

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Bruna de Almeida Rocha**

**NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE  
ÓLEO DE COPAÍBA COMO ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DE *ACNES  
VULGARES***

**Diamantina  
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Bruna de Almeida Rocha**

**NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE  
ÓLEO DE COPAÍBA COMO ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DE *ACNES*  
*VULGARES***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Coorientador: Prof. Dr. João Vinícios Wirbitzki da Silveira

**Diamantina**

**2023**

### Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

R672n Rocha, Bruna de Almeida  
2023 NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE  
ÓLEO DE COPAÍBA COMO ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DE ACNES  
VULGARES [manuscrito] / Bruna de Almeida Rocha. -- Diamantina,  
2023.  
153 p.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Guilherme Carneiro.  
Coorientador: Prof. João Vinícios Wirbitzki da Silveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) --  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Diamantina, 2023.

1. Nanopartículas lipídicas. 2. Óleo de copaíba. 3.  
Polióxido de etileno. 4. Nanofibras. 5. Aplicação tópica. I.  
Carneiro, Guilherme. II. Silveira, João Vinícios Wirbitzki da.  
III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.  
IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).

Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-  
2886

e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM

**NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO  
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA COMO  
ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DE ACNES VULGARES**

Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS, nível de  
MESTRADO como parte dos requisitos  
para obtenção do título de MESTRA EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador (a): Prof. Dr. Guilherme  
Carneiro

Co-orientador: Prof. Dr. João Vinícios  
Wirbitzki da Silveira

Data da aprovação : 10/02/2023

Documento assinado digitalmente



GUILHERME CARNEIRO  
Data: 13/02/2023 10:49:24-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Documento assinado digitalmente



JOAO VINICIOS WIRBITZKI DA SILVEIRA  
Data: 13/02/2023 13:46:23-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr. GUILHERME CARNEIRO - UFVJM

Documento assinado digitalmente



SANDRO LUIZ BARBOSA DOS SANTOS  
Data: 12/02/2023 14:56:46-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

of.Dr. JOÃO VINÍCIOS WIRBITZKI DA SILVEIRA - UFVJM

Prof.Dr. SANDRO LUIZ BARBOSA DOS SANTOS - UFVJM

Documento assinado digitalmente



RODRIGO MOREIRA VERLY  
Data: 14/02/2023 10:37:43-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY - UFVJM

## AGRADECIMENTOS

O período do mestrado foi um grande desafio, uma enorme oportunidade de crescimento, aprendizado e desenvolvimento. Sou grata por ter trilhado esse caminho da melhor forma possível, com disposição, saúde e foco. Grata a Deus por me proporcionar oportunidades de aprender a caminhar de forma mais leve equilibrada pelos momentos desafiadores que enfrentei.

A minha mãe e meu padrasto, Andreia e Luiz, pelo apoio incondicional nos estudos, pela torcida, pelas orações e por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus objetivos. Ao meu noivo, Mateus, pela paciência no dia a dia, pela disposição de me ajudar sempre que necessário e com boa vontade e, principalmente por não me deixar desistir. À minha madrinha, Ângela e ao meu padrinho Claudio, que sempre incentivaram e torceram por mim. A minha terapeuta, Erlaine, sou muito grata por me instruir a lidar melhor com meus sentimentos e com as adversidades da vida cotidiana.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas (PPGCiFarm) agradeço por todos os ensinamentos, em especial ao Prof. Guilherme Carneiro, meu orientador, pela compreensão e paciência, por contribuir fortemente no meu crescimento pessoal e profissional, por acreditar e confiar em meu potencial e por se tornar uma grande inspiração e exemplo. Ao Prof. João Vinícios, meu coorientador pela disponibilidade, grande incentivo e conselhos. À Prof<sup>ª</sup>. Franciele Maria Pelissari Molina pela disponibilidade e ajuda com as análises estatísticas.

Aos técnicos e funcionários do ICT/EQ, do DEFAR e da UFVJM, em especial Thiago, Laise, Lívia, Patrícia, Wellington, Gustavo, Poliana, Keyla e Nathália, pela disponibilidade e auxílio na realização dos experimentos e análises. Ao Laboratório de Tecnologia de Materiais e aos DEFAR que me proporcionou realizar diversas análises.

Aos discentes do programa, colegas de mestrado e alunos de iniciação científica, em especial o Sofia, Amanda e Mateus, pela companhia, apoio, cooperação e ajuda em diversos momentos.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos, que por muitas vezes ouviram lamentações e comemoraram cada uma das minhas conquistas. A todas as pessoas que cruzaram meu caminho durante esses anos, com os menores dos atos de incentivo, meus sinceros agradecimentos. Sem cada um de vocês eu não estaria onde estou hoje!

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri.

## RESUMO

O óleo de copaíba (OC) tem ganhando atenção devido aos seus efeitos benéficos à saúde associados à sua composição rica em compostos anti-inflamatórios e antibacterianos. No entanto a utilização desse óleo é limitada por sua baixa solubilidade aquosa e instabilidade de seus compostos, limitações que podem ser contornadas através da sua encapsulação. A busca por mecanismos alternativos ao tratamento da *Acnes Vulgaris* é alta, visando reduzir os efeitos adversos do tratamento e aumentando assim a adesão do paciente. Uma alternativa interessante é a utilização de bioativos com propriedades farmacológicas. O ácido salicílico (AS) é um ativo tipicamente utilizado em administrações epidérmicas devido a suas propriedades queratolítica e bacteriostáticas. Entretanto, há algumas complicações relacionadas ao seu uso tópico, como irritação na pele, secura e sensação de queimação. A utilização de sistemas carreadores pode contornar essas adversidades. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e caracterizar nanofibras (NFs) poliméricas contendo nanocarreadores lipídico de óleo de copaíba (CLN-OC) como estratégia para o tratamento da acne. Bem como validar um método de baixo custo para a quantificação de AS incorporados nos nanocarreadores lipídicos (CLN). O método foi validado segundo critérios nacionais e internacionais, demonstrando-se seletivo, linear, exato, preciso, robusto e com limites de detecção e quantificação baixos. Comprovando assim, sua eficácia na quantificação de AS em nanopartículas lipídicas de matriz complexa. Desenhos experimentais foram utilizados na produção dos nanocarreadores e das nanofibras. A validação experimental da CLN-OC foi satisfatória e o diâmetro médio obtido foi de  $50,06 \pm 1,17$  nm. Os valores de índice de polidispersão e potencial zeta indicam seu caráter relativamente neutro e a estabilidade química dos seus componentes. Essa estabilidade dos CLN-OC em dispersão aquosa foi observada ao longo de 90 dias. Para as NFs, a média e o desvio padrão apresentaram significância estatística e preditividade. A validação experimental das NFs foi adequada para as duas variáveis de entrada, sendo a média e o DP do diâmetro médio obtidos 126,54 e 9,53 nm, respectivamente. As NFs otimizadas apresentaram morfologia lineares, lisas e homogêneas e exibem uma semelhança entre os espectros de absorção no infravermelho das NFs contendo ou não CLN-OC, indicando que a incorporação dos CLNs em sua solução polimérica não interfere na produção de NFs pelo método de eletrofiação.

*Palavras-chave: óleos vegetais, nanopartículas lipídicas, polióxido de etileno, aplicação tópica.*

## ABSTRACT

Copaiba oil (OC) has been gaining attention due to its beneficial health effects associated with its composition rich in anti-inflammatory and antibacterial compounds. However, the use of this oil is limited by its low aqueous solubility and instability of its compounds, limitations that can be circumvented through its encapsulation. The search for alternative mechanisms for the treatment of *Acnes Vulgaris* is high, aiming to reduce the adverse effects of the treatment and thus increasing patient compliance. An interesting alternative is the use of bioactive with pharmacological properties. Salicylic acid (AS) is an active ingredient typically used in epidermal administrations due to its keratolytic and bacteriostatic properties. However, there are some complications related to its topical use, such as skin irritation, dryness and burning sensation. The use of carrier systems can circumvent these adversities. The objective of this work was to develop, optimize and characterize polymeric nanofibers (NFs) containing copaiba oil lipid nanocarriers (CLN-OC) as a strategy for the treatment of acne. As well as validating a low-cost method for the quantification of AS incorporated in lipid nanocarriers (CLN). The method was validated according to national and international criteria, showing to be selective, linear, accurate, precise, robust and with low limits of detection and quantification. Thus, proving its effectiveness in quantifying AS in complex matrix lipid nanoparticles. Experimental designs were used in the production of nanocarriers and nanofibers. The experimental validation of the CLN-OC was satisfactory and the mean diameter obtained was  $50.06 \pm 1.17$  nm. Polydispersion index and zeta potential values indicate its relatively neutral character and the chemical stability of its components. Furthermore, stability of CLN-OC in aqueous dispersion was observed over 90 days. For NFs, the mean and standard deviation were statistically significant and predictive. The experimental validation of the NFs was adequate for the two input variables, with the mean and SD of the mean diameter obtained being 126.54 and 9.53 nm, respectively. Optimized NFs showed linear, smooth and homogeneous morphology and exhibit a similarity between the infrared absorption spectra of NFs containing or not CLN-OC, indicating that the incorporation of CLNs in their polymeric solution does not interfere with the production of NFs by the electrospinning method.

*Keywords: vegetable oils, lipid nanoparticles, polyethylene oxide, topical application.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Exemplificação esquemática da pele, suas camadas (epiderme, derme e hipoderme) e seus anexos. ....	21
Figura 2 - Estrutura molecular do ácido salicílico.....	24
Figura 3 – Copaiabeira - (A) Árvore, (B) Folhas e frutos, (C) Sementes. ....	27
Figura 4 – Extração do óleo de copaíba. ....	28
Figura 5 – Estrutura molecular dos principais sesquiterpenos detectados na oleorresina de copaíba.....	29
Figura 6 – Estrutura molecular dos principais diterpenos detectados na oleorresina de copaíba. ....	30
Figura 7 – Estrutura da matriz lipídica das nanopartículas lipídicas sólidas e dos carreadores lipídicos nanoestruturados. ....	32
Figura 8 – Classificação dos CLNs de acordo com variações na sua matriz lipídica. ....	34
Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura de nanofibras com diferenças morfológicas: (a) alinhadas uniaxialmente, (b) orientadas biaxialmente, (c) fita, (d) fibras porosas, (e) tipo colar, (f) nanoteias, (g) ocas, (h) nanofio no microtubo e (i) tubular multicanal. ....	38
Figura 10 – Estrutura esquemática de formação de nanofibras através do processo eletrofição convencional.....	40
Figura 11 – Processo de deformação da gotícula na ponta da agulha e formação do cone de Taylor. ....	41
Figura 12 – Diagrama esquemático das etapas de implementação do QbD farmacêutico.....	46
Figura 13 – Exemplo de diagrama de Ishikama: parâmetros críticos do processo de desenvolvimento de CLN-OC. ....	48
Figura 14 – Representação espacial 3D dos pontos do DCCR para três fatores de entrada ( $\alpha=1,68$ ). ....	51
Figura 15 – Exemplo de gráficos 3D e 2D da superfície resposta para função do modelo linear + interação + quadrático. ....	52
Figura 16 – Exemplificação gráfica das funções de desejabilidade para maximizar (a), minimizar (b) e (c) otimizar a variável resposta.....	54



## **CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA**

Figura 17 – Representação esquemática do processo de preparo dos CLNs: Método de homogeneização a quente associado a ultrassonicação.....	69
Figura 18 – Diagrama de Pareto da variável resposta tamanho, correlacionado as variáveis de entrada: total de lípide, total de tensoativos, proporção de óleo (lineares e quadráticas) e a interações entre as mesmas.....	78
Figura 19 – Superfícies resposta do tamanho médio das CLN-OC em função de: (A) Total de lípides e proporção de óleo (tensoativos = 3%); (B) Total de lípides e total de tensoativo (proporção de óleo = 35%); (C) Total de tensoativo e proporção de óleo (total de lípides = 8%). .....	79
Figura 20 – Otimização das condições de processo para a produção de CLN-OC em função das variáveis de entrada, variáveis respostas previstas e perfil de desejabilidade.....	81
Figura 21 – Representação gráfica da distribuição de tamanho das partículas do CLN-OC. ..	84
Figura 22 – Espectros de absorção por FTIR do óleo de copaíba antes e após aquecimento a 85 °C (a), dos componentes das formulações (b) e das formulações de nanocarreadores contendo ou não OC (c). .....	86
Figura 23 – Difratoograma do Capmul® e das amostras de CLN-branco e CLN-OC após liofilização.....	88
Figura 24 – Avaliação da estabilidade dos CLN-OC ao longo de 90 dias, em relação ao diâmetro (A), IP (B), potencial zeta (C) e pH (D), armazenados à 8 °C.....	91

## **CAPÍTULO 2 - MÉTODO DE BAIXO CUSTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA**

Figura 25 – Espectro de absorção no ultravioleta-visível entre a faixa de 200-400 nm do AS realizado em três diluentes diferentes e do CLN-branco no solvente com menor interferência em 310 nm (mistura de Et:AF). .....	108
Figura 26 – Resultados da linearidade. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos (B) do método desenvolvido para detecção de AS em concentrações de 5 a 30 µg/mL. ....	110

### **CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA**

Figura 27 – Representação esquemática das soluções poliméricas de PEO contendo CLN-OC. .....	124
Figura 28 – Representação esquemática do preparo das nanofibras por eletrofiação. ....	125
Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura dos ensaios 1 (a), 2(b), 3(c), 4(d), 5(e), 6(f), 7(g), 8(h) e 9(i) realizados nos testes preliminares.....	132
Figura 30 – Morfologia das nanofibras eletrofiadas a partir das soluções estabelecidas dos ensaios 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f) e 7 (g) do planejamento fatorial. ....	134
Figura 31 - Diagramas de Pareto das variáveis resposta: média (a) e DP (b) do diâmetro das nanofibras, obtido a partir das variáveis de entrada: PEO, CLN-OC/PEO e interação entre as mesmas. ....	138
Figura 32 - Superfícies respostas das variáveis resposta média (a) e DP (b) diâmetro médio das nanofibras em função do percentual de PEO e CLN-OC/PEO.....	139
Figura 33 - Otimização das condições de processo para a produção de nanofibras eletrofiadas em função das variáveis de entrada, variáveis respostas previstas e perfil de desejabilidade. .....	141
Figura 34 - Morfologia da nanofibra otimizada de PEO, sendo (a) contendo CLN-OC e (b) PEO puro. ....	143
Figura 35 - Espectros de absorção por FTIR das nanofibras de PEO contendo ou não CLN-OC.....	145
Figura 36 - Análise termogravimétrica (TGA) das nanofibras.....	146

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Principais compostos químicos do oleorresina da <i>C. Officinalis</i> e suas atividades biológicas.....	31
Tabela 2 - Principais parâmetros que influenciam no processo de eletrofiação, seus efeitos e relevância.....	41
Tabela 3 - Resumo das características dos projetos de triagem e otimização: número de experimentos, níveis e fatores. ....	49

### CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA

Tabela 4 – Planejamento experimental da composição das formulações de nanocarreadores lipídicos contendo OC, foi utilizado o DCCR 2 <sup>3</sup> , com o total de 20 experimentos, incluindo 6 repetições do ponto central. ....	68
Tabela 5 – Matriz do DCCR contendo as variáveis independentes codificadas e reais ( $X_1$ = total de lípidos, $X_2$ = proporção de óleo, $X_3$ = total de tensoativo), os valores de tamanho e IP obtidos como variáveis respostas. ....	74
Tabela 6 – Resultados dos coeficientes de regressão da equação ajustada e da ANOVA para as variáveis resposta: tamanho, IP e PZ.....	76
Tabela 7 – Validação experimental das condições otimizadas (total de lípidos=1,5%, proporção de óleo=41,7% e total de tensoativos = 4,6%) para a produção de CLN-OC.....	82
Tabela 8 – Caracterização das suspensões de formulações otimizadas de nanocarreadores lipídicos contendo ou não óleo de copaíba. ....	83
Tabela 9 – Parâmetros de cor CIE-Lab para os nanocarreadores lipídicos. ....	89
Tabela 10- Conteúdo de umidade e atividade de água. ....	90

## **CAPÍTULO 2 - MÉTODO DE BAIXO CUSTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA**

Tabela 11 – Parâmetros avaliados no ensaio de robustez com suas condições nominais e alternativas. Os ensaios (s a z) foram realizados de acordo com a matriz de combinação fatorial.....	105
Tabela 12 – Parâmetros de linearidade e regressão.....	109
Tabela 13 - Exatidão, precisão intra-dia e inter-dias para quantificação do AS. ....	111
Tabela 14 – Efeitos dos parâmetros analíticos sobre a absorbância do método espectrofotométrico para a quantificação de AS. ....	112

## **CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA**

Tabela 15 - Testes preliminares para a produção de nanofibras a partir do PVP.....	122
Tabela 16 - Testes preliminares para a produção de nanofibras a partir do PVA.....	122
Tabela 17 - Testes preliminares para a produção de nanofibras a partir do PEO.....	123
Tabela 18 – Planejamento fatorial da composição das formulações das soluções poliméricas de PEO contendo CLN-OC. ....	123
Tabela 19 - Matriz do planejamento fatorial e valores do diâmetro e desvio padrão obtidos como variáveis respostas. ....	133
Tabela 20 – Resultados dos coeficientes de regressão da equação ajustada e da ANOVA para a média do diâmetro e o DP das nanofibras. ....	136
Tabela 21 - Validação experimental das condições otimizadas para a produção de nanofibras de PEO contendo CLN-OC. ....	142
Tabela 22 - Caracterização das nanofibras otimizadas.....	143

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Ácido salicílico
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-branco	Carreadores lipídicos nanoestruturados sem ácido salicílico
CLN-OC	Nanocarreador lipídico contendo óleo de copaíba
CLN-SA	Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ácido salicílico
CMA	<i>Critical Material Attributes</i>
CPP	<i>Critical Process Parameters</i>
CQA	<i>Critical Quality Attributes</i>
DCCR	Delineamento do composto central rotacional
DoE	Design de experimentos
DRX	Difração de Raio X
Et:AF	Mistura de etanol absoluto e ácido fosfórico
FA	Fase aquosa
FDA	Food and Drug Administration
FO	Fase oleosa
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano
IP	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NF	Nanofibras
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
OC	Óleo de copaíba
PEO	Poli (óxido de etileno)
PVA	Poli (álcool vinílico)
PVP	Poli (vinil pirrolidona)
PZ	Potencial zeta

QbD	<i>Quality by Design</i>
QTPP	<i>Quality Target Product Profile</i>
THF	Tetrahidrofurano
UV-Vis	Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
<b>1 ACNE VULGARIS.....</b>	<b>20</b>
<b>2 ÓLEO DE COPAÍBA.....</b>	<b>26</b>
<b>3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Nanopartículas lipídicas solidas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Nanopartículas lipídicas desenvolvidos para entrega de óleos bioativos.....</b>	<b>35</b>
<b>4 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELETROFIADAS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Nanofibras poliméricas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Eletrofiação.....</b>	<b>39</b>
<b>5 <i>QUALITY BY DESIGN</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Elementos do QbD farmacêutico.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2 Avaliação de risco.....</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Projeto de experimentos (DoE).....</b>	<b>48</b>
<b>5.3.1 <i>Desenho experimental</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3.2 <i>Função desejabilidade</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPITULO 1 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA.....</b>	<b>66</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
<b>2.1 Materiais.....</b>	<b>68</b>

<b>2.2 Delineamento experimental do preparo dos nanocarreadores lipídicos .....</b>	<b>68</b>
<b>2.3 Preparo dos nanocarreadores lipídicos.....</b>	<b>69</b>
<b>2.4 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão.....</b>	<b>70</b>
<b>2.5 Potencial Zeta.....</b>	<b>71</b>
<b>2.6 Secagem por liofilização.....</b>	<b>71</b>
<b>2.7 Caracterização da formulação otimizada.....</b>	<b>71</b>
<i>2.7.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....</i>	<i>71</i>
<i>2.7.2 Difração de raios X.....</i>	<i>72</i>
<i>2.7.3 Colorimetria.....</i>	<i>72</i>
<i>2.7.4 Conteúdo de umidade.....</i>	<i>72</i>
<i>2.7.5 Atividade de água.....</i>	<i>73</i>
<b>2.8 Estabilidade .....</b>	<b>84</b>
<b>2.9 Delineamento estatístico dos nanocarreadores lipídicos .....</b>	<b>73</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Influência dos parâmetros da formulação no tamanho, IP e PZ das nanopartículas.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.1 Efeito sobre o tamanho.....</b>	<b>78</b>
<b>3.1.2 Efeito sobre o IP e PZ.....</b>	<b>81</b>
<b>3.2 Otimização da CLN-OC através da função desejabilidade.....</b>	<b>81</b>
<b>3.3 Caracterização da CLN-OC otimizada.....</b>	<b>83</b>
<i>3.3.1 Caracterização físico-química.....</i>	<i>83</i>
<i>3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....</i>	<i>85</i>
<i>3.3.3 Difração de raios X.....</i>	<i>88</i>
<i>3.3.4 Colorimetria.....</i>	<i>90</i>
<i>3.3.5 Conteúdo de umidade e atividade de água.....</i>	<i>91</i>
<b>3.4 Estabilidade.....</b>	<b>91</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>



**CAPÍTULO 2 - MÉTODO DE BAIXO CUSTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
ÁCIDO SALICÍLICO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO..... 100**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>103</b>
<b>2.1 Materiais.....</b>	<b>103</b>
<b>2.2 Preparação das nanopartículas lipídicas.....</b>	<b>103</b>
<b>2.3 Interferência do diluente na quantificação do AS.....</b>	<b>103</b>
<b>2.4 Validação do método analítico.....</b>	<b>104</b>
<b>2.4.1 Seletividade.....</b>	<b>104</b>
<b>2.4.2 Linearidade.....</b>	<b>104</b>
<b>2.4.3 Limites de detecção e quantificação.....</b>	<b>105</b>
<b>2.4.4 Exatidão e precisão.....</b>	<b>105</b>
<b>2.4.5 Robustez.....</b>	<b>106</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>108</b>
<b>3.1 Seletividade.....</b>	<b>108</b>
<b>3.2 Linearidade.....</b>	<b>110</b>
<b>3.3 Limites de detecção e quantificação.....</b>	<b>111</b>
<b>3.4 Exatidão, precisão intra e inter-dias.....</b>	<b>112</b>
<b>3.5 Robustez .....</b>	<b>113</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>115</b>

**CAPITULO 3 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS  
LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA..... 119**

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>122</b>
<b>2.1 Materiais.....</b>	<b>122</b>
<b>2.2 Delineamento experimental do preparo das nanofibras.....</b>	<b>122</b>
<b>2.2.1 Testes preliminares.....</b>	<b>122</b>
<b>2.2.1.1 Eletrofiação com PVP.....</b>	<b>122</b>

2.2.1.2 Eletrofiação com PVA.....	123
2.2.1.3 Eletrofiação com PEO.....	123
2.2.2 Planejamento fatorial.....	124
2.3 Preparo das soluções poliméricas.....	125
2.4 Eletrofiação das nanofibras .....	126
2.5 Caracterizações da nanofibra otimizada.....	127
2.5.1 MEV.....	127
2.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> .....	127
2.5.4 Análise termogravimétrica.....	127
2.6 Delineamento estatístico das nanofibras.....	128
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>129</b>
3.1 Testes preliminares de eletrofiação das nanofibras.....	129
3.2 Influência dos parâmetros da solução polimérica no diâmetro médio das nanofibras.....	134
3.3 Efeito sobre a média e o DP do diâmetro das nanofibras.....	137
3.4 Otimização das nanofibras através da função desejabilidade.....	141
3.5 Caracterização da nanofibra otimizada.....	143
3.5.1 MEV.....	143
3.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> .....	145
3.5.3 Análise termogravimétrica.....	146
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>148</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>154</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tema central desta dissertação é a encapsulação de compostos bioativos como estratégia para aplicação tópica, mais especificamente para o tratamento da *Acnes Vulgaris*. Dentro desta área, pretendeu-se encapsular o óleo de copaíba de forma a obter nanopartículas lipídicas contendo compostos bioativos, bem como avaliar a influência da incorporação desses carreadores na morfologia de nanofibras eletrofiadas. Também foi realizado a validação analítica do método de quantificação por espectrofotometria UV-visível para quantificar ácido salicílico encapsulado em nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba.

