



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

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DE
GORDURA VEGETAL DE MURUMURU
(*Astrocaryum murumuru* Mart.)**

LUANN WENDEL PEREIRA DE SENA

BELÉM-PA
2016

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

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DE
GORDURA VEGETAL DE MURUMURU
(*Astrocaryum murumuru* Mart.)**

Autor (a): Luann Wendel Pereira de Sena

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior

Dissertação apresentada 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

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Sena, Luann Wendel Pereira de, 1990-

Obtenção e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de murumuru (*astrocaryum murumuru mart.*) / Luann Wendel Pereira de Sena. - 2016.

Orientador: José Otávio Carréra Silva Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 2. *Astrocaryum murumuru Mart.*.
3. Plantas medicinais. 4. Óleos voláteis. 5. Homogeneizador a alta pressão.

I. Título.

CDD 22. ed. 615.321

LUANN WENDEL PEREIRA DE SENA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DE
GORDURA VEGETAL DE MURUMURU
(*Astrocaryum murumuru* Mart.)**

Dissertação apresentada 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 obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Maria Ribeiro Costa
Instituição: Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior (Orientador)
Instituição: Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, CARLOS SENA e REGINA SENA e à
minha Noiva ROSANA SARMENTO pelo amor e apoio
incondicional.

À minha família pelo apoio em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos em todos os momentos da minha vida, especialmente nos mais difíceis.

Aos meus pais, Carlos Sena e Regina Sena, pela compreensão, apoio e por todo amor, dedicação e sacrifícios que culminaram em todas as conquistas da minha vida. E a toda minha família pela indispensável presença, amizade, incentivo e apoio.

A minha noiva Rosana Sarmiento, pelo apoio, compreensão, paciência, presença e por estar caminhando ao meu lado todos os dias, buscando nossos sonhos e ideais com muito amor e alegria. O início dessa trajetória foi determinante para nosso encontro e união.

À meu orientador, professor Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior, pela orientação concedida, apoio e confiança em mim depositados, pelos ensinamentos, respeito, compreensão, paciência, além das oportunidades proporcionadas nesses dois anos de trabalho.

À professora Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa por, gentilmente, disponibilizar o Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (Nanofarm) para realização de análises físico-química e análise térmica das misturas lipídicas.

Ao professor Dr. Antônio Manoel da Cruz pelo apoio e disponibilidade durante a execução da cromatografia gasosa e elaboração do artigo científico.

Ao professor Dr. Carlos Emmerson pela disponibilização do laboratório de Oleoquímica da UFPA para a realização das análises térmicas dos materiais isolados.

Ao professor Dr. Madson Ralide pelo apoio e amizade durante a minha breve estadia na Universidade Federal do Amapá.

Aos professores Dr. Caio Pinho e Dr. José Carlos Tavares pelo apoio e ajuda em minhas análises na Universidade Federal do Amapá.

Ao Jonatas Lobato, estudante de farmácia da Universidade Federal do Amapá, pelo apoio e ajuda em minhas análises no Zeta Sizer.

A professora Msc. Andrea Diogo pelo apoio, amizade e disponibilidade durante as análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Química – Cesupa. E aos técnicos de laboratório Raphael e Hellen Reis.

A professora Dra. Mileide Brito, pelo apoio e disponibilidade.

Aos professores Dra. Jaqueline Rodrigues e Dr. João Paulo Longo pelo apoio e disponibilidade durante minha estadia na Universidade de Brasília e análise no homogeneizador sob alta pressão e Zeta Sizer. Vocês foram peça chave para o término deste estudo.

Ao professor Dr. Jose Antônio Picanço Diniz Junior e ao Farmacêutico Sanderson Araújo, pelo apoio durante o preparo da amostra de microscopia eletrônica realizada no Instituto Evandro Chaga (IEC).

Aos meus queridos amigos do laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético: Rayanne Rocha, Denise Contente, Russany Costa, Fernanda Brito, Diego Rosa, Ana Paula, Natália Farias e Lenin Fernandez pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (Nanofarm), Tais Gabbay, Kallene Oliveira, Ana Carolina, Taylon Aguiar e Lorena Diniz, pelo apoio e amizade.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, Brasília e Cliciane, pelo apoio e paciência durante esses dois anos de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Enfim a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, meus profundos agradecimentos.

RESUMO

SENA, L. W. P. **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DE GORDURA VEGETAL DE MURUMURU (*Astrocaryum murumuru* Mart.)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 116 p. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) têm sido propostas como uma categoria de carreadores para ingredientes farmacêuticos e cosméticos e crescente interesse devido a uma série de vantagens quando comparadas a formulações convencionais. As gorduras vegetais amazônicas são consideradas matrizes lipídicas de grande potencial para a produção de CLN de administração tópica, em função da baixa toxicidade e biocompatibilidade, além de suas propriedades emoliente, protetora e hidratante na pele. O murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) é uma palmeira amazônica e a utilização de sua gordura é promissora pois agrega valor aos produtos, favorece o crescimento da região, além de utilizar esses recursos de maneira sustentável. O objetivo deste estudo foi obter e caracterizar os CLN a partir da gordura vegetal de Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) pela técnica de homogeneização sob alta pressão a quente, utilizando o cetoconazol como fármaco modelo. A cromatografia gasosa revelou o ácido láurico (48,1 %), ácido mirístico (26,6 %) e ácido oleico (8,4 %), como os principais constituintes. A caracterização físico-química mostrou valores de acidez, iodo, saponificação, peróxido, refração e densidade dentro dos limites e padrões recomendados. As matérias-primas isoladas e os CLN obtidos foram avaliados por calorimetria diferencial exploratória, sendo que os resultados sobre as matérias-primas isoladas utilizadas corroboram com o descrito na literatura e os CLN evidenciaram uma estrutura cristalina menos ordenada. Nas formulações testadas, as nanopartículas apresentaram tamanho médio entre 98,60 e 161,56 nm, índice de polidispersidade entre 0,115 e 0,276, potencial zeta superiores a -30 mV e eficiência de encapsulação próximo a 100 %. A microscopia eletrônica de transmissão indicou aspecto esférico das nanopartículas e o perfil de liberação apresentou um modelo cinético de ordem zero, com liberação de cerca de 70,9 % do fármaco encapsulado em 8 horas. As nanopartículas permaneceram estáveis durante um período de 60 dias. O estudo realizado mostrou que a gordura de murumuru obteve um sistema eficaz, com pequenos tamanhos de partículas e penetrabilidade na pele, tornando possível a veiculação da formulação em usos farmacêuticos e cosmético.

Palavras-chave: Carreadores lipídicos nanoestruturados; Homogeneização sob alta pressão; Gordura Vegetal de Murumuru.

ABSTRACT

SENA, L. W. P. **ACQUISITION AND CHARACTERIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER FROM MURUMURU VEGETABLE FAT (*Astrocaryum murumuru* Mart.)**. Thesis (Master) – Postgraduate program in Pharmaceutical Sciences, 116 p. Federal University of Para, Belem, 2016.

The nanostructured lipid carrier (NLC) have been proposed as a carrier's category for pharmaceutical and cosmetic ingredients and an increasing of interest due to a series of advantages when compared to conventional formulations. The Amazonian vegetable fats are considered lipids arrays of great potential for the production of NLC from topical administration, according to the low toxicity and biocompatibility, beyond their emollient properties, protector and moisturizer in the skin. The murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) is an amazon palm and the utility of its fat is promising, because it adds value to the products, favour the growth in the region, in addition to using these resources in a sustainable way. The objective of this research was to obtain and characterize the NLC from the vegetable fat of Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) by the homogenization technique under high pressure to hot, using ketoconazole as a drug modelling. The gas chromatography showed lauric acid (48,1 %), myristic acid (26,6 %) and oleic acid (8,4 %), as main constituents. The physical-chemical characterization showed acid, iodine, saponification, peroxide, refraction and density values within the limits and standards recommended. The isolated raw materials and the NLC obtained were evaluated using differential scanning calorimetry, where the results about the isolated raw materials used support as was described in Literature and the NLC demonstrated a crystalline structure less ordained. In the tested formulations, the nanoparticles showed average size between 98,60 and 161,56 nm, polydispersibility index between 0,115 and 0,276, zeta potential higher than -30mV and encapsulation efficiency near 100 %. The Transmission Electron Microscopy indicated spherical aspect of the nanoparticles and the clearance profile showed a zero order kinetic model, with the release of 70,9 % of the encapsulated drug in 8 hours. The nanoparticles remained stable during a period of 60 days. This research showed that the murumuru fat obtained an effective system, with small sizes particles and penetrability in the skin, making possible the formulation propagation in pharmaceutical and cosmetic uses.

Keywords: Nanostructured lipid carrier; homogenization under high pressure; Murumuru vegetable fat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Palmeira de murumuru.	25
Figura 2: A: Amêndoas de Murumuru; B: Gordura de Murumuru.	26
Figura 3: Linha do tempo de alguns sistemas de liberação nanoestruturados. ...	28
Figura 4: Estrutura da pele.	30
Figura 5: Via de penetração cutânea de fármacos através da camada do estrato córneo (via transcelular) e entre os corneócitos (via intercelular).	31
Figura 6: Penetrabilidade do cosmético na pele.	32
Figura 7: A: Representação de Nanoemulsões; B: Nanopartículas Lipídicas. ...	33
Figura 8: Processo de incorporação do ativo em nanopartículas lipídicas sólidas: A formação de uma estrutura cristalina quase perfeita em nanopartículas lipídicas sólidas em forma idêntica por moléculas semelhantes a uma parede de tijolo, que resulta na expulsão do ingrediente ativo.	34
Figura 9: Processo de incorporação do ativo em carreadores lipídicos nanoestruturados: Formação de uma matriz de partículas sólidas de carreadores lipídicos nanoestruturados com muitas imperfeições comparáveis para a construção de um muro de pedras de forma muito diferentes, resultando na incorporação do ativo.	35
Figura 10: Homogeneizador sob Alta Pressão.	37
Figura 11: Esquema de operação do homogeneizador sob alta pressão.	37
Figura 12: Processo de produção de nanopartículas lipídicas por homogeneização sob alta pressão. À esquerda, homogeneização sob alta pressão a frio; à direita, homogeneização sob alta pressão a quente.	39
Figura 13: Árvore da Carnaúba.	45
Figura 14: Cera de carnaúba em escamas	45

Figura 15: A: Representação esquemática do ácido cáprico; B: Representação esquemática do ácido caprílico.....	46
Figura 16: Representação esquemática do Polissorbato [®] 80.....	49
Figura 17: Representação esquemática do Pluronic [®] F-127.....	49
Figura 18: Representação esquemática do Cetoconazol.....	50
Figura 19: Fluxograma do processo de produção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	60
Figura 20: A: Cubeta de poliestireno; B: Cubeta de análise de Potencial Zeta	61
Figura 21: Preparo da amostra para a MET: A: Colocação da dispersão em uma grade de cobre; B: Secagem da dispersão em filme contínuo.....	61
Figura 22: Determinação da EE por ultrafiltração-centrifugação.....	62
Figura 23: Modelo da célula de difusão. a) célula fechada, onde há orifícios de entrada (inferior) e saída (lateral) da solução receptora; b) célula aberta, 1- parte superior da célula (CD), onde foram colocadas as amostras, 2 – parte inferior da célula (CR), que continha parte da solução receptora, 3 – pinos de vedação da célula e 4 – borracha de vedação da membrana.....	67
Figura 24: Diagrama esquemático do modelo da célula de difusão com suas respectivas medidas.....	67
Figura 25: Esquema de montagem do sistema de difusão a partir da célula de difusão. 1 – banho termostaticado; 2 – recipiente receptor; 3 – célula de difusão; 4 – bomba peristáltica.....	68
Figura 26: Membrana natural de pele de orelha de porco.....	69
Figura 27: A: Pele de orelha de porco cortada em tamanhos padronizados e adequados à utilização na área de permeação; B: Célula de difusão devidamente fechada.....	70

Figura 28: Cromatografia da gordura de murumuru, obtida por Cromatografia Gasosa.....	72
Figura 29: Curvas DSC das matérias-primas. A: Gordura de murumuru; B: Cera de carnaúba; C: Triglicérides de ácido cáprico e caprílico; D: Cetoconazol.....	77
Figura 30: Curvas DSC das misturas lipídicas: A: Formulação 1; B: Formulação 2 e C: Formulação 3.....	79
Figura 31: Especificidade do método de doseamento de cetoconazol: a) Cromatograma do Cetoconazol (SQR) em metanol a 6,0 µg/mL; b) Cromatograma do Cetoconazol (fornecido pela Natural Pharma) em metanol a 6,0 µg/mL; c) Cromatograma do filtrado de carreadores lipídicos nanoestruturados (referente à formulação 3).....	80
Figura 32: Curva analítica do cetoconazol, obtida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	81
Figura 33: Média da Distribuição dos tamanhos das partículas (nm).....	86
Figura 34: Distribuição do Potencial Zeta.....	86
Figura 35: Imagens dos CLN obtidas por MET. A: Aglomerado de CLN sendo observado a uma objetiva de 500 nm; B: Aglomerado de CLN sendo observado a uma objetiva de 200 nm; C: CLN de forma isolada, sendo observada a uma objetiva de 100 nm D: CLN de forma isolada, sendo observado a uma objetiva de 50 nm.....	88
Figura 36: Perfil de liberação de cetoconazol dos CLN.....	89
Figura 37: Comparativo entre a quantidade retida e não retida de CLN contendo Cetoconazol (%)......	91
Figura 38: Variação do tamanho de partículas das formulações 1, 2 e 3 nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias.....	92

Figura 39: Variação do índice de polidispersidade (PDI) das formulações 1, 2 e 3 nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias.....	93
Figura 40: Variação do potencial zeta (mV) das formulações 1, 2 e 3 nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias.....	93
Figura 41: Laudo de análise do cetoconazol pela Fundação Oswaldo Cruz.....	115
Figura 42: Laudo de análise do TACC fornecido pela Fagron.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais técnicas para obtenção de nanopartículas lipídicas.....	36
Tabela 2: Exemplos de lipídios sólidos utilizados em nanopartículas lipídicas.....	43
Tabela 3: Exemplos de tensoativos usados em nanopartículas lipídicas.....	48
Tabela 4: Equipamentos, reagentes, solventes e utensílios para a caracterização dos materiais.....	54
Tabela 5: Equipamentos, reagentes, solventes e utensílios utilizados para a obtenção dos CLN.....	54
Tabela 6: Condições experimentais para preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	59
Tabela 7: Perfil de ácidos graxos (%) da gordura de murumuru, obtido por Cromatografia Gasosa.....	73
Tabela 8: Perfil de ácidos graxos (%) de gorduras vegetais, obtido por Cromatografia Gasosa.....	74
Tabela 9: Resultado das análises do índice de iodo, saponificação, acidez, peróxido, densidade e refração da gordura de murumuru.....	75
Tabela 10: Resultados de Repetibilidade de quantificação de cetoconazol em carreadores lipídicos nanoestruturados.....	82
Tabela 11: Resultados de Precisão Intermediária de quantificação de cetoconazol em carreadores lipídicos nanoestruturados.....	83
Tabela 12: Valores experimentais obtidos para o teste de recuperação do cetoconazol.....	84
Tabela 13: Tamanho de partícula (nm), Índice de Polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta (mV) dos CLN produzidos.....	85
Tabela 14: Efeito das concentrações dos tensoativos.....	87
Tabela 15: Resultados descritos no laudo de análise de cera de carnaúba, segundo o fornecedor, GM Ceras.....	114
Tabela 16: Resultados descritos no laudo de análise do cetoconazol fornecido pela Natura Pharma.....	114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(A/O) - Água em óleo
(O/A) - Óleo em água
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC - Cera de carnaúba
CD - Compartimento doador
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN - Carreadores lipídicos nanoestruturados
CR - Compartimento receptor
CTZ - Cetoconazol
DP - Desvio padrão
DSC - Calorimetria diferencial exploratória
ECF - Espectroscopia de correlação de fótons
EE - Eficiência de encapsulação
EHL - Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
GM - Gordura de murumuru
HAADF - High Angle Annular Dark Field
HAP - Homogeneização sob alta pressão
HCL - Ácido clorídrico
IL-2 – Interleucina 2
KOH - Hidróxido de Potássio
KOH/g - Hidróxido de potássio por grama
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
NL - Nanopartículas Lipídicas
NLS - Nanopartículas lipídicas sólidas
PDI - Índice de polidispersidade
pH - Potencial hidrogeniônico
PLB - Polissorbato[®] 80
PLC - Pluronic[®] F-127
rpm - Rotação por minutos
SQR - Substância química de referência
TACC - Triglicéride de ácido cáprico e caprílico
UV/VIS - Ultravioleta-visível
XX - Vinte
XXI - Vinte e um

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

% - Porcentagem
 ΔH - Variação de entalpia
 cm^2 - Centímetro ao quadrado
g - Gramas
g/mol - Grama por mol
 g^2 - Gramas por litro ao quadrado
kV - Quilovolt
m - Metro
M - Molar
Meq - Mili equivalente
mg - Miligrama
min - Minutos
Mj - milijoule
mL - Mililitro
mL/min – Mililitro por minuto
mm - Milímetro
mol/L - Mol por litro
mV - Milivolts
nm - Nanômetros
°C - Graus celcius
R\$ - Reais
v/v - Volume volume
 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - Microgramas por mililitro
 μl - Microlitro

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Índice de Iodo.....	55
Equação 2: Índice de Saponificação.....	56
Equação 3: Índice de Acidez.....	56
Equação 4: Índice de Peróxido.....	57
Equação 5: Densidade Relativa.....	58
Equação 6: Eficiência de Encapsulação.....	63
Equação 7: Precisão Intermediária.....	65
Equação 8: Exatidão.....	66
Equação 9: Limite de Detecção.....	66
Equação 10: Limite de Quantificação.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 MURUMURU (<i>Astrocaryum murumuru</i> MART.)	25
2.2 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA	27
2.3 VIAS DE PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS NA PELE	29
2.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	32
2.4.1 Considerações gerais.....	32
2.4.1.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	33
2.4.1.2 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN).....	35
2.5 OBTENÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PELA TÉCNICA DE HOMOGENEIZAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO (HAP)	36
2.5.1 Homogeneização sob alta pressão a quente e a frio	38
2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	40
2.6.1 Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta.....	40
2.6.2 Aspectos Morfológicos.....	41
2.6.3 Eficiência de Encapsulação.....	41
2.6.4 Perfil de liberação <i>ex vivo</i>	42
2.7 LIPÍDIOS	42
2.7.1 Cera de Carnaúba.....	44

2.7.2 Triglicéride de Ácido Cáprico e Caprílico (TACC).....	46
2.8 TENSOATIVOS.....	47
2.8.1 Polissorbato [®] 80.....	48
2.8.2 Pluronic [®] F-127.....	49
2.9 CETOCONAZOL.....	50
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 GERAL.....	51
3.2 ESPECÍFICOS.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 MATERIAL.....	52
4.1.1 Gordura de Murumuru.....	52
4.1.2 Cetoconazol.....	52
4.1.3 Cera de Carnaúba.....	52
4.1.4 Triglicérides de Ácido Cáprico e Caprílico (TACC).....	52
4.1.5 Polissorbato [®] 80.....	53
4.1.6 Pluronic [®] F-127.....	53
4.1.7 Membrana Biológica.....	53
4.2 EQUIPAMENTOS, REAGENTES, SOLVENTES E UTENSÍLIOS.....	54
4.2.1 Composição da Gordura Vegetal.....	54
4.2.2 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	54
4.3 MÉTODOS.....	55

4.3.1 Caracterização da Gordura de Murumuru.....	55
4.3.1.1 Composição de Ácidos Graxos.....	55
4.3.1.2 Índice de Iodo.....	55
4.3.1.3 Índice de Saponificação.....	56
4.3.1.4 Índice de Acidez.....	56
4.3.1.5 Índice de Peróxido.....	57
4.3.1.6 Índice de Refração.....	57
4.3.1.7 Densidade Relativa.....	57
4.3.2 Análise Térmica dos Materiais.....	58
4.3.3 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	58
4.3.4 Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta.....	60
4.3.5 Morfologia.....	61
4.3.6 Eficiência de Encapsulação.....	62
4.3.7 Validação Analítica para Doseamento de Cetoconazol em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	63
4.3.7.1 Substância Química de Referência (SQR).....	64
4.3.7.2 Preparo da Solução Mãe.....	64
4.3.7.3 Especificidade.....	64
4.3.7.4 Linearidade.....	65
4.3.7.5 Precisão Intermediária.....	65
4.3.7.6 Repetibilidade.....	65

4.3.7.7 Exatidão.....	65
4.3.7.8 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	66
4.3.8 Perfil de Liberação <i>ex vivo</i>	66
4.3.9 Estudo de Retenção Cutânea.....	71
4.3.10 Estudo de Estabilidade.....	71
4.3.11 Análise Estatísticas.....	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GORDURA DE MURUMURU.....	72
5.1.1 Composição de Ácidos Graxos.....	72
5.1.2 Índice de Iodo, Saponificação, Acidez, Refração, Peróxido e Densidade Relativa.....	75
5.1.3 Análise Térmica.....	76
5.1.3.1 Material isolado.....	76
5.1.3.2 Misturas Lipídicas.....	78
5.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DO CETOCONAZOL...	80
5.2.1 Especificidade.....	80
5.2.2 Linearidade.....	81
5.2.3 Precisão Intermediária e Repetibilidade.....	82
5.2.4 Exatidão.....	83
5.2.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	84
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADO.....	85

5.3.1 Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta.....	85
5.3.2 Morfologia.....	87
5.3.3 Eficiência de Encapsulação.....	88
5.3.4 Perfil de Liberação <i>ex vivo</i>	89
5.3.5 Estudo de Retenção Cutânea.....	90
5.3.6 Estudo de Estabilidade.....	92
6 CONCLUSÃO.....	94
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8 ANEXOS.....	114

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é considerada a principal fonte de biodiversidade do mundo. Este bioma possui inúmeros insumos inovadores de interesse para a indústria farmacêutica e cosmética, dentre eles destacam-se os óleos e gorduras de origem vegetal, como por exemplo a gordura vegetal de murumuru (BARATA, 2005). Esta gordura, tem sido bastante utilizada na área farmacêutica e cosmética, principalmente na fabricação de sabonetes, cremes e xampus (SANTOS et al., 2011). Aproveitar esses recursos de maneira sustentável, aplicando tecnologia, como a nanotecnologia, agrega valor aos produtos e, é necessário para o crescimento da região, além de preservar os recursos proporcionados pelo ecossistema (FERREIRA E SAMPAIO, 2013).

A nanotecnologia farmacêutica pode ser uma alternativa promissora para melhorar a eficácia dos fármacos. Em razão disso, a busca por opções tecnológicas que aumentem a efetividade de drogas já conhecidas tem sido identificado (ETHERIDGE et al., 2012). Muitas dessas escolhas estão direcionadas ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, o que tem permitido o aumento dos efeitos das substâncias e favorecendo a reintrodução de outros anteriormente descartados por suas propriedades terapêuticas (KAMBLE et al., 2012).

Neste sentido, é importante destacar que formulações farmacêuticas associadas a nanotecnologia estão sendo amplamente utilizadas, devido a presença de diversas vantagens sobre as técnicas convencionais, tais como: proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, aumento da eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada, direcionamento a alvos específicos, possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas, diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (JEBORS et al., 2010).

Entre os carreadores nanoestruturados, destacam-se as nanopartículas lipídicas (NL) que são sistemas formados por lipídios e misturas complexas de glicerídeos, apresentando tamanho de partícula em escala nano (SOUTO et al., 2011). Suas principais características incluem uma ótima estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis frente à degradação, capacidade de

liberação controlada, excelente tolerabilidade e possibilidade de vetorização (WISSING et al., 2004). No resumo, as NL apresentam limitações quanto à produção em grande escala e à esterilização (GARUD et al., 2012).

De acordo com o tipo de lipídio utilizado para a obtenção de NL é possível obter dois tipos básicos de sistemas nanoestruturados: as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (PELTIER et al., 2006). Os CLN constituem a segunda geração de NL que surgiram com o intuito de superar as limitações deixadas pelas NLS, tais como: capacidade limitada de encapsulação, expulsão da droga durante a estocagem e alto conteúdo de água na dispersão (GUIMARÃES E RÉ, 2001). Isto ocorre devido os CLN serem constituídos por uma matriz lipídica sólida e por um lipídio líquido enquanto os NLS consistem em apenas um tipo de lipídio sólido, o que permite a formação de uma estrutura menos ordenada e capaz de reter o fármaco incorporado de forma mais eficiente (MÜLLER et al., 2002).

Guimarães e Ré (2011) relatam que os CLN podem ser obtidos por diferentes métodos, sendo a homogeneização sob alta pressão uma das técnicas mais utilizadas, pois esta tem demonstrado alto desempenho e vantagens em relação às demais, como: facilidade para transposição de escala, não utilização de solventes orgânicos, possibilidade de operações em condições assépticas e curto tempo de produção. Por outro lado, a caracterização desses sistemas tornou-se um desafio devido ao tamanho, complexidade e à natureza dinâmica e coloidal dos CLN, por esse motivo, parâmetros cruciais devem ser avaliados, tais como: tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e estabilidade física ao longo do tempo (MEHNERT et al., 2012).

Neste sentido, este estudo tem por objetivo obter e caracterizar os CLN para o uso tópico, a partir de gordura vegetal de murumuru obtidos pela técnica de homogeneização sob alta pressão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MURUMURU (*Astrocaryum murumuru* MART.)

O murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) (Figura 1) é encontrada na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guianas, Peru e Venezuela, sendo que no Brasil, os estados amazônicos são os mais prevalentes (ROCHA E POTIGUARA 2007). O vegetal é pertencente a família *Arecaceae* e se distribui ao longo dos rios, áreas temporariamente inundadas, florestas densas ou semi-abertas. É uma palmeira visualmente atraente, podendo atingir até dez metros de altura (QUEIROZ et al., 2008). Os óleos extraídos das amêndoas do murumuru transformam-se em uma gordura semi-sólida (Figura 2 B), que apresenta composição rica nos ácidos graxos láurico e mirístico, possuindo ainda, baixa acidez. Apesar das dificuldades de exploração devido o seu manuseio, pois possui inúmeros espinhos, a gordura de murumuru apresenta características e potencial econômico, o que justifica o interesse nos setores farmacêuticos e cosméticos (ROCHA E POTIGUARA, 2007).



