.

ROGNAN, D. Docking Methods for Virtual Screening: Principles and Recent Advances. **Virtual Screening**. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, p. 153–76, 2011.

ROSAS-GARCÍA, V. M.; SÁENZ-TAVERA, I. **Molecular dynamics - Theoretical developments and applications in nanotechnology and energy**. In: **Application of Molecular Dynamics Simulation to Small Systems**. Chapter 4, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: The Royal Pharmaceutical society of great Britain and the american Pharmaceutical Association, 2009.

RUSCHEINSKY, N. **Estudo da cristalização e fracionamento térmico a seco da gordura de cupuaçu (Theobroma grandiflorum Scchumann)**. Tese de Doutorado - Campinas Universidade Estadual de Campinas, 2005.

SANNA, V.; CARIA, G.; MARIANI, A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. **Powder Technology**, v. 201, n. 1, p. 32–36, 2010.

SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.

SANT'ANNA, L. DA S.; ALENCAR, M. S. DE M.; FERREIRA, A. P. Patenteamento em nanotecnologia no Brasil: desenvolvimento, potencialidades e reflexões para o meio ambiente e a saúde humana. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 348–353, 2013.

SEVERINO, P. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas para encapsulação de proteínas**. Tese de Doutorado - Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

SHI, J.; VOTRUBA, A.; FAROKHZAD, O.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3223–3230, 2010.

SHINODA, W.; DEVANE, R.; KLEIN, M. L. Computer simulation studies of self-assembling macromolecules. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, n. 2, p. 175–186, 2012.

SHLICK, T. **Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide**. 21 ed. New York: Springer Editor, 2010.

SHOLL, D. S.; STECKEL, J. A. **What is Density Functional Theory?** In: **Density Functional Theory: A Practical Introduction**. 1 ed. John Wiley & Sons Editor, p. 252, 2009.

SILVA, J. C.; PLIVELIC, T.; HERRERA, M.; RUSCHEINSKY, N.; KIECKBUSCH, T.; LUCCAS, V.; TORRIANI, I.L. Polymorphic Phases of Natural Fat from Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Beans: A WAXS/SAXS/DSC Study. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 12, p. 5155–5163, 2009.

SILVA, K. C. C. **Simulação computacional da interação de nanopartículas de quitosana com íons metálicos**. Dissertação de Mestrado - Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

SILVA, N. DE F.; DA SILVA, R.; ALMEIDA, K.; NASCIMENTO-JÚNIOR, A.; BRASIL, D. do S. B.; SILVA-JUNIOR, J.O.C.; TEIXEIRA, F.M.; RIBEIRO-COSTA, R.M. Study of molecular interactions between Chitosan and Vi Antigen. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 72, p. 148–155, 2017.

SOUTO, E. B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71–77, 2004.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.A.; PINHO, S.C. Solid lipid nanoparticles: classical methods of lab production. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762–1769, 2011.

SOUTO, E. B.; MEHNERT, W.; MÜLLER, R. H. Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. **Journal of microencapsulation**, v. 23, n. 4, p. 417–33, 2006.

SOUTO, F. L. G. **Obtenção e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. Dissertação de Mestrado - Belém (PA): Universidade Federal do Pará, 2013.

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

TAN, S. W.; BILLA, N.; ROBERTS, C.R.; BURLEY, J.C. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 73–79, 2010.

TEIXEIRA, G. L. **Estudo da estabilidade e comportamento reológico de emulsões de gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) com diferentes tensoativos**. Dissertação de Mestrado - Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2014.

THOMPSON, J. E.; DAVIDOW, L. W. **A Prática Farmacêutica na Manipulação de Medicamentos**. 3^a ed. Artmed Editora, 2013.

TODOROVA, N; CHIAPPINI, C.; MAGER, M.; SIMONA, B.; PATEL, I.I.; STEVENS, M.; YAROVSKY, I. Surface Presentation of Functional Peptides in Solution Determines Cell Internalization Efficiency of TAT Conjugated Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 14, n. 9, p. 5229–5237, 2014.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TZACHEV, C. T.; SVILENOV, H. L. Lipid Nanoparticles at the current stage and prospects—a review article. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 18, n. 1, p. 103–115, 2013.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A.E.; BERENDSEN, H. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VERLI, H. **Bioinformática: Da biologia a flexibilidade molecular**. 1. ed. Porto alegre (RS): Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles:

The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, n. 1, p. 161–170, 2006.

WANG, D.; SU, Y.; JIN, C.; ZHU, B.; PANG, Y.; ZHU, L.; LIU, J.; TU, C.; YAN, D.; ZHU, X. Supramolecular copolymer micelles based on the complementary multiple hydrogen bonds of nucleobases for drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 1370–1379, 2011.

WANG, X.-Y.; ZHANG, L.; WEI, X.-H.; WANG, Q. Molecular dynamics of paclitaxel encapsulated by salicylic acid-grafted chitosan oligosaccharide aggregates. **Biomaterials**, v. 34, n. 7, p. 1843–1851, 2013.

WINIWARTER, S.; AX, F.; LENNERNÄS, H.; HALLBERG, A.; PETTERSSON, C.; KARLÉN, A. Hydrogen bonding descriptors in the prediction of human in vivo intestinal permeability. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 21, n. 4, p. 273–287, 2003.

YANG, Y.; CORONA, A.; SCHUBERT, B.; REEDER, R.; HENSON, M. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, p. 261–272, 2014.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C. B. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations. **The Journal of Physical Chemistry. A**, v. 111, n. 8, p. 1554–1561, 2007.

ZHANG, R.; WANG, Y.; TAN, L.; ZHANG, H.Y.; YANG, M. Analysis of polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 7, p. 598–607, 2012.

ZHANG, S. SUN, H.-J.; HUGHES, A.; MOUSSODIA, R.; BERTIN, A.; CHEN, Y.; POCHAN, D.; HEINEY, P.A.; KLEIN, M.; PERCEC, V. Self-assembly of amphiphilic Janus dendrimers into uniform onion-like dendrimersomes with predictable size and number of bilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 25, p. 9058–9063, 2014.

ZHENG, M.; FALKEBORG, M.; ZHENG, Y.; YANG, T.; XU, X. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 430, p. 76–84, 2013.