A escolha deste tema baseou-se na importância do desenvolvimento de estratégias alternativas e/ou complementares para o tratamento tópico da acne, no interesse de oferecer melhor adesão ao paciente. São escassos os trabalhos na literatura sobre a adição de carreadores com bioativos encapsulados em nanofibras poliméricas, bem como a influência desses carreadores na estrutura das nanofibras eletrofiadas. Por estes motivos, espera-se obter resultados promissores e de relevância na área farmacológica.

Neste cenário, esta pesquisa envolveu um delineamento composto central rotacional para a produção e otimização dos nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba, um óleo vegetal rico em compostos anti-inflamatórios, antibacterianos e anestésicos. As técnicas de encapsulação promovem melhorias nas características tecnológicas dos óleos, sendo alternativas interessantes para a resolução das principais limitações em se aplicar esses compostos topicamente, que são a baixa solubilidade em água e biodisponibilidade. Uma vez que o óleo passa a estar incorporado no interior dos carreadores, sua biodisponibilidade é melhorada, bem como direcionando suas moléculas para locais específicos e controle de sua liberação (ALMEIDA, 2019; FALCÃO *et al.*, 2015).

Em seguida, foi estudado o desenvolvimento e otimização de nanofibras poliméricas contendo os nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba desenvolvidos anteriormente. Para isso foi utilizado um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>. As nanofibras poliméricas foram confeccionadas através do processo de eletrofiação, que, dentre as técnicas de produção de nanofibras, demonstra ser um método adequado para a produção escalonada de fibras contínuas. Propriedades como área superficial elevada, bioabsorbilidade e taxa de degradação, são atrativas para a utilização de nanofibras como sistemas de liberação de bioativos (DREYER, 2015; GONÇALVES, 2015; SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022).

O processo de nanoencapsulação oferece diversos benefícios ao bioativos encapsulado, visto que características como solubilidade e biodisponibilidade são promovidas.

A partir da nanoencapsulação, os compostos também se tornam mais estáveis, as aplicações se tornam mais direcionadas e eficientes, sendo necessárias quantidades menores e ideais de produtos ativos para obter efeitos satisfatórios, o que pode tornar o processo economicamente viável (CHOI, M. J.; KWAK, 2015; ESFAHANI *et al.*, 2019).

Estas perspectivas engrandecem o interesse na aplicação do óleo de copaíba como estratégia para o tratamento tópico da acne. O polióxido de etileno foi o material utilizado como matriz polimérica das nanofibras, pois possui propriedades que favorecem o processo de eletrofiação, bem como é muito explorado em aplicabilidades farmacológicas.

Para possibilitar melhor organização e experiência de leitura, este trabalho foi dividido em quatro etapas:

- Referencial teórico sobre os tópicos abordados na presente pesquisa.
- Capítulo 1: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas de óleo de copaíba.
- Capítulo 2: Validação analítica do método de quantificação por espectrofotometria UV-visível para quantificar ácido salicílico encapsulado em nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba.
- Capítulo 3: Desenvolvimento e caracterização de nanofibras eletrofiadas contendo nanopartículas lipídicas de óleo de copaíba.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanofibras poliméricas ativas contendo nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### **Parte 1: Produção e caracterização de nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba**

- Desenvolver nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba através do delineamento do composto central rotacional 2<sup>3</sup>.
- Avaliar a influência da variação dos componentes da matriz lipídica nas propriedades do nanocarreador.
- Otimizar as condições de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos.
- Caracterizar os nanocarreadores lipídicos.

#### **Parte 2: Validação analítica do método espectrofotométrico UV-visível**

- Desenvolver e validar um método espectrofotométrico de baixo custo para a determinação de ácido salicílico incorporado em nanocarreadores de óleo de copaíba de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação nacional e internacional.

#### **Parte 3: Produção e caracterização de nanofibras poliméricas contendo nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba**

- Determinar as condições preliminares para a produção das nanofibras poliméricas.
- Desenvolver nanofibras a partir poliméricas contendo os nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba otimizados através de um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.
- Avaliar a influência da variação dos parâmetros da solução polimérica na morfologia das nanofibras.
- Otimizar as condições de média e desvio padrão do diâmetro das nanofibras otimizadas.
- Caracterizar as nanofibras poliméricas otimizadas.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 ACNE VULGARIS

O tegumento humano, mais conhecido como pele, é um órgão vital que funciona como um invólucro corporal ligado à saúde da pessoa. Ele desempenha função estética, imunológica, de proteção química, física e biológica (DRÉNO *et al.*, 2018). A função da pele é proteger o corpo contra influências indesejadas do meio externo, além de evitar a perda de água, possuir funções imunológicas e sensoriais, regular a temperatura do corpo e sintetizar a vitamina D (SUNDBERG *et al.*, 2012).

A pele compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas de tecidos: superior (a epiderme); intermediária (derme ou cório); e profunda (hipoderme ou tecido celular subcutâneo). A epiderme é constituída por epitélio estratificado; A segunda camada tissular componente da pele, é a derme ou cório, que compreende denso estroma fibroelástico. A terceira, mais profunda, é a hipoderme, compõe-se de tecido adiposo (RIVITTI, 2014).

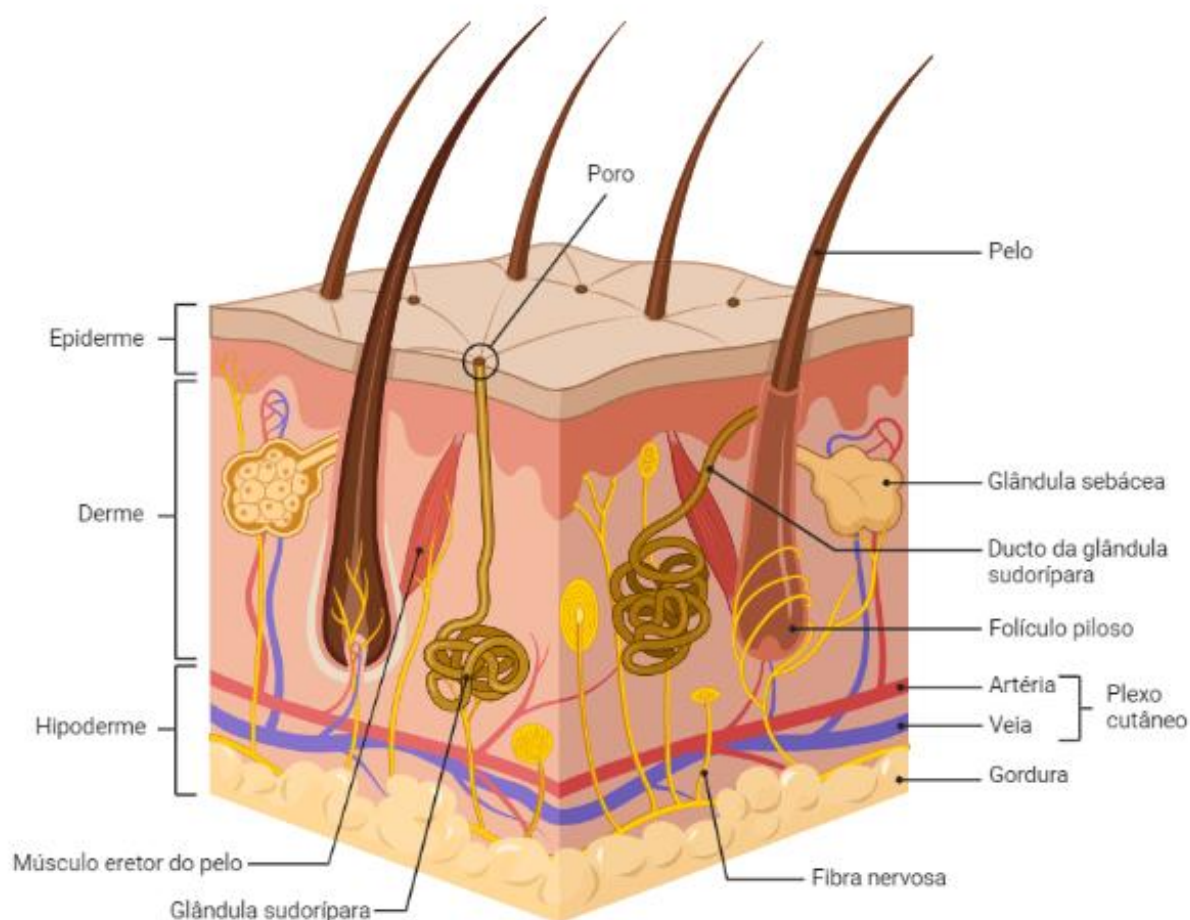
A epiderme (Figura 1) é uma camada em constante renovação, no qual uma perda de células da superfície do estrato córneo (descamação) é equilibrada pelo crescimento celular na epiderme inferior. Dessa forma, exibem várias características baseadas no seu grau de diferenciação. A mais imatura dessas células, chamada queratinócitos basais, formam o estrato basal e são ligados à derme por hemidesmossomas (SUNDBERG *et al.*, 2012).

A derme (Figura 1), a camada subjacente à epiderme, é uma região de tecido conjuntivo colagenoso denso e irregular que confere à pele sua resistência e fornece proteção estrutural para os músculos e órgãos esqueléticos subjacentes. É nesta camada que se situam os vasos sanguíneos, canais linfáticos e nervos sensoriais, bem como os órgãos anexiais da pele, as glândulas sebáceas, sudoríparas e os folículos pilosos (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; SUNDBERG *et al.*, 2012). O folículo piloso começa na superfície da epiderme e pode se estender até a derme para produção dos pelos terminais (YANG, C. C.; COTSARELIS, 2010). As glândulas sebáceas são um apêndice do folículo piloso, localizado acima da protuberância e do músculo eretor de pelo e logo abaixo do orifício da haste capilar na superfície da pele. O principal papel da glândula é gerar sebócitos terminalmente diferenciados, que produzem lipídios e sebo (BLANPAIN; FUCHS, 2006).

A hipoderme (Figura 1) é a terceira camada mais interna da pele composta por adipócitos. Estes são organizados em lóbulos de gordura, que são separados uns dos outros

por septos fibrosos. Essa camada conduz os principais feixes neurovasculares e linfáticos que suprem e drenam a pele e sua espessura varia de acordo com o estado nutricional do indivíduo (SUNDBERG *et al.*, 2012).

**Figura 1 – Exemplificação esquemática da pele, suas camadas (epiderme, derme e hipoderme) e seus anexos.**



Fonte: Autor. Baseado em LAWTON, 2019.

A acne vulgaris é a doença inflamatória cutânea que acomete nas unidades pilossebáceas da pele, incluindo pelo, folículos capilares, glândula sebácea. As características clínicas da acne incluem seborreia (excesso de sebo), lesões não inflamatórias (comedões abertos e fechados), lesões inflamatórias (pápulas e pústulas), e vários graus de cicatrizes (FEUILLOLAY *et al.*, 2016; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012).

Os vários fatores patogênicos responsabilizados pelo desenvolvimento da acne incluem hiperqueratinização da unidade pilossebáceas e produção indevida de sebo, descarga

de mediadores inflamatórios e infiltrados inflamatórios. *P. acnes*, e as demais bactérias iniciam a formação de ácido propiônico e acético, resultando assim no metabolismo dos triglicerídeos sebáceos em ácidos graxos. Isso resulta na irritação da parede folicular e derme circundante (HAN *et al.*, 2018). O produto da secreção das glândulas sebáceas, o sebo, constitui, com os lipídeos da queratinização, o filme lipídico da superfície cutânea. Esse complexo de lipídios é composto por triglicerídeo, diglicerídeos, ácidos graxos, ésteres, esqualeno e esteróis. No sebo recém-secretado, não existem ácidos graxos livres, os quais surgem intrafolicularmente por ação de lipases bacterianas (RIVITTI, 2014).

A acne pode ser categorizada em quatro estágios, leve, moderada, grave e cística. O primeiro estágio, a acne leve, é caracterizado pela presença de manchas de acne especificamente na zona T, e não em todo o rosto. Aparece na forma de pequenas manchas conhecidas como comedões abertos. Essas manchas ocorrem quando parte dos poros entupidos são esticados e abertos para o meio externo, e por isso sofrem oxidação da melanina produzindo pequenas manchas pretas conhecidas como “cravos” ou “comedões abertos”. O estágio dois é a acne moderada, que mostra a presença de manchas de acne em todo o rosto, em vez de se limitar apenas à zona T. Ao contrário do estágio um, a acne moderada se apresenta com manchas vermelhas inflamadas, conhecidas como espinhas “comedões fechados” em que os poros obstruídos são totalmente bloqueados sem partes expostas ao meio ambiente e, portanto, apresentam leve inchaço, inflamação e vermelhidão. Ocasionalmente, podem ocorrer pápulas e pústulas. As pápulas são protuberâncias vermelhas presentes na superfície da pele e podem até chegar mais perto da derme, mas não têm fluidos no interior, ao contrário das pústulas que são protuberâncias vermelhas com fluidos brancos devido ao acúmulo de glóbulos brancos e detritos da pele. O estágio três é a acne grave, que ocorre quando a acne se espalha para áreas maiores da pele, resultando em mais inflamação, vermelhidão e inchaço, o que permite a fusão das manchas, resultando em uma grande área infectada, em vez de apenas um único poro. e isso pode levar a cicatrizes posteriores. O estágio quatro é a acne cística, que aparece na forma de cistos ou nódulos. Os cistos são protuberâncias dolorosas na superfície da pele e podem até atingir cinco mm de profundidade na derme da pele, enquanto os nódulos são protuberâncias dolorosas, mas sem pus ou quaisquer outros fluidos. Essa fase é considerada a pior e pode durar meses, anos ou até a vida inteira (AMER *et al.*, 2019; VYAS; SONKER; GIDWANI, 2014; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012).

O tratamento da acne visa controlar e tratar as lesões de existentes, prevenir cicatrizes permanentes tanto quanto possível, limitar a duração do distúrbio e minimizar a morbidade. A



escolha do tratamento ocorre de acordo com certos critérios, como o grau das lesões da acne, a rota preferível de administração e a condição médica do paciente (FOX *et al.*, 2016). As opções terapêuticas para o tratamento envolvem principalmente retinóides, antibióticos e terapia hormonal, cada um atuando contra a doença por mecanismos específicos (CHARNY; CHOI; JAMES, 2017). Existem tratamentos orais e tópicos, onde a terapia sistêmica é aplicada para tratar casos graves e moderados, enquanto o tratamento tópico é a primeira escolha na acne leve e moderada (JAIN *et al.*, 2014).

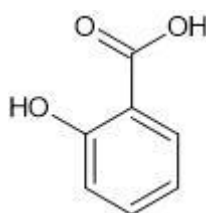
O tratamento sistêmico é frequentemente indicado quando as manchas de acne são resistentes à terapia tópica, ou se houver lesões inflamatórias óbvias ou formação de cicatriz. O inconveniente mais proeminente que surge da terapia sistêmica são os efeitos adversos que ocorrem devido à distribuição das drogas a órgãos indesejáveis. Os efeitos adversos variam desde anormalidades gastrointestinais como diarreia, síndrome inflamatória intestinal, tontura e deposição de pigmentos na pele. Os agentes químicos mais utilizados para o este tratamento são os retinóides, como a isotretinoína, os antibióticos, como a eritromicina e agentes hormonais. As desvantagens do uso sistêmico de retinóides são sua teratogenicidade, além de outros efeitos como diminuição da visão noturna, dor de cabeça e diarreia. Eles também produzem ressecamento da pele, descamação e eritema (FOX *et al.*, 2016; VYAS; SONKER; GIDWANI, 2014). A isotretinoína mostrou-se eficaz no tratamento da acne, no entanto, causa muitos efeitos adversos indesejados, variando desde o ressecamento da pele sendo o mais comum, até a diminuição do apetite, alterações de humor e dores de cabeça. O uso de antibióticos é considerado outro método de tratamento eficaz; no entanto, eles mostram alguns efeitos adversos, como o desenvolvimento de resistência bacteriana que está aumentando dramaticamente ao longo do tempo. (AMER *et al.*, 2019; FOX *et al.*, 2016; VALLERAND *et al.*, 2018).

A terapia tópica é considerada um dos métodos mais seguros e fáceis para o tratamento da acne. Tem muitos prós, um deles é a sua aplicação direta sobre a lesão e, portanto, intensifica a exposição da glândula pilosebácea ao tratamento. Por ser considerado não invasivo, alcança uma alta adesão do paciente. Bem como, diminui a absorção sistêmica, minimizando os efeitos colaterais dos medicamentos. Por outro lado, a terapia tópica pode causar irritação ocasional da pele e vermelhidão quando combinada com retinóides, por exemplo. A terapia tópica funciona principalmente acumulando no interior do folículo piloso da pele exibindo ações anti-inflamatórias e antibacterianas (AMER *et al.*, 2019; FOX *et al.*, 2016).

Além dos agentes químicos, a busca por medicamentos e medidas cosméticas para curar a acne tornou-se uma importante área de pesquisa. A terapia complementar é considerada a mais nova tendência no tratamento da acne e é um campo promissor para o tratamento a longo prazo de muitas outras doenças. Utiliza plantas derivadas de origem botânica, que possuem princípios ativos e, portanto, apresentam diferentes ações como diminuir a produção de sebo, exercer ação anti-inflamatória e reduzir a hiperqueratinização da pele. Esses fitoterápicos podem reduzir os efeitos adversos e apresentarem ações anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo assim, possíveis alternativas no tratamento da acne (AMER *et al.*, 2019).

O ácido salicílico (AS) é tipicamente utilizado em administrações epidérmicas, devido a suas propriedades queratolítica, bacteriostáticas, fungicidas e fotoprotetoras. Sendo um salicilato, também possui propriedades anti-inflamatórias. O AS pode ser obtido de fontes naturais como casca de salgueiro, bétula doce e folhas de gaultéria ou sintetizado artificialmente. Sua classificação como ácido aromático fenólico está relacionada aos grupos carboxila (-COOH) e hidroxila (-OH) diretamente ligados a um anel benzênico aromático presentes em sua estrutura molecular (Figura 2) (ARIF, 2015).

**Figura 2 - Estrutura molecular do ácido salicílico.**



Fonte: Autor.

O *peeling* do ácido salicílico é empregado no tratamento da acne vulgaris, devido ao seu efeito comedolítico e seboestático, provocando assim uma descamação da camada superior das camadas lipídicas do estrato córneo, devido a sua capacidade de dissolver o cimento intercelular. Em virtude de sua lipofilicidade, apresenta melhor penetração na unidade pilosebácea; ademais, as camadas mais externas da pele possuem grandes concentrações lipídicas permitindo que o ácido salicílico aja e promova remoção de células mortas. O efeito de *peeling* ácido pirúvico a 50% e AS a 30% foi estudado no filme lipídico da pele em pacientes com acne vulgar. O AS teve um efeito sebômetro maior do que o ácido pirúvico,

diminuindo a adesão de corneócitos e causando o afrouxamento das células e seu subsequente desprendimento. Sendo um agente lipofílico, o AS remove os lipídios intercelulares, que estão ligados covalentemente ao envelope cornificado que envolve as células epiteliais superficiais. Esse efeito anti-hiperplásico do AS na epiderme tem sido usado por muitos dermatologistas no *peeling* químico da pele (ARIF, 2015; MARCZYK *et al.*, 2014). As complicações do uso tópico do AS vão de leves a fortes irritações na pele, que incluem eritema, bem como secura e sensação de queimação (OLIVEIRA; PEREIRA; CERRI, 2021). Essas adversidades podem ser contornadas utilizando sistemas carreadores, como lipossomas, microemulsão, hidrogel e nanopartículas lipídicas. Portanto, o encapsulamento do AS em mecanismos de liberação prolongada pode ser uma abordagem potencial para minimizar seus efeitos colaterais e reduzir a frequência de aplicação, oferecendo assim melhor adesão do paciente (DATE; NAIK; NAGARSENKER, 2005; WOO *et al.*, 2014).

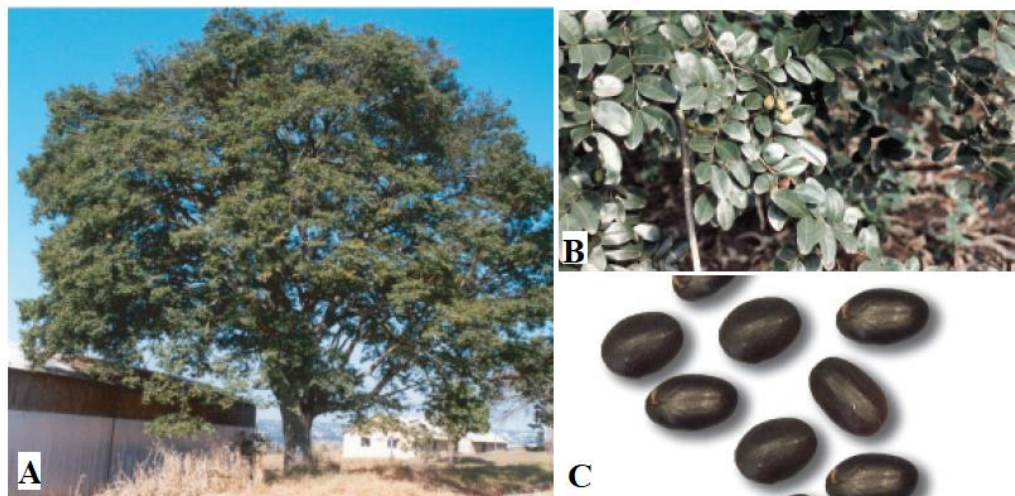
## 2 ÓLEO DE COPAÍBA

O Brasil, em seu extenso território e variados biomas, apresenta grande diversidade de solos e climas que favorece a variedade de vegetação, distribuídas nos diversos ecossistemas brasileiros (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Essa biodiversidade é vista como fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental, tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos. Entre as inúmeras espécies vegetais da flora brasileira que apresentam substâncias químicas biologicamente ativas, o gênero *Copaifera*, da família *Fabaceae* se destaca por produzir um oleorresina que se caracteriza pela presença de uma importante classe de metabólitos que são os terpenos, responsáveis por diversas atividades terapêuticas (VEIGA; PINTO, 2002).

O gênero *Copaifera* foi descrito pela primeira vez por Marcgraf e Piso em 1638, que empregaram o nome “Copaíba” sem designar a espécie. Em 1760, Nicolaus Joseph Von Jacquin descreveu a espécie *Copaiva Officinalis* na obra *Enumeratio Systematica Plantarum*. Posteriormente, no ano de 1764, Carl von Linnaeus fez um estudo mais detalhado do gênero na obra *Species Plantarum*, na qual descreveu a espécie-tipo *Copaifera Officinalis* (Jacq.) L. (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). A origem do nome da copaibeira veio da língua indígena “tupi”: elas foram chamadas de “cupa-yba”, significando a árvore do reservatório/depósito, por causa do tronco contendo oleorresina (ARRUDA *et al.*, 2019). No Brasil, são conhecidas e descritas por diversos nomes: copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva, copaibarana, copaibo, copal, marimari e bálsamo dos jesuítas; já seu óleo resinoso é chamado de óleo de copaíba ou bálsamo (VEIGA; PINTO, 2002).

A árvore de copaíba (Figura 3) possui 72 espécies e é comumente encontrada na América Latina e África Ocidental (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). O Brasil possui cerca de 16 espécies de copaibeiras, sendo localizadas regiões nortes, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul (COSTA, 2020). Tais plantas, apesar de possuírem crescimento lento, podem viver por 400 anos e alcançarem a altura de até 40 metros. Seu tronco varia o diâmetro entre 0,4 e 4 metros, apresenta casca marrom escura com superfície áspera e aromática. Possui folhagem densa, flores pequenas, frutos secos e sementes são pretas e ovoides com um arilo amarelo rico em lipídeos. Essas árvores são importantes fontes de oleorresina e madeira (ARRUDA *et al.*, 2019; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

**Figura 3 – Copaiabeira - (A) Árvore, (B) Folhas e frutos, (C) Sementes.**



Fonte: CARVALHO, 2003. Adaptado.