Figura 1: Palmeira de murumuru. **Fonte:** Ferreira, 2011.

As características da gordura de murumuru que a torna atrativa são: tendência de ser emoliente natural, capacidade de formar uma película protetora que ajuda a pele a reter a umidade, uso nos cuidados de peles normais, secas e envelhecidas, ação multifuncional de hidratação, reparação de barreiras cutâneas e redução da perda de água transdérmica, recuperação da elasticidade natural da pele e nutrição (NASCIMENTO et al., 2007). As ações imunológica e antiinflamatória da gordura do murumuru vem sendo estudadas devido apresentar composição rica no ácido graxo láurico, o qual aumenta a resposta do sistema imunológico e ação antiinflamatória pela liberação de interleucina 2 (IL-2), além de influenciar na formação de células CD4, que são a primeira linha de defesa do organismos contra doenças e infecções (FERREIRA, 2012).

Informações registradas sobre a produção e comercialização de produtos derivados do murumuru no mercado nacional e internacional ainda são escassas (NEHDI, 2013). No entanto, as características e propriedades específicas que a gordura de murumuru possui tem aumentado o interesse dos mercados farmacêutico e cosmético, principalmente na fabricação de sabonetes, cremes e xampus (FERREIRA, 2011).



A

B

Figura 2: A: Amêndoas de Murumuru; B: Gordura de Murumuru.

Fonte: Adaptado de Queiroz et al., 2008.

2.2 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA

A nanotecnologia é uma das tecnologias chaves do século XXI (GARCIA, 2014). Ela vem ampliando novas perspectivas para o desenvolvimento de soluções baseadas na ciência para uma aplicação inovadora, como o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos refinados, cujo desempenho final pode ser diretamente impactado pelas características de nanoescala, representando uma excelente oportunidade de pesquisa e negócios (PEDERSEN et al., 2006). Esta é claramente uma área de pesquisa muito ampla e interdisciplinar que vem se desenvolvendo em países industrializados, pois se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semi-condutores e biomateriais) estruturados em escala nanométrica (WILSON et al., 2002).

De acordo com Lobão (2011), os locais que mais investem em nanotecnologia são: Europa, Estados Unidos da América e Japão. Cada região investe cerca de um bilhão de dólares anual, o que corresponde mais da metade dos investimentos no mundo. No entanto, países como a Rússia, China, Índia e Brasil têm realizado investimentos significativos neste setor nos últimos anos, sendo que o governo brasileiro já investiu R\$ 140 milhões entre 2001 e 2006 em redes de pesquisas e projetos na área de nanotecnologia (RAMOS et al., 2008). Apesar de todo o investimento, a nanotecnologia encontra-se em fase inicial, pois ainda há muito a ser compreendido sobre o comportamento dos materiais em nanoescala.

A nanomedicina é uma área da nanotecnologia voltada diretamente para o âmbito da saúde. Esta ciência consiste em usar nanopartículas, nanorobôs e outros elementos em escala nanométrica envolvendo aplicações e descobertas de novos fármacos, diagnósticos e imagens *in vitro* e *in vivo*, biomateriais, engenharia de tecidos e sistemas terapêuticos (SHI et al., 2010). A nanotecnologia, associada aos agentes terapêuticos mais modernos pode ser uma alternativa promissora para melhorar a efetividade do fármaco, visto que, ao longo da história, a utilização da maioria dessas substâncias foi sempre limitada por diversos fatores farmacocinéticos (GARCIA et al., 2014). No decorrer do século XX e início do século XXI, na tentativa de aperfeiçoar o tratamento de diversas patologias e reduzir limitações, uma grande variedade de nanomateriais orgânicos e inorgânicos tem

vido investigados e/ou usados como veículos de agentes terapêuticos (Figura 3) (DOMINGO E SAURINA 2012).

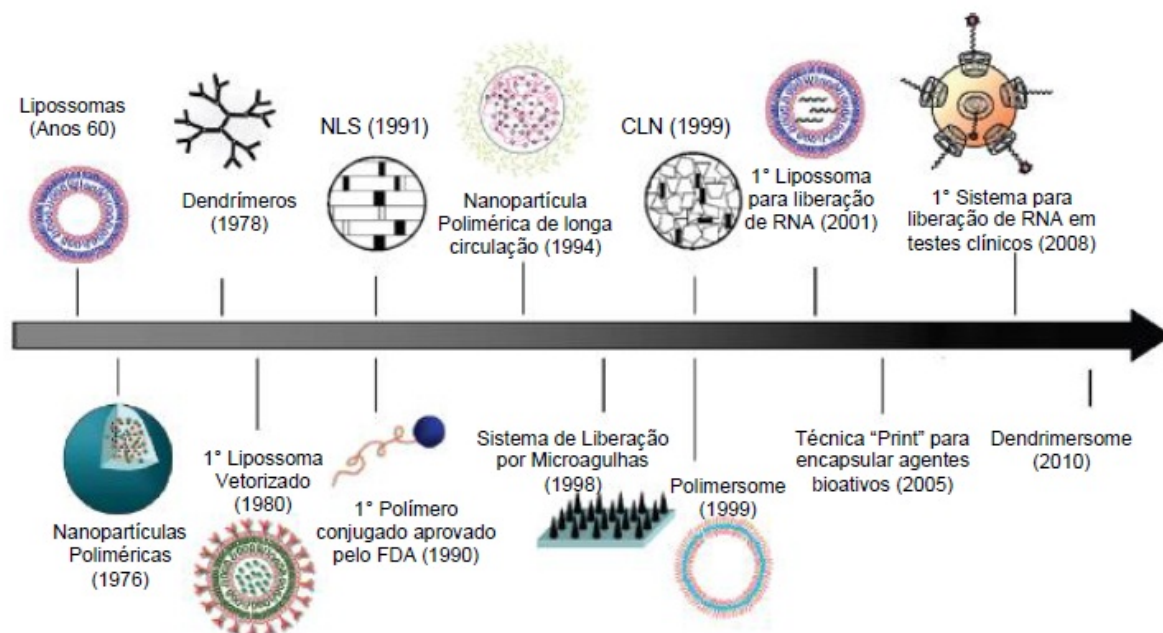


Figura 3: Linha do tempo de alguns sistemas de liberação nanoestruturados. **Fonte:** Adaptado de SHI et al., 2010.

Como pode ser observado na Figura 3, há uma grande diversidade de organizações de sistema de liberação nanoestruturados. Esses sistemas funcionam modificando intencionalmente sua estrutura conforme seu ambiente ou sítio de ação promovendo uma ação esperada ou controlada do fármaco, de modo que será possível conduzir, aplicar e associar a amostra sem que ocorram alterações do princípio ativo, aumentando assim, o tempo de ação do fármaco, o que torna o tratamento mais eficiente (PARVEEN et al., 2012).

Na indústria farmacêutica, os usos de nanopartículas possibilitaram o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármaco que ofereceram inúmeras vantagens em relação aos sistemas convencionais de dosagem (PIMENTEL et al, 2007). Dentre essas vantagens podemos destacar (PIMENTEL et al., 2007; ALVES et al, 2008):

- proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo;
- aumento da eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (variação do pH ou de temperatura);
- diminuição da instabilidade e de composição dos fármacos sensíveis;
- possibilidade de direcionamento a alvos específicos;
- possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas;
- diminuição de efeitos adversos locais e sistêmicos;
- maior eficiência de encapsulação quando comparadas aos sistemas convencionais.

2.3 VIAS DE PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS NA PELE

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano e atinge cerca de 16 % do peso corporal (PIROT, 1998). Com espessura de $2,97 \pm 0,28$ mm, a pele desempenha muitas funções, como: proteger e guardar os órgãos internos, limitar a passagem de produtos químicos para dentro e para fora do corpo, estabilizar a temperatura corporal, regular sensações (calor, frio, toque e dor), proteger o organismo contra a perda de água, colaborar na excreção de várias substâncias, além de atuar na proteção contra fatores externos (bactérias, vírus e radiação solar) (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

A pele é constituída por três camadas distintas firmemente unidas entre si: epiderme, derme e a hipoderme (Figura 4).

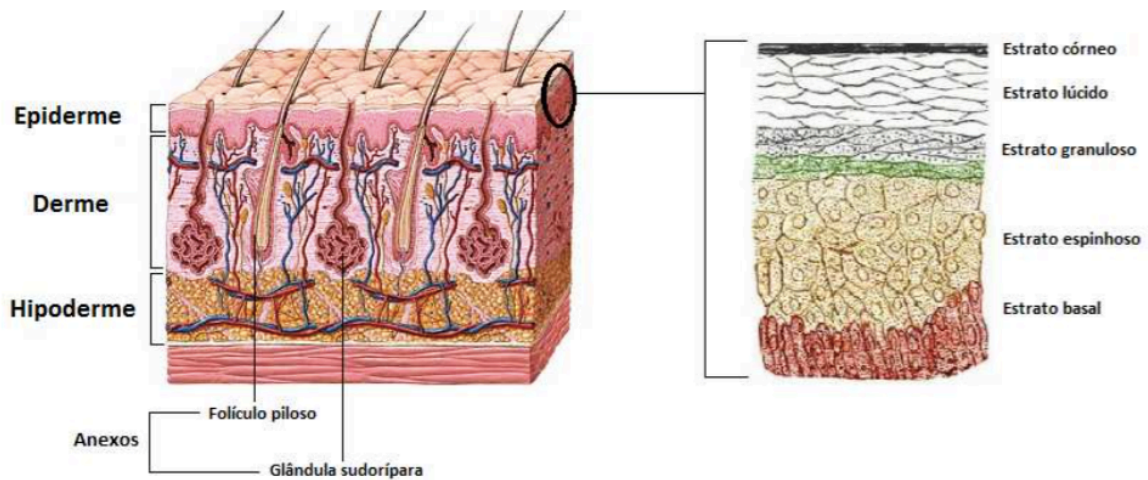


Figura 4: Estrutura da pele. **Fonte:** Junqueira e Carneiro, 2004.

Entre as estruturas superficiais da epiderme, encontram-se a camada córnea que é constituída por células achatadas, sem núcleo e mortas (corneócitos), dispersas em uma matriz rica em lipídios não polares (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Essa matriz é constituída principalmente por ceramidas, ácidos graxos, esteroides e triacilgliceróis (FARTASCH, 1997). A camada córnea é a principal barreira limitante à difusão percutânea de fármacos, devido sua estrutura e composição (PIROT, 1998).

Para que o fármaco exerça sua atividade nas diferentes camadas da pele, é necessário que ele penetre através do estrato córneo, ocorrendo por duas vias (Figura 5): via transcelular, em que o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica intercelular; e via intercelular, onde o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo na matriz lipídica. Existe ainda uma rota paralela que são os apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas) que apresentam-se em minoria, pois ocupam cerca de 0,1 % da área superficial do corpo humano e a contribuição para a penetração pode ser considerada baixa (MOSER et al., 2001; PROW et al., 2001).

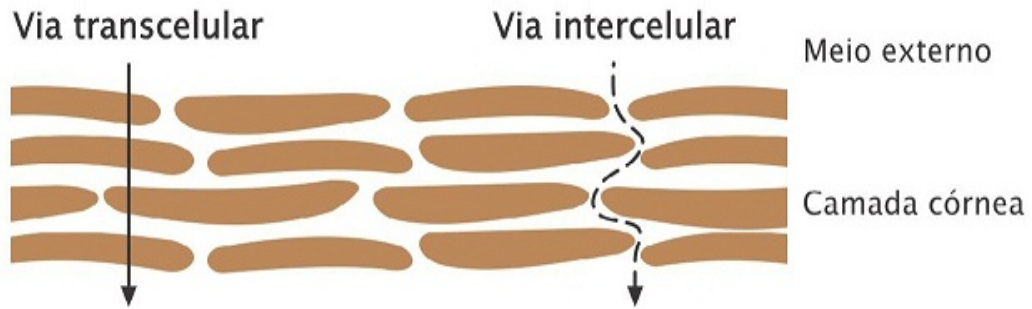


Figura 5: Via de penetração cutânea de fármacos através da camada do estrato córneo (via transcelular) e entre os corneócitos (via intercelular). **Fonte:** Allen et al., 2007.

As nanoestruturas funcionam como reservatórios que controlam a profundidade de penetração da substância (podendo atingir até a camada basal) (Figura 6), e a velocidade com que o ativo é liberado, permitindo um fornecimento constante às diferentes camadas da pele, além de evitar concentrações tóxicas do ativo. Nesse sentido monitorar o tamanho, polidispersidade, caráter hidrofílico ou lipofílico, além da forma e organização das moléculas é essencial (NGUYEN et al., 2012).

De acordo com Clares e colaboradores (2014), tratando-se de produtos e/ou substância nanotecnológicas de aplicação tópica, o ideal é que corresponda a um tamanho de 100 nanômetros. Superior a esse tamanho, essas partículas tendem a ficar retidas no estrato córneo, e quando ocorre o processo de renovação da pele elas são eliminadas com maior facilidade.



Figura 6: Penetrabilidade do cosmético na pele. **Fonte:** Allen et al., 2007.

2.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

2.4.1 Considerações Gerais

As nanopartículas surgiram no início dos anos 80 quando foi desenvolvido por Speiser e colaboradores, em Zurique (Suíça). A técnica utilizada foi o procedimento de emulsificação com o emprego de agitação sob alta velocidade para mistura da fase oleosa (estado líquido) e da fase aquosa, sob alta temperatura e contendo tensoativos (TOMAZINI et al., 2007). Após as misturas, procedia-se o arrefecimento, obtendo-se então, partículas contendo substâncias ativas e que foram inicialmente denominadas de “*nanopelletes*” lipídicos (MARQUES, 2010).

A primeira geração de nanopartículas lipídicas (NL) em tamanho nanométrico patenteadas surgiu durante os anos de 1991 e 1996 na sequência dos trabalhos de Lucks e Müller (1996), os quais introduziram o termo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) utilizando o método de produção por homogeneização sob alta pressão. Em 1999, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram introduzidos como uma segunda geração de NL, com o intuito de minimizar as limitações deixadas pelas NLS, como por exemplo: a capacidade limitada de

encapsulação, expulsão do fármaco durante a estocagem e alto conteúdo de água na dispersão (NICULAE et al., 2014).

Segundo Cevc e Vierl (2010), as NL têm uma estrutura similar às nanoemulsões, pois seus tamanhos variam de 40 a 1000 nanômetros. A diferença é que o núcleo lipídico se encontra no estado sólido e a matriz consiste apenas em um único lipídio sólido ou uma mistura de lipídios (Figura 7) (GUIMARÃES E RÉ. 2011).

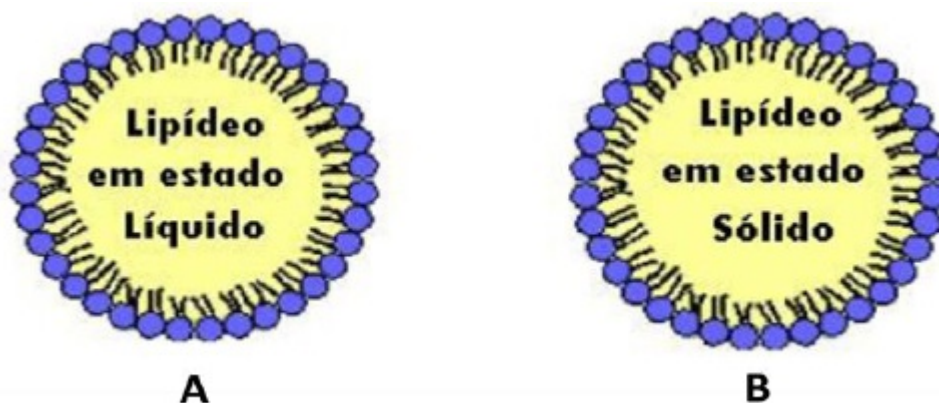


Figura 7: A: Representação de Nanoemulsões; B: Nanopartículas Lipídicas. **Fonte:** Guimarães e Ré. 2011.

2.4.1.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente ou corporal e apresentam tamanho médio de partículas entre 100 a 300 nm. Dentre as várias vantagens que as NLS oferecem, ressalta-se a possibilidade de obter liberação prolongada, excelente estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis frente à degradação, capacidade de controle de liberação, redução da toxicidade dos seus componentes, além da facilidade de produção em larga escala e de esterilização (WISSING et al., 2004). O tamanho em escala nanométrica e a proteção do fármaco encapsulado são características que tornam esses sistemas promissores para sua administração (SAUPE E RADES, 2006). Com o decorrer do tempo, estas nanopartículas apresentaram uma baixa capacidade de encapsulação devido sua estrutura ser mais ordenada, fazendo com que ocorresse a expulsão do princípio ativo encapsulado, tornando a capacidade de incorporação de fármacos limitada (GUIMARÃES E RÉ, 2011).

As NLS são constituídas por uma rede cristalina, em que a incorporação de fármacos ocorre, em geral, apenas no espaço situado entre as cadeias dos lipídios (WONG et al., 2007). Desde modo, essas estruturas cristalinas deixam em sua estrutura espaços quase perfeitos (Figura 8). Porém, devido o seu alto grau de ordem, o número de imperfeições na malha cristalina é reduzido, levando a expulsão dos ingredientes ativos dentro de um curto período de tempo, que pode ocorrer durante o processo de recristalização (GUIMARÃES E RÉ, 2011).

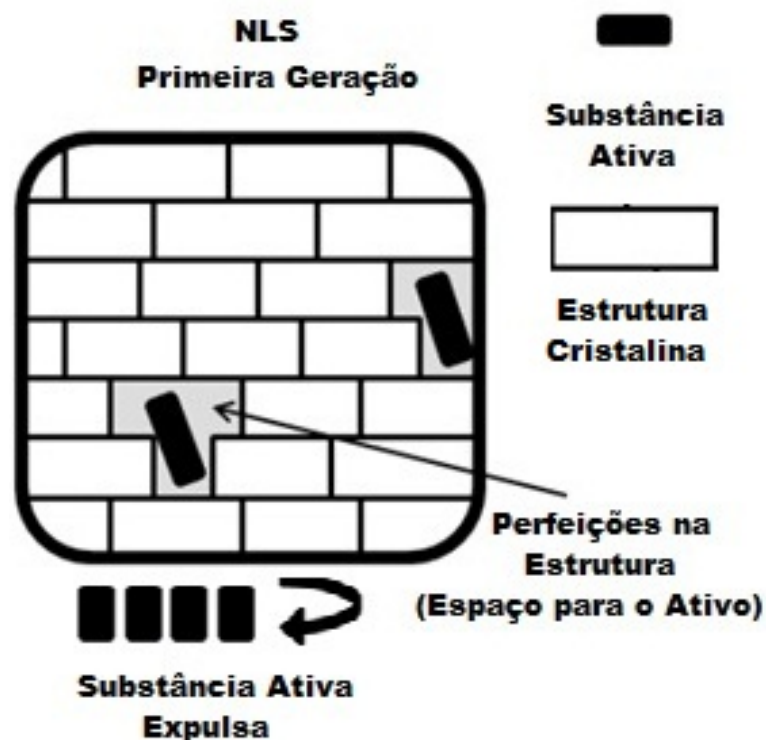


Figura 8: Processo de incorporação do ativo em nanopartículas lipídicas sólidas: A formação de uma estrutura cristalina quase perfeita em nanopartículas lipídicas sólidas em forma idêntica por moléculas semelhantes a uma parede de tijolo, que resulta na expulsão do ingrediente ativo. **Fonte:** Adaptado de Guimarães e Ré, 2011.

Neste sentido, tem sido proposto que a incorporação de fármacos pode ser aumentada pela incorporação de óleo na matriz lipídica sólida, o que deu origem aos carreadores lipídicos nanoestruturados (FREITAS E MÜLLER, 1999).

2.4.1.2 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)

Os CLN têm sido proposto como nanopartículas lipídicas de segunda geração, pois possibilitam uma maior incorporação de fármacos e mantiveram o controle de liberação dessas substâncias (SOUTO et al, 2004). Os CLN são formados por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos em temperatura ambiente ou corporal, utilizando o mesmo processo de obtenção que as NLS (TAMJIDI et al., 2013). Entretanto, por possuírem porcentagens variáveis de lipídios líquidos em sua composição, formam estrutura mais densas e com mais imperfeições (Figura 9), o que resulta no aumento dos espaços para acomodar o fármaco, acarretando em uma maior eficiência de encapsulação, devido à inibição do processo de cristalização (WISSING et al., 2004).

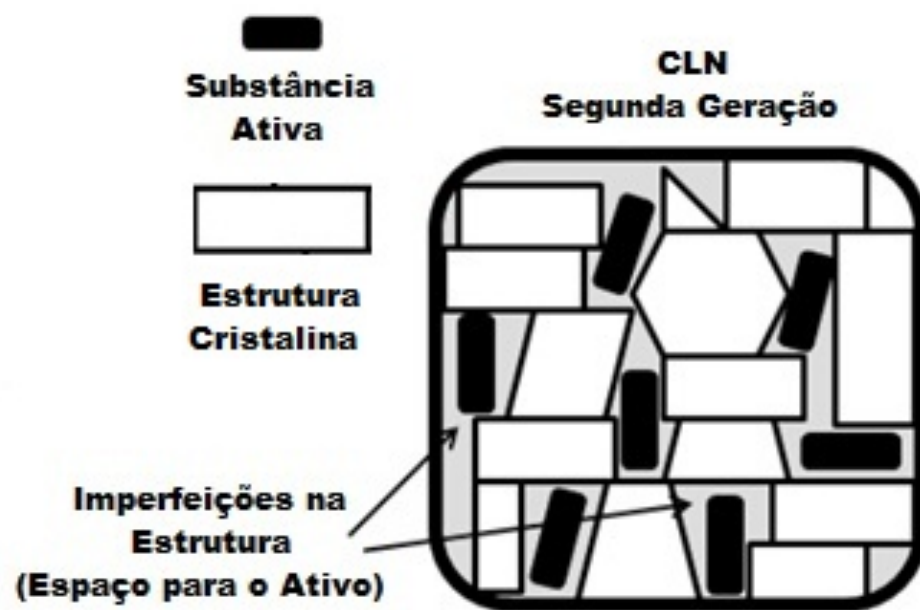


Figura 9: Processo de incorporação do ativo em carreadores lipídicos nanoestruturados: Formação de uma matriz de partículas sólidas de carreadores lipídicos nanoestruturados com muitas imperfeições comparáveis para a construção de um muro de pedras de forma muito diferentes, resultando na incorporação do ativo. **Fonte:** Adaptado de Guimarães e Ré, 2011.

2.5 OBTENÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PELA TÉCNICA DE HOMOGENEIZAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO (HAP)

De acordo com Souto e colaboradores (2011), a incorporação de substâncias ativas hidrossolúveis e lipossolúveis é obtida através de diversos métodos de produção de nanopartículas lipídicas (NL). A Tabela 1 indica algumas das técnicas descritas na literatura para a obtenção de NL:

Tabela 1: Principais técnicas para obtenção de nanopartículas lipídicas.

Técnica	Referências
Homogeneização sob Alta Pressão	Liedtke, 2000; Mehnert, 2001; Wissing, 2004.
Microemulsificação	Gasco, 1993; Priano, 2007.
Ultrasonicação	Pietkiewicz, 2004; Puglia, 2008.
Membrana Contrátil	Charcosset, 2005; El-harati, 2006.
Emulsificação-evaporação do Solvente	Sjöström, 1992.
Emulsificação-difusão do solvente	Hu, 2002; Trotta, 2003.
Substituição do Solvente	Schubert, 2003.
Inversão de Fases	Heurtault, 2002
Emulsão Múltipla	Garcy-fuentes, 2002.

Fonte: Pardeike et al., 2009.

A técnica de homogeneização sob alta pressão (HAP) tem surgido como uma técnica segura e importante para a preparação de NL (PARDEIKE et al., 2009). O HAP (Figura 10) atua transportando uma emulsão ou suspensão por um espaço pequeno, que através de um impacto, leva ao cisalhamento das partículas por um processo mecânico, fazendo com que estas tenham os tamanhos reduzidos (TADROS, 2009). Este processo, pode ocorrer várias vezes até que se atinja o tamanho desejado das partículas (GUIMARÃES E RÉ, 2011). Esta técnica apresenta vantagens em relação as demais, tais como: facilidade de transposição de escala, não utilização de solventes orgânicos, possibilidade de operação em condições assépticas e curto tempo de produção (SOUTO et al., 2011). Além disso, a HAP é utilizada há anos em indústrias farmacêuticas na produção de nanoemulsões para nutrições parenterais (HIPALGAONKAR et al., 2010).

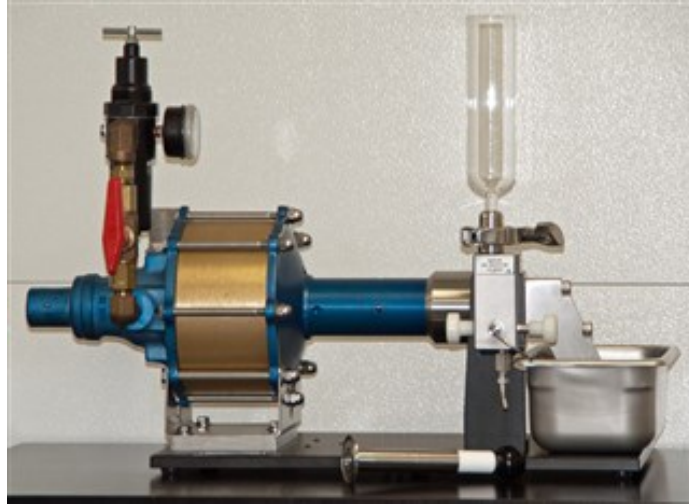


Figura 10: Homogeneizador sob Alta Pressão. **Fonte:** Microfluidics.

A HAP pode ser realizada a uma temperatura superior ou inferior à temperatura de fusão do lipídio, o que permite realizar o processo de homogeneização de duas maneiras: homogeneização sob alta pressão a quente e homogeneização sob alta pressão a frio (KASONGO et al., 2011). Em ambos os casos, ocorre a passagem de um fluido através de uma fenda de cerca de 3 μm de diâmetro, submetendo as partículas a vários fenômenos físicos simultâneos (Figura 11), causando a redução do tamanho de partículas e/ou gotículas (HOMMOSS, 2009).

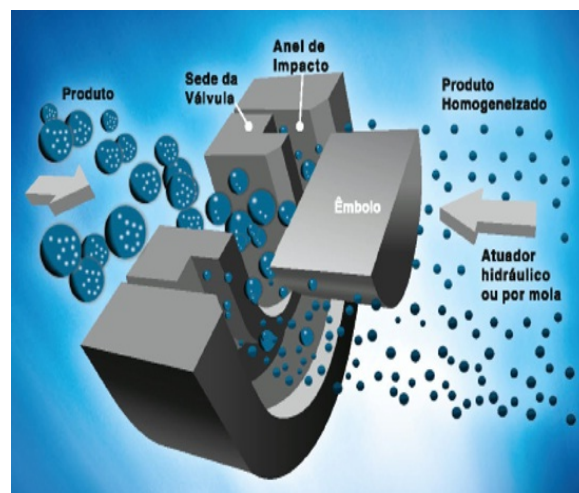


Figura 11: Esquema de operação do homogeneizador sob alta pressão. **Fonte:** adaptado de Floury et al., 2014.

2.5.1 Homogeneização sob alta pressão a quente e a frio

A homogeneização a quente é feita em temperatura acima do ponto de fusão do lipídio e seu produto primário é uma nanoemulsão, devido o estado líquido do lipídio, que é resfriada em temperatura igual ou inferior a ambiente, resultando na solidificação e formação de NLS (MEHNERT E MÄDER, 2001). O lipídio fundido contendo a substância ativa é emulsificado com uma solução aquecida de tensoativo a uma temperatura variando cerca de 5 a 10 °C acima do seu ponto de fusão (Figura 12) (MÜLLER et al., 2002). Em geral, temperaturas maiores produzem partículas menores, devido a diminuição da viscosidade da fase interna, no entanto, temperaturas elevadas podem também favorecer a degradação do ativo e do carreador (WISSING et al., 2004).

A etapa de HAP a quente pode ser repetida várias vezes e na maioria dos casos, são necessários apenas três a cinco ciclos de homogeneização com pressão em torno de 500 a 1500 bar (GUIMARÃES E RÉ, 2011). No entanto, o aumento da pressão ou do número de ciclos pode favorecer a coalescência das partículas devido ao aumento da energia cinética fornecida (MÜLLER et al., 2002).

A homogeneização a frio tem sido desenvolvida para superar algumas limitações deixadas pelo processo a quente, como: indução de degradação do ativo por altas temperaturas, distribuição do ativo numa fase aquosa durante a homogeneização (SERRA et al., 2008). Diferente da homogeneização a quente, o processo a frio é feito com o lipídio sólido que junto com o fármaco são fundidos e resfriados, resultando em uma massa que ao ser triturado forma uma micropartícula lipídica as quais são dispersas em uma solução fria de tensoativo (MÜLLER et al., 2002).

A primeira etapa preparatória de homogeneização a frio (Figura 12) é a mesma utilizada na homogeneização a quente e inclui a solubilização do lipídio fundido. Porém as etapas seguintes são diferentes, pois o lipídio fundido é resfriado bruscamente (por meio de gelo seco ou nitrogênio líquido), o que favorece a distribuição homogênea do ativo dentro da matriz lipídica, seguida de moagem da micropartículas (50 a 100 microns) do lipídio sólido contendo o ativo (HOMMOSS, 2009). Essas micropartículas lipídicas são dispersas em uma solução fria de um tensoativo, formando uma pré suspensão, que é homogeneizada em seguida, para

que as forças de cavitação quebrem as micropartículas diretamente em nanopartículas (GUIMARÃES E RÉ, 2011).

Em comparação com a homogeneização a quente, o processo a frio requer um maior número de ciclos de homogeneização (5 a 10 ciclos em média) a 1500 bar, originando CLN de dimensões superiores e mais heterogêneos. Em geral, quanto maior for a pressão aplicada, menores serão as partículas, as quais serão limitadas, por meio da ocorrência do fenômeno da coalescência (SOUTO et al., 2011).

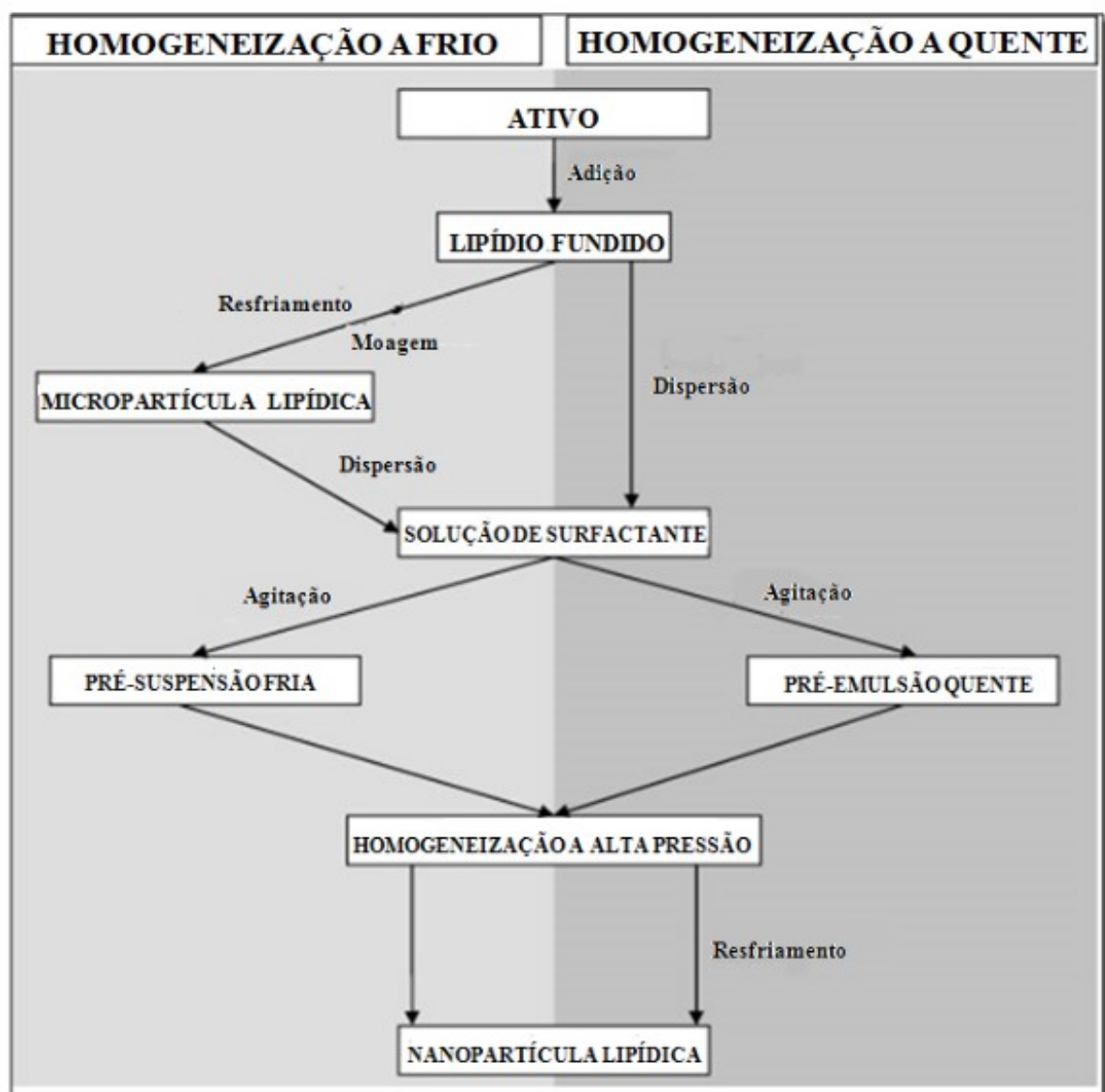


Figura 12: Processo de produção de nanopartículas lipídicas por homogeneização sob alta pressão. À esquerda, homogeneização sob alta pressão a frio; à direita, homogeneização sob alta pressão a quente. **Fonte:** Adaptado de Mehnert e Mäder, 2001.

2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Os métodos de caracterização pode estabelecer parâmetros para prever o desempenho das NL e pressupor a formação de algum produto de degradação (MEHNERT E MÄDER, 2001).

2.6.1 Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta

O tamanho de partícula é geralmente escolhido como o primeiro parâmetro de qualidade do produto e este pode variar em função da composição da formulação e dos métodos e condições utilizados: tempo, temperatura e pressão (GUIMARÃES E RÉ, 2011). O índice de polidispersidade (PDI) é uma medida da largura da distribuição do tamanho de partícula e quanto mais próximo de zero, mais homogênea é uma dada população de partículas. O PDI entre 0,10 e 0,20 indica uma distribuição relativamente estreita, enquanto valores acima de 0,5 são obtidos em caso de distribuição muito ampla (HOMMOSS, 2009). O Potencial Zeta, indica a estabilidade das partículas. Em geral, dispersões com potencial zeta variando de -30 a +30 mV (em valor absoluto) são consideradas fisicamente estáveis devido a repulsão eletrostática, tendendo a uma menor agregação durante a estocagem (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008).

A Espectroscopia de Correlação de Fótons (ECF) é a técnica mais utilizada na determinação de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta (HOMMOSS, 2009). É uma técnica útil na análise de partículas subcrômicas, capaz de detectar desde poucos nanômetros até cerca de 10 micrômetros em suspensão de concentração entre 0,001 a 40 % (GUIMARÃES E RÉ, 2011). Seu mecanismo baseia-se no movimento browniano, fenômeno no qual partículas suspensas em líquido nunca são estacionárias, estando em constante movimento aleatório, em razão de colisões com moléculas do líquido que circulam.

2.6.2 Aspectos Morfológicos

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) fornecem uma maneira de observar diretamente e caracterizar nanopartículas (GUIMARÃES E RÉ, 2011). A MET, é uma técnica eficaz para estudar os detalhes mais finos de uma estrutura. Por outro lado a MEV, é ideal para estudar a topografia da superfície da estrutura, mas fornece poucas informações sobre a estrutura interna da partícula (MEHNERT et al., 2012).

A MET é constituída basicamente de uma fonte de elétrons que são orientados e acelerados por alta diferença de potencial ao longo de uma coluna composta de lentes eletromagnéticas e aberturas que definem o caminho, intensidade e tamanho, ou seja, controlam o feixe de elétrons antes e após este relacionar-se com a amostra (BRETT et al., 2004). Após atravessar a imagem o feixe irá interagir com outros conjuntos de lentes e finalmente irá gerar a imagem ou difração em uma tela com cristais ativados ou então, registrar a imagem em um filme fotográfico situado logo abaixo da tela (GOZZO, 2009). A formação da imagem da MET está relacionada ao tipo de interação sofrida pelo feixe eletrônico ao atravessar o material e sua espessura.

2.6.3 Eficiência de Encapsulação

A Eficiência de encapsulação (EE) é definida como a porcentagem da substância ativa encapsulada em relação a quantidade total do ativo inicialmente adicionado ao sistema. Esta análise é fundamental para avaliar o desempenho do sistema de liberação (GUIMARÃES E RÉ). A EE é geralmente avaliada por um método de ultrafiltração/centrifugação, na qual, é uma boa técnica de separação das frações encapsuladas e livre de fármacos em NL. As partículas com o fármaco encapsulado permanecem na parte superior de tubos de centrifuga equipados com um sistema filtrante, enquanto a fase aquosa com fármaco livre move-se para a parte inferior (PUGLIA et al., 2008). Em seguida, a quantificação é realizada por métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV/VIS).

2.6.4 Perfil de Liberação *ex vivo*

A habilidade de um fármaco presente em formulações tópicas em permear a pele depende da sua capacidade de liberação e da difusão do princípio ativo por esta barreira para o sítio de ação (LIRA et al., 2004). Os estudos *in vitro* de liberação e absorção cutânea representam a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos onde é possível selecionar os excipientes mais apropriados às formas farmacêuticas de liberação dérmica, proporcionando uma liberação adequada dos princípios ativos e, conseqüentemente, alcance do efeito terapêutico desejado (ANTONIO, 2007; SATO et al., 2007).

O estudo de permeação cutânea *in vitro* é uma ferramenta determinante na avaliação do comportamento de formulações semi-sólidas de uso tópico, considerando as inúmeras variáveis que comprometem o processo de desenvolvimento. Este estudo baseia-se na liberação e difusão do fármaco veiculado na formulação através de uma membrana para uma solução receptora, garantindo condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco (NUNES, 2008). Através deste estudo são obtidos dados que possibilitam um maior entendimento dos fatos ocorridos, desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, retenção e absorção cutânea (NOKHODCHI et al., 2003; ANTONIO, 2007).

Os sistemas de difusão celular são empregados em modelo *in vitro* para quantificar a velocidade de liberação dos princípios ativos das preparações tópicas. Nesses sistemas, membranas da pele ou sintéticas podem ser empregadas como barreira ao fluxo do fármaco e do veículo para simular um sistema *in vivo* (SILVA-JÚNIOR, 2006; EKAMBARAM et al., 2012).

2.7 LIPÍDIOS

Os lipídios são biomoléculas que exibem uma grande variedade estrutural. São compostos orgânicos heterogêneos, poucos solúveis em água e mais solúveis em solventes não polares (CURI et al., 2002). Alguns lipídios combinam-se com outras classes de compostos como proteínas (lipoproteínas) e carboidratos (glicolipídios) (HORTO et al., 2002). Os lipídios participam como componentes não

proteicos das membranas biológicas, precursores de compostos essenciais, agentes emulsificantes, isolantes, vitaminas (A, D, E, K), fonte de transporte de combustíveis, metabólicos, além de componentes de biossinalização intra e intercelulares (HORTO et al., 2002). Nessas biomoléculas também podem ser encontrados óleos, gorduras, ceras, esteróis, terpenos, sabões, detergentes e sais biliares (CURI et al., 2002).

Óleos e gorduras de origem natural são amplamente utilizados como veículos para aplicação de substâncias ativas na pele, sendo, inclusive, componentes básicos em diversos produtos farmacêuticos e cosméticos (ROWE et al., 2009). Seu uso é justificado pela semelhança da composição química dos lipídios que são naturalmente encontrados na pele humana e são fisiologicamente compatíveis além de, possuir um menor risco de toxicidade aguda e crônica (MEHNERT et al., 2012).

As nanopartículas lipídicas são obtidas a partir de lipídios. Em geral, as nanodispersões lipídicas contem cerca de 5 a 40 % de lipídios (SCHÄFER-KORTING et al., 2007). A Tabela 2 apresenta exemplos de alguns lipídios sólidos utilizados na obtenção de nanopartículas lipídicas.

Tabela 2: Exemplos de lipídios sólidos utilizados em nanopartículas lipídicas.

Tipo	Nome Químico	Referência
Acilglicerois	Palmitoestearato de Glicerila Behenato de Glicerila Trimiristato de Glicerila Tripalmitato de Glicerila Triestearato de Glicerila Monoestearato de Glicerila	Nnamani et al., 2010 Pozo-Rodriguez et al, 2010 Basaran et al, 2010 Attama et al., 2007 Basaran et al., 2010 Shan et al., 2011
Ácidos Graxos	Ácido Esteárico Ácido Palmítico Ácido Bahênico	Cavalli et al., 1997 Xie et al., 2011 Cavalli et al., 1997
Alcoois Graxos	Álcool Cetílico Álcool Estearílico	Sanna et al., 2010 Souto et al., 2004
Ceras	Cera de Carnaúba Cera de Abelha Palmitato de Cetila	Villalobos-Hernandes et al., 2006 Kheradmandnia et al., 2010 Teeranachaideekul et al., 2007

A natureza química e a concentração dos lipídios influenciam significativamente nas características físico-químicas das nanopartículas (SOUTO et al., 2011). A composição lipídica, formada por diferentes proporções de lipídio sólido e líquido, e a concentração total de lipídios na formulação de CLN são parâmetros de composição que definem características relevantes como a incorporação, proteção e perfil de liberação do fármaco a partir dos CLN. Normalmente, o acréscimo da concentração de lipídios sólidos tende a aumentar o tamanho das partículas, devido à expansão de viscosidade da dispersão coloidal, tornando mais difícil a sua emulsificação na fase aquosa (BASARAN et al., 2010). No entanto, a adição de lipídios líquidos pode induzir a redução da viscosidade do meio, contribuindo para redução do tamanho dessas partículas (HEJRI et al., 2013).

Em geral, matrizes lipídicas sólidas muito ordenadas apresentam menor taxa de difusão de substâncias ativas, influenciando no perfil de liberação do fármaco. Além disso, outros fatores como velocidade de cristalização, hidrofiliicidade dos lipídios e a forma dos cristais lipídicos também podem influenciar nas características dessas nanoestruturas (ATTAMA et al., 2012).

2.7.1 Cera de Carnaúba

As ceras de origem vegetal são encontradas nas secreções de folhas, caules e frutos, como por exemplo a cera de carnaúba, que é obtida da árvore da carnaúba (*Corpenicia prunifera*) (Figura 13) (WARTH, 1947). A árvore de carnaúba pode ser encontrada nas regiões secas e áridas do nordeste brasileiro. O Brasil é o único país do mundo que produz a cera de carnaúba, tendo os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte como os principais produtores (BENNET, 1963).



Figura 13: Árvore da Carnaúba. **Fonte:** Carvalho, 2005.

A cera de carnaúba (Figura 14) é uma cera amplamente utilizada nos setores alimentício, cosméticos e farmacêutico. Na área cosmética e farmacêutica, é comumente usada em protetores solares (ROWE et al., 2009).

Seus principais componentes químicos incluem ésteres alifáticos, alcoóis livres, ésteres ω -hidroxilados, diésteres alifáticos p-metoxicinâmicos e diésteres alifáticos p-hidroxicinâmicos, compostos de cadeia de diversos tamanhos, onde predominam ácidos com vinte e seis carbonos e alcoóis com trinta e dois carbonos e seu ponto de fusão é de 81 a 86 °C (CARVALHO, 2005).



Figura 14: Cera de carnaúba em escamas. **Fonte:** Carvalho, 2005.

Mitrea e colaboradores (2014), analisaram desenvolvimento de NLS e CLN com cera de carnaúba como alternativa de componentes lipídicos. Os autores, verificaram a ação de vários lipídios sólidos no tamanho e estabilidade física de CLN obtidos pelo métodos de HAP. Os CLN apresentaram tamanho médio em torno de 200 nm e potencial zeta entre -30,4 e -64, que segundo os autores conferiu excelente estabilidade física e baixa probabilidade de agregação das nanopartículas.

2.7.2 Triglicéride de Ácido Cáprico e Caprílico (TACC)

Miglyol[®] ou triglicéride de ácido cáprico e caprílico (Figura 15) caracterizam-se por ser um óleo extraído da fração dura e seca do endosperma do *Cocos nucifera L.* ou do endosperma seco da *Elaeis guineensis Jacq*, também conhecido como coqueiro de dendê (SASOL, 2008). Ele consiste em um óleo neutro de aparência clara, ligeiramente amarelada, praticamente incolor, odor e sabor neutros, solidifica a cerca de 8 °C e é constituído por uma mistura de triglicerídeos de ácidos graxos saturados, principalmente os ácidos cáprico e caprílico, não contendo menos que 95 % de ácidos graxos saturados (ROWE et al., 2009).

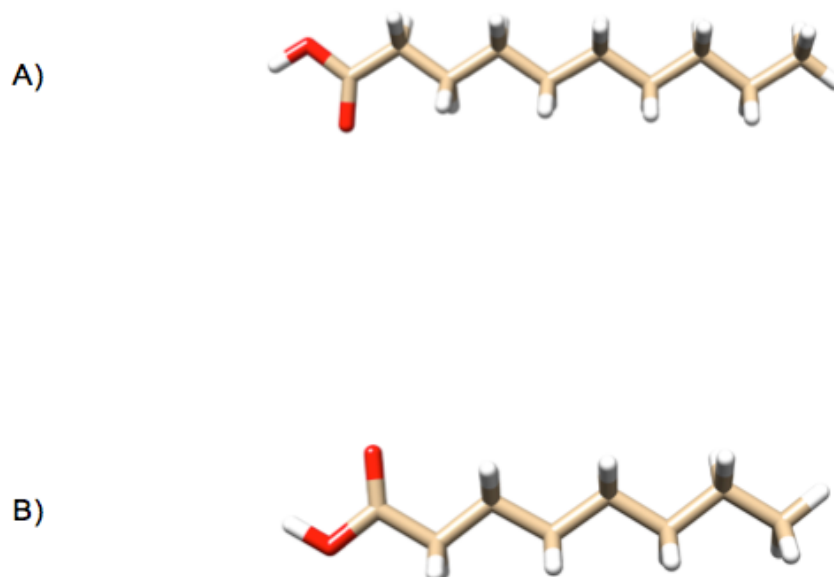


Figura 15: A: Representação esquemática do ácido cáprico; B: Representação esquemática do ácido caprílico. **Fonte:** Chimera 1.10.1.

Sendo altamente compatível com a pele, o TACC lubrifica e oferece uma suave sensação emoliente e não oleosa. Também, é usado para facilitar a dispersão de pigmentos e modificar sua viscosidade em formulações finais (MARTIDALE, 2002). O TACC apresenta as vantagens de ser inodoro, possuir grande miscibilidade e solubilidade, estabilidade contra oxidação, baixa viscosidade e alta lubrificação, provém de origem vegetal e possui excelente espalhabilidade (ROWE et al., 2009). Comparado aos óleos naturais seus benefícios são a alta estabilidade contra oxidação, permanece líquido a 0 °C, excelente espalhabilidade sobre a pele e boa absorção cutânea, não inibe a respiração da pele, promove excelente penetração, emoliência e possui boas características de solubilidade (SASOL, 2008).

2.8 TENSOATIVOS

Além dos lipídios, substâncias tensoativas são utilizadas para o preparo de nanopartículas lipídicas para evitar a deposição e agregação de partículas dispersas. Essas substâncias são caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares, as quais podem formar emulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), sendo definidas principalmente pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e apolar do emulsionante empregado, denominado tecnicamente de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) (BILLANY, 2005).

O tipo e a concentração de tensoativo influenciam diretamente no tamanho e na eficiência de encapsulação. Em geral, dependendo da concentração do lipídio utiliza-se 0,5 a 5 % de tensoativos. Essas substâncias reduzem a tensão interfacial, aumentam a área de superfície e, em consequência originam nanopartículas de tamanho menores, além disso, a presença deles permite a emulsificação entre as fases aquosas e oleosas e formam uma barreira elétrica ou mecânica que impede a coalescência das partículas ao longo do seu armazenamento (SCHÄFER-KORTING et al., 2007; SOUTO et al., 2011).

A escolha do tensoativo é baseada em sua compatibilidade química com os lipídios e com o seu valor de EHL (ATTAMA et al., 2012). A Tabela 3 exemplifica alguns agentes tensoativos comumente empregados para a constituição de nanopartículas lipídicas.

Tabela 3: Exemplos de tensoativos usados em nanopartículas lipídicas.

Tensoativos	EHL	Referência
Lecitina	4-9	Attama et al., 2008.
Poloxamer 188	29	Attama et al., 2006.
Poloxamer 407	21,5	Göpert et al., 2005.
Polissorbato 20	16,7	Varshosaz et al., 2010.
Polissorbato 65	10,5	Attama et al., 2005
Polissorbato 80	15	Attama et al., 2008.
Cremophor EL	12-14	Pandita et al., 2009.
Solutul HS 15	15	Schubert et al., 2006

Fonte: ATTAMA, 2012.

2.8.1 Polissorbato[®] 80

O polissorbato[®] 80, ou Tween 80 caracteriza-se como o tensoativo não iônico hidrófilo muito utilizado no preparo de formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Dentre suas características, destacam-se as funções solubilizantes, emulsificantes e estabilizantes, além de ser eficaz no controle da aglomeração da gordura, que contribui para a cremosidade devido vários graus de rigidez no congelamento e desenvolvimento de pequenas células. Essas características são determinantes para sua aplicação em cosméticos como cremes e loções (MAPRIC, 2008; ZHANG, 2012).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), o Polissorbato[®] 80 possui uma estrutura química característica (Figura 16), com cerca de vinte grupos de polioxietileno por molécula, sendo descrito como um líquido oleoso, límpido, de cor amarela ou marrom clara, com odor característico, EHL igual a 15, baixo potencial de irritação e toxicidade. Apresenta ainda, uma composição lipídica, de modo que os ácidos oléicos (58 %), linoléico (18 %) e palmítico (16 %) apresentam-se como componentes majoritários (ROWE et al., 2009).

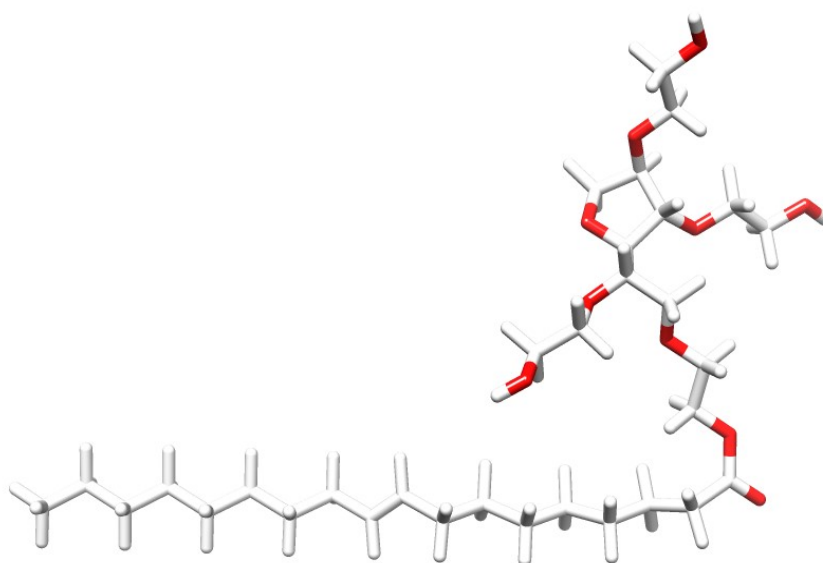


Figura 16: Representação esquemática do Polissorbato[®] 80. **Fonte:** Chimera 1.10.1.

2.8.2 Pluronic F-127[®]

O Pluronic[®] F-127 (Figura 17), pertence a um grupo de tensoativos não iônicos, apresentando alta biocompatibilidade e solubilidade (ROWE et al., 2009). Este tensoativo se caracteriza pela presença de copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, sendo muito usado como agente solubilizante ou emulsificante em formulações farmacêuticas, devido à estabilidade e a toxicidade das soluções aquosas do Pluronic (ZHANG, 2012).