O óleo de copaíba provém de canais esquizolizígeos, que são secretores, localizados em todas as partes da árvore. A técnica de extração mais utilizada atualmente é considerada sustentável por garantir a conservação da árvore *Copaifera*. A técnica consiste na perfuração do tronco com um trado de aproximadamente 2 metros de distância em dois furos. O primeiro furo deve ser feito 1 metro acima da base da planta e o segundo de 1 a 1,5 metros acima do primeiro. Insere-se então um cano de  $\frac{3}{4}$  de polegada nos orifícios (Figura 4), por onde o óleo escoar, e posteriormente é reservado. Após a finalização da extração, o orifício é vedado com argila ou uma tampa de plástico, para proteção contra fungos e cupins. Ambas as vedações são de fácil retirada para posteriores colheitas de óleo com maior facilidade de manipulação (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

**Figura 4 – Extração do óleo de copaíba.**



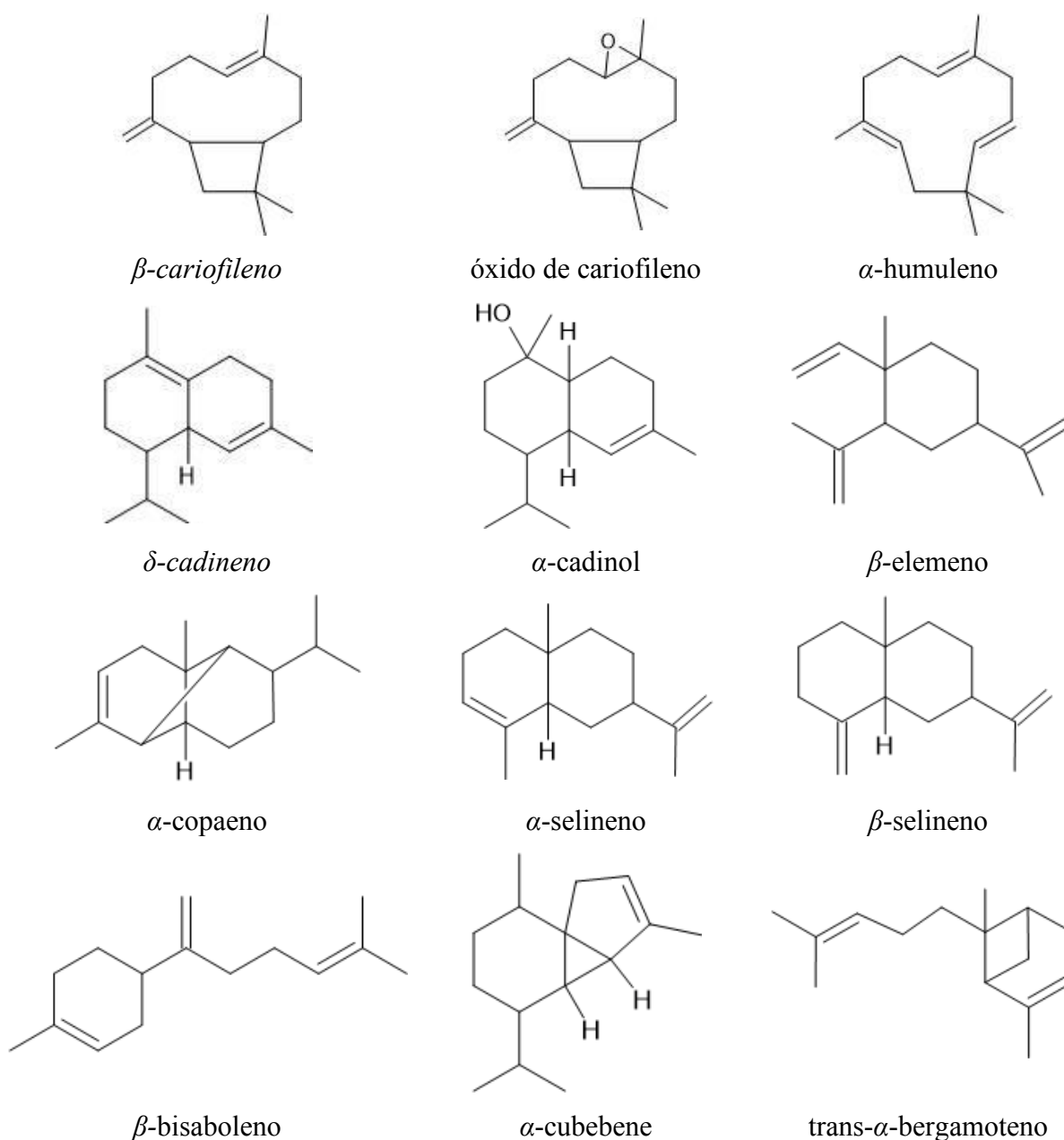
Fonte: PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009.

O oleorresina da copaíba (OC) é um líquido transparente que apresenta coloração que varia de amarelo claro ao marrom, e aspecto viscoso e fluido. Uma árvore adulta produz, anualmente, cerca de 40 a 50 litros de oleorresina, sendo este considerado de baixa toxicidade; seu odor característico deve-se aos compostos sesquiterpenos (LEANDRO *et al.*, 2012; LIMA; LIMA, 2012; TOBOUTI *et al.*, 2017; VEIGA; PINTO, 2002). Sua composição é formada por uma parte resinosa não volátil diluída no óleo essencial. O óleo essencial é composto por sesquiterpenos oxigenados e por hidrocarbonetos sesquiterpênicos, totalizando certa de 90 % do OC. A parte resinosa não volátil é composta por ácidos diterpênicos que estão presentes em menores concentrações (DIAS *et al.*, 2012; CARVALHO; TERESINHA MILKE, 2014; SACHETTI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011). Entretanto, a composição do OC pode variar de acordo com as espécies das árvores, além da época da colheita, das características geográficas e climáticas em que estas se encontram (SACHETTI *et al.*, 2011).

Dentre os 237 compostos químicos encontrados em espécies de *Copaifera* (ARRUDA *et al.*, 2019), os principais sesquiterpenos são:  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$  – e  $\beta$ -selineno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno, *trans*- $\alpha$ -bergamoteno e  $\beta$ -bisaboleno (Figura 5). Já os diterpenos mais comumente encontrados são

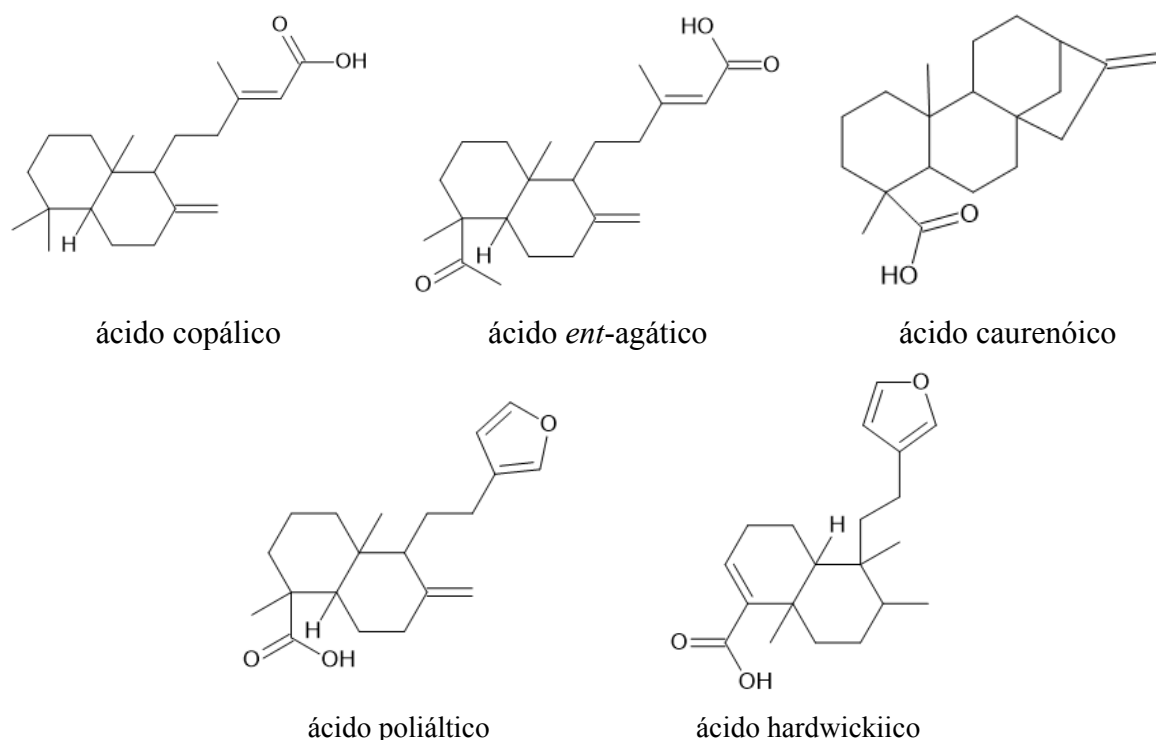
os ácidos copálico, poliáltico, hardwickiico, caurenóico e ent-caurenóico, juntamente com seus derivados 3-hidroxi-copálico, 3-acetoxi-copálico e ent-agático (Figura 6). Por serem os principais componentes, muitas das atividades farmacológicas das oleorresinas de copaíba são atribuídas aos principais sesquiterpenos da oleorresina. No entanto, o efeito farmacológico da oleorresina, não pode ser atribuído a apenas um constituinte, pois os constituintes presentes na oleorresina podem interagir sinergicamente na promoção da atividade observada (LEANDRO et al., 2012).

**Figura 5 – Estrutura molecular dos principais sesquiterpenos detectados na oleorresina de copaíba.**



Fonte: Autor, baseado em LEANDRO et al., 2012.

**Figura 6 – Estrutura molecular dos principais diterpenos detectados na oleorresina de copaíba.**



Fonte: Autor, baseado em LEANDRO et al., 2012.

O OC é utilizado para fins medicinais desde o século XVI, empregado pelos povos da Amazônia para uso tópico ou por ingestão para o tratamento de enfermidades tais como, feridas, queimaduras, inflamações, cistites, bronquites, diarreias crônicas, reumatismo e psoríase. As principais espécies utilizadas para fins medicinais são: a *Copaifera langsdorffii*, encontrada principalmente nos cerrados do Brasil Central, a *Copaifera reticulata* da região amazônica, e *Copaifera officinalis*, que ocorre amplamente na América do Sul, incluindo a Amazônia (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Suas propriedades farmacológicas são geralmente atribuídas aos sesquiterpenos e diterpenos da oleorresina (ARRUDA et al., 2019).

A oleorresina da *C. officinalis* apresentam diversas atividades biológicas tais como antibacteriana (GUIMARÃES et al., 2016; MORGUETTE et al., 2019; PIERI, F. A. et al., 2010; PIERI, FÁBIO ALESSANDRO et al., 2012; SANTOS, A. O. et al., 2008; SANTOS, R. C. V. et al., 2012; SILVA et al., 2019), antifúngica (SANTOS, A. O. et al., 2008), cicatrizante (GUIMARÃES et al., 2016), antimicrobiana (SILVA et al., 2019) e antinociceptiva (DALENOGARE et al., 2019). De acordo com ARRUDA et al., 2019, a OC da *C. officinalis* é composta por 10 diterpenos e 38 sesquiterpenos, a Tabela 1 apresenta os



principais sesquiterpenos e diterpenos responsáveis, individualmente ou em conjunto, por estas atividades biológicas citadas.

**Tabela 1 - Principais compostos químicos do oleorresina da *C. Officinalis* e suas atividades biológicas.**

<b>Sesquiterpenos</b>		
<b>Composição Química</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>
$\beta$ -cariofileno	Antimicrobiana, anestésica local e anti-inflamatória	(CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010; CHENG, S. S. <i>et al.</i> , 2004; GHELARDINI <i>et al.</i> , 2001; GOREN <i>et al.</i> , 2011; TUNG <i>et al.</i> , 2008)
$\alpha$ -humuleno + $\beta$ -cariofileno	Anti-inflamatória	(FERNANDES <i>et al.</i> , 2007; ROGERIO <i>et al.</i> , 2009)
$\delta$ -cadineno	Antibacteriano ( <i>P. acnes</i> )	(KUBO; MUROI; HIMEJIMA, 1992)
$\alpha$ -cadinol	Antifúngica	(CHENG, S. S. <i>et al.</i> , 2004)
<b>Diterpenos</b>		
<b>Composição Química</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>
Ácido copálico	Antibacteriano	(TINCUSI <i>et al.</i> , 2002)
Ácido hardwickiico	Antibacteriano	(KUETE <i>et al.</i> , 2007; MCCHESENEY; CLARK; SILVEIRA, 1991)
Ácido caurenóico	Anti-inflamatório e antibacteriano	(PAIVA <i>et al.</i> , 2003; TINCUSI <i>et al.</i> , 2002)

Fonte: Autor.

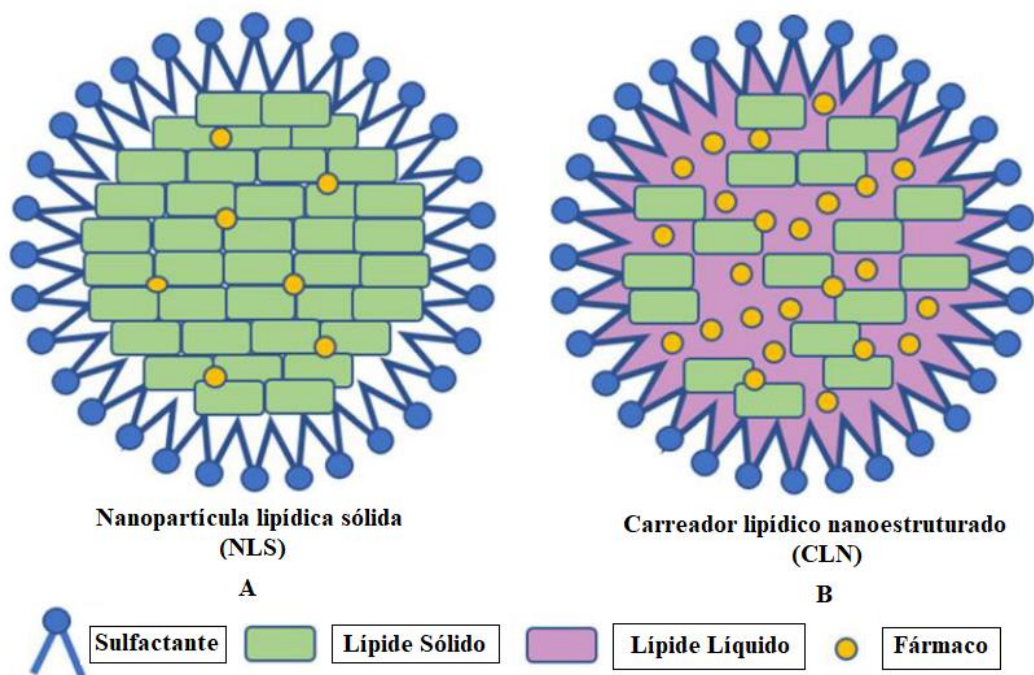
O OC pode ser usado puro ou como componente na preparação de produtos terapêuticos e cosméticos. Como relatado, esse óleo é capaz de agregar diversas atividades biológicas ao produto, além disso de possuir baixa toxicidade (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Diante do exposto, acredita-se que o OC possa ser efetivo no tratamento da acne leve a moderada, garantindo atividades essenciais como a anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante ao produto final no qual o OC será incorporado.

### 3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

As nanopartículas lipídicas com matriz sólida foram desenvolvidas na década 1990 como um sistema de alternativo para a lipossomas, emulsões e outros nanossistemas (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Dois tipos de nanopartículas lipídicas com matriz sólida têm sido utilizados para carreamento de fármacos pouco solúveis em água, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (Figura 7). Essas partículas podem ser amplamente aplicadas para liberação de fármacos por meio de diversas vias, no entanto o uso cutâneo tem sido um dos mais promissores, para fins terapêuticos e cosméticos. (CORRIAS; LAI, 2011; DAS; NG; TAN, 2012; GARCÊS *et al.*, 2018).

A classificação da NLS e do CLN são de acordo com sua estrutura interna. NLS foram desenvolvidos inicialmente e são compostos apenas por lipídios sólidos, enquanto os CLN constituem uma atualização do NLS e são compostos por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, apesar do lipídio sólido estar em maior quantidade para formar a nanopartícula (GARCÊS *et al.*, 2018).

**Figura 7 – Estrutura da matriz lipídica das nanopartículas lipídicas sólidas e dos carreadores lipídicos nanoestruturados.**



Fonte: SUBRAMANIAM; SIDDIK; NAGOOR, 2020. Adaptado.

### 3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas são compostas por lipídios que são sólidos à temperatura ambiente com uma cobertura superficial de surfactante para estabilizá-los como uma nanodispersão (Figura 7-A) (NASTITI *et al.*, 2017). Em comparação com outros sistemas particulados, as NLS possuem muitas vantagens como a viabilidade de liberação controlada e sustentada do fármaco, aumento da estabilidade físico-química de fármaco incorporado e capacidade de entrega de fármacos hidrófilos e lipófilos. Bem como a alta eficiência de aprisionamento, baixa toxicidade e facilidade de produção em larga escala (GHASEMIYEH *et al.*, 2019).

No entanto as NLS possuem algumas limitações. As estruturas cristalinas formadas a partir das NLS se apresentam com tamanha perfeição que acabam limitando o seu espaço para a incorporação de princípios ativos. Transições polimórficas do lipídio podem ocorrer com o tempo e, em escala nanométrica, o comportamento de cristalização é diferente conforme redução da temperatura (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Isso ocorre durante a produção e armazenamento das NLS. Na produção, os lipídeos cristalizam em forma instáveis de maior energia ( $\alpha$  ou  $\beta'$ ), com isso, são formadas imperfeições na matriz lipídica que permitem a acomodação das moléculas do insumo farmacêutico ativo. No entanto, durante o período de armazenamento, esses lipídios podem se transformar em modificações de baixa energia ( $\beta$ ), formando uma rede cristalina altamente organizada, que permite espaço muito pequeno para as moléculas do fármaco. Assim a quantidade de fármaco encapsulado e o perfil de liberação podem alterar durante o armazenamento (DAS; NG; TAN, 2012; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b, a).

### 3.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados

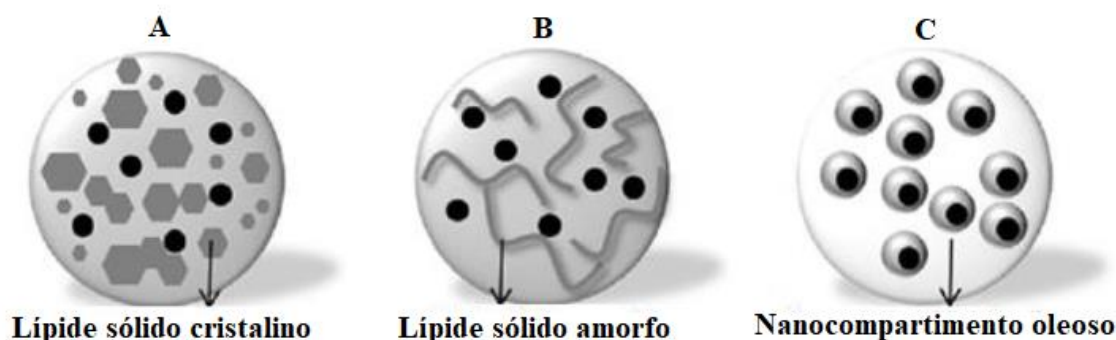
No processo de melhoria e redução dessas desvantagens das NLSs, os CLNs evoluíram como alternativa de sistemas transportadores de fármacos. Os CLNs são sistemas coloides compostos por uma fase lipídica fluida embutida em uma matriz lipídica sólida ou localizada na superfície de plaquetas sólidas e na camada de surfactante (

Figura 7-B). A estrutura espacial dos lipídios permite maior carga do fármaco e melhor estabilidade em relação ao NLS (NASTITI *et al.*, 2017). A presença de lipídios líquidos resulta em uma estrutura cristalina imperfeita, minimizando assim a expulsão do fármaco

durante o armazenamento. O perfil de liberação de ativo pode ser facilmente modulado variando a composição da matriz lipídica (DAS; NG; TAN, 2012).

Dependendo do método de produção e da composição da mistura lipídica, são obtidos diferentes tipos de CLNs: tipo imperfeito, amorfo e múltiplo. No tipo imperfeito (Figura 8-A), a cristalização lipídica é alterada pela adição de pequenas quantidades de óleos. Isso causa diferenças nas estruturas dos lípides tornam a matriz imperfeita e desordenada, oferecendo espaços para acomodar as moléculas de fármacos. No tipo amorfo (Figura 8-B), a matriz lipídica é sólida, mas não cristalina (estado amorfo). Isso pode ser obtido com concentrações ainda maiores de óleo, onde se forma uma lacuna de miscibilidade dos dois lípidios (lípidio sólido e líquido). No tipo múltiplo (Figura 8-C), a matriz lipídica sólida contém minúsculos compartimentos de óleo: eles são obtidos pela mistura de um lípidio sólido com uma alta concentração de óleo. A ideia básica é que ao dar uma certa nanoestrutura ao lípidio matriz, a carga útil para compostos ativos é aumentada e a expulsão do composto durante o armazenamento é evitada. O processo de produção de CLNs pode ser modificado para produzir dispersões de partículas lipídicas com teores de sólidos de 30 a 80% (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; BELOQUI *et al.*, 2017; RADTKE; SOUTO; MÜLLER, 2005).

**Figura 8 – Classificação dos CLNs de acordo com variações na sua matriz lipídica.**



Fonte: BELOQUI *et al.*, 2017. Adaptado. CLNs = carreadores lipídicos nanoestruturados.

As aplicações tópicas dos CLNs, entre outros sistemas nanocarreadores, são as mais estudadas, e as razões para a ausência de produtos comerciais estão relacionadas com a complexidade das questões regulatórias que devem ser abordadas antes que os medicamentos cheguem às clínicas (GARCÊS *et al.*, 2018). Idealmente, os nanocarreadores devem permitir o transporte de fármacos encapsulados ou adsorvidos na pele sem danificar a função de barreira natural, se deformando, ou utilizando promotores de permeação cutânea. Assim, podem facilitar o fornecimento de agentes ativos por meio das estruturas da pele, interagir

com os lipídios para mediar o transporte e permitir a criação de depósitos de fármacos na pele para uma liberação sustentada ou induzida por estímulos (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018).

Uso cutâneo de nanopartículas lipídicas apresenta certas vantagens, como a proteção química das substâncias incorporadas, permitindo a aplicação na pele de moléculas que são difíceis transportar em formulações semissólidas tradicionais; melhora da biodisponibilidade do fármaco, relacionada à possibilidade de modular a liberação de moléculas, promovendo sua penetração e retenção na pele. Essas propriedades estão relacionadas à composição lipídica fisiológica dos CLNs, que pode interagir com o estrato córneo, criando seu rearranjo lipídico, que facilita a penetração das moléculas. Além disso, o pequeno tamanho das nanopartículas também contribui para aumentar sua adesividade e área de superfície de contato, promovendo um fluxo do fármaco através da pele. (BELOQUI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2018; SALA *et al.*, 2018).

### **3.3 Nanopartículas lipídicas desenvolvidos para entrega de óleos bioativos**

Os óleos vegetais possuem características singulares que dependem da fonte e da forma que são obtidos. Muitos dos ácidos graxos e outros compostos presentes nos óleos vegetais são conhecidos há muito tempo por beneficiar nossa saúde. Estudos experimentais destacaram benefícios biológicos desses óleos, como atividade anti-inflamatória (HSU; PARTHASARATHY, 2017), analgésico e antipirético (INTAHPHUAK; KHONSUNG; PANTHONG, 2010), hipolipidêmico (ALI; EL-ANANY, 2017), antibacteriano (TABASSUM; VIDYASAGAR, 2014), antifúngico (SVETLICHNY *et al.*, 2015), antioxidante (KRAMBECK *et al.*, 2020), antiviral (ORHAN; ÖZÇELIK; ŞENER, 2011), propriedades hepatoprotetoras e gastroprotetoras (CHENG; LU; YEN, 2015).

No campo farmacêutico, os óleos vegetais entraram na composição de muitas formas farmacêuticas das diversas vias de administração (ASBAHANI *et al.*, 2015). Apesar disso, as preparações à base de óleos vegetais apresentam algumas restrições como baixa solubilidade em fluidos biológicos, baixa permeação e baixa biodisponibilidade devido à sua possível oxidação (MÁRQUEZ-RUIZ; GARCÍA-MARTÍNEZ; HOLGADO, 2008). Por exemplo, a aplicação tópica de OV pode resultar em reação alérgica significativa e choque anafilático, que por sua vez pode ser fatal (DIBA; STATHAM, 2003). Alguns óleos como os extraídos de cominho, bergamota, verbena e limão podem causar fotossensibilidade e induzir vermelhidão, coceira, queimaduras, hiperpigmentação, alterações pigmentares ou dermatite berloque

(ZAMMIT, 2010). Portanto, a nanocapsulação tem sido considerada uma chave para superar as limitações mencionadas.

Nos últimos anos, CLNs foram amplamente utilizadas para encapsulamento de óleos vegetais. Uma vez que os óleos são em sua maioria lipofílicos, eles apresentam uma boa miscibilidade com os lípidos sólidos na matriz lipídica, resultando em alta quantidade de óleo que pode ser aprisionada (FALCÃO *et al.*, 2015). Esses carreadores protegem os componentes lábeis e sensíveis do óleo da degradação química, fotoquímica ou oxidativa, devido à imobilização por lípidos sólidos. Outra característica pretendida pelo uso de CLNs como transportador de óleos vegetais é fornecer um padrão de liberação controlada (LAMMARI *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2020).

O óleo de copaíba é um exemplo de óleos vegetais muito conhecido na medicina como agente cicatrizante, anti-inflamatório, antinociceptivo, antimicrobiano entre outros (ARRUDA *et al.*, 2019). No entanto, pouco explorado para aplicação tópica, ou mais especificamente, para o tratamento da acne vulgaris. A nanocapsulação tem sido considerada uma alternativa para superar as limitações dos óleos vegetais. Além de melhorar a biodisponibilidade do óleo ativo, direcionando suas moléculas para locais específicos e controlando sua liberação. SVETLICHNY *et al.* (2015) foram um dos poucos estudos que encapsularam OC em NLS. O objetivo deste trabalho foi desenvolver NLS contendo óleo de copaíba com e sem alantoína e avaliar sua atividade antifúngica. Em resumo, as análises de nanopartículas demonstraram que ambas as suspensões tinham perfis homogêneos e propriedades físico-químicas estáveis. Bem como suscetibilidade antifúngica diante de todas as cepas testadas. Por fim, a nanoencapsulação melhorou a atividade antifúngica do óleo de copaíba, que foi potencializada pela presença de alantoína.

## 4 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELETROFIADAS

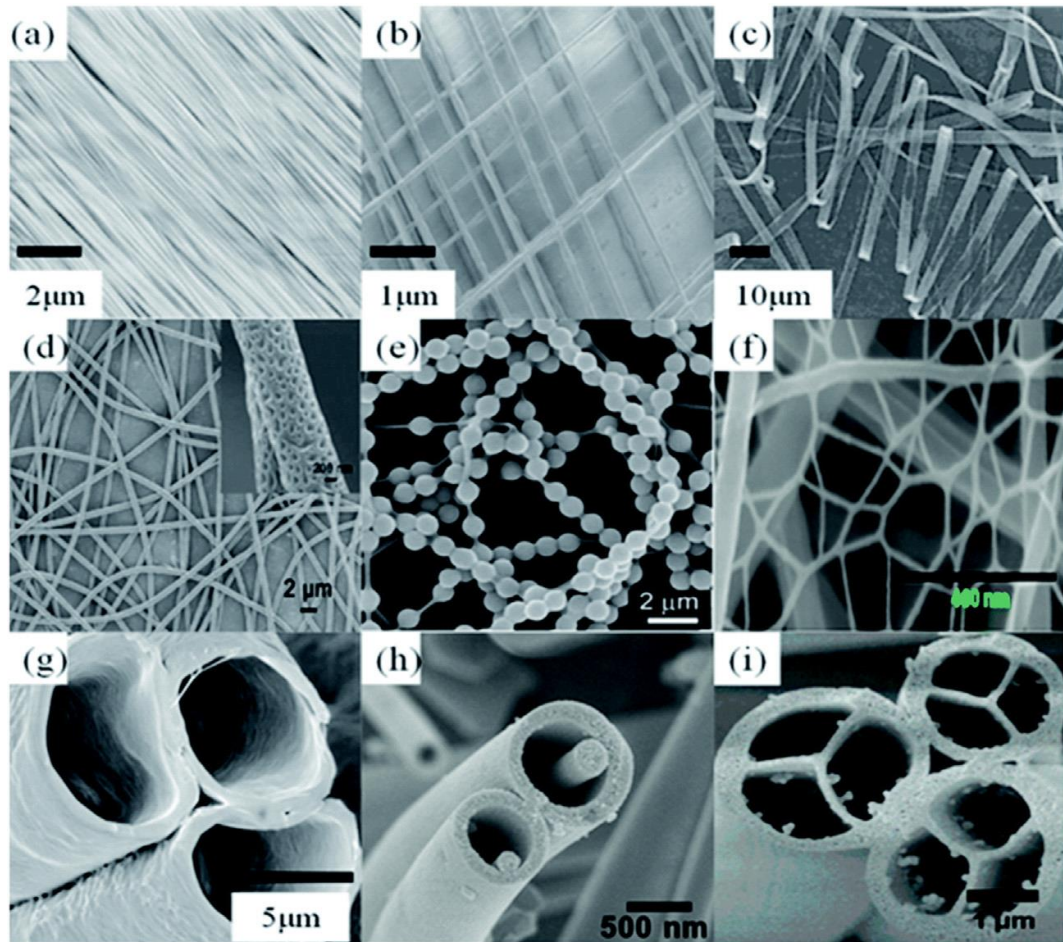
### 4.1 Nanofibras poliméricas

Objetos nanométricos, são aqueles que possuem pelo menos uma das suas dimensões estão em escala nanométrica. Dentre os nano-objetos, os três exemplos frequentemente alvos de estudos na área de nanotecnologia são: as nanopartículas, que contém as três dimensões na escala nanométrica; as nanofibras, tal como os nanotubos, nanofios e nanobastões, são nano-objetos com duas dimensões na escala nanométrica; e as nanoplacas que possuem apenas uma dimensão na escala nanométrica (SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022).

De modo geral, os materiais na nanoescala abrangem quatro gerações de produtos com crescente complexidade estrutural e dinâmica: nanoestruturas passivas, nanoestruturas ativas, nanossistemas e nanossistemas moleculares (ROCO, 2011). As nanoestruturas passivas são a primeira geração de nanomateriais e consistem na incorporação de estruturas passivas visando à melhoria das propriedades finais, como nanotubos de carbono como reforços em polímeros ou preparação de materiais com revestimentos (HIREMATH *et al.*, 2017). A segunda geração diz respeito à utilização de nanoestruturas ativas, como nanocarreadores de fármacos (PATRA *et al.*, 2018). Já a terceira geração compreende os nanomateriais multifuncionais inteligentes (WU *et al.*, 2020), enquanto a quarta geração de nanomateriais se refere aos nanossistemas moleculares, sendo que é dentro destas duas últimas gerações que as nanofibras poliméricas têm sido amplamente investigadas (YANG *et al.*, 2018).

O impacto significativo da tecnologia de nanofibras (NFs) se deve à disponibilidade de uma ampla gama de materiais que podem ser usados para sua produção, incluindo polímeros naturais e sintéticos, metais e óxidos metálicos, à base de carbono e nanomateriais compostos. Além disso, a superfície da NFs e os recursos de volume podem ser modificados para transportar várias funcionalidades, levando a diferentes propriedades físicas e aplicações potenciais. Existem muitos tipos de NFs (Figura 9) e elas são categorizadas com base em sua natureza (NFs naturais e artificiais ou projetadas), composição (baseada em orgânicos, inorgânicos, à base de carbono e NFs compostas), estrutura (NFs sólidas, poroso, não poroso, oco e núcleo-casca) e rigidez (flexível e rígido) (BARHOUM *et al.*, 2019).

**Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura de nanofibras com diferenças morfológicas: (a) alinhadas uniaxialmente, (b) orientadas biaxialmente, (c) fita, (d) fibras porosas, (e) tipo colar, (f) nanoteias, (g) ocas, (h) nanofio no microtubo e (i) tubular multicanal.**



Fonte: BARHOUM *et al.*, 2019.

Nanofibras poliméricas têm seu tamanho dependente de muitas características intrínsecas do polímero utilizado em sua produção, com por exemplo sua massa molar, e a metodologia utilizada para sua obtenção. Neste caso, o material apresenta algumas características interessantes, como elevada área superficial, aumento nos valores de condutividade elétrica em polímeros de natureza condutora e melhora das propriedades mecânicas. Devido à sua alta proporção e capacidade de formar estruturas de rede 3D, as NFs são excelentes candidatas para várias aplicações biomédicas, como administração de medicamentos, cicatrização de feridas e engenharia de tecidos. A textura da superfície da NF (porosidade e aspereza da superfície), composição (superfície e estrutura a granel), estrutura da rede (aleatória ou alinhada) e orientação molecular podem ser controladas para potencializar sua bioatividade (BARHOUM *et al.*, 2019; KENRY; LIM, 2017).

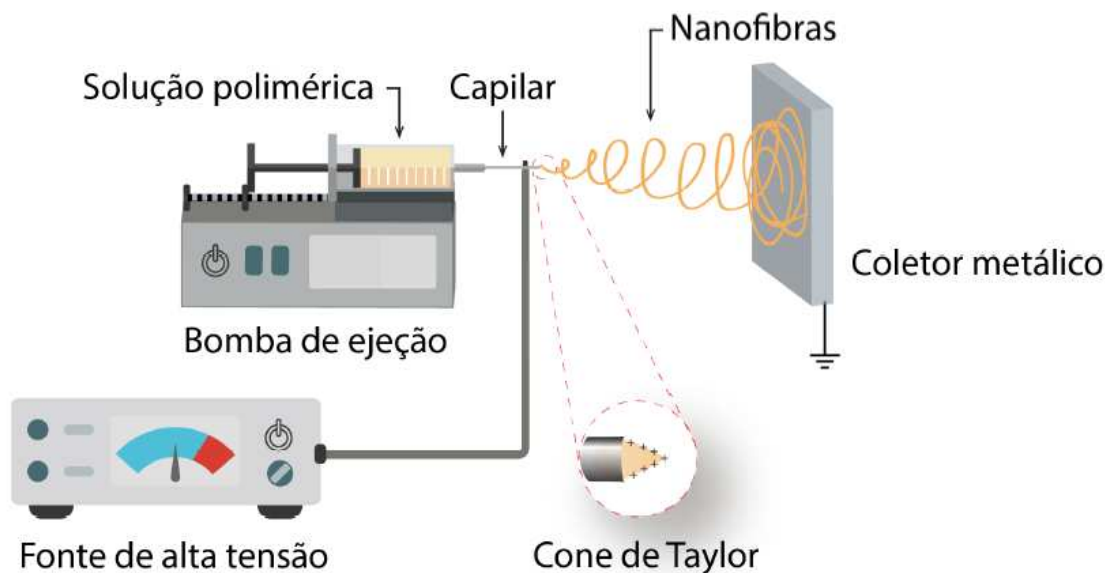


## 4.2 Eletrofiação

A produção de NFs pode ocorrer a partir de inúmeras técnicas, como fiação, separação de fases, automontagem, síntese template, eletrofiação (do inglês, *electrospinning*), fiação por sopro em solução, dentre outras. Todas essas técnicas possuem mencionadas particularidades, como a possibilidade de obtenção de fibras individuais longas (por exemplo pelas técnicas de fiação), obtenção de túbulos e fibrilas nanométricas a partir de diversos materiais, como polímeros condutores, metais, semicondutores a partir do uso da síntese do tipo template, entre outros exemplos. Dentre as técnicas citadas, a eletrofiação demonstra ser um método adequado para a produção escalonada de NFs contínuas, a partir de uma vasta gama de polímeros, bem como de materiais compósitos. Pela técnica podem ser obtidas mantas formadas por NFs dispostas de forma randômica ou orientada. Além disso, variando-se os parâmetros de processo é possível obter fibras poliméricas eletrofiadas com diferentes morfologias/estruturas, incluindo fibras porosas, fibras coaxiais ou do tipo núcleo-casca, fibras decoradas, entre outras (SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022).

Em termos gerais, a eletrofiação é um processo eletrohidrodinâmico que resulta no movimento de um fluido por meio da aplicação de um campo eletrostático. Um sistema convencional de eletrofiação é constituído por uma fonte de alta tensão, uma bomba para ejeção da solução, um recipiente para a solução acoplado a um capilar metálico (geralmente uma agulha hipodérmica) e um coletor também condutor (Figura 10) (MERCANTE *et al.*, 2021). Esse sistema convencional pode ser ajustado de forma conveniente para aumentar a produção ou para favorecer a formação de materiais com características específicas. Para isso, coletores de diferentes formatos podem ser empregados, bem como seu posicionamento (vertical ou horizontal) e a forma de coleta (rotativa ou plana). Diferentes formas e tamanhos dos capilares (agulhas) também podem ser utilizados, como por exemplos capilares concêntricos, paralelos ou múltiplos (MERCANTE *et al.*, 2021; SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022).

**Figura 10 – Estrutura esquemática de formação de nanofibras através do processo eletrofiação convencional.**

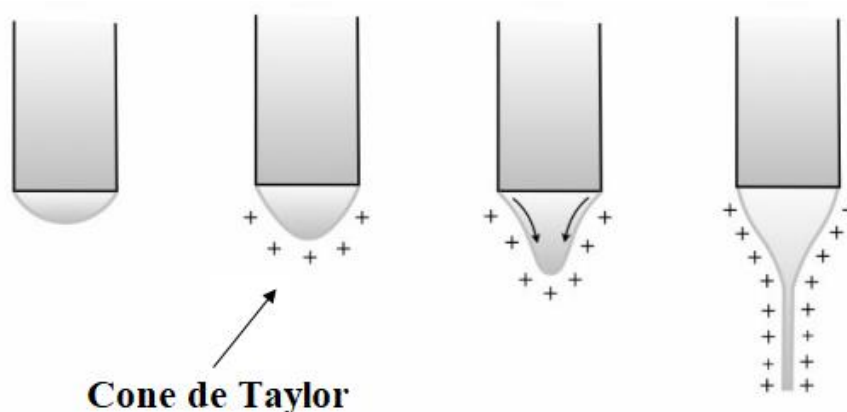


Fonte: MERCANTE *et al.*, 2021.

No processo de eletrofiação, a solução polimérica contida no reservatório é injetada, a uma vazão pré-demanda, através de um capilar, o que leva a formação de uma gota que é mantida na ponta do mesmo por forças de tensão superficial. Em seguida, a aplicação de um campo elétrico induz a formação de cargas elétricas na superfície do líquido. A repulsão eletrostática e as forças de Coulomb são as principais forças motrizes para induzir a distorção da geometria da gota. Quando o campo aplicado atinge uma tensão alta suficiente, as forças elétricas repulsivas superam as forças de tensão superficial e a gota se alonga adquirindo um formato cônico, conhecido como cone de Taylor (Figura 11). Na sequência, a solução sofre um estiramento uniaxial formando um jato que é rapidamente acelerado no sentido do coletor, o qual encontra-se aterrado. Quando o jato percorre o caminho até o coletor, a flexão do jato e a evaporação do solvente vão levar à solidificação do polímero e sua deposição na forma de fibras no coletor, formando mantas/membranas de NFs. Esse jato pode ainda sofrer diferentes intensidades de movimentos turbulentos de chicoteamento que provocam o alongamento e afinamento das fibras. Em geral, o mecanismo de formação de fibras eletrofiadas pode ser dividido em quatro etapas consecutivas: (i) formação de cargas elétricas na gota da solução polimérica e formação do cone de Taylor; (ii) extensão do jato carregado ao longo de uma linha reta; (iii) afinamento do jato na presença do campo elétrico e aumento da instabilidade

elétrica; (iv) solidificação e coleta do jato como fibra sólida no coletor (BARHOUM *et al.*, 2019; MERCANTE *et al.*, 2021; SURESH; BECKER; GLASMACHER, 2020).

**Figura 11 – Processo de deformação da gotícula na ponta da agulha e formação do cone de Taylor.**



Fonte: SURESH; BECKER; GLASMACHER, 2020. Adaptado.

Apesar da simples configuração experimental, o processo de eletrofição é influenciado por diferentes parâmetros que podem ser classificados essencialmente em parâmetros de solução, parâmetros de processo e parâmetros ambientais (Tabela 2). O controle desses parâmetros permite modular a morfologia, o diâmetro (espessura) e o alinhamento das NFs.

**Tabela 2 - Principais parâmetros que influenciam no processo de eletrofição, seus efeitos e relevância.**

Parâmetros da solução	Efeito	Relevância
<b>Concentração de polímero</b>	Diretamente proporcional ao diâmetro da fibra. Em casos extremos pode entupir o capilar e sessar o processo. Influência na quantidade de polímero depositado e na formação de <i>beads</i> (grânulos).	•••
<b>Viscosidade</b>	Diretamente proporcional ao tamanho dos poros e dos diâmetros das fibras. Inversamente proporcional a formação de <i>beads</i> . Em casos extremos pode entupir o capilar e sessar o processo.	••
<b>Peso molecular</b>	Diretamente proporcional ao diâmetro da fibra. Efeito direto na viscosidade, inversamente proporcional a formação de <i>beads</i> e gotículas.	••
<b>Condutividade</b>	Inversamente proporcional ao tamanho dos poros e dos diâmetros das fibras. Um valor mínimo é necessário, porém valores extremamente altos	•••

---

	podem produzir múltiplos jatos.	
<b>Tensão superficial</b>	Inversamente proporcional a estabilidade do jato e formação de <i>beads</i> . Diretamente proporcional ao diâmetro das fibras.	•
<b>Parâmetros de processo</b>		
<b>Tensão</b>	Influência no cone de Taylor, valores altos, forma múltiplos jatos e valores baixos interrompe o jato. Inversamente proporcional ao diâmetro da fibra, porém ao atingir um valor crítico pode tornar diretamente proporcional.	•••
<b>Vazão</b>	Diretamente proporcional ao diâmetro das fibras e tamanho dos poros. Influência na formação de beads se estiver em altos valores.	•
<b>Distancia da ponta do capilar ao coletor</b>	Inversamente proporcional a densidade elétrica, logo também ao diâmetro das fibras. Uma distância mínima é necessária, porem distancias elevadas não são adequadas para solventes muito voláteis.	••
<b>Parâmetros ambientais</b>		
<b>Temperatura</b>	Diretamente proporcional ao diâmetro e ao tamanho dos poros da fibra. Afeta a taxa de evaporação do solvente e a viscosidade da solução.	•
<b>Umidade</b>	Inversamente proporcional ao diâmetro das fibras, por influenciar na evaporação do solvente. Diretamente proporcional a incidência e tamanho dos poros circuladas nas fibras.	•••

---

Fonte: HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; LIAO *et al.*, 2018; SURESH; BECKER; GLASMACHER, 2020.

Adaptado.

## 5 QUALITY BY DESIGN

A qualidade tem sido de grande importância por todos os órgãos reguladores de produtos farmacêuticos. A competição global atualmente exige que as empresas se destaquem, desenvolvendo produtos confiáveis, de alto desempenho e a um baixo custo. A qualidade deve ser aplicada em todo o processo de produção, visando detectar problemas com antecedência. Com ênfase na precaução, ações podem ser tomadas sem que se comprometa o custo, cronograma ou qualidade do produto (SANGSHETTI *et al.*, 2017). A qualidade farmacêutica é alcançada quando o produto apresenta desempenho clínico, nenhum risco adicional é introduzido devido a contaminantes inesperados e um sistema de fabricação robusto é garantido. Para garantir isso, agências reguladoras, como International Conference on Harmonization (ICH) e Food and Drug Administration (FDA), destacam, em suas diretrizes, o conceito de *Quality by Design* (QbD). Este conceito é proposto para desenvolvimento de produtos de melhor qualidade por meio da compreensão dos parâmetros críticos do processo e do produto com base no gerenciamento de risco (FDA, 2006; ICH, 2009).

O termo QbD, em português traduzido para “Qualidade baseada no projeto” foi criado em meados de 1950, pelo pioneiro da qualidade Dr. Joseph M. Juran. Dr. Juran acreditava que a maioria dos problemas de qualidade se relacionam com a forma que o produto foi projetado e, portanto, a qualidade deve ser controlada a cada etapa do processo para maximizar a probabilidade de que o produto final alcance seus atributos de qualidade e as especificações (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; YU *et al.*, 2014). Ao longo dos anos, o QbD farmacêutico evoluiu com a emissão das diretrizes do FDA e ICH. Atualmente, a *Quality by Design* significa projetar e desenvolver processos de fabricação durante o estágio de desenvolvimento do produto para garantir consistentemente uma qualidade predefinida no final do processo de fabricação (FDA, 2006).

O QbD farmacêutico é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de produtos que começa com objetivos predefinidos e enfatiza a compreensão e o controle de produtos e processos com base em ciência sólida e gerenciamento de risco de qualidade. Dos objetivos do QbD farmacêutico estão inclusos: alcançar especificações de qualidade do produto significativas; aumentar a capacidade do processo e reduzir a variabilidade do produto; aumentar a eficiência de desenvolvimento e fabricação de produtos e aprimorar a análise de causa-efeito e a flexibilidade regulatória (FUKUDA *et al.*, 2018; ICH, 2009; YU *et al.*, 2014). A aplicação do QbD no desenvolvimento de um produto farmacêutico assegura a

eficácia do produto, permite a compreensão científica do processo e métodos farmacêuticos e oferece um método robusto. Além de realizar uma avaliação de risco e promover benefícios comerciais, o conceito de design do método ajuda a evitar custos envolvidos com mudanças pós-aprovação (SANGSHETTI *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, o desenvolvimento e otimização de produtos farmacêuticos têm sido realizados por abordagem univariada. Dentro de um nível apropriado, apenas um fator é alterando enquanto os outros são mantidos constantes. Esse procedimento classicamente aplicado não permite avaliar a interação entre os fatores, além de aumentar o número de experimentos à medida que o número de fatores aumenta. Para superar essas limitações, uma estratégia multivariada pode ser aplicada, onde vários fatores são estudados simultaneamente em um número pré-definido de experimentos, variando em conjunto os níveis de todos os fatores envolvidos no processo. O *design* de experimentos (DoE) é o principal complemento do QbD que se adequa a uma abordagem multivariada e pode fornecer melhores resultados com poucos experimentos (CANDIOTI *et al.*, 2014; FUKUDA *et al.*, 2018).

### **5.1 Elementos do QbD farmacêutico**

Os elementos do QbD farmacêutico permitirão projetar um produto de qualidade e seu processo de fabricação para entregar de forma consistente o desempenho pretendido em termos de segurança e eficácia. Usando a abordagem QbD, o desenvolvimento farmacêutico fornecerá uma compreensão completa do produto e seu processo de fabricação (FUKUDA *et al.*, 2018).