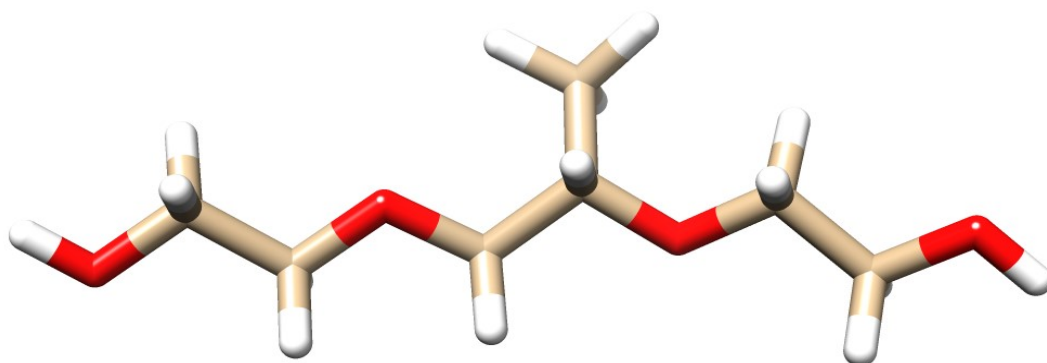


Figura 17: Representação esquemática do Pluronic[®] F-127. **Fonte:** Chimera 1.10.1.

2.9 CETOCONAZOL

Até 1970, poucos agentes antifúngicos eram conhecidos e apresentavam limitações como toxicidade e estreito espectro de atividade farmacológica (SANTOS et al., 2009). Os fármacos da classe dos imidazóis foram introduzidos na terapêutica por apontar vantagens como grande versatilidade de administração, baixa toxicidade, amplo espectro de atividades e efetividade nos tratamentos de infecções superficiais e sistêmicas (PANDEESWARAN E ELANGO, 2009).

O cetoconazol (Figura 18), lançado no início da década de 80, foi o primeiro composto imidazólico disponível para tratamento por via oral (FITZPATRICK et al., 1997). Este fármaco tem caráter lipofílico e representa um dos antifúngicos mais usados na terapêutica, sendo este, uns dos fármacos de escolha para o tratamento de micoses superficiais e cutâneas, podendo ainda, ser incorporado em diversas formas farmacêuticas (SANTOS et al., 2009). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de ergosterol, o principal componente das membranas celulares dos fungos (KATHIRAVAN et al., 2012). Segundo especificações da Farmacopéia Americana de 2006, o cetoconazol é um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool e solúvel em metanol e cloreto de metileno, com ponto de fusão entre 148 a 152 °C e peso molecular de 531,43 g/mol. Seu nome químico é *cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclofenil)-2-(1H-imidazol-1-yl)-metil]1,3-dioxolan-4-yl]metoxil]fenil]piperazina.

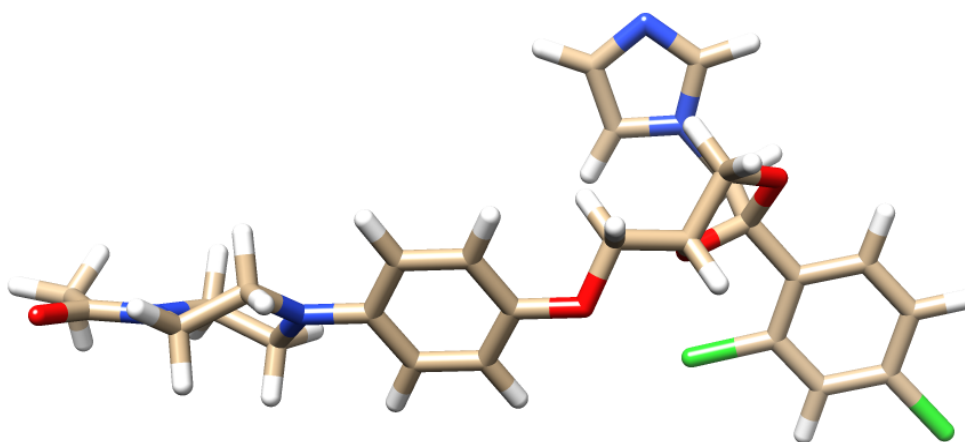


Figura 18: Representação esquemática do Cetoconazol. **Fonte:** Chimera 1.10.1.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Obter e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de murumuru pela técnica de homogeneização sob alta pressão, usando o cetoconazol como fármaco modelo.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a gordura de murumuru quanto ao perfil de ácidos graxos, o índice de iodo, saponificação, acidez, peróxido, refração e densidade;
- ✓ Caracterizar por análise térmica a gordura de murumuru, cera de carnaúba, triglicéride de ácido cáprico e caprílico, cetoconazol isoladamente e associados;
- ✓ Produzir os carreadores lipídicos nanoestruturados pela técnica de homogeneização sob alta pressão;
- ✓ Caracterizar os carreadores lipídicos nanoestruturados quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, perfil de liberação *ex vivo* e estabilidade física.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Gordura de Murumuru

A gordura (Lote: AMO 012/2012) foi coletada no estado do Pará em junho de 2012 e fornecida pela *Amazon Oil Industry* (Pará, Brasil). A extração foi realizada através de prensa mecânica e armazenada à temperatura de 4 °C, ao abrigo de luz e ar atmosférico, até a realização das análises. Vale ressaltar que, a gordura de murumuru não apresentou etapas de refinamento, sendo portanto de natureza bruta.

4.1.2 Cetoconazol

O Cetoconazol (Lote: 002082), fármaco modelo deste estudo, foi adquirido da Natural Pharma (São Paulo, Brasil) e sua substância química de referência (Lote: 1033), foi gentilmente fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, sendo coordenado pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

4.1.3 Cera de Carnaúba

A cera de Carnaúba (Lote: 3211/12) foi adquirida da GM Ceras (São Paulo, Brasil). Foi utilizada como coadjuvante na constituição da matriz lipídico sólido dos CLN.

4.1.4 Triglicérides de Ácido Cáprico e Caprílico (TACC)

O TACC (Lote: 15084604A) foi adquirido pela Fagron (São Paulo, Brasil). Foi utilizado como coadjuvante na constituição da matriz lipídico líquido dos CLN.

4.1.5 Polissorbato[®] 80

O Polissorbato[®] 80, ou Tween 80 (Lote: 37365), foi adquirido junto a Sabão e Glicerina (São Paulo, Brasil). Foi o tensoativo utilizado para estabilização de dispersão aquosa de nanopartículas.

4.1.6 Pluronic[®] F-127

O Pluronic[®] F-127 (SLBL1780V) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Foi o tensoativo utilizado para estabilização de dispersão aquosa de nanopartículas.

4.1.7 Membrana Biológica

A pele de orelha de porco foi adquirida do matadouro Arrudão (Castanhal, Pará).

4.2 EQUIPAMENTOS, REAGENTES, SOLVENTES E UTENSÍLIOS

Com o objetivo de determinar a caracterização dos materiais e obtenção dos CLN, foram utilizados alguns materiais como podem ser observado nas Tabelas 4 e 5.

4.2.1 Composição da Gordura Vegetal

Tabela 4: Equipamentos, reagentes, solventes e utensílios para a caracterização dos materiais.

Equipamentos	Reagentes e Solventes	Utensílios
Cromatógrafo GC CP 3380 Varian, equipado com detector de ionização em cha-ma	Hidróxido de Potássio	Espátulas
	Metanol	Beckeres
	Ácido Clorídrico	
	Hexano	Balões Volumétricos
	Gás Nitrogênio	
Gás Hélio		
Termobalança Shimadzu DSC60HPlus	Gás Hidrogênio	Espátulas Cadinhos de Alumínio
	Gás Nitrogênio	

4.2.2 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Tabela 5: Equipamentos, reagentes, solventes e utensílios utilizados para a Obtenção dos CLN.

Equipamentos	Utensílios
Agitador Magnético Fisatom	Beckeres
	Barra magnética
	Termômetro químico
Dispersador Ultra-Turrax – Ultra Stirrer – Modelo: 380	Beckeres
Homogeneizador de Alta pressão – Microfluidics-Newton, Massachusetts, USA. Modelo: 110S(s)	Beckeres

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Caracterização da Gordura de Murumuru

4.3.1.1 Composição de Ácidos Graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa dos seus respectivos ésteres metílicos, de acordo com a metodologia de Rodrigues e colaboradores (2010). Os derivados foram isolados via saponificação e esterificação com Hidróxido de Potássio (KOH) em Metanol (0,1 mol/L) e Ácido Clorídrico (HCL) em Metanol (0,12 mol/L). Em seguida, foram extraídos com hexano e injetados em um cromatografo gasoso. A identificação dos componentes foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões ésteres metílicos. Já a quantificação, foi realizada pela conversão das percentagens das áreas dos picos, em percentagem de massa.

As condições cromatográficas incluem: Fase estacionária: coluna capilar CP-Sil 88 (60 m x 0,25 mm); Gás de arraste: Hélio; Volume de injeção: 1 µl; Vazão do gás de arraste: 0,9 mL/min; Temperatura no injetor e no detector: 250 °C; Temperatura na coluna: 80 a 205 °C, de acordo com a seguinte programação de temperatura: a) 5 minutos a 80 °C; b) Aquecimento gradual até 175 °C; c) 28 minutos a 175 °C; d) Aquecimento gradual até 205 °C, e) 8 minutos a 205 °C.

4.3.1.2 Índice de Iodo

O índice de iodo foi determinado pelo método indireto, de acordo com os protocolos AOCS Cd 1c- 85 e calculado de acordo com a Equação 1.

Equação 1:

$$\text{Índice de Iodo} = (\% \text{ ácido palmitoleico} \times 0,950) + (\% \text{ ácido oleico} \times 0,860) + (\% \text{ ácido linoleico} \times 1,732) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,616)$$

4.3.1.3 Índice de Saponificação

O índice de saponificação foi determinado pelo método indireto, de acordo com os protocolos da AOCS Cd 3a- 94 e calculado de acordo com a Equação 2.

Equação 2: Índice de Saponificação = $3 \times 56,1 \times 1000 / PM \times 3 + 92,09 - (3 \times 18)$

Onde:

PM: peso molécula (ou massa molar) médio dos ácidos graxos (g/mol);

3: número de ácidos graxos por triacilglicerol;

56,1: peso molecular do KOH (g/mol);

1000: conversão de g para mg;

92,09: peso molecular do glicerol (g/mol);

18: peso molecular da água.

4.3.1.4 Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado segundo o protocolo AOCS Cd3d-63. O procedimento consistiu em pesar 0,2 g da amostra em um frasco erlenmeyer de 125 mL e 50 mL de uma solução éter etílico: etanol etílico (1:1), previamente neutralizada com KOH 0,1 N. Em seguida foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína e a solução foi titulada com KOH 0,1N, até coloração rósea, que permaneceu por aproximadamente 30 segundos. O índice de acidez foi calculado com auxílio da Equação 3.

Equação 3: Índice de Acidez = $5,61 \ n/m$

Onde:

n: Volume de hidróxido de potássio 0,1N gasto na titulação;

m: a massa da amostra.

4.3.1.5 Índice de Peróxido

O índice de Peróxido foi determinado de acordo com o protocolo AOCS Cd 8-53. As determinações foram feitas em triplicatas, onde pesou-se 5 g da amostra e em um erlenmeyer. Foram adicionados 30 mL de uma mistura v/v de ácido acético glacial e clorofórmio (3:2), e agitou-se para dissolver. Adicionou-se 0,5 mL da solução saturada de iodeto de potássio e 30 mL de água e agitou-se ocasionalmente durante um minuto. Titulou-se com solução 0,01 M de Tiosulfato de Sódio, até a cor amarela desaparecer. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de solução de amido 1 %, continuando a titulação até a cor azul desaparecer. Para os cálculos do índice de peróxido, expresso em Meq de peróxido em 1000 gramas da amostra, aplicou-se a (Equação 4):

Equação 4: Índice de Peróxido = $10 (n_1 - n_2) / m$

Onde:

n1: Volume gasto na titulação da amostra;

n2: Volume gasto na titulação do branco;

m: Peso da amostra.

4.3.1.6 Índice de Refração

Para a determinação do índice de refração utilizou-se o refratômetro de Abbé, marca Jena acoplado a um banho térmico (Thermo Haake) com temperatura controlada. A leitura foi feita na temperatura de 50 °C, obedecendo o protocolo AOCS Cc7-25.

4.3.1.7 Densidade Relativa

A densidade foi determinada à temperatura de 50 °C, através do método do picnômetro. O picnomêtro com capacidade de 5 mL, previamente calibrado, limpo e seco.

A quantidade de 5 mL da amostra foi transferida para o picnomêtro, caso necessário foi retirado o excesso de amostra, e conferido a temperatura. A massa da

amostra foi obtida através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa é igual a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas na mesma temperatura. A densidade foi calculada com auxílio da Equação 5. O ensaio foi feito em triplicata. A determinação da densidade foi realizada conforme a metodologia proposta pela Farmacopéia Brasileira (2010).

Equação 5:

Densidade relativa a 50 °C = $A - B/C$

Onde:

A: massa do picnomêtro com óleo;

B: massa do picnômetro vazio;

C: massa da água à temperatura de 50 °C.

4.3.2 Análise Térmica dos Materiais

A gordura de murumuru, cera de carnaúba, TACC, cetoconazol e as misturas lipídicas foram caracterizados por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), conforme a metodologia descrita por Lacerda e colaboradores (2011).

Um grama das misturas lipídicas, foi fundida a 92 °C em banho-maria e mantido sob agitação magnética por cinco minutos. A amostra foi resfriada à temperatura ambiente e cinco miligramas foram transferidos para cadinhos de alumínio. Para registo da curva, utilizou-se uma razão de aquecimento de 5 °C/min a uma temperatura entre 25 a 200 °C. A medida ocorreu em uma atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

4.3.3 Obtenção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Foram testados três formulações com diferentes concentrações de tensoativos, conforme indicado na Tabela 6. Foram feitas outras três formulações excluindo o Cetoconazol, com as diferentes concentrações de tensoativo descritas na tabela 6, servindo como referencial para o estudo.

Tabela 6: Condições experimentais para preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.

Formulação	CC (%)	GM (%)	TACC (%)	CTZ (%)	PLC (%)	PLB (%)
F-1	2	2	4	1	0,25	0,25
F-2	2	2	4	1	0,5	0,5
F-3	2	2	4	1	0,75	0,75
F-1*	2	2	4	0	0,25	0,25
F-2*	2	2	4	0	0,5	0,5
F-3*	2	2	4	0	0,75	0,75

CC: Cera de carnaúba; **GM:** Gordura de murumuru; **TACC:** Triglicérides de ácido cáprico e caprílico; **CTZ:** Cetoconazol; **PLC:** Pluronic[®] F-127; **PLB:** Polissorbato[®] 80; * Formulação sem o cetoconazol.

Utilizando a metodologia de Müller e colaboradores (2002), preparou-se uma pré-emulsão óleo em água com as formulações descritas na Tabela 6 e para uma melhor emulsificação das fases, foi necessário a utilização de dois tensoativos: Polissorbato[®] 80 e o Pluronic[®] F-127. A fase aquosa foi preparada pela dispersão a quente de Polissorbato[®] 80 em água, enquanto a fase oleosa, foi constituída por uma mistura lipídica de gordura de murumuru, cera de carnaúba, TACC, Pluronic[®] F-127 e cetoconazol, foi fundida entre 87-92 °C.

Inicialmente, as fases ficaram sob agitação magnética separadamente. Em seguida, a fase aquosa foi invertida sob fase oleosa e essa mistura aplicou-se uma ultra-agitação de 9500 mil rpm por 30 segundos, até a completa homogeneização. As pré-emulsões foram então submetidas a 3 ciclos de 500 bar. Por fim, as nanoemulsões formadas foram resfriadas em temperatura ambiente para a formação das dispersões de CLN. A Figura 19 apresenta um fluxograma simplificado do processo de produção destes sistemas carreadores.

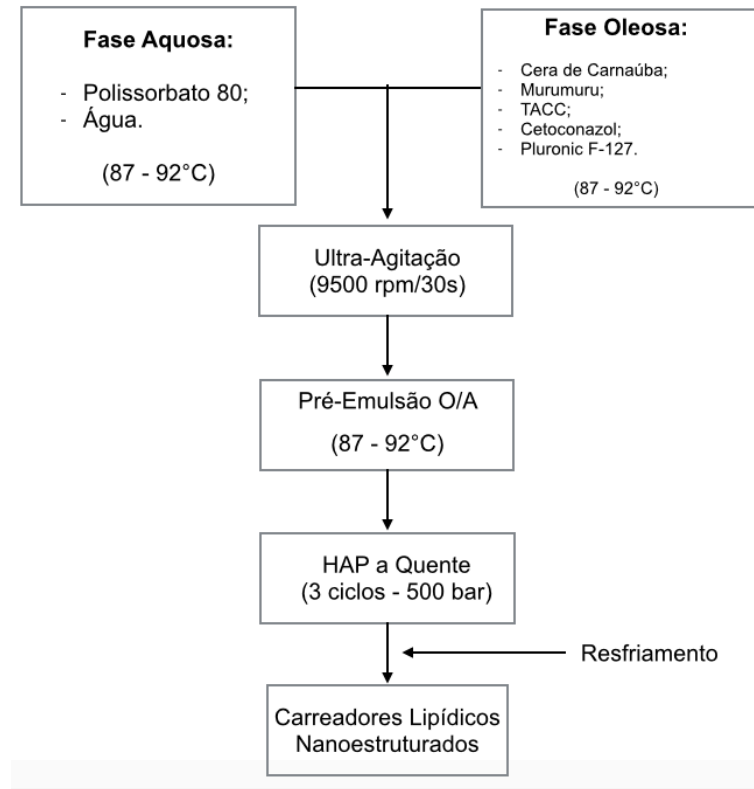


Figura 19: Fluxograma do processo de produção dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.

4.3.4 Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta

As análises foram feitas em triplicata, utilizando cubetas de poliestireno (Figura 20 A) e cubetas específicas para análise de potencial zeta (Figura 20 B) em um analisador Malvern Zetasizer SZ (Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas com água ultra-pura, na razão 1:100, para evitar efeitos de retroespalhamento (BOUREZG et al., 2012) e analisadas em um ângulo fixo de 90 a 25 °C no comprimento de onda de 633 nm.



Figura 20: A: Cubeta de poliestireno; B: Cubeta de análise de Potencial Zeta.

4.3.5 Morfologia

Preparou-se uma diluição da dispersão aquosa de CLN, na razão de 1:100 em água destilada. Uma gota da dispersão diluída foi colocada em uma grade de cobre com 400 malhas (mesh) por unidade. Após 30 segundos, foram secas em filme contínuo utilizando o papel filtro. Em seguida, colocou-se uma gota de ácido fosfotúngstico a 2 % e novamente após 30 segundos foram secas em filme contínuo utilizando o papel filtro (Figura 21).

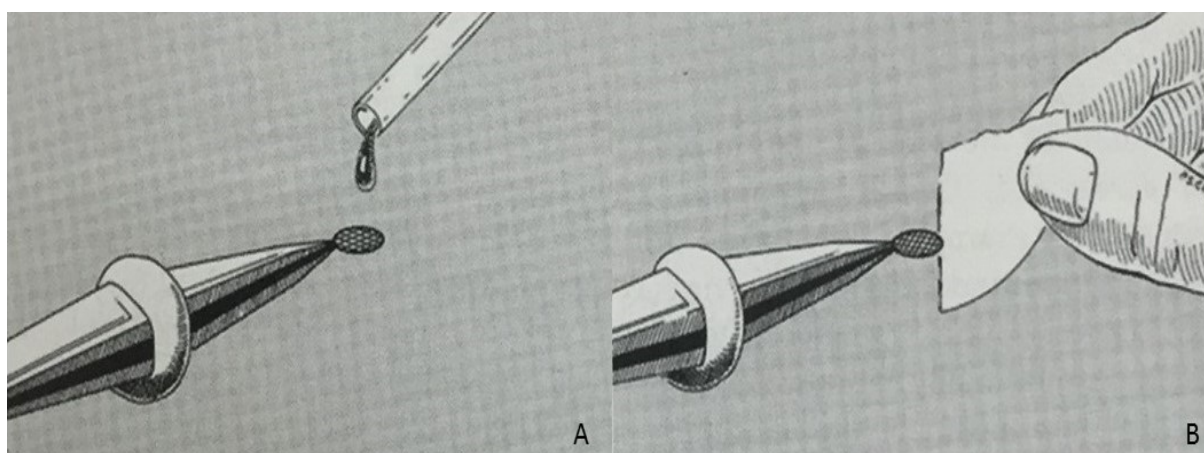


Figura 21: Preparo da amostra para a MET: A: Colocação da dispersão em uma grade de cobre; B: Secagem da dispersão em filme contínuo.

Foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 2100, com canhão de filamento LaB6, tensão de aceleração máxima: 200 kV, Resolução: 0,23 nm (ponto) e 0,14 nm (rede), Magnificação máxima: x 1.500.000 e com o Detector: HAADF (High Angle Annular Dark Field).

4.3.6 Eficiência de Encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação (EE) foi determinada em triplicata medindo-se a concentração livre do fármaco na fase aquosa. Conforme ilustra a Figura 22, a quantificação da substância ativa encapsulada foi determinada após filtração da dispersão de CLN, seguida de solubilização em metanol e centrifugação para separação da fase sólida do meio aquoso. Frações dos sobrenadantes foram coletadas e quantificadas. Em cada sistema filtrante (filtro de nylon 66 membranas 0,45 μm x 47 mm), foi adicionado 1 mL da dispersão de CLN. As unidades foram centrifugadas a 4.000 rpm por 60 minutos em uma centrífuga Centribio.

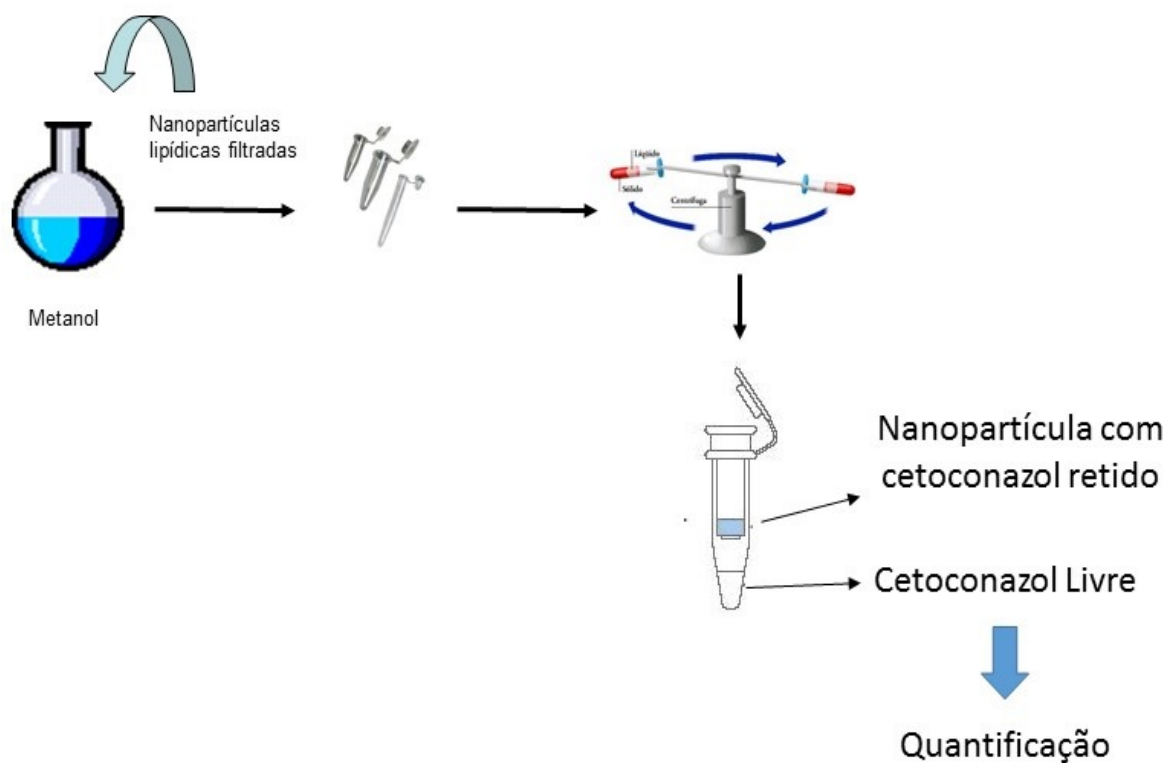


Figura 22: Determinação da EE por ultrafiltração-centrifugação.

As nanopartículas com o fármaco encapsulado permaneceram na parte superior dos tubos (antes do sistema filtrante) enquanto a fase aquosa com o fármaco livre moveu-se para a parte inferior. A quantificação da fração livre do cetoconazol foi estimada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector ultravioleta fixado em 244 nm. Por fim, a EE foi calculada pela diferença entre a concentração total teórica do fármaco (quantidade do ativo inicialmente adicionado ao sistema) e a concentração livre (Equação 6).

Equação 6:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade total da droga presente} - \text{Quantidade da droga não encapsulada}}{\text{Quantidade total da droga na formulação}} \times 100$$

4.3.7 Validação Analítica para Doseamento de Cetoconazol em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Todo método analítico, deve ser cientificamente respaldado e quando for utilizado por diferentes operadores, equipamentos similares ou em diferentes laboratórios, este deve ser capaz dentro de certos limites, de fornecer resultados confiáveis e/ou deve ter uma base racional a ser adequada para o propósito estabelecido (SHARP, 2000). O processo que demonstra que tal método funciona é chamado de validação analítica ou validação de método bioanalítico (RIBANI, 2004). Entretanto, tendo em vista que a determinação da eficiência de encapsulação e o perfil de liberação *in vitro* dos CLN estão entre os objetivos deste estudo, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica sensível e reprodutível para o doseamento do cetoconazol.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003), a validação analítica deve garantir através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para a validação da metodologia analítica foram analisados parâmetros como: especificidade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação, segundo a Resolução-RE Nº 899, de 20 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Na quantificação do cetoconazol a partir dos CLN foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência Waters® e2695 em um sistema de software Empower™ 3. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna: Coluna X Bridge™ C18 5µm (4.6 x 250mm); pré coluna X Bridge® C 18 5 µm (4.6 X 20mm) GuardCartridge (2 PK); fase móvel composta de uma mistura de Trietilamina:Metanol (1:500) e Acetato de Amônio:Água (1:200) - (75:25 v/v); fluxo de 1,23 mL/min; volume de injeção 10 µL e comprimento de onda de detecção de 244 nm e o tempo de retenção de 15 minutos.

4.3.7.1 Substância Química de Referência (SQR)

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizado o fármaco cetoconazol substância química de referência. De acordo com o laudo fornecido, este fármaco tem um teor de pureza de 99,8 %, calculado em relação à substância dessecada, determinado por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1 M.

4.3.7.2 Preparo da Solução Mãe

A solução mãe foi preparada pesando-se 0,0030 g do fármaco cetoconazol em balança analítica e dissolvido em um balão volumétrico de 100 mL contendo metanol, afim de obter a concentração de 30 µg/mL.

Esta solução foi diluída para obtenção das soluções de trabalho na faixa de concentração de 1,0 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL.

4.3.7.3 Especificidade

A especificidade do método foi determinada pela comparação do tempo de retenção dos cromatogramas do fármaco cetoconazol (SQR) em metanol na concentração de 6,0 µg/mL, do fármaco cetoconazol (fornecido pela Natural Pharma) em metanol na concentração de 6,0 µg/mL e do filtrado de carreadores lipídicos nanoestruturados (referente à formulação F-3) da Tabela 6.

4.3.7.4 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção da curva analítica com uma solução padrão de 30 µg/mL de cetoconazol em metanol. A partir desta solução foram realizadas seis diluições para obter soluções do fármaco em concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL. A equação da reta foi obtida através de estudos de regressão linear, entre as concentrações de cetoconazol e as alturas dos picos correspondentes. As curvas foram realizadas em triplicata, onde a curva média foi obtida e o seu coeficiente de correlação foi calculado.

4.3.7.5. Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi verificada por meio da escolha de três concentrações (2,0; 6,0 e 10,0 µg/mL), quantificadas em triplicata e realizando a comparação entre a quantificação das mesmas concentrações em dois dias consecutivos. Em ambos os casos foi aplicada a seguinte equação (Equação 7):

Equação 7: % CV = Desvio Padrão / média x 100

4.3.7.6. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada mediante a escolha de uma concentração média (6,0 µg/mL), quantificadas em sextuplicata, de modo que o resultado foi expresso como coeficiente de variação.

4.3.7.7. Exatidão

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi analisado através da escolha de três concentrações (2,0; 6,0 e 10,0 µg/mL), quantificadas em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica, multiplicado por cem. Os limites de recuperação não devem ser inferiores a 80 % e nem superiores a 120 % (RIBANI et al., 2004).

A exatidão foi calculada segundo a seguinte equação (Equação 8):

Equação 8: $\text{Exatidão} = \text{CME} / \text{CT} \times 100$

Onde:

CME: Concentração média experimental.

CT: Concentração Teórica.

4.3.7.8. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram feitos a partir da relação entre desvio padrão do menor ponto da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador indicado pela norma ICH (1996), da seguinte forma (Equação 9 e 10):

Equação 9:

$$\text{LD} = (\text{DP} / \text{IC}) \times 3$$

Equação 10:

$$\text{LQ} = (\text{DP} / \text{IC}) \times 10$$

Onde:

LD: Limite de detecção;

LQ: Limite de Quantificação;

DP: Desvio padrão da reta de calibração;

IC: Inclinação da curva de calibração.

4.3.8. Perfil de Liberação *ex vivo*

O sistema de difusão é formado por dois compartimentos 1 e 2 (Figuras 23 e 24) onde o compartimento 1, é denominado de compartimento doador (CD) e o 2, de compartimento receptor (CR). A amostra em estudo é acondicionada no CD e a solução receptora no CR. Entre as duas câmaras a membrana é inserida e fixada por uma borracha (acessório 4, Figura 23 B). A membrana fica de um lado em

contato com a amostra em estudo e, do outro, com a solução receptora (Figura 24). Desta forma, todo material liberado pelo veículo é permeado pela membrana e quantificado na fase receptora (ARAUJO, 2003, ALVES 2004, NUNES, 2005).

Na Figura 25, observa-se o aparelho montado por completo.

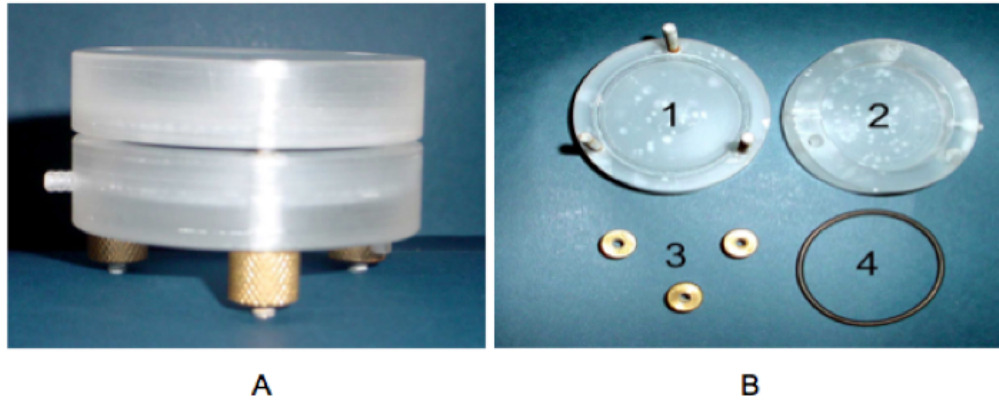


Figura 23: Modelo da célula de difusão. a) célula fechada, onde há orifícios de entrada (inferior) e saída (lateral) da solução receptora; b) célula aberta, 1- parte superior da célula (CD), onde foram colocadas as amostras, 2 – parte inferior da célula (CR), que continha parte da solução receptora, 3 – pinos de vedação da célula e 4 – borracha de vedação da membrana. **Fonte:** Nunes, 2008.

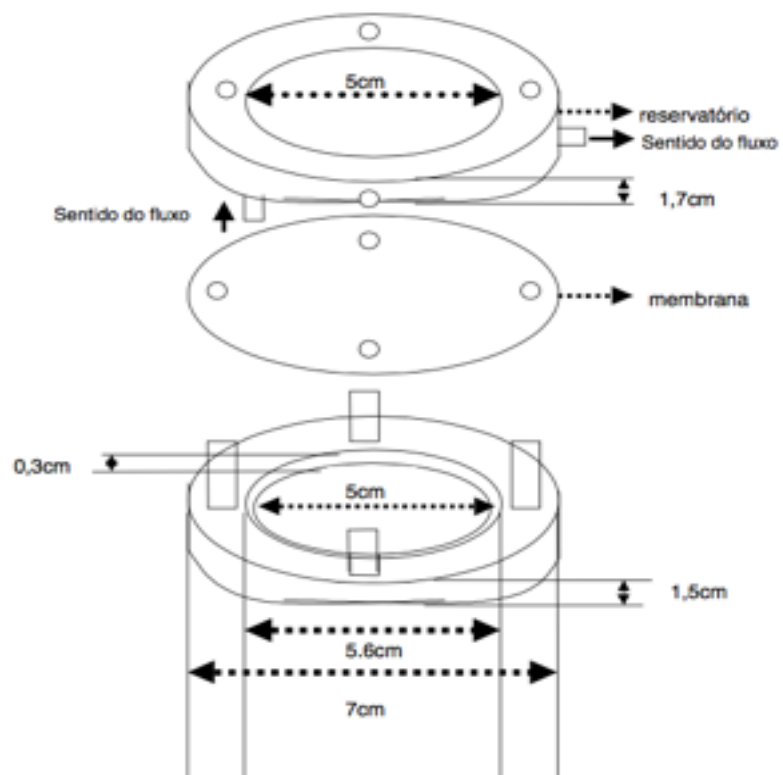


Figura 24: Diagrama esquemático do modelo da célula de difusão com suas respectivas medidas. **Fonte:** Nunes, 2008.

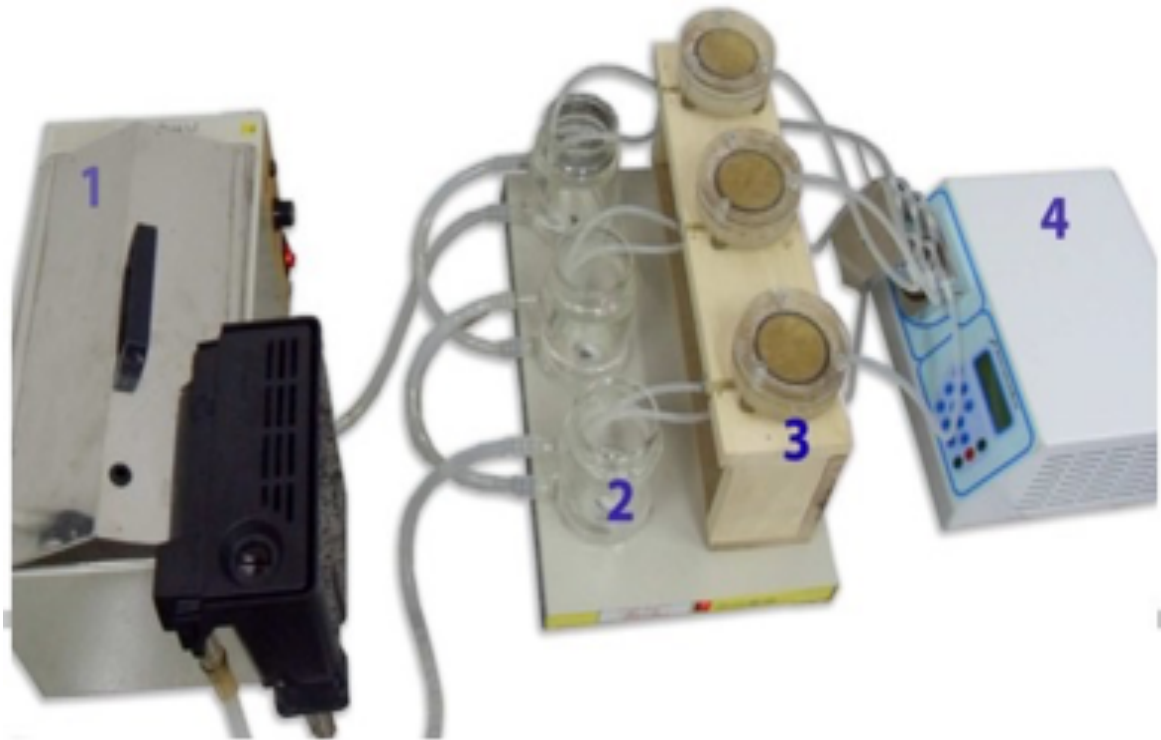


Figura 25: Esquema de montagem do sistema de difusão a partir da célula de difusão. 1 - banho termostático; 2 - recipiente receptor; 3 - célula de difusão; 4 - bomba peristáltica. **Fonte:** Nunes, 2008.

Experimento Realizados com Membrana Biológica

Foi utilizado como membrana biológica, a pele de orelha de porco (Figura 26), pois esta tem sido recomendada para os estudos de permeação cutânea *ex vivo*, devido a similaridade fisiológicas, histológicas, quanto à densidade de folículos piloso, bem como bioquímicas, próximo a da pele humana (SIEWERT *et al.*, 2003).



Figura 26: Membrana natural de pele de orelha de porco.

Inicialmente as orelhas foram lavadas com água purificada sendo o excesso de água retirado com papel absorvente. Após a seleção das peles integras (livres de lesões, arranhões ou manchas) os pêlos foram cortados com auxílio de tesoura. Em seguida, com o auxílio da pinça anatômica e bisturi, procedeu-se a dissecação extraíndo-se a epiderme conjuntamente com a derme, e descartando a hipoderme (tecidos subcutâneos e gordurosos presentes abaixo da derme). As amostras da pele foram cortadas em tamanhos padronizados e adequados à utilização na área de permeação (Figura 27).

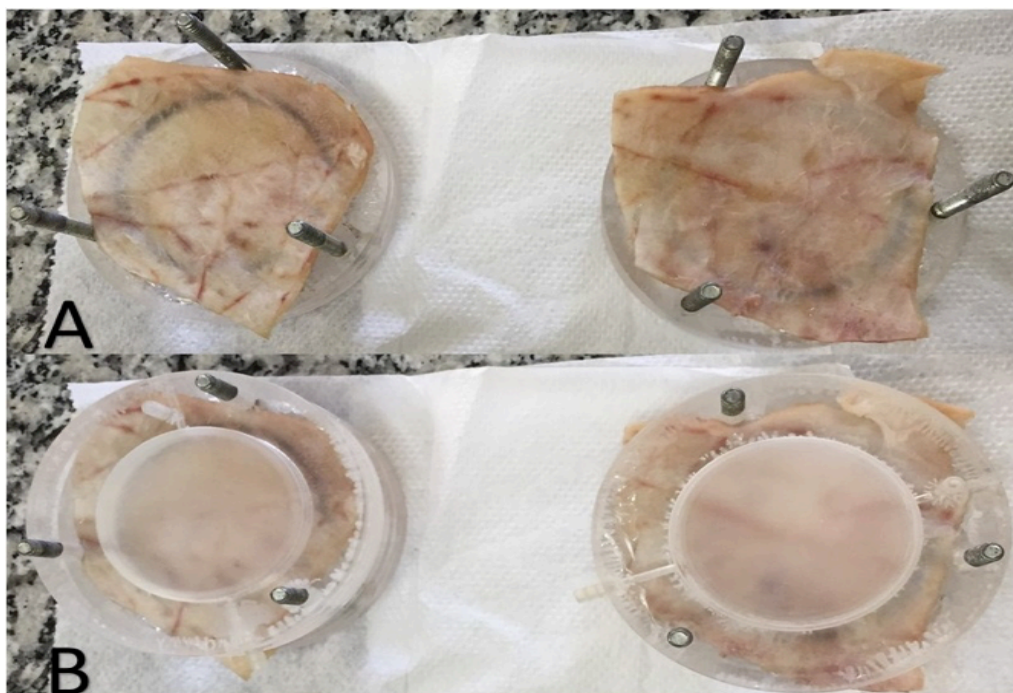


Figura 27: A: Pele de orelha de porco cortada em tamanhos padronizados e adequados à utilização na área de permeação; B: Célula de difusão devidamente fechada.

Na câmara receptora, foi utilizado tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 mantido a 37 °C por água circulante sob agitação de 200 rpm com o auxílio de barras magnéticas. Sobre a extremidade das células foram esticadas a membrana, com a derme voltada para a solução receptora. Esparalharam-se sobre toda área da membrana 2,0 g da formulação 3 (Tabela 6) de CLN. A escolha da formulação 3 para este ensaio foi devido a mesma apresentar o menor tamanho de partícula, ainda que não haja diferenças significativas em relação as demais formulações. A área de exposição da membrana foi de 19,625 cm². O volume no compartimento receptor foi de 50 mL e o experimento foi realizado em triplicata. Durante o experimento, 5 mL da solução receptora foram removidos nos tempos: 15, 30, 60, 120, 240, 360, 420 e 480 minutos com o auxílio de uma pipeta volumétrica e repostos novamente com a solução tampão, para manter o volume constante. No final do experimento, o material coletado na solução receptora foi analisado em um comprimento de onda de 244 nm por cromatografia líquida de alta eficiência (SILVA JÚNIOR; PEREIRA, 2008).

4.3.9 Estudo de Retenção Cutânea

O estudo de retenção foi baseado no método proposto por Sasaki e colaboradores (1991) e Tauber e Toda (1976). Após o término do tempo de permeação cutânea, retiraram-se as membranas do aparelho de difusão com o auxílio de uma espátula. As amostras dos cremes que sobraram, foram colocadas em um recipiente contendo metanol (25 mL) e sonicado por 30 min. Após diluição 1:10 em metanol, estas soluções foram analisadas por CLAE, obtendo-se assim os valores do cetoconazol não retido na pele.

As peles foram lavadas com solução receptora e as lavagens foram submetidas à análise. A área da pele exposta à permeação foi delimitada, recortada e picotada com o auxílio de bisturi e lâmina e os fragmentos recolhidos em frascos contendo metanol (25 mL), e então submetidos a sonicação em ultra-som por 20 min. E novamente foram analisadas por CLAE, obtendo-se assim os valores do cetoconazol retidos na pele. Desta maneira, determinou-se a quantidade de cetoconazol retido nas camadas da pele para todas as formulações e em todos os tempos de análise.

4.3.10 Estudo de Estabilidade

A estabilidade física das nanopartículas foi avaliada segundo os parâmetros de tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta das formulações F1, F2 e F3, nos tempo 0, 15, 30 e 60 dias.

4.3.11 Análise Estatísticas

Os resultados de tamanho de partícula, perfil de liberação *ex vivo* e os estudos de retenção cutânea foram submetidos ao teste estatístico de T de Student. O estudo de estabilidade foi mensurado através da análise de variância. Os dados foram analisados no programa de estatística Bioestat 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GORDURA DE MURUMURU

5.1.1 Composição de Ácidos Graxos

O cromatograma obtido por cromatografia gasosa está ilustrado na Figura 28. Na Tabela 7 pode ser verificada a composição percentual dos ácidos graxos encontrados na gordura de murumuru.

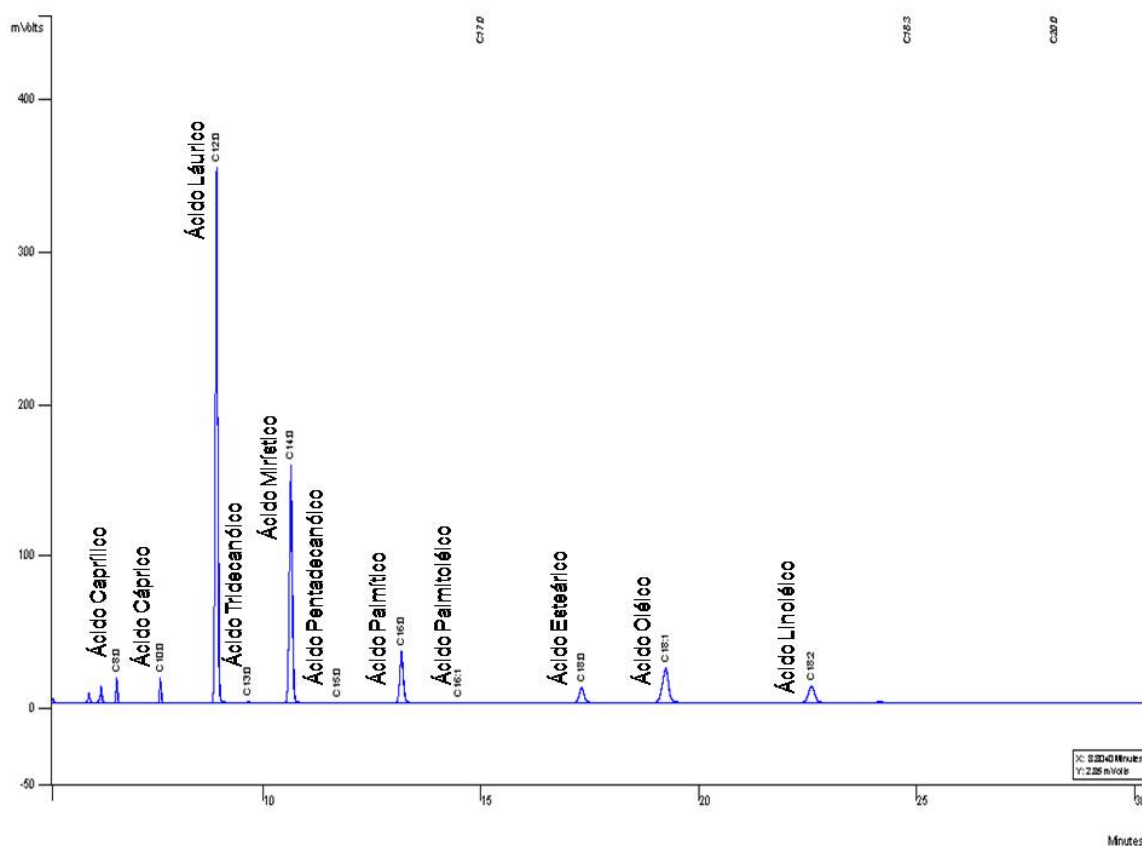


Figura 28: Cromatografia da gordura de murumuru, obtida por Cromatografia Gasosa.

Dentre os principais ácidos graxos presentes na gordura de murumuru, têm-se os ácidos Láurico (C 12:0), Mirístico (C 14:0), Oléico (C 18:1), Palmítico (C 16:0) e Linoléico (C 18:2), totalizando 94,2 %. A gordura apresentou uma composição superior de ácidos graxos saturados (87,4 %) e insaturados (12,6 %) (Tabela 7). Tal evidência do perfil de ácidos graxos corrobora com valores

semelhantes à gordura de *A. aculeatum* e ao óleo de *C. Nucifera*, que obtiveram valores 85,42 % e 92,63 % respectivamente (BARBOSA et al., 2009).

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos (%) da gordura de murumuru, obtido por Cromatografia Gasosa.

Ácidos graxos	%
C 8:0 (Caprílico)	1,4
C 10:0 (Cáprico)	1,4
C 12:0 (Láurico)	48,1
C 13:0 (Tridecanóico)	TR
C 14:0 (Mirístico)	26,6
C 15:0 (Pentadecanóico)	TR
C 16:0 (Palmitico)	6,9
C 16:1 (Palmitoléico)	Tr
C 17:0 (Heptadecanóico)	-
C 18:0 (Esteárico)	3,0
C 18:1 (Oléico)	8,4
C 18:2 (Linoléico)	4,2
C 18:3 (Linolênico)	-
C 20:0 (Aráquico)	-
Saturados	87,4
Mono-insaturados	8,4
Poli-insaturados	4,2

"-" indica quantidade não detectada.

"tr" indica concentração abaixo do limite de detecção

A gordura de *A. Aculeatum* é um insumo, de origem amazônica que apresenta grande potencial de emprego nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos (BARBOSA et al., 2009). Já o óleo extraído do *C. nucifera* é mais utilizado na área de alimentos e produtos farmacêuticos (KUMAR, 2011).

Os ácidos graxos láurico (51,2 %) e mirístico (25,2 %) foram determinados como os principais na composição química da gordura do murumuru no estudo de Mambrim e Barrera-Arellano (1997), o que também foi observado no presente trabalho. Igualmente, estes autores também observaram que a predominância de ácido graxos láurico e mirístico é comum em gorduras extraídas de amêndoas de frutos de palmeiras, sendo isso analisado quando compara-se o murumuru aos

óleos de tucumã e coco, uma vez que todos estes são extraídos das amêndoas dos respectivos frutos (Tabela 9).

Tabela 8: Perfil de ácidos graxos (%) de gorduras vegetais, obtido por Cromatografia Gasosa.

Ácidos Graxos	Nome Comum	% Área (murumuru)	% Área (tucumã)*	% Área (coco)**
12:0	Ácido láurico	48,1	51,42	52,52
14:0	Ácido mirístico	26,6	26,09	23,05
16:0	Ácido palmítico	6,9	5,55	12,99
18:0	Ácido esteárico	3,0	2,36	4,07
18:1	Ácido oléico	8,4	5,97	4,2
18:2	Ácido linoléico	4,2	2,09	2,8
SFA*	-	84,6	85,42	92,63

SFA* indica ácidos graxos saturados.

Fonte: Barbosa et al., 2009; Kumar, 2011.

Geralmente gorduras vegetais apresentam alto teor de ácidos graxos saturados, sendo encontradas no estado sólido quando em temperatura ambiente, pois o ponto de solidificação desses ácidos é alto, se comparado com o ponto de solidificação de ácidos graxos com uma ou mais insaturações. Portanto, tal característica é de suma importância para a diferenciação entre óleos e gordura (KUMAR, 2011).

5.1.2 Índice de Iodo, Saponificação, Acidez, Refração, Peróxido e Densidade Relativa

Tabela 9: Resultado das análises do índice de iodo, saponificação, acidez, peróxido, densidade e refração da gordura de murumuru.

Parâmetros	Média e Desvio Padrão
Índice de acidez mg KOH/g	3,9 ± 0,057
Índice de Peróxido	2,99 ± 0,027
Índice de Saponificação mg KOH/g	241 ± 0,065
Índice de Iodo g ² /100 g	11 ± 0,200
Densidade g/mL a 50 °C	0,49 ± 0,015
Índice de Refração	1,46 ± 0,014

A gordura de murumuru apresentou índice de acidez de 3,9 mg KOH/g (Tabela 9). Esse valor foi superior aos encontrados por Lopes (2007) que em seu estudo encontrou valor de 1,016 mg KOH/g. Tal fato pode ser justificado pelo processo de degradação da gordura de murumuru e aos fatores que favoreceram o aumento do grau de rancidez hidrolítica, como: tempo decorrido entre a coleta e o processamento das amostras, temperatura, ar atmosférico e luz. Valores encontrados por Soares (2009), sobre o índice de acidez da gordura de murumuru (3,79 mg KOH/g) foi semelhante ao encontrado neste estudo. Vale ressaltar que, segundo a RDC 270 da ANVISA, recomenda-se ao índice de acidez valores abaixo de 4 mg KOH/g para óleos e gorduras vegetais. O índice de peróxido de 2,99 mostrou-se semelhante ao resultado sugerido por Bora e colaboradores (2011) e próximo ao valor de 2,75 encontrado por Brasil (2011). De acordo com os estudos de Gunstone (2004), o índice de peróxido não pode ser superior a 10 para óleos e gorduras de origem vegetal.

O índice de acidez e peróxido são importantes parâmetros para determinar a qualidade de óleo e gordura vegetal, uma vez que indicam a presença de rancidez hidrolítica e oxidativa respectivamente. Este é resultado da deteriorização dos triacilglicerois, que culmina no aumento de ácidos graxos livres ocasionando mudanças sensoriais no óleo e/ou gordura, tais como: diferenças na cor e no odor e consequentemente nos produtos derivados deste óleo (NEDHI, 2003; FERREIRA et al., 2008; SILVA et al, 2009; WALIA et al., 2014).