*Quality Target Product Profile* (QTPP), traduzido para o português como “perfil do produto alvo de qualidade” constitui a base do design para o desenvolvimento do produto. O QTPP pode desempenhar um papel central em toda a descoberta de produtos farmacêuticos, desde os processos de desenvolvimento, otimização, planejamento e tomada de decisão, até concepção de estratégias de pesquisa clínica (SANGSHETTI *et al.*, 2017). O QTPP é formado pelas características de qualidade do produto que, idealmente serão alcançadas para garantir a qualidade desejada, levando em consideração a segurança e eficácia do mesmo. Em outras palavras, o QTPP consiste na definição das expectativas no produto farmacêutico final. As considerações para QTPP devem incluir o uso pretendido em ambiente clínico, via de administração, forma farmacêutica, sistema de entrega, dosagem, sistema de fechamento do recipiente, fatores que afetam as propriedades farmacocinéticas e critérios de qualidade do

produto (como esterilidade, pureza, estabilidade, liberação do medicamento, entre outros) (SANGSHETTI *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2014; ZHANG; MAO, 2017).

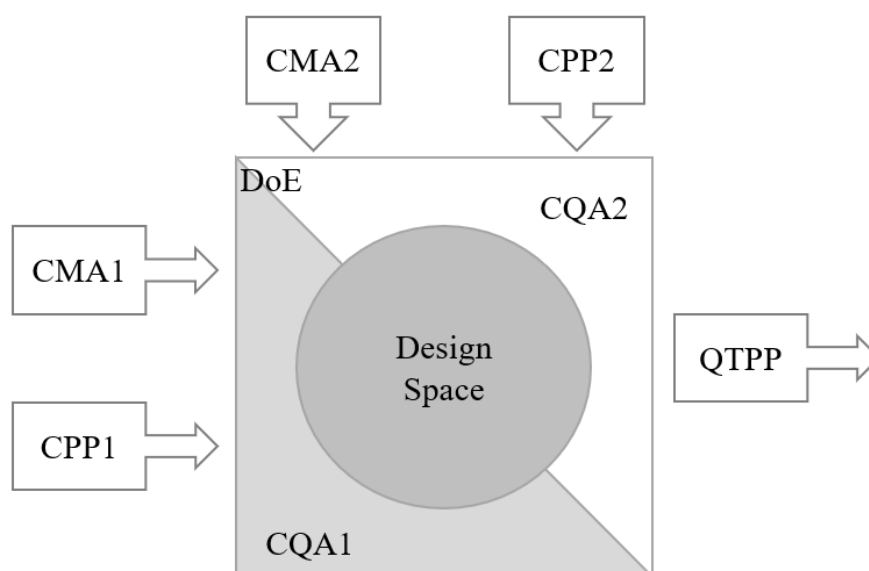
A identificação dos atributos críticos da qualidade (*Critical Quality Attributes*, CQA) do produto é o próximo passo do QbD farmacêutico. De acordo com a ICH (2009), um CQA é uma propriedade ou característica física, química, biológica ou microbiológica de um material de saída que deve estar dentro de um limite, intervalo ou distribuição apropriados para garantir a qualidade desejada. Os CQA podem pertencer ao produto final, intermediários ou as matérias-primas, e têm impacto significativo na qualidade do produto final (BEZERRA; RODRIGUES, 2017). Os atributos de qualidade de um produto farmacêutico podem incluir identidade, ensaio, uniformidade de conteúdo, produtos de degradação, solventes residuais, liberação ou dissolução do fármaco, teor de umidade, limites microbianos e atributos físicos como cor, forma, tamanho, odor, configuração de pontuação e friabilidade. Esses atributos podem ser críticos ou não críticos. A criticidade de um atributo baseia-se principalmente na gravidade do dano ao paciente, caso o produto esteja fora da faixa aceitável para esse atributo (YU *et al.*, 2014). O potencial CQA derivado do QTPP é usado para orientar o desenvolvimento de produtos e processos. Assim, atributos de materiais críticos (*Critical Material Attributes*, CMA) e parâmetros críticos de processo (CPP) também podem ser identificados para atingir CQA e QTPP (FUKUDA *et al.*, 2018).

Os atributos de materiais críticos consistem em propriedades físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas que as matérias primas devem atender para garantir o CQA desejado. Os CMAs devem estar dentro de um limite, alcance ou distribuição que para garantir a qualidade desejada do produto farmacêutico, excipiente ou material em processo (ZHANG; MAO, 2017). O papel do CMA no QbD é ressaltar a importância da funcionalidade das matérias-primas no desenvolvimento de uma formulação. Um processo farmacêutico contém inúmeras CMA, isto porque uma formulação é composta por vários componentes e cada um destes apresenta inúmeros tipos de atributos (BEZERRA; RODRIGUES, 2017). Nesse contexto, a avaliação de riscos atua como um facilitador, pois indica quais os CMA exigem maior atenção, reduzindo o gasto de recursos disponíveis' (ICH, 2009; YU *et al.*, 2014).

No processo, quando um parâmetro tem papel significativo na qualidade do material fabricado, este é identificado pela abordagem QbD como um CPP e deve ser avaliado quanto ao risco que sua variação representa na qualidade do produto final (BEZERRA; RODRIGUES, 2017). Os CPPs são parâmetros de processo como tempo de mistura, velocidade de agitação, temperatura, vazão de ar, entre outros que devem ser monitorados

antes ou durante o processo para garantir o CQA desejado. Tais parâmetros podem influenciar significativamente na aparência, pureza e rendimento do produto final (FUKUDA *et al.*, 2018; ZHANG; MAO, 2017). Assim, é possível perceber como os elementos da abordagem QbD são essenciais para conseguir estruturar um processo com qualidade e com redução de gastos desnecessários, com isso facilitando o desenvolvimento e aperfeiçoamento do produto final. O potencial CQA derivado do QTPP é usado para orientar o desenvolvimento de produtos e processos. Assim, o CMA e o CPP também podem ser identificados para atingir CQA e QTPP, conseqüentemente (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; FUKUDA *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2014). A Figura 12 apresenta esquematicamente as etapas de implantação do QbD, incluindo a relação entre seus elementos.

**Figura 12 – Diagrama esquemático das etapas de implementação do QbD farmacêutico.**



Fonte: FUKUDA *et al.*, 2018. Adaptado. QbD = *Quality by Design*, CPP = Parâmetro Crítico do Processo, CMA = Atributo Crítico do Material, CQA = Atributo Crítico de Qualidade, QTPP = Perfil do Produto Alvo de Qualidade, DoE = design de experimentos.

## 5.2 Avaliação de risco

A avaliação de risco é um processo sistemático de organização de informações de conhecimento para apoiar a decisão. Ela permite discriminar as fontes de variação de um sistema e, conseqüentemente, priorizar os pontos de investigação de um processo. Existem três elementos essenciais na avaliação de risco: a) identificação de risco: uso sistemático de informações para identificar fontes potenciais de perigo a partir de dados históricos, análise

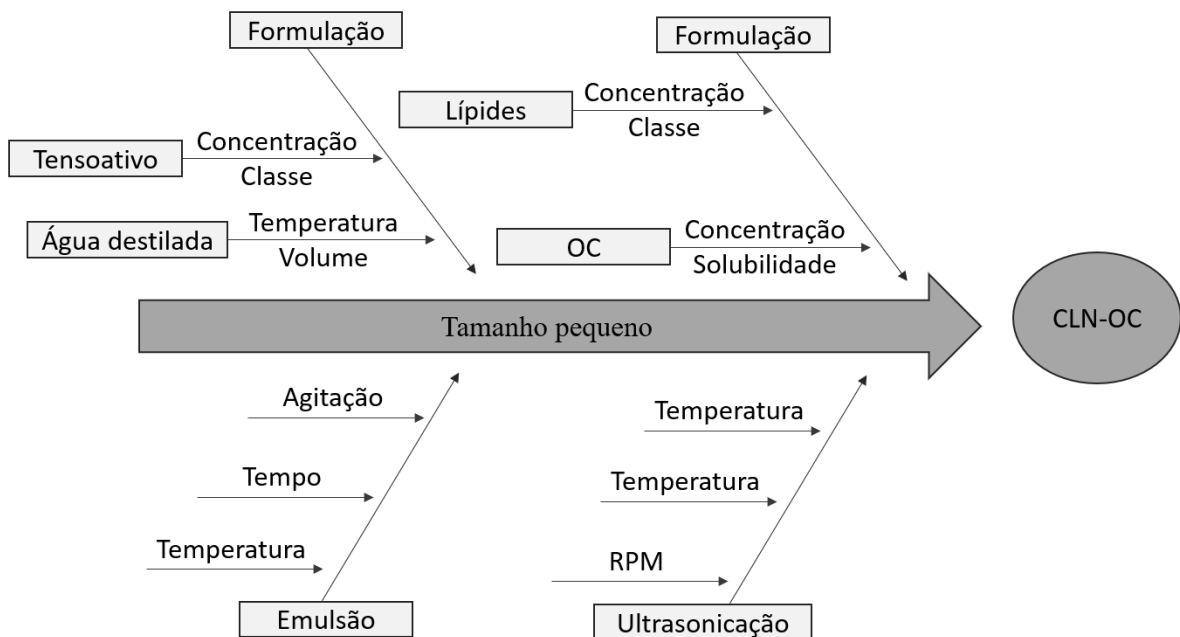


teórica e preocupações das partes interessadas; b) análise de risco: a estimativa do risco associado aos perigos identificados; e c) avaliação de risco: comparação dos riscos estimados utilizando escala quantitativa ou qualitativa para determinar sua significância (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; FUKUDA *et al.*, 2018).

Dentre os modelos de avaliação e risco sugeridos pelo ICH Q9, o diagrama de Ishikawa (espinha de peixe) e a análise de modo e efeitos de falha são ferramentas de avaliação de risco amplamente utilizadas. O diagrama de Ishikawa, também conhecido como escama de peixe ou diagrama causa e efeito, é uma ferramenta qualitativa de avaliação de risco que permite identificar e classificar em amplas categorias as principais possíveis falhas. Neste tipo de diagrama, os principais CQA a serem estudados são incluídos como eixo central em uma seta horizontal apontando para o produto (efeito). Todos os CMA e CPP identificados são listados de acordo com as suas categorias (seta inclinada que aponta para o eixo central), e cada categoria apresenta o fator em questão (causa) listado em setas na horizontal (SHAH, B. *et al.*, 2015). A Figura 13 exemplifica esse tipo de diagrama aplicado ao processo de desenvolvimento dos nanocarreadores lipídicos contendo óleo de copaíba (CLN-OC). O método FMEA é frequentemente usado para realizar uma avaliação quantitativa de risco, que fornece um número de prioridade de risco (RPN). Este parâmetro é estimado com base na probabilidade de ocorrência (P), gravidade (S) e probabilidade de detecção (D), através da Equação 1 (ICH, 2005; ZHANG; MAO, 2017).

$$PN = P \times S \times D \quad (1)$$

**Figura 13 – Exemplo de diagrama de Ishikama: parâmetros críticos do processo de desenvolvimento de CLN-OC.**



Fonte: SHAH *et al.*, 2015. Adaptado. OC = óleo de copaíba, CLN-OC = carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo de copaíba.

### 5.3 Projeto de experimentos (DoE)

DoE é um conjunto de ferramentas estatísticas que inclui projetos de triagem de otimização. Sua metodologia é estruturada para determinar as relações entre fatores de entrada ( $x_i$  – variáveis independentes) que afetam uma ou mais respostas de saída ( $y$  – variáveis dependentes), através do estabelecimento de modelos matemáticos ( $y = f(x_i)$ ) (FUKUDA *et al.*, 2018). As variáveis independentes são propositalmente variadas para determinar seus efeitos nas variáveis respostas (dependente) (POLITIS *et al.*, 2017).

#### 5.3.1 Desenho experimental

Para selecionar o desenho experimental adequado, vários aspectos devem ser considerados, como definição de objetivo, número de fatores e interações a serem estudados, validade estatística e eficácia de cada desenho, restrições de operação, custo e tempo e facilidade de compreensão e complexidade de implementação de cada projeto (CANDIOTI *et al.*, 2014). A aplicação do DoE consiste inicialmente na identificação das principais fontes de

variação (projeto de triagem) e em seguida os resultados dessa triagem são empregados nos estudos das interações entre os fatores (projeto de otimização) (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; FUKUDA *et al.*, 2018). A Tabela 3 fornece um resumo das características dos projetos de triagem e otimização, como número de experimentos necessários, número de níveis de fatores de entrada e número de fatores a serem estudados.

**Tabela 3 - Resumo das características dos projetos de triagem e otimização: número de experimentos, níveis e fatores.**

Projeto	Design experimental	Experimentos	Níveis	Fatores
<b>Triagem</b>	Plackett-Burman	N (múltiplo de 4)	2	< N-1
	Fatorial fracionado	$2^{k-p}$	2	$k > 4$
	Fatorial completo de dois níveis	$2^k$	2	$2 < k < 5$
<b>Otimização</b>	Box-Behnken	$2k(k-1) + C$	3	$3 < k < 5$
	Design composto central	$2^k + 2k + C$	5	$2 < k < 5$
	Fatorial de três níveis	$3^k$	3	$2 < k < 3$

Fonte: FUKUDA *et al.*, 2018.  $k$  = número de fatores de entrada,  $N$  = número de experimentos,  $p$  = número de geradores independentes,  $C$  = replicação do ponto central.

Uma das limitações mais relevantes dos projetos de triagem reside no fato de que eles só permitem modelar a superfície de resposta de 1ª ordem (linear), pois possuem apenas dois níveis para cada fator de entrada. Os projetos de otimização podem suprir tais limitações, já que utilizam de 3 a 5 níveis de cada fator de entrada, o que permite modelar a superfície de resposta de 2ª ordem (quadrática). Os delineamentos mais usados na etapa de otimização são o fatorial completo de três níveis, design composto central e Box-Behnken (FUKUDA *et al.*, 2018).

O planejamento fatorial completo de três níveis geralmente é usado apenas quando dois ou três fatores de entrada precisam ser estudados, porque é necessário um número maior de experimentos. O número de experimentos necessários pode ser calculado como  $3k$ , onde  $k$  é o número de fatores de entrada a serem estudados (FUKUDA *et al.*, 2018). Por exemplo, um planejamento fatorial completo de três níveis para três fatores de entrada requer  $3^3 = 27$

experimentos. Já o delineamento Box-Behnken são tipos especiais de projetos fatoriais fracionados de três níveis, que permitem modelar superfícies de resposta de 1ª e 2ª ordem. Esses projetos são mais econômicos do que os projetos fatoriais completos de três níveis, particularmente para um grande número de fatores de entrada (BEZERA *et al.*, 2008; CANDIOTI *et al.*, 2014; POLITIS *et al.*, 2017).

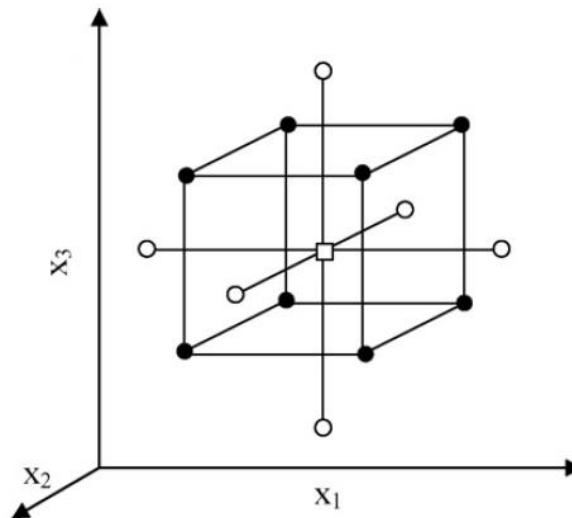
O *design* composto central é um dos delineamentos de otimização mais utilizados, pois utiliza 5 níveis ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ) de cada fator de entrada com um número reduzido de experimentos necessários, quando comparado ao planejamento fatorial completo de três níveis. Este delineamento requer um número de experimento de acordo com a Equação 2, onde  $k$  é o número do fator e  $c$  é o número de replicação do ponto central. Os valores de  $\alpha$  dependem do número de variáveis e podem ser calculados pela Equação 3. Para duas, três e quatro variáveis, o valor de  $\alpha$  é 1,41, 1,68 e 2,00, respectivamente (BEZERA *et al.*, 2008; FUKUDA *et al.*, 2018).

$$N = 2^k \times 2k + C \quad (2)$$

$$\alpha = 2^{\frac{k-p}{4}} \quad (3)$$

O projeto experimental conhecido como delineamento composto central rotacional (DCCR) é um delineamento composto central que tem pontos axiais definidos, sendo a denominação “Central Rotacional” devido ao fato de que os pontos escolhidos no espaço amostral estão equidistantes do ponto central (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Uma representação espacial 3D do DCCR para três fatores de entrada é fornecida na Figura 14. Este planejamento é composto pelos os pontos do planejamento fatorial ( $\bullet$ ), pontos axiais ( $\circ$ ); e o ponto central ( $\square$ ) (Figura 14).

**Figura 14 – Representação espacial 3D dos pontos do DCCR para três fatores de entrada ( $\alpha=1,68$ ).**



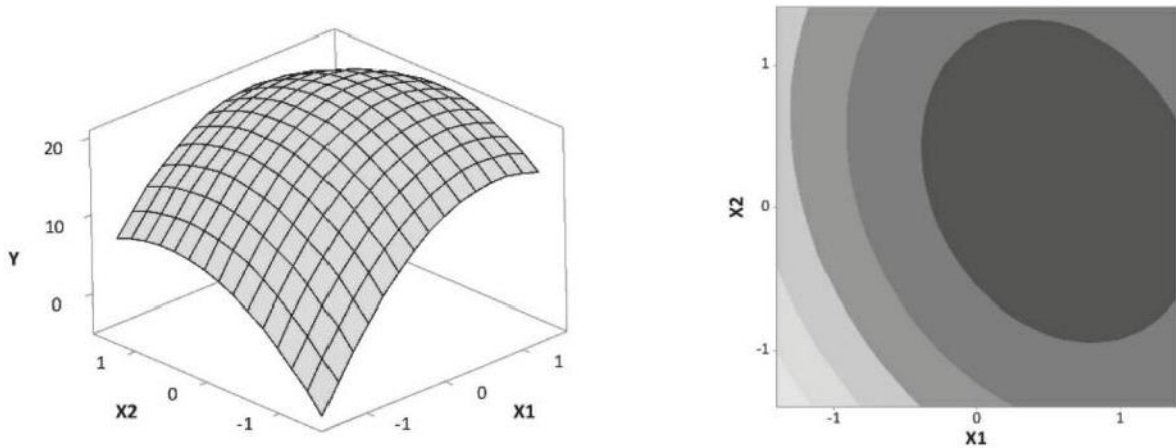
Fonte: BEZERA *et al.*, 2008. Adaptado.  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$ , = variáveis de entrada, (●) Pontos do planejamento fatorial, (○) pontos axiais e (□) ponto central, DCCR = delineamento do composto central rotacional.

A escolha do delineamento e do ajuste adequado dependerá do modelo matemático a ser adotado. Dentre os modelos, o mais completo possui termos lineares + interação + quadráticos (Figura 15). O modelo pode ser ajustado com base em uma função de modelo completo, se a resposta de saída estiver bem ajustada à Equação 4.

$$y = \beta_0 + \sum_i^k \beta_i \times X_i + \sum_{ij}^k \beta_{ij} \times X_i \times X_j + \sum_i^k \beta_{ij}^2 \times X_i^2 \quad (4)$$

Onde  $y$  é a variável dependente,  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes,  $\beta_0$  é a constante,  $\beta_i$  é a constante linear,  $\beta_{ij}^2$  é o coeficiente quadrático e  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação (FUKUDA *et al.*, 2018; PELISSARI *et al.*, 2013).

**Figura 15 – Exemplo de gráficos 3D e 2D da superfície resposta para função do modelo linear + interação + quadrático.**



Fonte: FUKUDA *et al.*, 2018. Adaptado.  $X_1$  e  $X_2$  = variáveis de entrada,  $Y$  = variável de saída.

O modelo matemático deve ser selecionado com base na aplicação da análise de variância (ANOVA). O propósito da ANOVA é comparar a variabilidade devido ao tratamento (variando o nível dos fatores de entrada) com a variabilidade devido ao erro residual, e em seguida avaliar a significância do modelo de regressão. A análise de regressão é válida somente se os resíduos (quadrado da diferença entre a resposta prevista pelo modelo matemático e a resposta experimental) apresentarem distribuição normal e homocedasticidade (BEZERA *et al.*, 2008; CANDIOTI *et al.*, 2014; POLITIS *et al.*, 2017). Com base na ANOVA, é possível decidir incluir ou excluir os coeficientes de termos lineares (por exemplo,  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ), termos de interação (por exemplo,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  e  $X_2X_3$ ) e termos quadráticos (por exemplo  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  e  $X_3^2$ ). Esta decisão é baseada em p-valores para cada termo de regressão de coeficiente normalmente, um termo de regressão de coeficiente deve ser incluído no modelo de regressão quando seu valor de p-valor for menor que 0,05 ou em alguns casos, menor que 0,10 (FUKUDA *et al.*, 2018).

O ajuste do modelo de regressão múltipla deve ser avaliado com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o qual indica a proporção da variação na resposta de saída ( $Y$ ) que é prevista dos fatores de entrada ( $X$ ). Além disso, a variabilidade devido à falta de ajuste da regressão modelo deve ser comparada com a variabilidade devido a erro puro para avaliar o ajuste do modelo de regressão. O modelo de regressão é bem ajustado quando o erro fornecido pela falta de ajuste do modelo de regressão for significativamente menor do que erro puro aleatório. É importante notar que o erro de falta de ajuste só pode ser estimado

quando o projeto experimental inclui réplicas, geralmente para centrais apontar (FUKUDA *et al.*, 2018).

A preditividade das equações ajustadas é verificada através de um determinado critério baseado nos valores de  $F_{\text{teste}}$ , que por sua vez depende da razão das regressões relacionadas aos resíduos ( $F_{\text{calculado}} / F_{\text{listado}}$ ). O critério é que, o modelo matemático é considerado preditivo quando o valor de  $F_{\text{teste}}$  é maior 3. Valores de  $F_{\text{teste}}$  maiores que 3 implicam que os modelos representados pelas equações, não são validos para as variáveis avaliadas, portanto não podem ser consideradas preditivas. Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{listado}}$  são obtidos através da análise ANOVA e tabela de distribuição F de Fisher-Snedecor, respectivamente (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

### 5.3.2 Função desejabilidade

A otimização de múltiplas respostas pode ser estimada por técnicas numéricas de funções de desejabilidade. As características de qualidade do produto (as CQA) são consideradas variáveis de resposta, e são geralmente afetadas pela combinação de configurações das diversas variáveis de entrada (CMA e CPP) para obtenção do produto. Portanto, a função desejabilidade (*desirability*) tem sido utilizada com o intuito de aperfeiçoar as várias respostas, conforme proposto em 1980 por Derringer e Suich (CANDIOTI *et al.*, 2014). O objetivo principal dessa função é encontrar as condições experimentais que assegurem o cumprimento dos critérios de todas as variáveis respostas avaliadas e, ao mesmo tempo, proporcionar o melhor valor de compromisso na resposta conjunta desejável (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016). Isto é conseguido convertendo as múltiplas respostas em uma única, combinando as respostas individuais em uma função composta seguida de sua otimização (DERRINGER; SUICH, 1980).

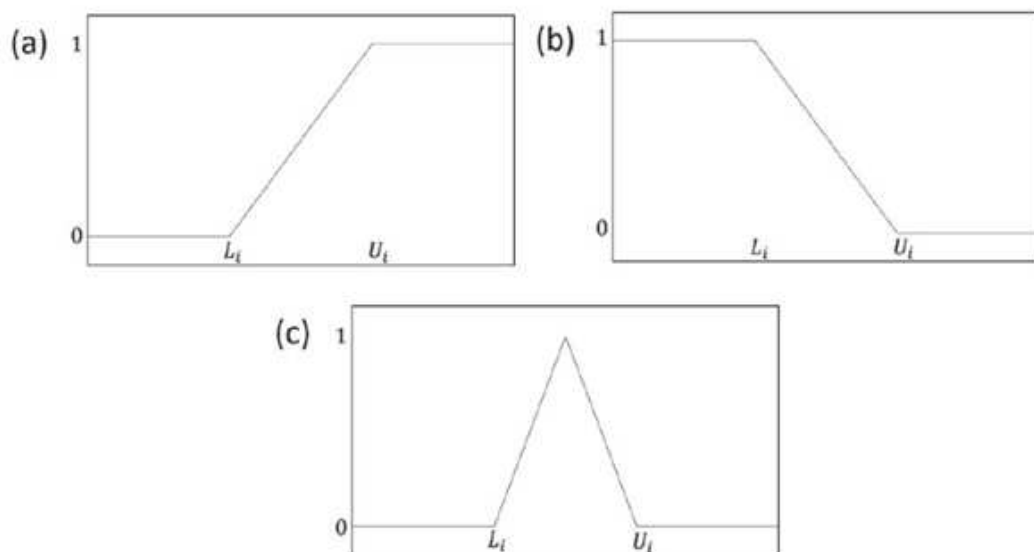
O método multi-resposta, ou função desejabilidade, envolve a transformação de cada variável resposta ( $Y_i$ ) em uma função individual de desejabilidade ( $d_i$ ) (Equação 5 e Equação 6) que varia de 0 a 1. Se a resposta estiver fora do aceitável pré-estabelecido, a função é definida como  $d_i = 0$ , caso a resposta seja desejável, a função é definida como  $d_i = 1$  (CANDIOTI *et al.*, 2014; PAL; GAURI, 2018; PELISSARI *et al.*, 2013). As Equações 5 e 6 podem ser aplicadas quando a meta é maximizar ou minimizar a função desejável, respectivamente. Para isso o valor mínimo ( $Y_{\text{min}}$ ) e valor máximo ( $Y_{\text{max}}$ ) de resposta devem ser utilizados, como apresentados nas equações a seguir (PELISSARI *et al.*, 2013).

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}} \quad (5)$$

$$d_i = \frac{Y_{max} - Y_i}{Y_{max} - Y_{min}} \quad (6)$$

As funções de desejabilidade, geralmente são projetadas para atingir critérios diferentes, por exemplo, para maximizar, minimizar e otimizar a meta das respostas de saída (Figura 16). As funções podem ser construídas, dependendo dos critérios de otimização adotados, dentro de uma faixa aceitável de valores de resposta dada por  $(U_i - L_i)$ , onde  $U_i$  é o valor máximo aceitável para a resposta e  $L_i$  é o mínimo (CANDIOTI *et al.*, 2014; FUKUDA *et al.*, 2018).

**Figura 16 – Exemplificação gráfica das funções de desejabilidade para maximizar (a), minimizar (b) e (c) otimizar a variável resposta.**



Fonte: FUKUDA *et al.*, 2018. Adaptado.

Uma vez que todas as variáveis (níveis de fatores e respostas) são transformadas em funções de desejabilidade, elas são combinadas em uma única função denominada desejabilidade global, com o intuito de reaver as melhores respostas conjuntas. A desejabilidade global pode ser representada graficamente para o espaço experimental, usando  $d_i(Y_i)$  para todas as respostas. A função geralmente encontra mais de uma combinação de níveis de fatores onde as respostas são aceitáveis (CANDIOTI *et al.*, 2014; DERRINGER; SUICH, 1980).



## REFERÊNCIAS

- ALI, R. F. M.; EL-ANANY, A. M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds oil in experimental male rats. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 1, p. 41–49, 2017.
- AMER, S. S. *et al.* Insights on the Use of Nanocarriers for Acne Alleviation. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 1, p. 18–25, 2019.
- ARIF, T. Salicylic acid as a peeling agent: A comprehensive review. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 8, p. 455–461, 2015.
- ARRUDA, C. *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. July 2018, p. 1–20, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.030>>.
- ASBAHANI, A. EL *et al.* Antimicrobial Activity of Nano-Encapsulated Essential Oils: Comparison to Non-Encapsulated Essential Oils. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 39–48, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1166/jcsb.2015.1118>>.
- BARHOUM, A. *et al.* Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. **Applied Materials Today**, v. 17, p. 1–35, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.06.015>>.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: State of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497–508, 2012.
- BELOQUI, A. *et al.* Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>>.
- BELOQUI, A. *et al.* Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 144–154, 2017.
- BEZERA, M. A. *et al.* Response surface methodology ( RSM ) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.
- BEZERRA, M. P.; RODRIGUES, L. N. C. Quality By Design (Qbd) Como Ferramenta Para Otimização Dos Processos Farmacêuticos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 1, p. 5–12, 2017.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. **Annual Review of Cell and**

**Developmental Biology**, v. 22, p. 339–373, 2006.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: An introduction to Design, Data analysis, and Model Building. Wiley ed. New York, 1978.

CANDIOTI, L. V. *et al.* Experimental design and multiple response optimization . Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>>.

CARVALHO, P. E. R. Copaíba: *Copaifera langsdorffii*. Espécies Arbóreas brasileiras. Brasília-DF: **Embrapa**, 2003. v. 1. p. 394–404. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1139732/1/Especies-Arboreas-Brasileiras-vol-1-Copaiba.pdf>>.

CHARNY, J. W.; CHOI, J. K.; JAMES, W. D. Spironolactone for the treatment of acne in women, a retrospective study of 110 patients. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 3, n. 2, p. 111–115, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijwd.2016.12.002>>.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016>>.

CHENG, S. S. *et al.* Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 10, p. 1957–1967, 2004.

CHENG, Y. T.; LU, C. C.; YEN, G. C. Beneficial effects of Camellia oil (*Camellia oleifera* Abel.) on hepatoprotective and gastroprotective activities. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 61, p. S100–S102, 2015.

CORRIAS, F.; LAI, F. New Methods for Lipid Nanoparticles Preparation. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 5, n. 3, p. 201–213, 2011.

COSTA, J. A. S. *Copaifera* in Flora do Brasil 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22895>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

COSTA, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.

DALENOGARE, D. P. *et al.* Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 829–844, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10787-019-00588-3>>.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations

- of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.05.010>>.
- DATE, A. A.; NAIK, B.; NAGARSENKER, M. S. Novel drug delivery systems: Potential in improving topical delivery of antiacne agents. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 1, p. 2–16, 2005.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.
- DIAS, D. DE O. *et al.* Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of  $\beta$ -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79–84, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.055>>.
- DIBA, V. C.; STATHAM, B. N. Contact urticaria from cinnamal leading to anaphylaxis. **CONTACT DERMATITIS**, v. 48, n. 2, p. 115–119, 2003.
- DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 58–84, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.003>>.
- DRÉNO, B. *et al.* Cutibacterium acnes (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, p. 5–14, 2018.
- FALCÃO, D. Q. *et al.* Challenges in development of essential oil nanodelivery systems and future prospects. In: NAIK, J. (Org.). **Nano Based Drug Delivery**. Zagreb, Croatia: IAPC Publishing, 2015. p. 557–578.
- FDA, F. AND D. A. Q9 Quality Risk Management. **Center for Drug Evaluation and Research**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/71543/download>>. , 2006
- FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.
- FEUILLOLAY, C. *et al.* A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. **Phytomedicine**, v. 23, n. 3, p. 307–315, 2016.
- FOX, L. *et al.* Treatment modalities for acne. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1–20, 2016.
- FUKUDA, I. M. *et al.* Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–16, 2018.

- GARCÊS, A. *et al.* Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, n. September 2017, p. 159–167, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>>.
- GHAZEMIEH, P. *et al.* Cyproterone acetate-loaded nanostructured lipid carriers: effect of particle size on skin penetration and follicular targeting. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 24, n. 7, p. 812–823, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2019.1596133>>.
- GHELARDINI, C. *et al.* Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. **Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 387–389, 2001.
- GOREN, A. C. *et al.* Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 448–453, 2011.
- GUIMARÃES, A. L. A. *et al.* Antimicrobial Activity of Copaiba (Copaifera Oils against *Staphylococcus Aureus*: Importance in Compounding for Wound Care. **International Journal of Pharmaceutical compounding**, v. 20, n. 1, p. 58–62, 2016.
- HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>>.
- HAN, R. *et al.* The antimicrobial effect of CEN1HC-Br against *Propionibacterium acnes* and its therapeutic and anti-inflammatory effects on acne vulgaris. **Peptides**, v. 99, n. October 2017, p. 36–43, 2018.
- HIREMATH, N. *et al.* Polyacrylonitrile nanocomposite fibers from acrylonitrile-grafted carbon nanofibers. **Composites Part B: Engineering**, v. 130, p. 64–69, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.07.031>>.
- HSU, E.; PARTHASARATHY, S. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Sesame Oil on Atherosclerosis: A Descriptive Literature Review. **Cureus**, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2017.
- ICH, H. T. G. Gestão do risco à qualidade. v. Fase 4, p. 1–19, 2005. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/institucional/relacoes-internacionais/convergencia-regulatoria/arquivos/1558json-file-1>>.
- ICH, H. T. G. Pharmaceutical development q8(r2). **Computational Toxicology**. Disponível em: <[https://database.ich.org/sites/default/files/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf)>. , 2009
- INTAHPHUAK, S.; KHONSUNG, P.; PANTHONG, A. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 151–157,

2010.

JAIN, A. K. *et al.* Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 222–229, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.041>>.

KENRY; LIM, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments.

**Progress in Polymer Science**, v. 70, p. 1–17, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002>>.

KIM, H. *et al.* Seeking better topical delivery technologies of moisturizing agents for enhanced skin moisturization. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 1, p. 17–31, 2018.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2017.1306054>>.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203–213, 2011.

KRAMBECK, K. *et al.* Lipid nanocarriers containing Passiflora edulis seeds oil intended for skin application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. May, p. 111057, 2020.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111057>>.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antimicrobial Activity of Green Tea Flavor Components and Their Combination Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 245–248, 1992.

KUETE, V. *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 54–60, 2007.

LAMMARI, N. *et al.* Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use.

**International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 1–34, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538>>.

LAWTON, S. Skin 1: the structure and functions of the skin. **Clinical Practice**, v. 115, n. 12, p. 30–33, 2019.

LEANDRO, L. M. *et al.* Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866–3889, 2012.

LI, Z.; WANG, C. One-Dimensional Technique and Electrospinning Nanostructures Unique Nanofibers. **Springer**, 2013.

LIAO, Y. *et al.* Progress in electrospun polymeric nanofibrous membranes for water treatment: Fabrication, modification and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 77, p. 69–94, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.10.003>>.

LIMA, A. F.; LIMA, J. F. DE J. F. M. Utilização medicinal do óleo de copaíba: aspectos

- históricos e estudos atuais. **Pós em Revista**, v. 5, p. 332–336, 2012.
- MARCZYK, B. *et al.* Comparative study of the effect of 50% pyruvic and 30% salicylic peels on the skin lipid film in patients with acne vulgaris. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 13, n. 1, p. 15–21, 2014.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M. C.; HOLGADO, F. Changes and effects of dietary oxidized lipids in the gastrointestinal tract. **Lipid Insights**, v. 2, p. 11–19, 2008.
- MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of croton sonderianus, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1625–1633, 1991.
- MERCANTE, L. A. *et al.* Nanofibras eletrofiadas e suas aplicações: avanços na última década. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 717–736, 2021.
- MORGUETTE, A. E. B. *et al.* Hydrogel Containing Oleoresin From *Copaifera officinalis* Presents Antibacterial Activity Against *Streptococcus agalactiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–16, 2019.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 121–128, 2002a.
- 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. SUPPL., p. 131–155, 2002b.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. Response Surface Methodology. Fourth Edition. New Jersey, 2016.
- NASTITI, C. M. R. R. *et al.* Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 1–25, 2017.
- OLIVEIRA, G. C. DE; PEREIRA, G. G.; CERRI, M. F. Aplicabilidade Dos Peelings Químicos: Revisão De literatura. **Revista Acadêmica: Novo Milênio**, v. 3, n. 4, p. 1–17, 2021.
- ORHAN, I.; ÖZÇELİK, B.; ŞENER, B. Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 2, p. 251–258, 2011.
- PAIVA, L. A. F. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 2003.
- PAL, S.; GAURI, S. K. A desirability functions-based approach for simultaneous

optimization of quantitative and ordinal response variables in industrial processes. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 76–87, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4314/ijest.v10i1.6>>.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>>.

PELLISSARI, F. M. *et al.* Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.011>>.

PIERI, F. A. *et al.* Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 578–585, 2010.

PIERI, F.A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PIERI, FÁBIO ALESSANDRO *et al.* Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 36–38, 2012.

POLITIS, S. N. *et al.* Design of experiments ( DoE ) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy I**, v. 43, p. 889–901, 2017.

RADTKE, M.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Nanostructured lipid carriers: A novel generation of solid lipid drug carriers. **Pharmaceutical Technology Europe**, v. 17, n. 4, p. 45–50, 2005.

RIVITTI, E. A. Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti. 2014.

ROCO, M. C. The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 2, p. 427–445, 2011.

ROGERIO, A. P. *et al.* Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene  $\alpha$ -humulene in experimental airways allergic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 1074–1087, 2009.

SACHETTI, C. G. *et al.* Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1080–1085, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.015>>.

SALA, M. *et al.* Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of

- skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.046>>.
- SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S. Nanotecnologia Aplicada a Polímeros. São Paulo, 2022.
- SANGSHETTI, J. N. *et al.* Quality by design approach: Regulatory need. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3412–S3425, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.025>>.
- SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.
- SANTOS, R. C. V. *et al.* Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 265–268, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.002>>.
- SHAH, B. *et al.* Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 78, p. 54–66, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.002>>.
- SILVA, S. *et al.* Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium bergamia*, and *Copaifera officinalis* Alone and in Combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.
- SOUSA, J. P. B. *et al.* Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653–659, 2011.
- SUBRAMANIAM, B.; SIDDIK, Z. H.; NAGOOR, N. H. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 22, n. 6, 2020.
- SUNDBERG, J. P. *et al.* Skin and Adnexa. Comparative Anatomy and Histology. First Edit ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012. p. 433–455. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00023-8>>.
- SURESH, S.; BECKER, A.; GLASMACHER, B. Impact of apparatus orientation and gravity in electrospinning—a review of empirical evidence. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 1–15, 2020.
- SVETLICHNY, G. *et al.* Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin:



Development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Pharmazie**, v. 70, n. 3, p. 155–164, 2015.

TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G. M. in-Vitro Antimicrobial Activity of Edible Oils Against Human Pathogens Causing Skin Infections. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 10, p. 4493, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5>>.

TEIXEIRA, F. B. *et al.* Copaiba oil-resin ( *Copaifera reticulata* Ducke ) modulates the inflammation in a model of injury to rats ' tongues. p. 1–8, 2017.

TINCUSI, B. M. *et al.* Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 808–812, 2002.

TOBOUTI, P. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93–99, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.092>>.

TRINDADE, R.; SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the neotropics: A review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1–33, 2018.

TUNG, Y. T. *et al.* Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3908–3913, 2008.

VALLERAND, I. A. *et al.* Efficacy and adverse events of oral isotretinoin for acne: a systematic review. **British Association of Dermatologists**, v. 178, n. 1, p. 76–85, 2018.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VIEIRA, R. *et al.* Sucupira Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Lipid Screening, Factorial Design, Release Profile, and Cytotoxicity. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 1–22, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25030685>>.

VYAS, A.; SONKER, A. K.; GIDWANI, B. Carrier-based drug delivery system for treatment of acne. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 276260, p. 1–14, 2014. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L372626846%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1155/2014/276260%5Cnhttp://sfxhosted.exlibrisgroup.com/dal?sfxurl=http://dx.doi.org/10.1155/2014/276260&atitle=Carrier-based+drug+delivery+s>>.

WILLIAMS, H. C.; DELLAVALLE, R. P.; GARNER, S. Acne vulgaris. **The Lancet**, v. 379, n. 9813, p. 361–372, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60321-](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60321-)

8>.

WOO, J. O. *et al.* Development of a controlled release of salicylic acid loaded stearic acid-oleic acid nanoparticles in cream for topical delivery. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

WU, C. *et al.* Multifunctional nanostructured materials for next generation photovoltaics. **Nano Energy**, v. 70, n. October 2019, p. 104480, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2020.104480>>.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Copaiba Oil and Its Medicinal Properties: a Bibliographical Review. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137–146, 2012a. Disponível em <<http://www.cesumar.com.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudpesq/article/viewArticle/2082>>.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Mediciniais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137–146, 2012b. Disponível em: <<http://www.cesumar.com.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudpesq/article/viewArticle/2082>>.

YANG, C. C.; COTSARELIS, G. Review of hair follicle dermal cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, n. 1, p. 2–11, 2010.

YANG, X. *et al.* Amphiphilic polysaccharides as building blocks for self-assembled nanosystems: molecular design and application in cancer and inflammatory diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p. 114–144, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.033>>.

YU, L. X. *et al.* Understanding pharmaceutical quality by design. **AAPS Journal**, v. 16, n. 4, p. 771–783, 2014.

ZAMMIT, M. Photosensitivity: light, sun and pharmacy. **Journal of The Malta College of Pharmacy Practice**, n. 16, p. 12–17, 2010.

ZHANG, L.; MAO, S. Application of quality by design in the current drug development. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>>.

## CAPITULO 1

### DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA

#### 1 INTRODUÇÃO

O óleo de copaíba (OC) é conhecido por sua composição rica em sesquiterpenos e diterpenos, os quais o competem diversas propriedades medicinais (LEANDRO *et al.*, 2012). Este pode ser extraído sustentavelmente a partir do tronco das árvores do gênero *Copaifera*. A disposição dos sesquiterpenos (óleo essencial) e diterpenos (resina) podem apresentar variações no teor de acordo com a espécie. O OC da *C. officinalis* é composta por 10 diterpenos e 38 sesquiterpenos (ARRUDA *et al.*, 2019), sendo estes compostos responsáveis individualmente ou em conjunto, por estas atividades biológicas. Dentre eles,  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpeno que se destaca por sua atividade anti-inflamatória, anestésica e antibacteriana (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010; CHENG *et al.*, 2004; GHELARDINI *et al.*, 2001; GOREN *et al.*, 2011; TUNG *et al.*, 2008). Bem como, o  $\delta$ -cadineno (sesquiterpenos) e os ácidos copálico e hardwickiico (diterpenos), que apresentam atividade antibacteriana (KUBO; MUROI; HIMEJIMA, 1992; MCCHESENEY; CLARK; SILVEIRA, 1991; TINCUSI *et al.*, 2002).

O OC pode ser usado puro ou como componente na preparação de produtos terapêuticos e cosméticos, visto que possui baixa toxicidade (TEIXEIRA *et al.*, 2017). No entanto sua baixa solubilidade em água e a estabilidade de seus compostos podem ser fatores limitantes em abordagens *in vivo* e *in vitro* e aplicações industriais relacionadas a elas (SILVA, L. C. *et al.*, 2020). Por outro lado, a nanocapsulação tem sido considerada uma alternativa para superar limitações como essas. Além de melhorar a biodisponibilidade do óleo ativo, direcionando suas moléculas para locais específicos e controlando sua liberação (FALCÃO *et al.*, 2015; SVETLICHNY *et al.*, 2015).

Os nanocarreadores lipídicos (CLNs) têm sido utilizadas para carreamento de compostos pouco solúveis em água, como óleo vegetais. Uma vez que os óleos são em sua maioria lipofílicos, eles apresentam uma boa miscibilidade com os lípidos sólidos na matriz lipídica, resultando em alta quantidade de óleo que pode ser aprisionada (FALCÃO *et al.*, 2015). Esses carreadores protegem os componentes lábeis e sensíveis do óleo da degradação química, fotoquímica ou oxidativa, devido à imobilização por lípidos sólidos. Outra

característica pretendida pelo uso de CLNs como transportador de óleos vegetais é fornecer um padrão de liberação controlada (LAMMARI *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2020).

Os CLNs são a segunda geração de nanopartículas lipídicas. Esses nanossistemas foram introduzidos para superar as desvantagens das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Compostos por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos (óleos), os CLNs atuam auxiliando a incorporação dos componentes bioativos em sua matriz lipídica sólida em temperatura ambiente. A incorporação de um lipídeo líquido à matriz sólida aumenta as imperfeições no núcleo da matriz sólida e altera o perfil de solubilidade dos compostos ativos, facilitando a incorporação de uma quantidade maior deste em comparação com NLS (KRAMBECK, K. *et al.*, 2020). Além disso, esses sistemas não utilizam solventes orgânicos durante seu processo de produção e possuem alta estabilidade *in vivo*, uma vez que permanecem sólidas mesmo na temperatura corporal (36 a 37,5 °C) (BELOQUI *et al.*, 2016).

Tendo em vista as propriedades do OC, a obtenção de CLNs é uma possibilidade para o desenvolvimento e estudo de novas estruturas lipídicas contendo este óleo que apresenta elevado potencial de inovação. Diante disso, esta primeira etapa do trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de nanocarreadores lipídicos de OC, visando o aproveitamento das propriedades anti-inflamatória e antibacteriana desse óleo como uma possível estratégia para aplicações farmacológicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Para o preparo do carreador lipídico nanoestruturado (CLN), o óleo de copaíba (OC) foi fornecido pela Laszlo (Belo Horizonte, Brasil), os tensoativos Span 80 (monooleato de sorbitano) e Tween 80 (polissorbato 80), adquiridos da Croda Inc (Edison, EUA); e o Capmul® GDB EP/NF, gentilmente cedido pela IMCD Brasil (São Paulo, Brasil).

### 2.2 Delineamento experimental do preparo dos nanocarreadores lipídicos

Para a composição da matriz lipídica dos nanocarreadores, foi utilizado o Capmul® (mono di- e triglicerídeos do ácido berrênico) como lípide sólido e o OC como um bioativo e lípide líquido. Uma mistura 1:3 entre Tween 80 e Span 80 foi utilizada na composição do sistema tensoativo (EHL =12,3) (MIKULCOVÁ *et al.*, 2017, p. 1–15).

Para otimizar as condições de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas, foi utilizado o delineamento do composto central rotacional (DCCR)  $2^3$ , com o total de 20 experimentos, incluindo 6 repetições do ponto central (Tabela 4). As variáveis independentes, total de lípides ( $X_1$ ), proporção de óleo ( $X_2$ ) e total de tensoativo ( $X_3$ ) foram analisadas em três níveis equidistantes de variação e codificadas com -1, 0 e +1, além de dois pontos axiais (-1,68 e +1,68), sendo utilizadas três variáveis de resposta, tamanho (conforme o diâmetro hidrodinâmico) ( $Y_1$ ), índice de polidispersão (IP;  $Y_2$ ) e potencial zeta (PZ;  $Y_3$ ), que foram analisadas em conjunto. As faixas de concentrações utilizadas no estudo foram determinadas em testes preliminares.