O índice de saponificação de 241 mg KOH/g (Tabela 9) encontrado neste estudo corrobora com Castro (2006), semelhante ao óleo de maçã (184,91 mg KOH/g), a semente de rambutam (186 mg KOH/g) e ao óleo de buriti (192,88 mg KOH/g). O valor de saponificação é a medida do peso molecular médio dos ácidos graxos presentes na gordura. Esse parâmetro fornece informações importantes a respeito de adulterações dos óleos e gorduras vegetais, quando estes são misturados com matéria insaponificável, como óleo mineral.

O índice de iodo de 11 gI²/100 g (Tabela 9) encontrado neste estudo é semelhante aos valores de Lopes (2007) e Bezerra (2008) que apontaram valores entre 5,6 e 11 gI²/100 g, respectivamente. O valor de iodo significa a média dos ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais. A densidade de 0,49 g/mL (Tabela 9) encontrada neste estudo foi semelhante aos trabalhos de Teixeira (2010) e Lopes (2007). O índice de refração de 1,46 (Tabela 9) concorda com os estudos de Araujo (2005) que obteve o valor de 1,49. Esses índices são parâmetros físicos influenciados pelo grau de instauração dos ácidos graxos.

5.1.3 Análise Térmica

5.1.3.1 Material isolado

As curvas DSC da gordura de murumuru, cera de carnaúba, triglicéride de ácido cáprico e caprílico e o cetoconazol obtidos por calorimetria diferencial exploratória por fluxo de calor estão representados na Figura 29.

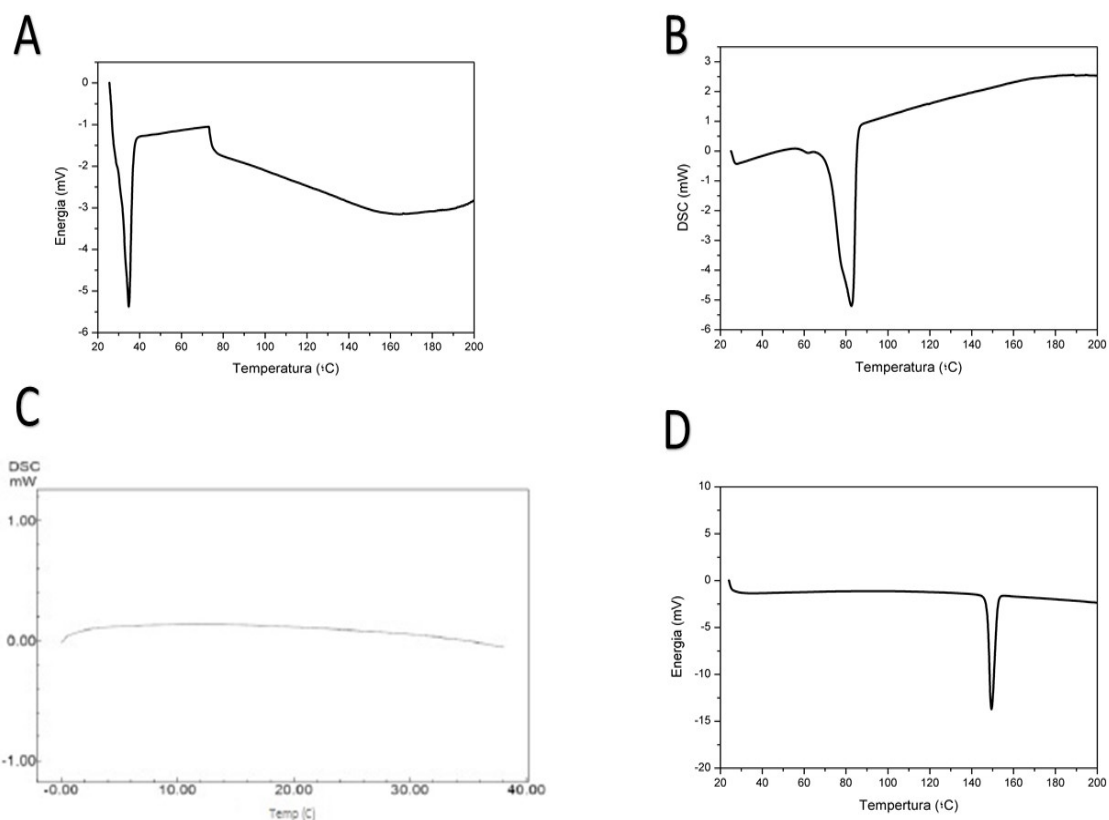


Figura 29: Curvas DSC das matérias-primas. A: Gordura de murumuru; B: Cera de carnaúba; C: Triglicérides de ácido cáprico e caprílico; D: Cetoconazol.

A calorimetria diferencial exploratória (DSC) fornece informações sobre o calor específico de uma substância analisada numa ampla faixa de temperatura, entretanto, os picos endotérmico e exotérmico são registrados como pico, e as áreas desses picos correspondem a variação de entalpia (ΔH) de cada processo ocorrido (CHEIKH-ROUHOU et al., 2007).

A curva DSC da gordura de murumuru (Figura 29 A) apresenta um evento endotérmico, registrando um pico na temperatura de 36,80 °C com $\Delta H = -177,04$ mJ, correspondente à temperatura próxima do ponto de fusão do ácido láurico, que é de 44,2 °C (STOTT et al., 2001), que corresponde ao ácido graxo de maior concentração na gordura e um segundo pico na temperatura 164,19 °C e $\Delta H = -733,16$ mJ, que equivale a degradação dos ácidos graxos da gordura de murumuru.

A cera de carnaúba é uma das mais duras e de maior ponto de fusão entre as ceras naturais, que segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), possui um ponto de fusão entre 80 a 86 °C. A cera de carnaúba (Figura 29 B) indicou fusão do

material lipídico a 84,0 °C, com extrapolação onset a 79,4 °C e entalpia de -169,9 mJ. O resultado confirma dados da literatura sobre esta cera (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002; VILLALOBOS-HERNANDEZ et al., 2006 & LACERDA et al., 2011).

Nos trabalhos de Castelli e colaboradores (2005) e Lacerda e colaboradores (2011), foram observadas ausência de eventos calorimétricos para os triglicérides de ácido cáprico e caprílico (Figura 29 C), fato este que também foi constatado no presente trabalho.

Segundo dados da literatura, a faixa de fusão do cetoconazol encontra-se entre 148 a 152 °C (MARCINIEC et al., 2004). Por sua vez, o termograma (Figura 29 D) mostra um pico estreito a 149,4 °C, com extrapolação onset a 147,7 °C e entalpia de -82,4 mJ. Este resultado está coerente com o ponto de fusão do cetoconazol segundo a Farmacopéia Americana de 2006, USP 29.

5.1.3.2 Misturas Lipídicas

As curvas DSC das misturas lipídicas referentes as formulações 1, 2 e 3 (Tabela 6) obtidas por calorimetria diferencial exploratória por fluxo de calor estão representados na Figura 30.

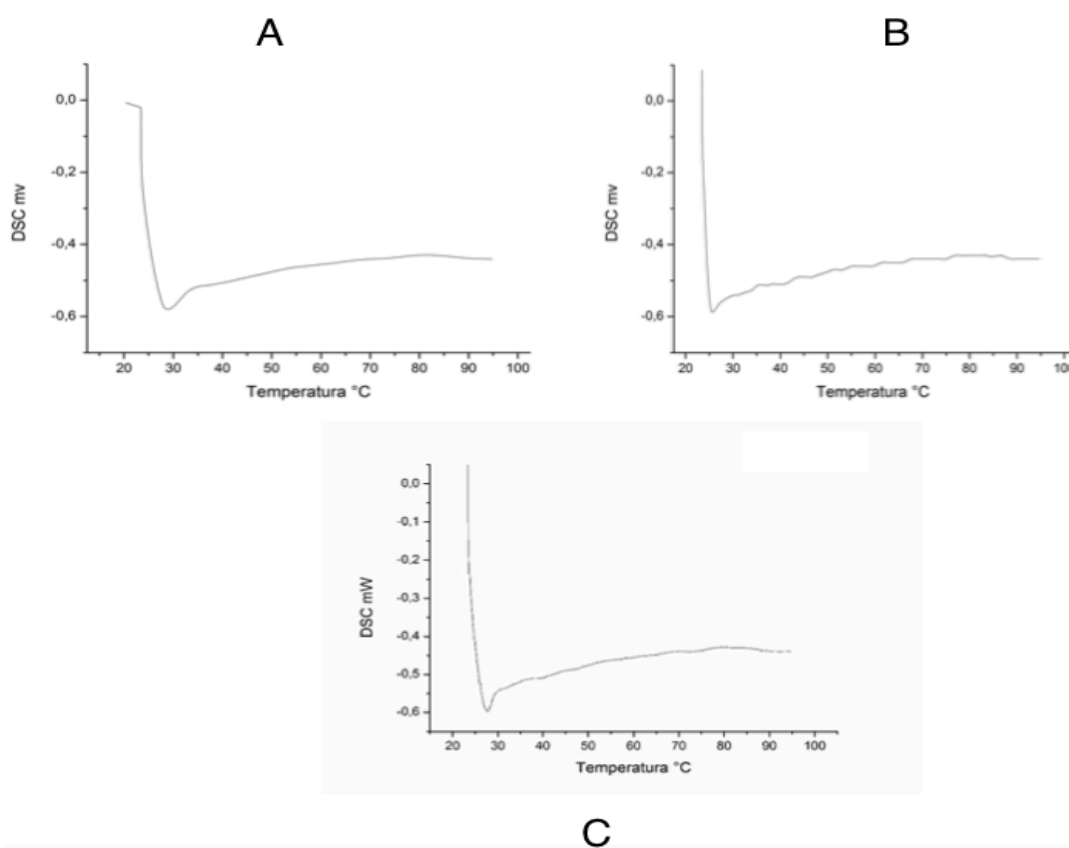


Figura 30: Curvas DSC das misturas lipídicas: A: Formulação 1; B: Formulação 2 e C: Formulação 3.

Os termogramas das misturas lipídicas referente as formulações 1, 2 e 3, apresentaram um pico endotérmico, registrando um pico nas temperaturas de 27,57 °C, 25,54 °C e 28,89 °C respectivamente, com extrapolação onset de 21,42 °C, 23,60 °C e 25,65 °C respectivamente e variação de entalpia de -16,88 mJ, -16,99 mJ e -14,77 mJ respectivamente. Comprova-se o efeito do lipídio líquido e sólido na estrutura cristalina dos CLN, onde percebe-se que resultou em diminuição da endoterma de fusão e variação de entalpia, comparando-se a gordura de murumuru (84,0 °C; -169,9 mJ), cera de carnaúba (36,80 °C; -177,04 mJ) e cetoconazol (149,4 °C; -82,4 mJ). Isso significa que, este afetou a recristalização dos CLN durante o processo de resfriamento e sugere-se que as matrizes dos carreadores foram solidificadas com êxito durante a preparação das partículas, deste modo, estes resultados confirmam que as NL foram obtidas (LASERRA et al., 2015). No entanto, de acordo com Teeranachaideekul e colaboradores (2008), a diminuição do ponto de fusão, entalpia de fusão e como alterações nos picos indica uma estrutura menos ordenada.

5.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DO CETOCONAZOL

5.2.1 Especificidade

A especificidade é um parâmetro essencial para a confiabilidade do método. Contudo, de acordo com o indicado pela ANVISA (2003), é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos diferentes, preferencialmente em relação ao material de referência conhecido. A capacidade do método em quantificar o cetoconazol nos ensaios sem que os componentes das formulações interfiram, foi confirmada pela comparação do tempo de retenção dos cromatogramas do fármaco cetoconazol (SQR) em metanol na concentração de 6,0 µg/mL, do fármaco cetoconazol (fornecido pela Natural Pharma) em metanol na concentração de 6,0 µg/mL e do filtrado de carreadores lipídicos nanoestruturados (referente à formulação F-1), onde estão ilustrados na Figura 31.

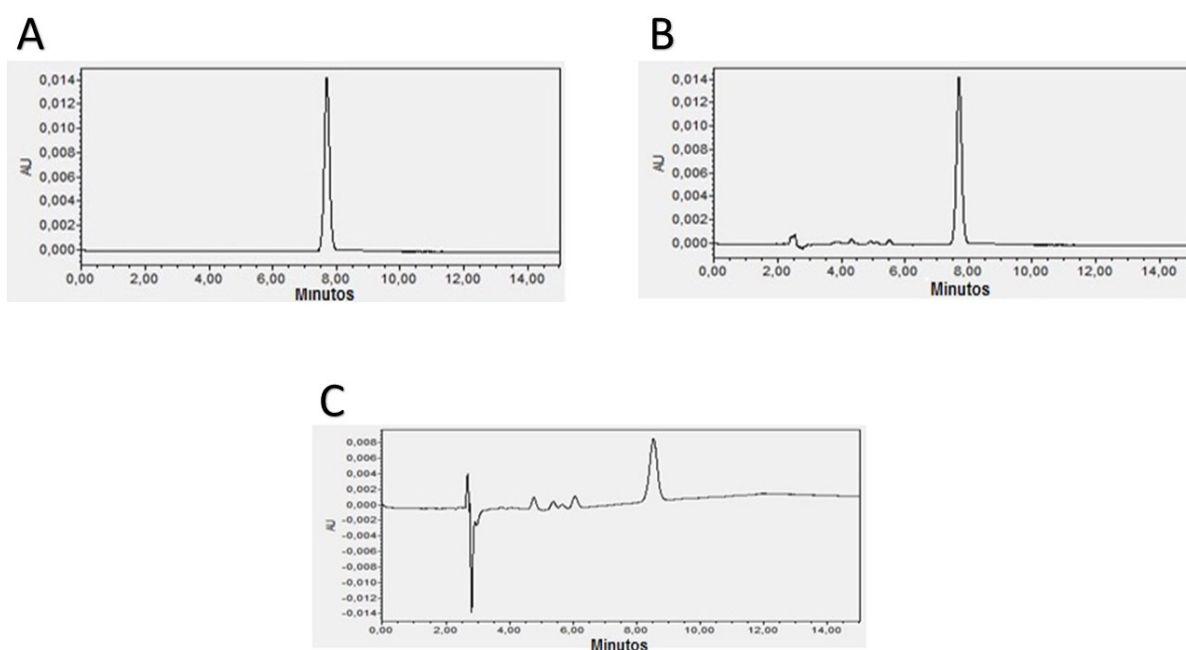


Figura 31: Especificidade do método de doseamento de cetoconazol: a) Cromatograma do Cetoconazol (SQR) em metanol a 6,0 µg/mL; b) Cromatograma do Cetoconazol (fornecido pela Natural Pharma) em metanol a 6,0 µg/mL; c) Cromatograma do filtrado de carreadores lipídicos nanoestruturados (referente à formulação 3).

Observou-se que o tempo de retenção do fármaco cetoconazol (SQR) esteve em torno de 7,5 minutos de corrida (Figura 31 A). Na Figura 31 B, verificou-se um sinal analítico do cetoconazol no meio da eluição, em torno de 7,69 minutos. Tais componentes, também foram visualizados no cromatograma do filtrado de carreadores lipídicos nanoestruturados (referente à formulação 3) (8,52 minutos). Ressalta-se que, o tempo de retenção dos cromatogramas visualizados na Figura 31 não interferiu na quantificação do fármaco a 244 nm. Desta forma, o método foi específico para a quantificação de cetoconazol.

5.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da equação da regressão linear obtida pela média de três curvas analíticas. A Figura 32 demonstra que a curva analítica encontrada apresentou resultado linear, conforme preconizado na Resolução- RE nº 899, de 20 de maio de 2003, pois o coeficiente de correlação R^2 encontrado foi de 0,999 indicando um ajuste de 99,9 % entre a proposta e os resultados obtidos e o coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,991

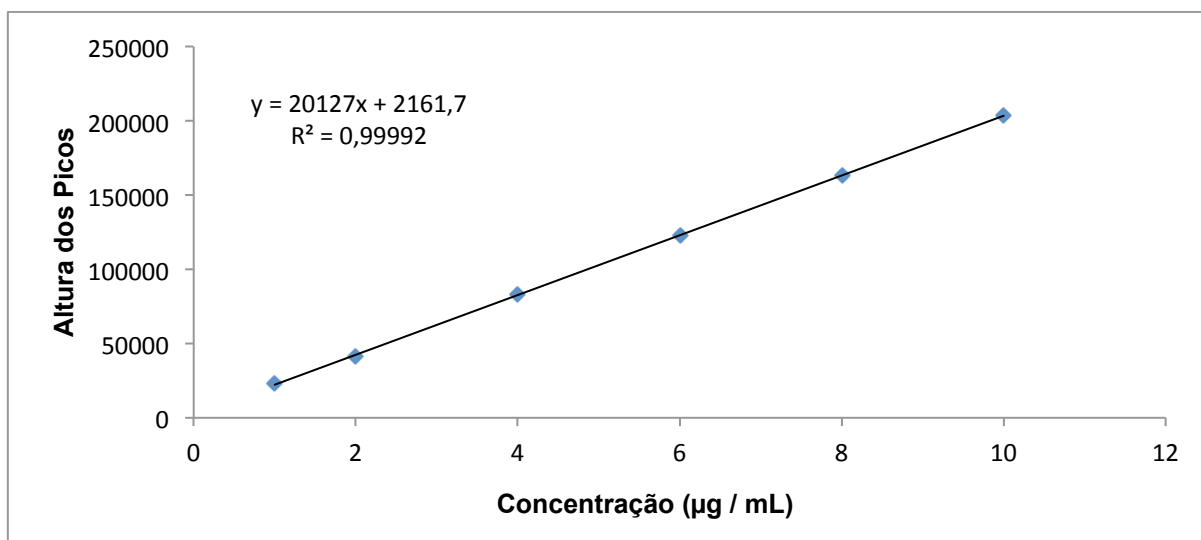


Figura 32: Curva analítica do cetoconazol, obtida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

5.2.3 Precisão Intermediária e Repetibilidade

A precisão do método foi verificada nos níveis de repetibilidade (análise no mesmo dia) e precisão intermediária (análise em dois dias diferentes com analistas diferentes). Neste trabalho, a repetibilidade foi avaliada mediante a escolha de uma concentração média (6,0 µg/mL), quantificadas em sextuplicata sendo o resultado expresso como coeficiente de variação. De acordo com a Tabela 10, o coeficiente de variação foi de 0,49 %, demonstrando que o método é preciso e está dentro da faixa preconizada pela legislação vigente, na qual determina um valor de coeficiente de variação menor que 5 %.

Tabela 10: Resultados de Repetibilidade de quantificação de cetoconazol em carreadores lipídicos nanoestruturados.

	Área (mV/s ²)	Concentração (µg/mL)
Área 6,0 ug/mL	100995	4,9105
	101178	4,9196
	100571	4,8894
	100081	4,8651
	101411	4,9311
	100526	4,8872
Média	100793,6667	4,9005
Desvio padrão	489,5849	0,0243
Coeficiente de variação	0,48572	0,4963

A precisão intermediária foi avaliada mediante a três concentrações analisadas em triplicata, totalizando nove determinações sendo os resultados expressos como coeficiente de variação. De acordo com a Tabela 11, o maior valor de coeficiente de variação correspondeu a 1,37 % e o menor foi de 0,06 %, resultando valores abaixo de 5 % como indica a Resolução-RE nº 899, de 20 de maio de 2003 da ANVISA.

Tabela 11: Resultados de Precisão Intermediária de quantificação de cetoconazol em carreadores lipídicos nanoestruturados.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mV/s^2)	Área (mV/s^2)	Área (mV/s^2)	Média da Concen- tração	Desvio Padrão	Coefficiente de variação
Analista 1 Dia 1	2	40349	41392	40682	1,9201	0,0264	1,3784
	6	99482	99520	101080	4,8624	0,0453	0,9317
	10	16625 9	16708 3	163012	8,1129	0,1069	1,3180
Analista 2 Dia 2	2	30578	30739	30260	1,4092	0,0121	0,7235
	6	97572	97460	97571	4,7385	0,0031	0,0674
	10	15773 8	15562 6	157326	7,6879	0,0556	0,8593

Os resultados expressos na Tabela 10 e 11 indicam que o método possui repetibilidade e precisão satisfatórios para a quantificação do fármaco em questão.

5.2.4 Exatidão

A análise de exatidão foi feita através do teste de recuperação. Conforme a Tabela 12, os valores obtidos de Recuperação (%) ficaram todos no intervalo de 80 a 120 %, demonstrando que os valores encontrados estão dentro da variação aceitável, conforme Ribani e colaboradores (2004), sendo, portanto, qualificado o método como exato para o que se propõe.

Tabela 12: Valores experimentais obtidos para o teste de recuperação do cetoconazol.

	Concentração Recuperação (µg / mL)	Concentração Recuperação (µg / mL)	Concentração Recuperação (µg / mL)	Concentração Recuperação (µg / mL)	
Concentração Teórica (µg / mL)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Recuperação (%)
2	2,5750	1,8531	1,4770	1,9684	98,42
6	7,5242	5,3518	4,9060	5,9273	98,78
10	11,2986	9,5125	8,8332	9,8814	98,81

5.2.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A partir de estimativas feitas pela curva de calibração, como sugere a Conferência Internacional sobre Harmonização - ICH (1996), os limites de detecção e quantificação foram apurados em 0,43 µg/mL e 1,45 µg/mL, respectivamente, indicando, assim, a boa sensibilidade do método.

Neste sentido, conclui-se que o método desenvolvido para a quantificação de cetoconazol nos carreadores lipídicos nanoestruturados deste estudo é específico, linear, sensível, preciso e exato, atendendo às recomendações do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, publicado por meio da Resolução-RE nº 899, de 20 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADO

5.3.1 Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta

Tabela 13: Tamanho de partícula (nm), Índice de Polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta (mV) dos CLN produzidos.

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersidade (PDI)	Potencial Zeta (mV)
F 1	142,33 ± 1,165	0,237 ± 0,043	- 30,0 ± 0,556
F 1*	161,56 ± 2,631	0,276 ± 0,001	- 31,5 ± 0,264
F 2	100,01 ± 0,406	0,130 ± 0,038	- 39,46 ± 0,446
F 2*	98,85 ± 1,186	0,143 ± 0,019	- 35,33 ± 1,616
F 3	98,72 ± 0,834	0,125 ± 0,018	- 35,96 ± 2,128
F 3*	98,60 ± 1,537	0,115 ± 0,010	- 34,9 ± 0,655

*Formulações não contendo fármaco cetoconazol e denominadas como referência.

Os resultados das formulações (Tabela 13) apresentaram tamanho de partícula entre 98,60 e 161,56 nm ($p > 0,05$) (Figura 33) e índice de polidispersidade entre 0,115 e 0,276. Com referência ao tamanho médio das partículas, valores similares foram obtidos por Khoe e colaboradores (2009) e Vasconcelos e colaboradores (2011) em pesquisas para obtenção de nanopartículas para uso tópico (entre 137,1 e 296,6 nm e 110,0 e 198,0 respectivamente). Os resultados de índice de polidispersidade apresentaram valores entre 0,115 e 0,276. Valor igual ou menor a 0,200 pode indicar uniformidade adequada no tamanho das partículas, conforme descrito por Guterres e colaboradores (2007). Considerando os resultados obtidos para o potencial zeta, valores igual ou maiores que -30 a +30 mV indicam adequada estabilidade na formulação (KHALIL et al., 2013). No presente estudo, as formulações apresentaram valores entre - 30,0 a - 39,46 mV sugerindo assim, um sistema fisicamente estável (Figura 34). Todas as dispersões apresentaram valores negativos, mostrando que as forças de repulsão predominam frente à de atração. Isso é desejável em CLN, pois evita a formação de agregados e além de indicar a estabilidade das partículas (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007).

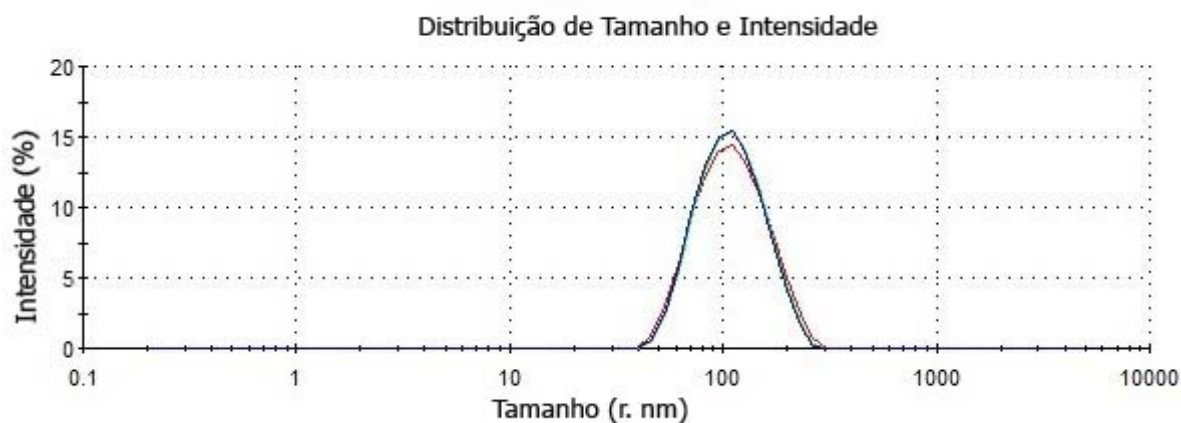


Figura 33: Média da Distribuição dos tamanhos das partículas (nm).



Figura 34: Distribuição do Potencial Zeta.

Além do mais, o aumento da concentração da mistura de tensoativos de 0,5 a 1,5 % nas formulações contendo 1 % de cetoconazol e 8 % de lipídios totais (2 % gordura de murumuru, 2 % de cera de carnaúba e 4 % de TACC) resultou em uma redução dos tamanhos de partículas, como mostra a Tabela 14.

Tabela 14: Efeito das concentrações dos tensoativos

Formulação / Concentração (%)	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersidade (PDI)	Potencial Zeta (mV)
F 1 / 0,5 %	142,33 ± 1,165	0,237 ± 0,043	- 30,0 ± 0,556
F 2 / 1,0 %	100,01 ± 0,406	0,130 ± 0,038	- 39,46 ± 0,446
F 3 / 1,5 %	98,72 ± 0,834	0,125 ± 0,018	- 35,96 ± 2,128

(p > 0,05)

O resultado está de acordo com o observado por vários autores (LIU et al, 2007; KHERADMANDNIA et al., 2010 e DAS et al., 2012). O fenômeno ocorre devido maiores quantidades de tensoativos serem responsável pela redução da tensão interfacial das gotículas de lipídio fundido, resultando assim, em menor energia necessária para quebrá-las em tamanhos menores.