**Tabela 4 – Planejamento experimental da composição das formulações de nanocarreadores lipídicos contendo OC, foi utilizado o DCCR 2<sup>3</sup>, com o total de 20 experimentos, incluindo 6 repetições do ponto central.**

<b>Ensaio</b>	<b>Total de lípides</b>		<b>Proporção de óleo</b>		<b>Total de tensoativo</b>	
<b>1</b>	<b>-1,00</b>	3,83%	<b>-1,00</b>	26,07%	<b>-1,00</b>	1,81%
<b>2</b>	<b>-1,00</b>	3,83%	<b>-1,00</b>	26,07%	<b>1,00</b>	4,19%
<b>3</b>	<b>-1,00</b>	3,83%	<b>1,00</b>	43,93%	<b>-1,00</b>	1,81%
<b>4</b>	<b>-1,00</b>	3,83%	<b>1,00</b>	43,93%	<b>1,00</b>	4,19%
<b>5</b>	<b>1,00</b>	12,17%	<b>-1,00</b>	26,07%	<b>-1,00</b>	1,81%
<b>6</b>	<b>1,00</b>	12,17%	<b>-1,00</b>	26,07%	<b>1,00</b>	4,19%
<b>7</b>	<b>1,00</b>	12,17%	<b>1,00</b>	43,93%	<b>-1,00</b>	1,81%
<b>8</b>	<b>1,00</b>	12,17%	<b>1,00</b>	43,93%	<b>1,00</b>	4,19%
<b>9</b>	<b>-1,68</b>	1%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>10</b>	<b>1,68</b>	15%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>11</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>-1,68</b>	20%	<b>0,00</b>	3%
<b>12</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>1,68</b>	50%	<b>0,00</b>	3%
<b>13</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>-1,68</b>	1%
<b>14</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>1,68</b>	5%
<b>15</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>16</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>17</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>18</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>19</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%
<b>20</b>	<b>0,00</b>	8%	<b>0,00</b>	35%	<b>0,00</b>	3%

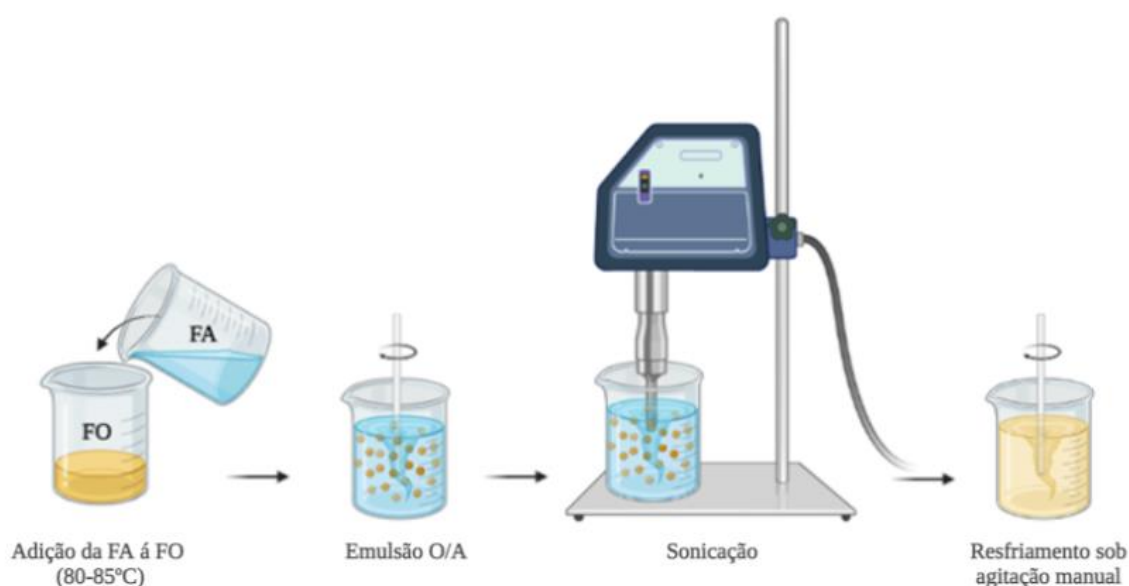
Fonte: Autor. OC = óleo de copaíba, DCCR = delineamento do composto central rotacional.

### 2.3 Preparo dos nanocarreadores lipídicos

Os CLN contendo OC (CLN-OC) foram preparados pelo método de homogeneização a quente associado a ultrassonicação (Figura 17). Inicialmente, a fase oleosa, composta pelos lípides e emulsificantes, foram aquecidos a 80-85 °C, até completa fusão e homogeneização. Em seguida, 15 mL de água recém destilada e previamente aquecida à mesma temperatura foi adicionada sob agitação por 2 minutos. A mistura foi levada a ultrassonicação por sonda de

ultrassom durante 10 minutos em amplitude de 40%. Após este tempo, a formulação foi resfriada sob agitação manual à temperatura ambiente para formação dos nanocarreadores e armazenada sob refrigeração em geladeira. A utilização da sonda ultrassom foi gentilmente cedida pelo laboratório de tecnologia e materiais do ICT.

**Figura 17 – Representação esquemática do processo de preparo dos CLNs: Método de homogeneização a quente associado a ultrassonicação.**



Fonte: Autor. CLN: carreadores lipídicos nanoestruturados; FO: fase oleosa; FA: fase aquosa. O/A: óleo em água.

#### 2.4 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (IP) dos CLN-OC foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), no Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Inglaterra), em 25 °C e ângulo de 173° para incidência do laser. As formulações foram diluídas 10 vezes na fase externa da formulação previamente à leitura. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A utilização do equipamento Zetasizer Nano ZS foi gentilmente cedido pelo laboratório multiusuários do DEFAR-UFVJM.

## 2.5 Potencial Zeta

O potencial zeta (PZ) dos CLN-OC foi determinado pela técnica de DLS associado à mobilidade eletroforética utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Worcestershire, Inglaterra), em ângulo fixo de 173° e temperatura de 25 °C. As formulações foram diluídas 10 vezes na fase externa da formulação previamente à leitura. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). A utilização do equipamento Zetasizer Nano ZS foi gentilmente cedido pelo laboratório multiusuários do DEFAR-UFVJM.

## 2.6 Secagem por liofilização

O procedimento de secagem por liofilização dos CLN-OC e CLN-branco otimizados foi realizado em liofilizador Labconco modelo FreeZone® de 4,5 Litros (Kansas, EUA), com sistema condensador operando em -50 °C, pressão de 0,37 mBar, por 24 horas, disponível do Departamento de Farmácia da UFVJM. As amostras foram dispostas em tubos Falcon de 50 mL e previamente congeladas em banho de nitrogênio por pelo menos 5 minutos. O pó liofilizado das amostras de CLN-OC e CLN-branco otimizadas foi utilizado para as caracterizações dos nanocarreadores.

## 2.7 Caracterização da formulação otimizada

### 2.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Foram obtidos espectros de absorção FTIR (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) dos componentes da formulação e das formulações liofilizadas. A estabilidade térmica do OC foi também analisada por FTIR após exposição a 85 °C por 10 minutos, para verificar possíveis sinais de degradação durante o processo de produção das nanopartículas. Para a análise foi utilizado o espectrofotômetro com transformada de Fourier Varian modelo 640-IR (Santa Clara, United States), equipado com modo de reflectância total atenuada (ATR; Pike Technologies, modelo GladiATR), na região de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras. A utilização do espectrofotômetro foi gentilmente cedida pelo laboratório multiusuários do ICT-UFVJM.



### 2.7.2 Difração de raios X

A análise de DRX foi realizada a partir do difratômetro RXD-6000 (Shimadzu, Quioto, Japão), submetendo as formulações brancas e contendo OC, além do Capmul® à análise direta no equipamento, utilizando-se uma porta amostra de alumínio. Empregou-se a radiação monocromática  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,540560 \text{ \AA}$ ) e  $2\theta$  variando de 10 a 50°, com velocidade de varredura de  $0,06^\circ 2\theta \cdot \text{s}^{-1}$  (3,6 graus/minuto). O equipamento para realização do DRX esteve disponível no departamento de química da UFVJM.

### 2.7.3 Colorimetria

As partículas liofilizadas da CLN-OC otimizada foram submetidas à análise em colorímetro Konica Minolta CM-5 (Tóquio, Japão), com iluminante D65, observador a 10°, em modo de reflectância e sistema de cor CIELab. Através das coordenadas cromáticas foi possível determinar os valores de  $\Delta E^*$ , que indicam o grau de diferença de cor entre as partículas e o OC. Esse parâmetro foi calculado por meio da seguinte equação (Equação 7):

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (7)$$

Onde  $L^*$  é a coordenada de luminosidade,  $a^*$  a coordenadas de cores entre vermelho e verde e  $b^*$  entre o amarelo e azul, da formulação. Os valores de  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$  são os valores das coordenadas cromáticas do OC (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007). O equipamento para realização da colorimetria esteve disponível no departamento de engenharia de alimentos da UFVJM.

### 2.7.4 Conteúdo de umidade

A determinação da umidade dos nanocarreadores liofilizados foi realizada pelo método gravimétrico, mantendo as amostras de CLN-branco, CLN-OC liofilizadas e do OC em estufa de aquecimento, localizada no Departamento de Farmácia da UFVJM, à temperatura de 105 °C até atingir peso constante (ANVISA, 2019).

### 2.7.5 Atividade de água

A atividade de água ( $a_w$ ) foi determinada por leitura direta dos nanocarreadores liofilizados no equipamento Aqualab, modelo 4TE (Washington, EUA), localizado no departamento de engenharia de alimentos da UFVJM. As análises foram realizadas em triplicata e foram determinados média  $\pm$  DP (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007). O equipamento para realização da atividade de água esteve disponível no departamento de engenharia de alimentos da UFVJM.

### 2.7.6 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH da dispersão aquosa de nanocarreadores lipídicos contendo ou não óleo de copaíba foi aferido com auxílio de pHmetro de bancada mPA-210 (Tecnoyon, São Paulo, Brasil), disponível no departamento de farmácia da UFVJM.

## 2.8 Estabilidade

A fim de avaliar a estabilidade físico-química da dispersão dos nanocarreadores, três frascos de CLN foram armazenados protegidos da luz e conservados em temperatura de 8 °C por 90 dias. Em intervalos de 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, uma alíquota foi retirada e os seguintes parâmetros foram avaliados: tamanho da partícula, IP, PZ e pH. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP.

## 2.9 Delineamento estatístico dos nanocarreadores lipídicos

A influência dos componentes da formulação dos CLNs em suas propriedades, foram avaliados por um modelo de segunda ordem (Equação 8), com o objetivo de as variáveis respostas:

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_i^2 X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (8)$$

Onde  $Y_i$  é a variável dependente,  $X_i$  e  $X_j$  são variáveis independentes codificadas,  $\beta_0$  é a constante,  $\beta_i$  é coeficiente linear,  $\beta_i^2$  é coeficiente quadrático e  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação (PELISSARI et al., 2013).

A análise estatística dos dados experimentais e da metodologia de superfície resposta foi realizada pelo *software* Statistica 7.0 (StatSoftInc, Oklahoma, USA). Os valores ótimos para a composição da nanopartícula e da nanofibra foram obtidos pela função desejabilidade, uma análise multi-resposta, conforme proposto por Derringer and Suich (1980). Este método envolve a transformação de cada variável de resposta ( $Y_i$ ) para uma função individual de desejabilidade ( $d_i$ ) (Equação 9); a escala de desejabilidade varia de 0 a 1. Se a resposta estivesse fora de uma região aceitável, ela era definida como  $d_i = 0$ ; se a resposta fosse totalmente desejável (em seu objetivo ou alvo), ela era definida como  $d_i = 1$ .

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}} \quad (9)$$

Onde,  $Y_{min}$  é o valor mínimo e  $Y_{max}$  é o valor máximo da variável resposta.

As funções de desejabilidade individuais das respostas preditivas são então combinadas, para obter a desejabilidade global ( $D$ ), definida como a média geométrica dos desejos individuais (DERRINGER; SUICH, 1980; PELISSARI *et al.*, 2013).

Valores de médias e desvios-padrão (DP) foram calculados em todas as etapas dos experimentos e o *software* utilizado no tratamento dos dados foi o GraphPad Prism 6.0. O estudo estatístico foi realizado por meio de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido de teste Tukey ao nível de 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Influência dos parâmetros da formulação no tamanho, IP e PZ das nanopartículas

Nanocarreadores lipídicos são sistemas capazes de incorporar bioativos pouco solúveis visando aumentar sua biodisponibilidade e protegê-los contra a degradação. Há uma série de atributos físicos desses nanocarreadores baseados em lipídios que determinam sua segurança, estabilidade, eficácia, bem como seu comportamento. Estes incluem o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão (IP), que é uma indicação do grau de uniformidade da distribuição dos tamanhos, e o potencial zeta (PZ), que se trata de um parâmetro relacionado às cargas das partículas e que fornece previsões da estabilidade física de armazenamento do nanocarreador (DANAEI et al., 2018; GHATE et al., 2016).

Foram preparadas as 20 formulações de CLN-OC conforme determinado pelo planejamento fatorial  $2^3$ , em relação aos parâmetros de formulação pré-determinados. As variáveis respostas analisadas de acordo com o desenho experimental foram o tamanho médio das nanopartículas (diâmetro hidrodinâmico), IP e PZ (Tabela 5).

**Tabela 5 – Matriz do DCCR contendo as variáveis independentes codificadas e reais ( $X_1$  = total de lípidos,  $X_2$  = proporção de óleo,  $X_3$  = total de tensoativo), os valores de tamanho e IP obtidos como variáveis respostas.**

Ensaio	Variáveis independentes			Tamanho (nm)	IP	PZ (mV)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$			
1	-1,00(3,83)	-1,00(26,07)	-1,00(1,81)	246±0,6	0,35±0,05	-17,7±0,5
2	-1,00(3,83)	-1,00(26,07)	1,00(4,19)	115±2,1	0,32±0,04	-15,8±0,1
3	-1,00(3,83)	1,00(43,93)	-1,00(1,81)	200±2,5	0,25±0,01	-17,0±0,4
4	-1,00(3,83)	1,00(43,93)	1,00(4,19)	154±0,3	0,24±0,00	-21,3±0,2
5	1,00(12,17)	-1,00(26,07)	-1,00(1,81)	549±2,0	0,38±0,01	-19,6±0,6
6	1,00(12,17)	-1,00(26,07)	1,00(4,19)	373±3,0	0,32±0,04	-14,8±0,6
7	1,00(12,17)	1,00(43,93)	-1,00(1,81)	544±4,1	0,43±0,28	-3,4±0,4
8	1,00(12,17)	1,00(43,93)	1,00(4,19)	393±3,1	0,26±0,01	-8,2±0,5
9	-1,68(1,00)	0,00(35,00)	0,00(3)	67±0,7	0,44±0,00	-5,5±20,5

<b>10</b>	1,68(15,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	557±2,7	0,34±0,04	-5,1±0,1
<b>11</b>	0,00(8,00)	-1,68(20,00)	0,00(3,00)	362±1,1	0,39±0,01	-15,1±0,5
<b>12</b>	0,00(8,00)	1,68(50,00)	0,00(3,00)	289±6,1	0,26±0,00	-14,4±0,3
<b>13</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	-1,68(1,00)	575±0,5	0,32±0,03	-7,8±0,5
<b>14</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	1,68(5,00)	274±6,0	0,30±0,01	-12,6±0,5
<b>15</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	347±2,8	0,28±0,01	-13,5±0,3
<b>16</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	305±3,1	0,27±0,01	-14,7±0,2
<b>17</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	304±2,1	0,27±0,00	-13,9±0,5
<b>18</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	330±2,6	0,30±0,03	-14,3±0,1
<b>19</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	327±6,2	0,28±0,01	-11,2±0,6
<b>20</b>	0,00(8,00)	0,00(35,00)	0,00(3,00)	344±2,2	0,29±0,01	-12,6±0,4

Fonte: Autor. DCCR = delineamento composto central rotacional, X<sub>1</sub> = total de lípides, X<sub>2</sub> = proporção de óleo, X<sub>3</sub> = total de tensoativo, IP = índice de polidispersão e PZ = potencial zeta. Apresentação: nível de variação (percentual); média da triplicata ± desvio padrão.

Nanocarreadores utilizados para entrega de ativos variam em tamanho de 1 a 1000 nm. O tamanho ideal de partícula de nanocarreadores para a penetração folicular está na faixa de 400 a 700 nm, no entanto quanto menor o tamanho melhor será a penetração cutânea e retenção da formulação na unidade polissebácia da pele (PATEL e PRABHU, 2020). Os resultados obtidos para o tamanho médio das formulações variaram entre 67 e 575 nm (Tabela 5), todos dentro do tamanho indicado para aplicação tópica. Os valores obtidos para o tamanho das partículas estão diretamente relacionados a composição das formulações de cada ensaios. O aumento de total de lípides e a redução do total de tensoativos tende aumentar o tamanho da partícula, o que pode ser observado nos ensaios 10 e 13, respectivamente (Tabela 5). Em contrapartida, o ensaio 9 obteve o menor valor de para tamanho, sendo sua formulação com apenas 1% de total de lípides e 3% de total de tensoativos. Além disso, possui 35% de proporção de óleo, o que auxilia na redução significativa do tamanho, pois a adição de lípides líquidos reduz a viscosidade do meio (BAŞARAN *et al.*, 2010; DANAEI *et al.*, 2018; HEJRI *et al.*, 2013; LAKSHMI; KUMAR, 2010; RAPALLI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2013).

Para o índice de polidispersão (IP) os resultados variaram entre 0,24 e 0,44, em sua maioria monodispersos. No caso do índice de polidispersão, nanocarreadores visando liberação de fármacos devem ter valores de IP iguais ou inferiores a 0,3 indicando distribuição de tamanho estreita e monodispersa. O IP tem um efeito importante na estabilidade física das suspensões. Uma distribuição homogênea (ou monodispersa) favorece a estabilidade física

das nanopartículas por desacelerar os fenômenos de agregação. Em contrapartida, valores maiores que 0,5 indicam uma distribuição muito ampla de tamanhos, o que não foi observado em nenhuma formulação de nanopartículas neste trabalho. Os resultados indicam que o ensaio 4 é a formulação mais monodispersa entre as 20, entretanto todos os sistemas de nanopartículas obtidos são consideravelmente monodispersos (DANAEI *et al.*, 2018; LAKSHMI; KUMAR, 2010; TAMJIDI *et al.*, 2013).

O potencial zeta é uma medida indireta da estabilidade física dos CLN e ainda influencia a cinética de liberação e o destino biológico das nanopartículas. Nanopartículas com potencial zeta entre -10 e +10 mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto nanopartículas com potenciais zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV são consideradas fortemente catiônicas e fortemente aniônicas, respectivamente. O PZ dos nanocarreadores deste delineamento experimental variou entre -21,3 e -3,4 mV, apresentando caráter aniônico (CLOGSTON; PATRI, 2011; DANAEI *et al.*, 2018; HEURTAULT *et al.*, 2003; PATEL; PRABHU, 2020; RAPALLI *et al.*, 2020).

Todos os dados obtidos (Tabela 5) foram então submetidos à análise estatística, incluindo adequação à equação (Equação 8), seguida de uma análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 90%. Somente os parâmetros estatisticamente significativos foram utilizados para análise do comportamento dos modelos matemáticos ajustados. Através da ANOVA, foi possível determinar os coeficientes de regressão para a equação polinomial de segunda ordem codificada, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), os valores F e p-valores (Tabela 6). Finalmente, para determinar se as equações ajustadas são preditivas, elas devem satisfazer um determinado critério baseado nos valores de  $F_{teste}$ , que por sua vez depende da razão das regressões relacionadas aos resíduos ( $F_{calculado} / F_{listado}$ ) (Tabela 6). O critério é que, o modelo matemático é considerado preditivo quando o valor de  $F_{teste}$  é maior 3 (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

**Tabela 6 – Resultados dos coeficientes de regressão da equação ajustada e da ANOVA para as variáveis resposta: tamanho, IP e PZ.**

Parâmetro	Coeficiente	Tamanho	IP	PZ
		Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
Linear	$\beta_0$	312,6937	0,293044	-14,2620
		(0,000000)	(0,000000)	(0,000000)
X <sub>1</sub>	$\beta_1$	144,1092	-	1,9384

		(0,000000)		(0,080121)
<b>X<sub>2</sub></b>	<b><math>\beta_2</math></b>	-	-0,029921 (0,014203)	-
<b>X<sub>3</sub></b>	<b><math>\beta_3</math></b>	-73,9716 (0,000000)	-0,022233 (0,078747)	-
<b>Quadrático</b>				
<b>X<sub>1</sub></b>	<b><math>\beta_1^2</math></b>	-	0,031421 (0,014203)	1,9581 (0,068101)
<b>X<sub>2</sub></b>	<b><math>\beta_2^2</math></b>	-	-	-
<b>X<sub>3</sub></b>	<b><math>\beta_3^2</math></b>	29,3718 (0,003976)	-	-
<b>Interação</b>				
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	<b><math>\beta_{12}</math></b>	-	-	3,4500 (0,021612)
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	<b><math>\beta_{13}</math></b>	-	-	-
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	<b><math>\beta_{23}</math></b>	-	-	-
<b>F<sub>calculado</sub></b>	-	110,33	5,83	4,60
<b>F<sub>listado</sub></b>	-	2,46	2,46	2,46
<b>F<sub>teste</sub> =</b>	-	69,87	2,37	1,87
<b>F<sub>calculado</sub>/F<sub>listado</sub></b>	-			
<b>p-valor</b>		6,68 x 10 <sup>-11</sup>	6,88 x 10 <sup>-3</sup>	1,67 x 10 <sup>-2</sup>
<b>R<sup>2</sup></b>		0,95	0,52	0,46

Fonte: Autor. X<sub>1</sub> = total de lípides, X<sub>2</sub> = proporção de óleo, X<sub>3</sub> = total de tensoativo, Y<sub>1</sub> = tamanho, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação, Y<sub>2</sub> = IP = índice de polidispersão, Y<sub>3</sub> = PZ = potencial zeta e p-valor = p-valor da equação. Os dados estão apresentados como coeficiente (p-valor do coeficiente).

### 3.1.1 Efeito sobre o tamanho

Neste estudo, o tamanho da partícula foi a primeira variável resposta a ser avaliada, com o intuito de verificar sua significância diante do modelo ajustado. A equação ajustada para essa variável foi preditiva, uma vez que seu valor de F<sub>teste</sub> foi maior que 3 (Tabela 6). Isso sugere que, para a variável tamanho, o modelo ajustado pode ser considerado adequado, ou seja, significativo e preditivo. Além disso, tem uma regressão significativa, valores

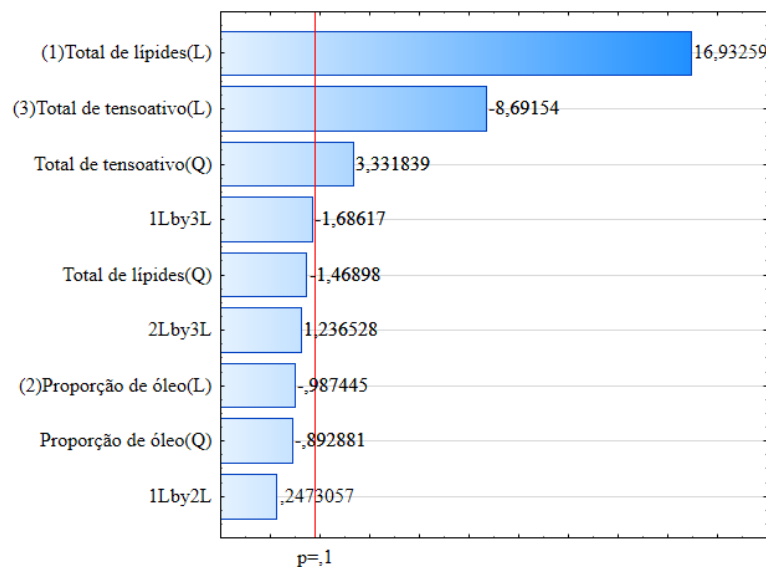
residuais baixos, não falta de ajuste e coeficiente de determinação satisfatório. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é a proporção da variação na resposta de saída que é prevista a partir dos fatores de entrada, ou seja, quanto da resposta de saída (Y) é explicada pelos fatores de entrada (X). Desse modo, a variável tamanho apresentou  $R^2$  igual a 0,95 (Tabela 6), indicando que o modelo explica 95% da variação observada nos dados (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; FUKUDA *et al.*, 2018; KHURI; CORNELL, 1996; PELISSARI *et al.*, 2013).

Assim, confirmada a significância estatística do tamanho, a equação polinomial de segunda ordem para esse parâmetro foi determinada (Equação 10).

$$Y_1 = 312,6937 + 144,1092X_1 - 73,9716X_3 + 29,3718X_3^2 \quad (10)$$

Os gráficos de Pareto são ferramentas úteis para expor de forma clara os fatores de entrada (e suas interseções) em ordem de importância e ainda, descartar os fatores insignificantes. Desde modo, para a variável tamanho, os fatores de entradas significativos são total de lípides linear e total de tensoativo linear e quadrático, nesta ordem (Figura 18) (FUKUDA *et al.*, 2018).