5.3.2 Morfologia

Observando as imagens (Figura 35) obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), sugere-se que as nanopartículas apresentem formato esférico. Pode ser claramente visto um núcleo interno denso de elétrons que está rodeado por uma coroa que aparece ser muito menos denso. Isso justifica-se pelas etapas de preparação dos CLN, na qual se inicia com a estabilização das gotículas (óleo mais gordura), tensoativo, ultraturraz, HAP a quente e resfriamento. Após esse processo, o produto gerado será possivelmente uma esfera sólida e estabilizada por uma camada de tensoativo ao seu redor (SHAFFAZICK et al., 2003).

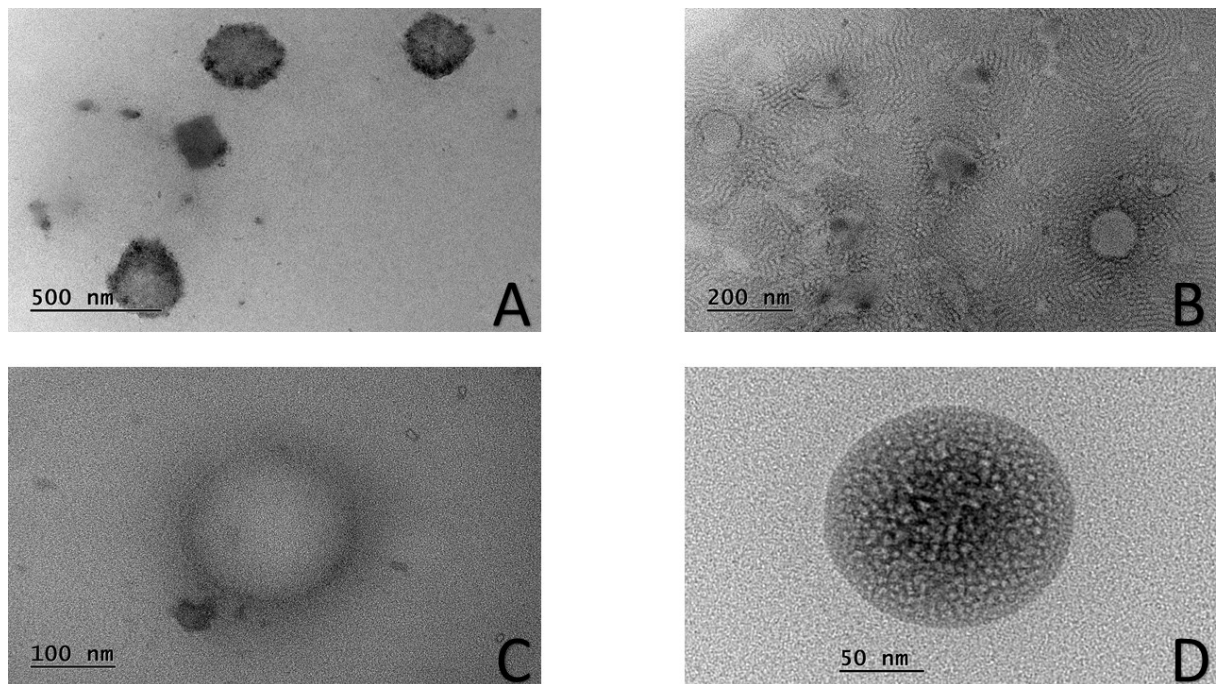


Figura 35: Imagens dos CLN obtidas por MET. A: Aglomerado de CLN sendo observado a uma objetiva de 500 nm; B: Aglomerado de CLN sendo observado a uma objetiva de 200 nm; C: CLN de forma isolada, sendo observada a uma objetiva de 100 nm D: CLN de forma isolada, sendo observado a uma objetiva de 50 nm.

5.3.3 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação estimada foi de 99 %. Era esperada alta em razão da natureza lipofílica do cetoconazol e por este fármaco possuir uma baixa solubilidade em água (HONG et al., 2013). Outros autores também relataram valores próximos a 100 %, tais como: Santos e colaboradores (2009b) que verificou a EE superior a 99 % em teossomas idebenona, utilizando também, gordura vegetal como componente lipídico; Ali e colaboradores (2010) encontraram valores de 99,9 % em CLN de sinvastatina, outro fármaco lipofílico

5.3.4 Perfil de Liberação *ex vivo*

O modelo de ordem zero (massa % liberada vs. Tempo) (Figura 36) apresentou o maior coeficiente de correlação de Pearson (r) (0,9988) ($p > 0,05$), sendo portanto, utilizado para descrever o mecanismo de liberação do fármaco.

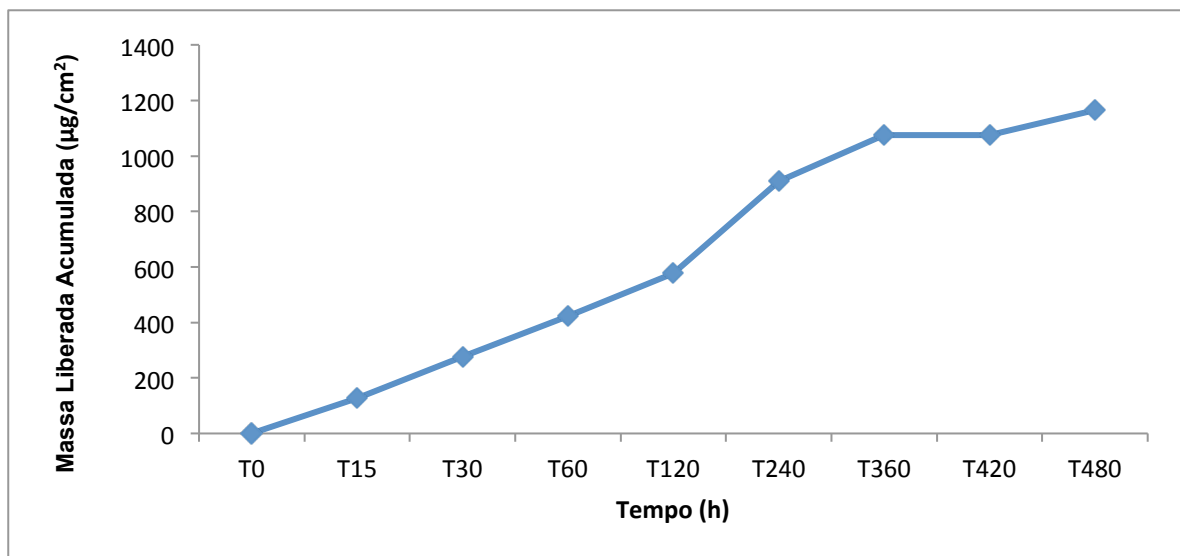


Figura 36: Perfil de liberação de cetozonazol dos CLN

O modelo de ordem zero baseia-se na liberação lenta da substância ativa a uma velocidade constante, independente da concentração da substância ativa (CÁRCAMO, 1981). Esta velocidade constante é altamente desejável na liberação de fármacos, pois significa que a mesma quantidade de fármaco é liberada por unidade de tempo (SINKO, 2008). Neste modelo, o mecanismo de liberação de um fármaco é descrito como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, podendo ser representado pela seguinte equação (MANADAS et al., 2002).

$$M = M_0 + Kt_1$$

Onde:

M : massa acumulada de fármaco liberada ou dissolvida no tempo t_1 ;

M_0 : massa inicial de fármaco na solução (geralmente zero);

K : é a contante de ordem zero.

Se a taxa de liberação é constante, o gráfico de M em função de t produzirá uma linha reta, com inclinação igual a K e liberação independente da concentração. Como pode ser observado na Figura 36, a liberação do cetoconazol seguiu um padrão monofásico ou acentuada ao longo de 4 horas (240 min) de experimento seguindo de uma estabilização da acentuação da liberação. De acordo com Xie e colaboradores (2011), em nanopartículas lipídicas, ocorre uma liberação acentuada (efeito burst) do fármaco nas primeiras horas de ensaio, seguindo de uma liberação mais sustentada.

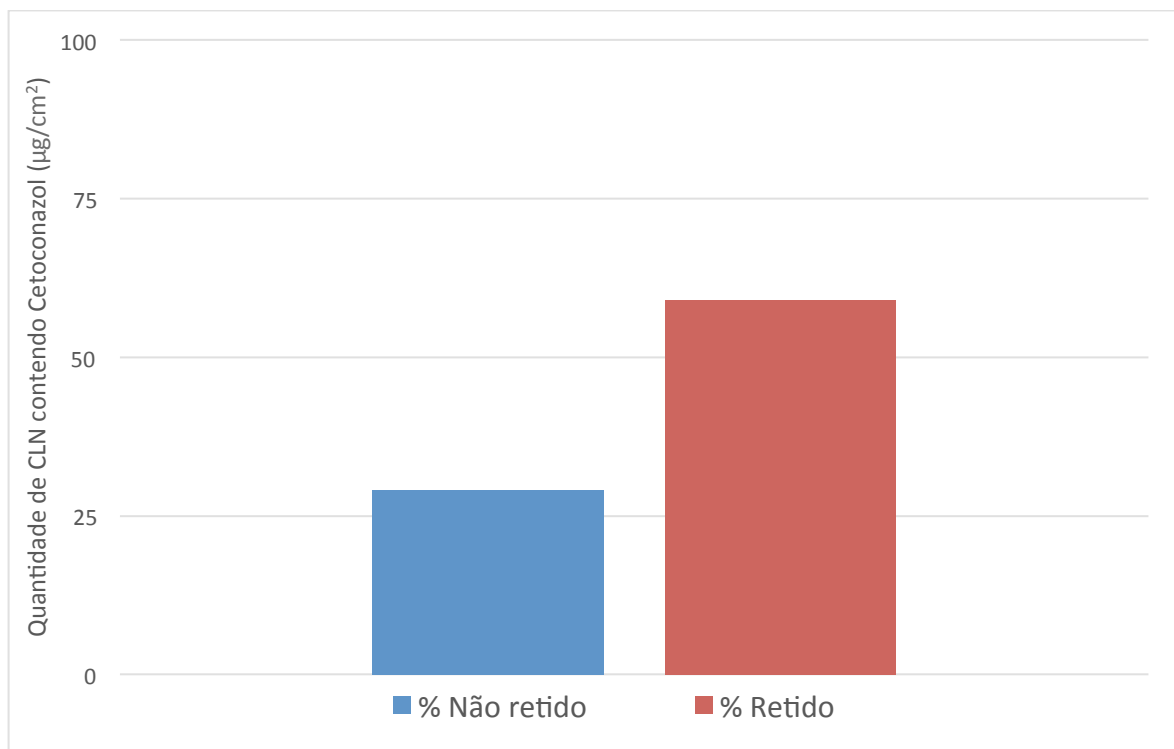
Durante todo o experimento, 11,8 % do fármaco foi liberado ao compartimento receptor, isso pode ser atribuído pela baixa solubilidade em água e a alta afinidade que o fármaco apresenta pela matriz lipídica, o que foi confirmado pelos ensaios de eficiência de encapsulação, mesmo este sendo de natureza lipofílica, o que facilita o seu transporte. Além disso, a adição do fármaco em uma nanoemulsão pode conduzir modificações no comportamento desses sistemas exigindo, portanto, uma cuidadosa avaliação dos seus parâmetros físico-químicos, os quais desempenham importante função na biodisponibilidade.

5.3.5 Estudo de Retenção Cutânea

A Figura 37 demonstra o comparativo entre as quantidades de CLN contendo cetoconazol retidas na pele de orelha de porco. Após 8 horas, 29,1 % da formulação não ficou retida, enquanto 59,1 % ficou retida nas camadas da pele de orelha de porco, concordando com o resultado do estudo de Antonio (2007), o qual demonstrou 56,52 % de retenção do cetoconazol para uso tópico em 24 horas. De acordo com Sanco (2004) o percentual de fármaco não retido pode ser justificado pela utilização de membranas naturais de pele de orelha de porco, que devido o tempo decorrido entre preparação e análise, variação entre animais, além de características de tamanho e absorção específicas da pele, observa-se aumento do desvio na análise de permeação, promovendo mudanças constantes das características de absorção.

Em relação a quantidade retida (59,1 %), sugere-se que a formulação ficou retida nos estratos córneo, epiderme e derme. Sanco (2004), demonstra que as propriedades físico-químicas das substâncias, o tipo e composição da formulação,

tamanho de partículas e índice de polidispersidade influenciam a penetração no estrato córneo, concordando ainda, com o que descrito pela SPPC (2006). De acordo com Clares e colaboradores (2014) o tamanho de partícula para produtos e/ou substância nanotecnológicas de aplicação tópica, é de 100 nanômetros, pois partículas com valores superiores a este tendem a ficar retidas no estrato córneo, facilitando sua eliminação durante o processo de renovação da pele, justificando a maior retenção nessas camadas.



($p > 0,05$)

Figura 37: Comparativo entre a quantidade retida e não retida de CLN contendo Cetoconazol (%).

5.3.6 Estudo de Estabilidade

As Figuras 38 a 40 apresentam os resultados do estudo de estabilidade a temperatura ambiente e sob proteção da luz em um período de 0-15-30-60 dias de preparo dos CLN.

Apesar de essas variações não serem consideradas significativas, segundo análise de variância ($p > 0,05$), é visível a tendência de aumento das partículas (Figura 38). Este fato ocorre devido a alteração das propriedades dos tensoativos e o aumento da concentração das partículas, no qual, facilita a agregação delas durante o decorrer do tempo. Contudo Attama e colaboradores (2012) destacam que os valores obtidos neste estudo são aceitáveis, pois estes autores relatam aumentos de tamanho entre 2,1 e 4,9 vezes a partir do valor inicial.

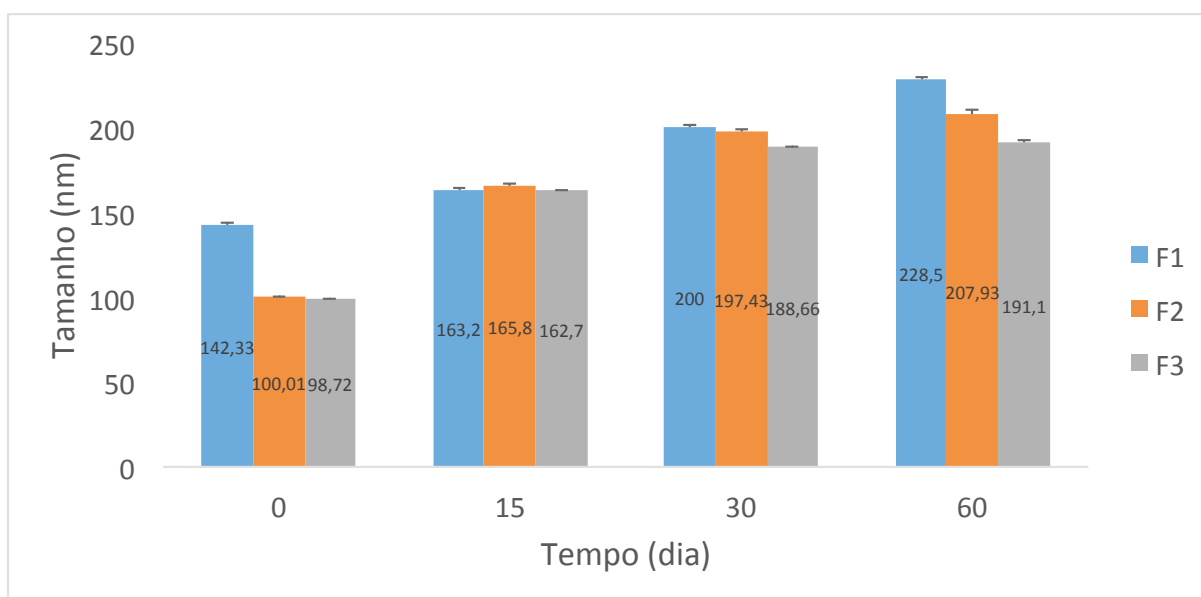


Figura 38: Variação do tamanho de partícula das formulações 1, 2 e 3 nos tempo 0, 15, 30 e 60 dias.

Em relação aos índices de polidispersidade (PDI) (Figura 39) e potencial zeta (Figura 40), os CLN se mantiveram em valores aceitáveis. Segundo Hommos (2009) e Teeranachaidekul e colaboradores (2007), os valores aceitáveis de PDI e potencial zeta estão entre 0,10 e 0,20 e -30 a + 30 mV (em valor absoluto), respectivamente.

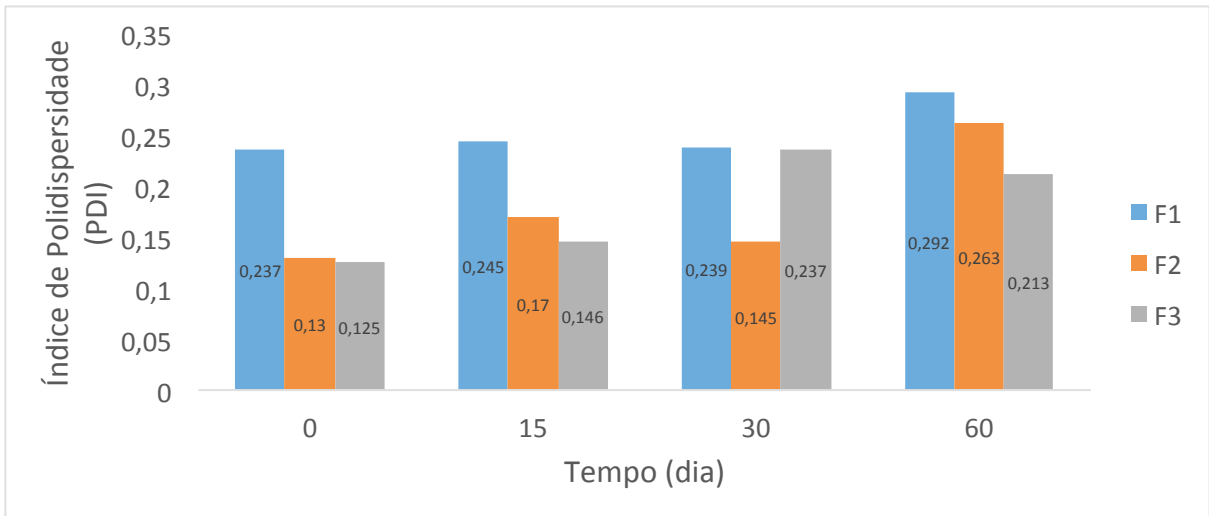


Figura 39: Variação do índice de polidispersidade (PDI) das formulações 1, 2 e 3 nos tempo 0, 15, 30 e 60 dias.

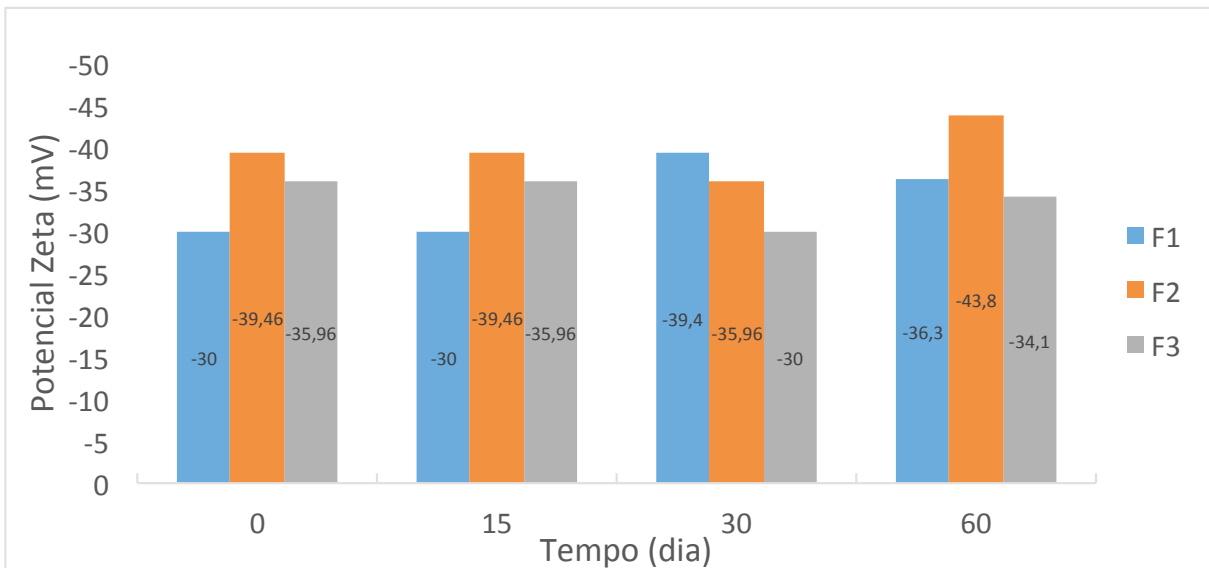


Figura 40: Variação do potencial zeta (mV) das formulações 1, 2 e 3 nos tempo 0, 15, 30 e 60 dias.

6 CONCLUSÃO

- A cromatografia gasosa evidenciou que a gordura de murumuru apresentou uma composição de ácidos graxos saturados (87,4 %) e insaturados (52,7 %), com predomínio dos ácido láurico (48,1 %), mirístico (26,6 %), oléico (8,4 %), palmítico (6,9 %) e linoleico (4,2 %).
- A caracterização físico-química da gordura de murumuru revelou que esta apresenta-se dentro dos limites recomendados, onde: índice de iodo 11 $\text{gI}^2/100\text{g}$; índice de saponificação 241 mg KOH/g; índice de acidez 3,9 mg KOH/g; Densidade 0,49 g/mL; refração 1,46; índice de peróxido 2,99.
- A Calorimetria Diferencial Exploratória dos constituintes isolados e da mistura lipídica estão dentro das especificações descritas na literatura.
- O método de doseamento do cetoconazol nos CLN por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou-se específico, linear, exato e preciso.
- De acordo com as concentrações de lipídios totais, tensoativos e de cetoconazol, as análises por espectroscopia de correlação de fótons indicaram tamanhos de partículas entre 98,60 e 161,56 nm, índice de polidispersidade entre 0,130 e 0,276 e potencial zeta entre .30,0 e 39,46 mV;
- Foi observado redução no tamanho das partículas (142,33 a 98,72 nm) e índice de polidispersidade (0,237 a 0,125) ao aumentar a concentração de tensoativos de 0,5 a 1,5 %;
- A microscopia eletrônica de transmissão indicou um formato esférico das nanoestruturas;
- A eficiência de encapsulação demonstrou a incorporação de aproximadamente 100 % de cetoconazol na matriz lipídica dos CLN;
- O ensaio de de liberação seguiu um modelo cinético de ordem zero com liberação de 70,9 % do fármaco ao longo de 8 horas de experimento.
- As nanopartículas apresentaram estabilidade física ao longo de 60 dias de observação. Os fatores observados foram tamanho de partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta.

- Com base no exposto, afirma-se que os CLN obtidos a partir da gordura vegetal de murumuru, cera de carnaúba, triglicérides de ácido cáprico e caprílico e os tensoativos Polissorbat[®] 80 e Pluronic[®] F-127, apresentaram características físico-químicas favoráveis para sistema de administração de medicamentos e cosméticos. Isso se justifica pelo fato dos resultados obtidos serem condizentes com os relatados na literatura. Os estudos adicionais de caracterização, bem como avaliação *in vivo* são fundamentais para a promoção de uma formulação de uso farmacêutico ou cosmético.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, H.; SHIRODE, A. B.; SYLVESTER, P. W.; NAZZAL, S. Preparation, characterization and anticancer effects of simvastatin-tocotrienol lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 389, p. 223 – 231, 2010.

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

ALVES, G. P.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**. 9º Ed. São Paulo. 2008. p. 44-50.

ALVES, J. S. **Obtenção e avaliação de formas farmacêuticas semi-sólidas fitoterápicas contendo extrato seco de *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica brasileira)**. Ribeirão Preto, 2004. 144p. Tese de Doutorado, 2004.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 1995, 4th ed. Champaign, USA (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66: Preparation of methyl esters of long chain fatty acids).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods AOCS Cc 7-25, Cc 10-25, Cd 3-25, Cd 3d-63, Cd 8-53, em **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 1998, 5th ed. Firestone, D., AOCS Press: Champaign, 1998.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 1995, 4th ed. Champaign, USA (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography).

ANTONIO, M, E. C. O. Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta semi-sólida de cetoconazol para aplicações tópicas. 2007. 147f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Departamento de farmácia. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. Paraná.

ARAUJO, J.S. **Obtenção e avaliação de cremes transdérmicos contendo fentanila, cetamina e clonidina no controle da dor crônica**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.

ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; JR, F. P. **Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química – 60 espécies do extrativismo florestal não madeireiro da Amazônia**. 2005. 244 p.

ATTAMA, A. A.; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. In: SEZER, A, D. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**. Intech, 2012, Capítulo 5, p. 107 – 140.

ATTAMA, A. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Investigation of Surface-modified Solid Lipid Nanocontainers Formulated with a Heterolipid-templated Homolipid. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 334, p. 179 – 189, 2007.

BARATA, G. Sobram razões para transformar biodiversidade em produtos. **Inovação Uniemp** [online]. Campinas, vol. 1, n. 3, p. 38-39, 2005. Disponível em: <http://inovacao.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180823942005000300023&lng=en&nrm=is>. Acesso em: 05 Jan. 2015.

BARBOSA, B.S.; KOOLEN, H. H. F.; BARRETO, A.C.; SILVA, J. D.; FIGLIUOLO, R., NUNOMURA, S. M. Aproveitamento do Óleo das Amêndoas de Tucumã do Amazonas na Produção de Biodiesel. **Acta amazônica**. Manaus – AM. v. 39, n. 2 p. 371 – 376, 2009.

BASARAN, E.; DEMIREL, M.; SIRMAGÜL, B.; YAZAN, Y. Cyclosporine – A Incorporated Cationic Solid Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 1, p. 37 – 47, 2010.

BENNET, H. **Industrial Waxes, Natural and Synthetic Waxes**, New York, Chemical Publishing Company, v. 1, 324p., 1963.

BEZERRA, V. S. Aspectos do estado da arte, da produção e pesquisa com a palmeira murumuru (*Astrocarium murumuru* Mart). In: CONGRESSO BRASILEIRO

DEPLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5.; **CLÍNICA-TECNOLOGICA EM BIODIESEL**, 2., Lavras, 2008.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artme. 2005. cap.23, p. 353-356.

BORA, P. S. et al. Characterisation of the oil and protein fractions os Tucuma (Astrocarym vulgare Mart.) fruit pulp and seed kernel. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 3, n. 2, p. 111-116, 2001.

BOUREZG, Z.; BOURGEOIS, S.; PRESSEDA, S.; SHEHADA, T.; FESSI, H. Redispersible lipid nanoparticles of Spironolactone obtained by three drying methods. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 413, p. 191 – 199, 2012.

BRASIL, R. V.; CAVALLIERI, A. L. F.; COSTA, A. L. M.; GONÇALVES, M. A. B.; Caracterização física e química do óleo de pequi exposto a diferentes condições de armazenamento.; **Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos**, Universidade Federal de Goiás, 2011.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, volume 1. 4ª Ed. Brasília, 2002.

BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RE nº 899/2003, de 29 de maio de 2003 - **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/conn/RE_899_2003. Acesso em: 01 de agosto de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução - RDC Nº 270, de 22 de setembro de 2005. REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS, GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL. Diário Oficial da União, 23, set. 2005.

BRETT, A. M. O.; PAQUIM, A. M. C. Microscopia de Força Atômica de moléculas de DNA adsorvidas na superfície de HOPG. **Sociedade Portuguesa de Química**, V. 94, P. 58 – 68, 2004.

CÁRCAMO, E.C. **Cinética de disolución de medicamentos**: Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1981, p. 103.

CARVALHO, F. P. A. D. Eco-eficiência na produção de pó de cera de carnaúba no município de Campo Maior (PI). 157 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal do Piauí, 2005.

CASTELLI, F.; PUGLIA, C.; SARPIETRO, M. G.; RIZZA, L.; BONINA, F. Characterization of indomethacin-loades lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 304, p. 231-238, 2005.

CASTRO, J. C.; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, L. P.; MENDES, N. B.; COSTA, M. S. T.; BARRETO, A. C.; CUNHA, T. M. F.; KOOLEN, H. H. F. Produção sustentável de biodiesel a partir de oleaginosas amazônicas em comunidades isoladas, CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, Resumo...v. 2, p. 285-289, Brasília, 2006.

CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, M.; SCARNECCHIA, C.; GASCO, M. R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, p. 47 – 54, 1997.

Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://ca.iq.usp.br/novo/>. Acesso em 15 de novembro de 2015.

CEVC, G., VIERL, U.: Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art re-view and critical appraisal. **J Control. Release**. V. 141,p. 277–299., 2010.

CHEIKH-ROUHO, S., BESBES, S., HENTATI, B., BLECKER, C., DEROANNE, C., ATTIA, H.,NIGELLA SATIVA L.: chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. **Food Chemistry**. v. 101, Tunisia. pp: 673–681, 2007.

CLARES, B.; CALPENA, A. C.; PARRA, A.; ABREGO, G.; ALVARADO, H.; FANGUEIRO, J. F.; SOUTO et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid

lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International journal of pharmaceutics*, ago. 2014. ISSN 1873-3476. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314005560>.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2002. cap. 33, p. 455-466.

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

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.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. B.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n. 1, p. 80 – 102, 2012.

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; CULLOUGH, J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, in press. 2012.

FARMACOPEIA AMERICANA, USP 29, 2006. **Ketoconazole tablets**. Disponível em http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m44000.html Acesso em 15/01/2015.

FARTASCH, M. Epidermal barrier in disorders of the skin. **Microscope Research and Technique**. v. 38, p. 361 – 372, 1997.

FERREIRA, E. J. L. CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DAS PINAS FOLIARES DE *Astrocaryum murumuru* Mart. (ARECACEAE). 63ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência realizada em Goiania-GO. 2011.

FERREIRA, E. J. L. F. Manual das palmeiras do Acre, Brasil. Disponível em:<http://www.nybg.org/bsci/acre/www1/manual_palmeiras.html>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2016.

FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. S. Physicochemical characterization of the fruit and oil extracted from tucuman (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 427-433, out./dez. 2008.

FERREIRA, S. N.; SAMPAIO, M. J. A. M. **Biodiversidade e conceitos tradicionais associados: implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil**. São Paulo. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2013, 360 p.

FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. **Dermatología en Medicina General**. 4° ed., Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, p. 2519 –2545, 1997.

FLOURY, J.; LEGRAND J.; DESRUMAUX, A Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. **Engineering science**, v.59, p. 1285-1294, 2014.

FREITAS, C.; MÜLLER, R.H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN(TM)) and crystallinity of the lipid phase. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 47, p. 125–32, 1999.

GARCIA, FABRICIO DE MELO. Avanços da Nanomedicina: A nova fronteira da medicina – artigo de atualização. **Rev. Ciênc. Saude Nova Esperança**. Santa Catarina, 2014.

GARUD, A.; SINGH, D.; GARUD, N. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method ,Characterization and Applications. International Current Pharmaceutical Journal, v. 1, n. 11, p. 384–393, 2012.

GOZZO, F. V. **Caracterização morfológica de tecidos oculares por Microscopia de Força Atômica (MFA)**. 2009, 109 f. (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Física da Universidade de São Paulo, 2009.

GUIMARÃES, K.; RÉ, M. I.; Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (CLN). In: BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. Springer, 2011, Capítulo 5, p. 101-122.

GUNSTONE, F. D. **The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses**. USA: CRC Press, 2004.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles monospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p.147-157, 2007.

HEJRI, A.; KHOSRAVI, A.; GHARANJIG, K.; HEJAZI, M. Optimisation of the formulation of β -carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. **Food Chemistry**, v. 141, p. 117 – 123, 2013.

HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 4, p. 1526–40, dez. 2010. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1208/s12249-010-9526-5/fulltext.html>>.

HOMMOSS, A. **Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations**. 2009. 202 f. (Tese de Doutorado) – Department of Biology, Chemistry and Pharmacy of the Freie Universität Berlin, Berlin, 2009.

HONG, X. Novel preparation method for sustained-release PLGA microspheres using water-in-oil-in-hydrophilic-oil-in-water emulsion. *Int J Nanomedicine* v. 2013:8 (1) p. 2433 – 2441, 2013.

HORTON, H. R., MORAN, L. A., OCHS, R. S., RAWN, J. D., SCRIMGEOUR, K. G. **Principles of biochemistry**. 3 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall. p. 264-303, 2002.

JEBORS, S., LEYDIER, A., WU, Q., GHERA, B.B., MALBOUYRE, M., COLEMAN, A.W.: **Solid lipid nanoparticles (SLNs) derived from para-acyl-calix[9]-arene: preparation and stability**. *J. Microencapsul.* V. 27(7), p. 561–571, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a Ed. Editora Guanabara Koogan, 2004.

KAMBLE, M. S.; VAIDYA, K. K.; BHOSALE, A. V.; CHAUDHARI, P. D. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – an overview. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, v. 2, n. 4, p. 681–691, 2012.

KASONGO, K. W.; MÜLLER, R. H.; WALKER, R. B. The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 17, n. 3, p. 353–362, jan. 2011. ISSN 1083-7450. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2010.542163>>.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P. MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A Review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 5678 – 5698, 2012.

KHALIL, R. M.; BARY, A. A.; KASSEM, M. A.; GHORAB, M. M.; AHMED, M. B. Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery of Meloxicam: Development and *in vitro* characterization. **1st Annual International Interdisciplinary Conference**, 2013.

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

KHOEE, S., YAGHOUBIAN, M., An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal Medicine Chemistry**. v. 44, p. 2392 – 2399, 2009.

KUMAR.S.N. Variability in Coconut (Cocos nucifera L.) **Germplasm and Hybrids for Fatty Acid Profile of Oil Food Chemistry**. v.59. India. pp: 13050–13058, 2011.

LACERDA, S. P.; CERIZE, N. N.; RÉ, M. I. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, p. 312 – 321, 2011.

LASERRA, S. BASIT, A. SOZIO, P. MARINELLI, L. FORNASARI, E. CACCIATORE, I. CIULLA, M. TÜRKEZ, H. GEYIKOGLU, F. Solid Lipid nanoparticles loaded with lipoyl-memantine codrug: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, 485, p. 183-191, 2015.

LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; ABREU, L.R.P.; SILVA, L.B.L.; WANDERLEY, A.G.; SANTANA, D.P.; Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n. 1, p. 36-41, jan./mar., 2004.

LIU J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191 – 195, 2007.

LOBÃO, E. B. **Nanotecnologia Aplicada a Fármacos**. (monografia em farmácia). Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, 2011.

LOPES, J.P.N; Transesterificação da gordura das amêndoas de murumuru com etanol para a Produção de Biodiesel, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – **Universidade Federal do Pará. Belém**, 2007.

LUCKS, S.; MÜLLER, R. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - sln). European Patent EP0000605497, 1996. Disponível em: <http://www.google.com/patents/EP0605497B1?cl=en>.

MAMBRIM, M.C.T.; BARRERA-ARELLANO, D. **Caracterización de aceites de frutos de paimeras de la región amazónica dei Brasil. Grasas y aceites**, Sevilha, v.48, n.3, p.154-158,1997, 2006. Disponível em: <http://cat.inist.frl?aModele=afficheN&cpsidt>. Acesso em 28 de agosto de 2014.

MANADAS R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375 – 394, 2002.

MAPRIC, Tween80, 2008. disponível em: <http://www.mapric.com.br/anex>. Acesso em dezembro de 2014.

MARCINIEC B, KOZAK M, DETTLAFF KJ. Thermal analysis in evaluation of the radiochemical stability of some fungicidal drugs. **J Therm Anal Calorim**; v. 77(1): p. 305-17, 2004.

MARQUES, C. P. **Formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas lipídicas**. 2010. Monografia (Grau de licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, **Faculdade Ciências da Saúde**, Porto. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/dspace/bitstream/10284/1pdf>>. Acesso em 19 de setembro de 2014.

MARTINDALE. The Extra Pharmacopeia. 33rd Edition. **Pharmaceutical Press**. London, 2002.

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

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83 – 101, 2012.

Microfluidics. Disponível em: <<http://www.microfluidicscor.com>>. Acesso em 15 de novembro de 2015.

MITREA, E.; OTT, C.; MEGHEA, A. New Approaches on the Synthesis of Effective Nanostructured Lipid Carriers. *Revista de Chimie*, v. 65, n. 1, p. 50–55, 2014. Disponível em: <<http://www.revistadechimie.ro/pdf/MITREAE.pdf114.pdf>>.

MOSER, K.; KRIWER, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutcs**, v. 52, p.103-112, 2001.

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, n. 1, p. 131 – 155, 2002.

MÜLLER, R.H., MEHNERT, W.LUCKS, J.S. Schwarz, Solid lipid nanoparticles (SLN) – na alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* V. 41, p. 423-427, 2002.

NASCIMENTO, J. F.; FERREIRA, E. J. L.; CARVALHO, A. L.; REGIANI, A. M. Potencial da palmeira de murumuru nativa do Acre. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.90-92, jul. 2007.

NEHDI, I. A. Cupressus sempervirens var. horizontalis seed oil: Chemical composition, physicochemical characteristics, and utilizations. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 381– 385, 2013.

NGUYEN, H.; HWANG, I. C.; PARK, J. W.; PARK, H. J. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. *Journal of Microencapsulation*, v. 99, n. 6, p. 596–604, 2012. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/02652048.2012.668960>>.

NICULAE, G.; LACATUSU, L.; BADEA, N.; MEGHE, A.; STAN, R. Influence of vegetable oil on the synthesis of bioactive nanocarriers with broad spectrum photoprotection. *Central European Journal of Chemistry*, v. 12, n. 8, p. 837–850, jan. 2014. ISSN 1895-1066. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2478/s11532-014-0503-9>>.

NNAMANI, P. O.; ADIKWU, M. U.; ATTAMA, A. A.; IBEZIM, E. C. Based Solid Lipid Microparticles: Application in Oral Delivery of Glibenclamide to Diabetic Rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 68 – 74, 2010.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 250, n. 2, p. 359-369, 2003.

NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

NUNES, R. S. **Avaliação de dispersões fosfolipídicas contendo clonidina em preparações transdérmicas.** Ribeirão Preto, 2005, 163 p. Tese de Doutorado, 2005.

PANDEESWARAN M, ELANGO KP. Electronic, Raman and FT- IR spectral investigations of the charge transfer interactions between ketoconazole and povidone drugs with iodine. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**; v. 72(4): p. 789-95, 2009.

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

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boom to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147 – 166, 2012.

PEDERSEN, N., HANSEN, S., HEYDENREICH, A.V., Kristensen, H.G., Poulsen, H.S.: Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 62, p. 155–162, 2006.

PELTIER, S.; OGER, JM.; LAGARCE, F.; COUET, W.; BENOÎT, JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-load lipid nanocapsules. **Pharmaceutical research**, v. 23(6), p.1243-1250, 2006.

PIMENTEL, L. F.; JUNIOR, A. T. J.; MOSQUEIRA, V. C. F.; MAGALHAES, N. S. S. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.43, n.4, 2007. Disponível: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151693322007000400003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 24 agosto 2014.

PIROT, F.; BERARDESCA, E.; KALIA, Y. N.; SINGH, M.; MAIBACH, H. I.; GUY, R. H. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity – Facile and noninvasive quantification in vivo. **Pharmaceutical Research**. V. 15, p. 492-494, 1998.

POZO-RODRÍGUEZ, A.; DELGADO, D.; SOLÍNIS, M. A. Solid Lipid Nanoparticles as Potential Tools for Gene Therapy: *In vitro* Protein Expression after Intravenous Administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1 – 2, p. 157 – 162, 2010.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470-491, 2011.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid Nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, 357, p. 295 – 304, 2008.

QUEIROZ, J. A. L. de; BEZERRA, V. S.; MOCHIUTTI, S. A palmeira murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) no estuário do rio Amazonas no Estado do Amapá. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5.; CLÍNICA TECNOLÓGICA EM BIODIESEL, 2., 2008, Lavras. Biodiesel: tecnologia limpa: anais completos. Lavras: UFLA, 2008. 1 CD-ROM.**

RAMOS, B. G. Z; PASA, T. B. C. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89 (2): p. 95-101, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5. P. 771 – 780, 2004.

ROCHA, C. B. R.; POTIGUARA, R. C. V. Morfometria das fibras das folhas de *Astrocaryum murumuru* var. murumuru Mart. (Arecaceae). **Acta Amazônica**, v.37, n.4, p.511-516. 2007.

RODRIGUES, A.M.C.; DARNET, S.; SILVA, L.H.M. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits. **Journal Brazilian Chem. Society**. v.21, n. 10, p. 2000-2004, 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington, Pharmaceutical Press, 917 p., 2009.

SANCO/222 - EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, rev. 7, 2004. Disponível em:http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc20_rev_en.pdf Data de acesso:10/03/2015.

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, p. 32 – 36, 2010.

SANTOS, G. S.; POHLMANN, A. R.; ASSUMPTÇÃO, E. R.; COLOMÉ, L. M.; RAFFIN, R. P. **Preparação e caracterização físico-química de teossomas contendo idebenona**. Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (21: 2009 out. 19-23). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2009b.

SANTOS, J. L., RIBEIRO, Y. A., SALGADO, H. R. N., CHUNG, M. C. Estudo de metodologia analítica para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 161 – 165, 2009.

SANTOS, O. D. H; MORAIS, J. M.; ANDRADE, F. F.; AGUIAR, T. A.; ROCHA FILHO, P. A. Development of vegetable oil emulsions with lamellar liquid-crystalline structures. **Jornal of dispersions Science and technology**, v. 32, p. 433-438, 2011.

SASAKI, H.; KOJIMA, M.; MORI, Y.; SHIBASAKI, J. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolona, acetone, indomethacin and flubiprofen. *J. Pharm Sci.*, Washington, v. 80, n. 6, p. 533-538, 1991.

SASOL Reaching New Frontiers, disponível em: <<http://abstracts.aapspharmaceutica..pdf>>. Acesso em 01/12/2014

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 43, n. 2, p. 195-203, abr./jun., 2007.

SAUPE, A.; RADES, T. Solid lipid nanoparticles. In: MOZAFARI, M. R. **Nanocarrier technologies: Frontiers of Nanotherapy**, Holanda: Springer. p. 41-50, 2006.

SCCP/0970 - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS – **Basic Criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients**, 2006.

SCHÄFER-KORTING, M.; MENHERT, W.; KORTING, H. C. Lipid Nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, p. 427 – 443, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SERRA, M.; TRUJILLO, A. J.; JARAMILLO, P. D.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Ultra-high Pressure Homogenization-Induced Changes in Skim Milk: Impact on Acid Coagulation Properties. **Journal of Dairy Research**, v.75, p.69-75, 2008.

SHAH, M.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K.; PATHAK, K. Oral Solid Compritol 888 ATO Nanosuspension of Simvastatin: Optimization and Biodistribution Studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 526 – 537, 2011.

SHARP, J. **Quality in the manufactured of medicines and other healthcare products**. 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

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

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.; SHAH, V. FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/*in vitro* release testing of Novel/Special dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2003.

SILVA JÚNIOR, J. O. C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. (confrei)**. Tese de doutorado / FCFRP - USP. 2006

SILVA JÚNIOR, J.O.C.; PEREIRA, N.L. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmácia**. Aceito para publicação, 2008.

SILVA, S. M; SAMPAIO, K. A.; TAHAM, T; ROCCO, S. A.; CERIANI; MEIRELLES, A. J. A. Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the brazilian amazon region. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 86, p. 611-616, 2009.

SINKO, P.J. Martin: **Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5a edição, Porto Alegre: Artmed, p. 354-358, 2008.

SOARES, W. DA SILVA.; Estudo da correlação entre as características da matéria-prima graxa e as propriedades físico-químicas do biodiesel, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) **Universidade do Estado do Rio de Janeiro**, 2009.

SOUTO, E. B. AND MÜLLER, R. H. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructures Lipid Carriers - Lipid Nanoparticles for Medicals and Pharmaceuticals. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 23, pp. 313-328, 2011.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos Clássicos de Produção Laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762 – 1769, 2011.

SOUTO, E. M.; 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, p. 71 – 77, 2004.

STOTT, P.W.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Mechanistic study into the enhanced transdermal permeation of a model β - blocker, propranolol, by fatty acids: a melting point depression effect. **Inter. J. of Pharm.** v. 219. Bradford, Inglaterra. pp.161-176, 2001.

TADROS, T. F. Emulsion Science and Technology. Weinheim, Germany: Wiley- VCH Verlag, 2009. 1–326 p. ISBN 9783527325252. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9783527626564>>.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 19, n. 29-43, p. 29–43, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856413000428>>.

TAUBER, U.; TODA, T. Biotransformation of Diflucortolon - vareriato in hairless mouse membrane. *Arzneim- Forsch.*, Aulendorf, v. 26, n. 7b, p. 1484-1487, 1976.

TEERANACHAIDEEKUL, V., JUNYAPRASERT, V.B., SOUTO, E.B., MÜLLER, R.H. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 354, p. 227-234, 2008.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. B.; MÜLLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 141 – 148, 2007.

TEIXEIRA, L. C. G.; Produção de Biodiesel da Gordura de Murumuru (*Astrocaryum murumuru*) Via Catálise Heterogênea, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) **Universidade Federal do Pará**, Belém, 2010.

TOMAZZINI, F.; DURAN, M.; VAUGHN; N. Nanopartículas lipídicas sólidas em fármacos. 2007. Disponível em: <<http://www.google.com.br/search?hl=ptB>>. Acesso em 15 de setembro 2014.

VASCONCELLOS, F. C.; GILBERTO, A. S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, v. 205, p. 65-70, 2011.

VILLALOBOS-HERNANDEZ, J.R., MÜLLER-GOYMANN, C.C. Novel nanoparticle carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreen in aqueous media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 60, p. 113 – 122, 2006.

WALIA, M.; RAWAT, K.; BHUSHAN, S.; PADWAD, Y. S.; SINGH, B. Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. **Journal SCIENCE Food Agriculture**, v. 94, p. 929-934, 2014.

WARTH, A. H. **The Chemistry and Technology of waxes**, New York, Reinhold Publishing Corporation, second printing, p. 366 – 376, 1947.

WILSON M., KANNANGARA K., SMITH G. SIMMONS M., RAGUSE B. Nanotechnology: **basic science and emerging technologies**. UNSW Press: Sidney, 2002.

WISSING, S. A., KAYSER, O., MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, maio, 2004.

WONG, H.L; BENDAYAN, R.; RAUTH, A.M.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v.59 n (6), p. 491- 504, 2007.

XIE, S.; ZHU, L.; DONG, Z.; WANG, X.; ZHOU, W. Preparation and evaluation of ofloxacin-loaded palmitic acid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 547 – 555, 2011.

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 Chromatography Science**, v. 2, n. 50, p. 598 – 607, 2012.

8 ANEXOS

Tabela 15: Resultados descritos no laudo de análise de cera de carnaúba, segundo o fornecedor, GM Ceras.

Análise	Especificações	Resultado
Cor	Amarela	Ok
Odor	Característico	Ok
Aparência	Escamas	Ok
Ponto de fusão (°C)	81 – 86	83,00
Índice de Saponificação (mg KOH / g)	78 – 88	86,40
% Cinzas	0,00 – 0,12	0,10
Úmidade	0,00 – 0,50	0,49
Índice de Áidez (mg KOH / g)	2,0 – 6,0	4,50

Tabela 16: Resultados descritos no laudo de análise do cetoconazol fornecido pela Natural Pharma.

Análise	Especificações	Resultado
Identificação	Conforme USP	De acordo
Rotação específica	De -1,0 a +1,0°	0°
Ponto de fusão	148 - 152°C	148 - 150°
Perda por secagem	Máximo de 0,50%	0,1%
Resíduo de ignação	Máximo de 0,10%	0,05%
Doseamento	98,0 – 102,0%	99,52%
Metais Pesados	Máximo de 0,002%	< 0,002%
Pureza cromatográfica	Máximo de 2,0%	De acordo
Acetona	Máximo de 0,5%	0,0%
Acetoacetato	Máximo de 0,5%	0,22%
Dimetilsulfóxido	Máximo de 0,5%	0,0%



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



CERTIFICADO

SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA *SQRFB*

cetoconazol

Lote: 1033

Descrição: pó branco a quase branco.

Teor: **99,8%**, calculado em relação à substância dessecada, determinado por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1M.

Armazenamento: conservar o frasco bem fechado, protegido da luz e em refrigerador (em temperatura entre 2°C e 8°C).



Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br

Figura 41: Laudo de análise do cetoconazol fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz.



CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7
 Aut. Especial de Funcionamento M.S.: 1.10238-0

Página: 1/1
 Impressão: 09/12/15 11:42

Insuno: TRIGLICERIDES AC. CAPRICO CAPR

Lote : 15084804A Origem : **Malscia** Fabric : 02/2015
 Lote Fab. : 110276B Precedência : **Brasil** Validade : 02/2018
 Fórmula : NADA CONSTA PM : N/C Frac : 1181216 28/08/2015
 CAS : 73398-81-6

Enunciado	Especificação	Resultado	Referência
* DESCRIÇÃO	INFORMATIVO	LIQUIDO AMARELO FALIDO	MET.GERAL FB V
* DENSIDADE RELATIVA	0,93 - 0,96 g/mL	0,9500 g/mL	FABRICANTE
ÍNDICE DE ACIDEZ	MÁXIMO: 0,1 mg KOH/g	0,1 mg KOH/g	FABRICANTE
ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	325 - 345 mg KOH/g	333 mg KOH/g	FABRICANTE
ÍNDICE DE IODO	MÁXIMO: 1,0 g/100g	0,2 g/100g	FABRICANTE
ÍNDICE DE HIDROXILA	MÁXIMO: 10 mg KOH/g	4 mg KOH/g	FABRICANTE
ÍNDICE DE PERÓXIDO	MÁXIMO: 1,0 meq/Kg	0,1 meq/Kg	FABRICANTE
ODR (APHA)	MÁXIMO: 50 HAZEN	32 HAZEN	FABRICANTE
UMIDADE	MÁXIMO: 0,15% m/m	0,02% m/m	FABRICANTE
ÁCIDO GRAXO C6	MÁXIMO: 2,0% m/m	0,0% m/m	FABRICANTE
ÁCIDO GRAXO C8	55 - 65%	63%	FABRICANTE
ÁCIDO GRAXO C10	35 - 45% m/m	43%	FABRICANTE
ÁCIDO GRAXO C12	MÁXIMO: 3,0%	0,0%	FABRICANTE
ÁCIDO GRAXO C14	MÁXIMO: 1,0%	0,0%	FABRICANTE
ÍNDICE DE REFRAÇÃO N20/D	1,440 - 1,452	1,449	FABRICANTE
VISCOSIDADE EN 20° C	25 - 33 mPa.s	29 mPa.s	FABRICANTE
CINZAS TOTAIS	MÁXIMO: 0,1%	0,0%	FABRICANTE
ISAPONIFICÁVEIS	MÁXIMO: 0,5% m/m	0,3% m/m	FABRICANTE
IMPUREZAS ALCALINAS	MÁXIMO: 0,15 mL DE HCl 0,01M	0,00 mL DE HCl 0,01M	FABRICANTE
METAIS PESADOS	MÁXIMO: 10 ppm	1 ppm	FABRICANTE
CRÔMO	MÁXIMO: 0,05 ppm	0,05 ppm	FABRICANTE
COBRE	MÁXIMO: 0,1 ppm	0,1 ppm	FABRICANTE
CHUMBO	MÁXIMO: 0,1 ppm	0,0 ppm	FABRICANTE
NIQUEL	MÁXIMO: 0,2 ppm	0,1 ppm	FABRICANTE
ESTANHO	MÁXIMO: 0,1 ppm	0,1 ppm	FABRICANTE
ARSÊNICO	MÁXIMO: 0,5 ppm	0,0 ppm	FABRICANTE

NOMENCLATURA : TRIGLICERIDES AC. CAPRICO CAPR

Continua na Próxima Folha


 Dra. Shirlei Contil Teruya de Sales
 Farmacêutica Responsável Técnica
 CRF-SP:55.711

Aprovado
 Reprovado

SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA

R. José Sarmato Rodrigues Agost 1370 Fone 11 4785-9600
 Cep 06833-300 Castro Log. Embu - SP www.fagron.com.br

Figura 42: Laudo de análise do TACC fornecido pela Fagron.