**Figura 18 – Diagrama de Pareto da variável resposta tamanho, correlacionado as variáveis de entrada: total de lípide, total de tensoativos, proporção de óleo (lineares e quadráticas) e a interações entre as mesmas.**

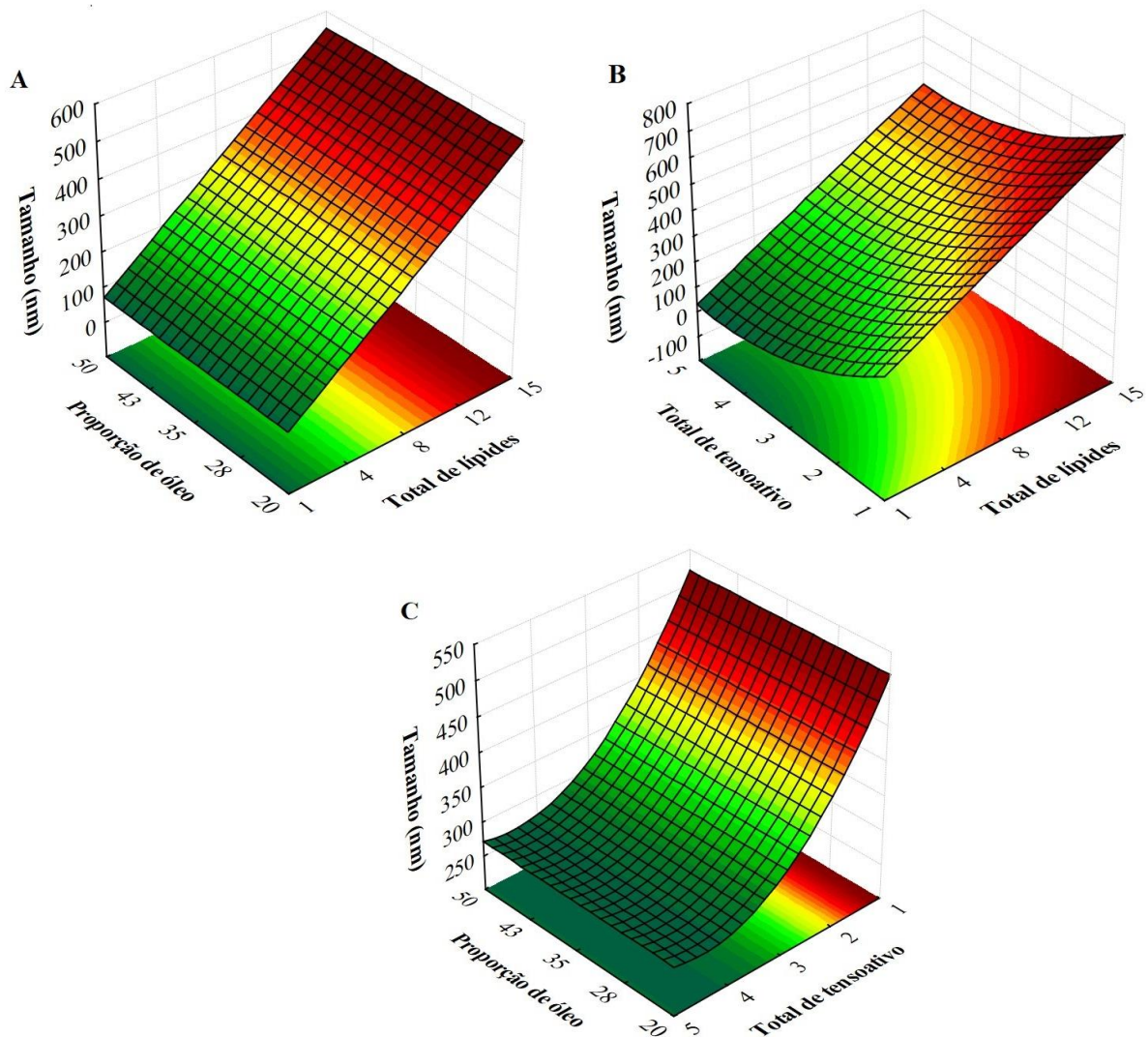


Fonte: Autor. 1Lby3L = interação entre total de lípides e total de tensoativo, 2Lby3L = interação entre proporção de óleo e total de tensoativo, 1Lby2L = total de lípides e proporção de óleo, p = p-valor. L = linear e Q = quadrático.



Uma vez comprovada a preditividade da variável tamanho é possível correlacionar a influência das variações dos fatores de entrada nesta variável, traçando as superfícies respostas tridimensionais (Figura 19).

**Figura 19 – Superfícies resposta do tamanho médio das CLN-OC em função de: (A) Total de lípides e proporção de óleo (tensoativos = 3%); (B) Total de lípides e total de tensoativo (proporção de óleo = 35%); (C) Total de tensoativo e proporção de óleo (total de lípides = 8%).**



Fonte: Autor. CLN-OC = carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de copaíba.

Com o aumento da concentração de lípidos sólidos, o tamanho das nanopartículas tende a aumentar, pelo aumento da viscosidade da dispersão coloidal, o que torna a sua emulsificação mais difícil. Isso explica o aumento do tamanho médio das CLN-OC com o aumento da concentração total de lípides (Figura 19A). Por outro lado, é esperado que o

aumento da proporção de óleo na matriz reduza a viscosidade do meio e, por consequência, reduza o tamanho médio das partículas. Este comportamento não foi observado com a variação da proporção de óleo, no qual o tamanho das CLN-OC não sofreu alteração (Figura 19A e B), uma vez que a variável proporção de óleo não ter apresentado significância estatística no modelo ajustado (Figura 18) (BAŞARAN *et al.*, 2010; HEJRI *et al.*, 2013).

Além disso, o aumento na concentração de tensoativos promoveu uma redução do tamanho das nanopartículas, mantendo (Figura 19C) ou aumentando (Figura 19B) a concentração de total de lípides. Esse comportamento sugere que a concentração crescente de surfactante reduziu a tensão interfacial de maneira mais eficaz e a matriz lipídica se tornou mais rapidamente homogeneizada na fase aquosa durante o preparo, causando a formação de nanopartículas menores. Entretanto, é notório que para concentrações elevadas de total de lípides o aumento do tamanho da partícula independe da maior concentração de total de tensoativos (Figura 19B). Isso ocorre devido a considerável diferença entre a significância da variável total de lípides e total de tensoativos (Figura 18) (ZHANG *et al.*, 2013).

Portanto, para a proporções óleo consideráveis, conforme o teor de bioativos desejado, pode-se reduzir a concentração de lípides e aumentar a proporção de tensoativos, de forma a se obter nanopartículas cada vez menores.

### 3.1.2 Efeito sobre o IP e PZ

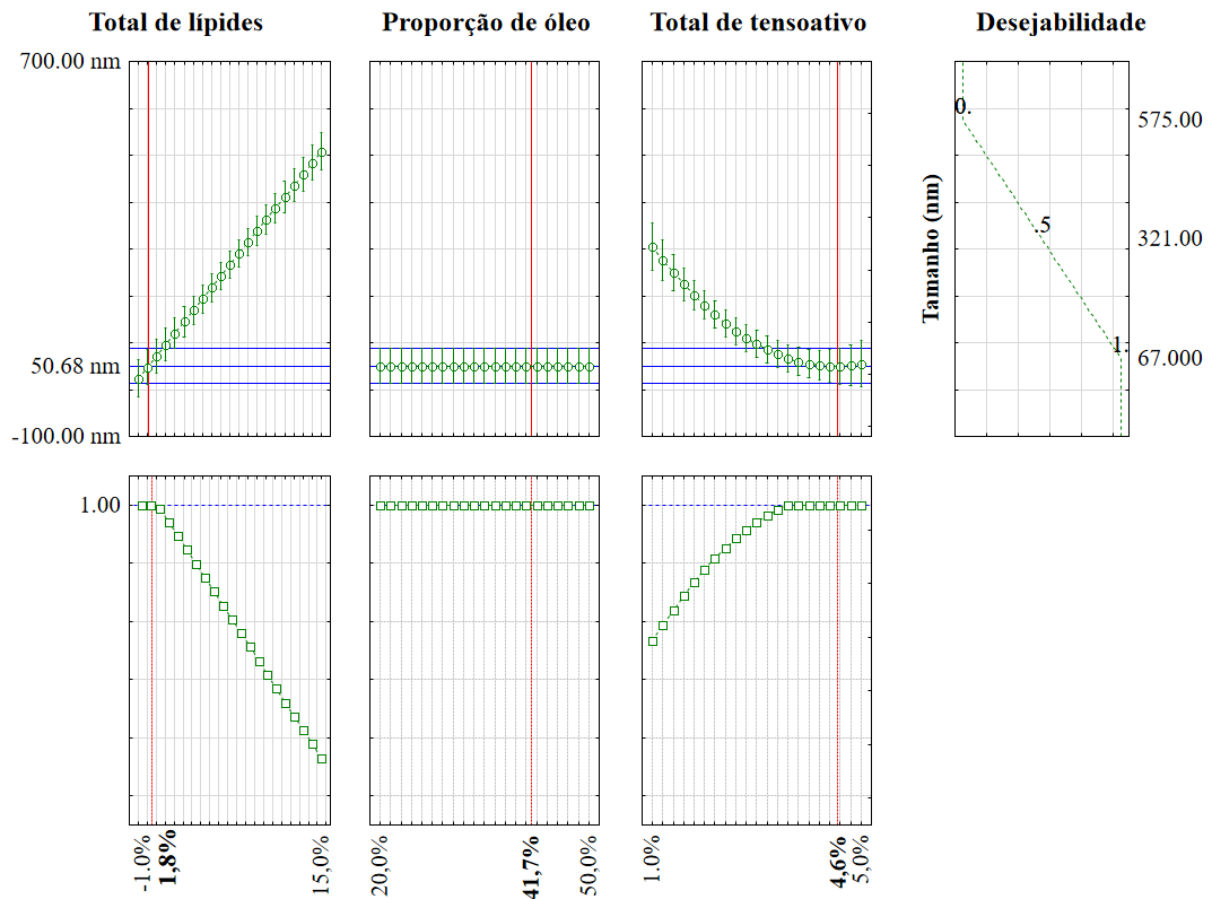
Para o índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta (PZ), as equações ajudadas não foram preditivas visto que seus valores de  $F_{teste}$  são menores que 3 (Tabela 6). O valor de  $F_{teste}$  inferior a 3 prova que o modelo não foi válido para essas variáveis. Como essas propriedades não se correlacionaram com as condições do processo, não foi possível gerar as superfícies de resposta. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para o IP e PZ foram 0,52 e 0,46, respectivamente, indicando que os modelos explicaram apenas 52% e 46% da variação dos dados observados (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; KHURI; CORNELL, 1996; PELISSARI *et al.*, 2013).

### 3.2 Otimização da CLN-OC através da função desejabilidade

A otimização da composição da CLN-OC foi realizada por meio de um método multi-resposta chamado de desejabilidade (BAKHAI DAR *et al.*, 2022; DERRINGER; SUICH, 1980). A otimização foi aplicada apenas para a variável resposta que apresentou modelo

matemático considerado válido, neste caso, o tamanho, e apresenta o perfil de função de desejabilidade para cada uma das variáveis investigadas (Figura 20). Desta forma, as condições ideais para obter o menor valor de tamanho desejável (50,68 nm) de CLN-OC foram: total de lípides = 1,8 % (p/v), proporção de óleo = 41,7 % (p/v) e total de tensoativos = 4,6 % (p/v). Outros trabalhos também utilizam o DCCR e otimização para encontrar condições ideais para carreadores lipídicos nanoestruturados (BAKHAI DAR *et al.*, 2022; MONTEIRO *et al.*, 2017; SOLEIMANIAN *et al.*, 2018; VELMURUGAN; SELVAMUTHUKUMAR, 2016).

**Figura 20 – Otimização das condições de processo para a produção de CLN-OC em função das variáveis de entrada, variáveis respostas previstas e perfil de desejabilidade.**



Fonte: Autor. CLN-OC = carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de copaíba.

A validação experimental foi realizada em triplicata, a partir do preparo da formulação com a composição fornecida a partir da função desejabilidade. O valor esperado e o resultado experimental para a variável resposta tamanho foi de 50,68 nm e 50,06 nm, respectivamente (Tabela 7). Com base no desvio relativo obtido (-1,24 %), a otimização e a metodologia

empregada foram consideradas satisfatórias, bem como o valor experimental alcançado para o tamanho indicando a alta preditividade e as características confiáveis dos modelos ajustados (DARABI *et al.*, 2022).

**Tabela 7 – Validação experimental das condições otimizadas (total de lípides=1,5%, proporção de óleo=41,7% e total de tensoativos = 4,6%) para a produção de CLN-OC.**

<b>Variável resposta</b>	<b>Valor preditivo</b>	<b>Valor experimental</b>	<b>Desvio relativo<sup>a</sup> (%)</b>
Tamanho (nm)	50,68	50,06±1,17	-1,24

Fonte: Autor. <sup>a</sup>Desvio relativo = [(Valor experimental – Valor previsto) / Valor experimental] x 100. CLN-OC: carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de copaíba.

Dentre os fatores de formulação que podem influenciar o processo de penetração folicular, o tamanho da partícula tem efeito significativo na extensão e profundidade do direcionamento do carreador. Partículas de tamanho menor (menor que 200 nm) exibem maior área de superfície o que favorece uma melhor permeação devido ao efeito oclusivo. O tamanho experimental obtido foi menor do que 100 nm, o que favorece as propriedades biofarmacêuticas dos nanocarreadores, como a absorção, a captação celular, a liberação controlada e a biodisponibilidade da substância encapsulada. O uso de CLN tem sido relatado em vários estudos para aplicação tópica, como por exemplo o desenvolvimento de um CLN contendo curcumina. Neste trabalho, o nanocarreador que foi usado para o tratamento de acne mediana e psoríase, obteve de tamanho igual a 95,4 nm e apresentou melhora no direcionamento e retenção do ativo nas camadas da pele. CLNs carregados com ácido azelaico permitiram uma liberação lenta do medicamento, com maior retenção dérmica e diminuição dos efeitos adversos sistêmicos em comparação com o medicamento sozinho. Neste caso, o tamanho encontrado para o CLNs foi de 81,5 nm (DANAEI *et al.*, 2018; GHASEMIYEH *et al.*, 2019; KUMARI *et al.*, 2015; RAPALLI *et al.*, 2020).

### **3.3 Caracterização da CLN-OC otimizada**

#### **3.3.1 Caracterização físico-química**

A determinação das características físico-químicas dos CLN-OC e CLN-branco otimizados em suspensão ocorreu pela obtenção do diâmetro hidrodinâmico médio, IP e PZ (Tabela 8), e permite avaliar a influência da presença do OC no nanocarreador. Apesar de

haver diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), o aumento observado no tamanho das partículas, quando comparado o CLN-OC (50,06 nm) com o CLN-branco (46,84 nm), foi relativamente pequeno, em torno de 4 nm. As formulações não apresentaram elevada polidispersividade, sendo 95% das partículas com tamanho inferior a 50 nm e o restante (5%) não ultrapassou 200 nm (Figura 21). Mesmo não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), o IP do CLN-branco (0,42) foi reduzido pela presença do OC na matriz lipídica (Tabela 8).

O PZ, ou análise de carga superficial, é a determinação do potencial eletrocinético de um sistema coloidal que indica a força eletrostática de repulsão entre as partículas de CLN-OC. O valor PZ fornece a estabilidade da dispersão coloidal entre as nanopartículas. Geralmente, um bom valor de ZP de nanoemulsão é superior a + 30 mV ou inferior a -30 mV, pois as partículas formuladas teriam força repulsiva adequada, menor agregação devido à repulsão eletrostática e, assim, levando a uma melhor estabilidade (NORDIN *et al.*, 2018). No entanto, vários experimentos demonstraram que não apenas repulsão eletrostática, mas também o uso de estabilizadores estéricos durante a preparação de nanopartículas determina a estabilidade de uma dispersão de nanopartículas (RAHMAN *et al.*, 2013). Embora o PZ obtido para CLN-OC (-4,76) para o CLN-branco (-7,43) seja de caráter neutro relativamente baixo, a estabilidade foi avaliada no período de 90 dias a partir do preparo da formulação.

O pH de ambas as formulações se permaneceram próximos (Tabela 8) e levemente ácido, o que pode ser causado pela presença do Capmul<sup>®</sup> e do OC, que possuem em sua composição ácidos graxos livres. Esse parâmetro é importante devido a posterior aplicação tópica das partículas contra a acne vulgaris, que pode ser favorecida a pH mais baixos ( $\approx 5$ ), por potencializar a atividade antibacteriana. Bem como, o controle do pH da formulação pode indicar a estabilidade química dos componentes (CLOGSTON; PATRI, 2011; COLA *et al.*, 2016; DANAEI *et al.*, 2018; LEANDRO *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2013; TAMJIDI *et al.*, 2013).

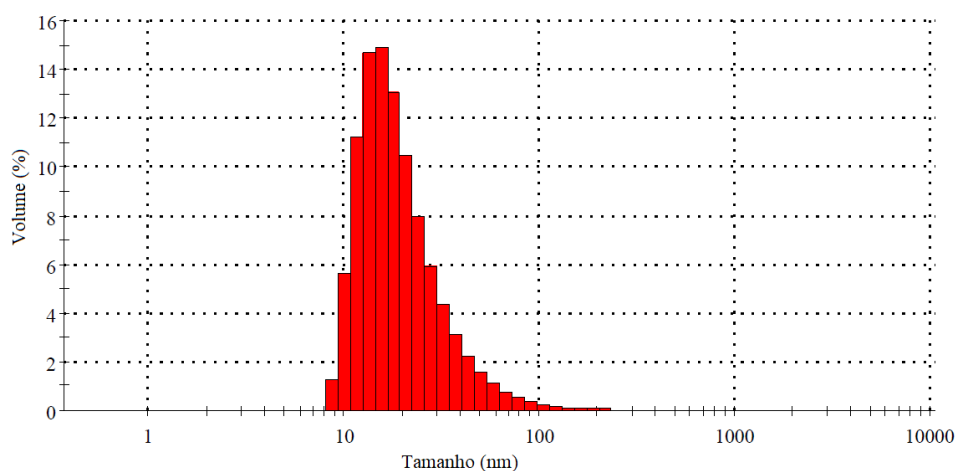
**Tabela 8 – Caracterização das suspensões de formulações otimizadas de nanocarreadores lipídicos contendo ou não óleo de copaíba.**

Parâmetro	CLN-branco	CLN-OC
Tamanho (nm)	46,84 ± 0,39	50,06 ± 1,17
IP	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,02
PZ (mV)	-7,43 ± 0,27	-4,76 ± 1,04

pH	4,52 ± 0,00	4,30 ± 0,06
----	-------------	-------------

Fonte: Autor. CLN branco: nanocarreador lipídico sem óleo de copaíba, CLN-OC: nanocarreador lipídico contendo óleo de copaíba, IP: índice de polidispersão, PZ: potencial zeta. Apresentação: média da triplicata ± desvio padrão.

**Figura 21 – Representação gráfica da distribuição de tamanho das partículas do CLN-OC.**



Fonte: Autor.

### 3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

O método de obtenção dos nanocarreadores lipídicos envolve a etapa de fusão do lípido sólido e emulsificação, que ocorre a 85 °C. Para avaliar a manutenção da qualidade do OC no preparo das formulações, uma alíquota de óleo foi aquecida até a temperatura de processo e submetida a análise direta no FTIR. A sobreposição dos espectros do OC antes e após o aquecimento (Figura 22a), obteve um alto valor do coeficiente de correlação dos espectros ( $r = 0,9995$ ), sendo possível afirmar que o aquecimento até a temperatura de 85 °C não alterou as características químicas do óleo, visto que os espectros apresentaram o mesmo perfil e uma correlação muito próxima ao valor de 1.

Os espectros de absorção no infravermelho para os componentes das formulações foram realizados (Figura 22b). O OC é constituído majoritariamente por sesquiterpenos e diterpenos que possuem em sua estrutura química, ácidos carboxílicos e olefinas. As bandas de estiramento correspondente as ligações duplas (C=C) presentes nas olefinas estão representadas pelas bandas em 1446  $\text{cm}^{-1}$  e entre 690 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , onde também são representadas as ligações C=C—H presentes nos anéis aromáticos. As bandas de absorção

observadas em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas ao grupo funcional C—H ( $\text{sp}^3$ ) presente nos ácidos diterpênicos, e as ligações C=O, presentes no grupo carbonila desses compostos, são representadas pela banda em  $1686\text{ cm}^{-1}$ . A pequena banda observada em meados de  $3010\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao grupo funcional C—H ( $\text{sp}^2$ ). Por último, o estiramento C—O está representado na banda em  $1211\text{ cm}^{-1}$  (LEANDRO *et al.*, 2012; PAVIA *et al.*, 2010).

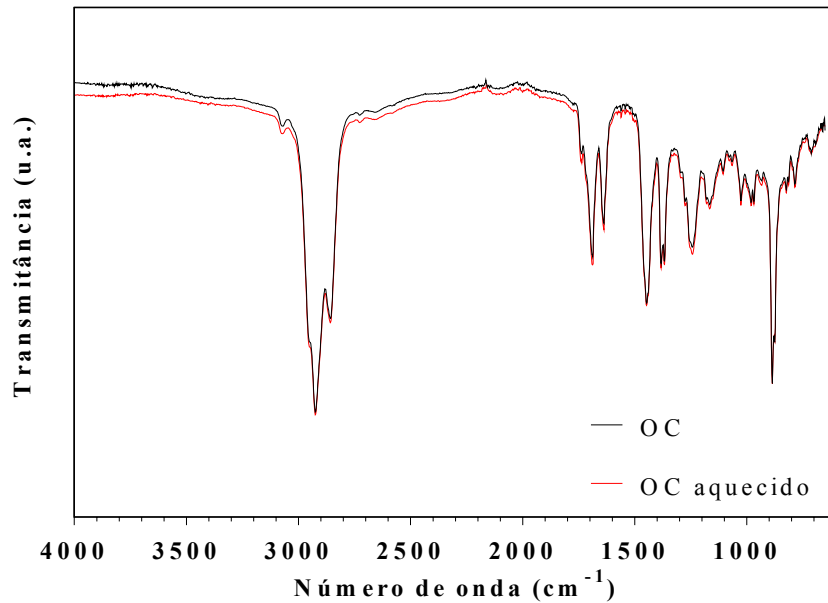
O Capmul<sup>®</sup> é uma mistura de ésteres mono e dissustituídos do ácido cáprico com glicerol. Desta forma, esse composto revelou banda de absorção do C=O em  $1735\text{ cm}^{-1}$  e alongamento do C—O em  $1174$  e  $1108\text{ cm}^{-1}$ , característico da carbonila de agrupamentos ácidos, presentes no ácido cáprico. A absorção em  $1460\text{ cm}^{-1}$ , deve-se à vibração do grupo  $\text{CH}_2$ , próximo do grupo carbonila. Os hidrocarbonetos presentes nesse composto também são representados por esta banda. O estiramento da ligação de hidrogênio do grupamento álcool presente no glicerol é representando pela banda larga observada em  $3650$  a  $3350\text{ cm}^{-1}$ . As bandas fracas dispostas entre  $1220$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  representam as ligações C—O—H e o grupo metil. As bandas estreitas apresentadas em  $2920$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$  representam as ligações C—H ( $\text{sp}^3$ ) presentes na estrutura química do Capmul<sup>®</sup>. Por fim, a banda em  $720\text{ cm}^{-1}$  representa a banda de cadeia longa (GURSOY; BENITA, 2004; HIRRI *et al.*, 2016; MÜLLERTZ *et al.*, 2010; PAVIA *et al.*, 2010).

O estiramento C—H estão representados nas bandas de absorção em  $2920$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$  para o Tween 80 e para o Span 80. O alongamento C=O dos grupos éster pode ser observados em  $1735\text{ cm}^{-1}$  para ambos os tensoativos. As ligações C—O—H e o grupo metil são representadas pelas bandas fracas e largas dispostas entre  $1220$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$ . Nesse intervalo, as bandas nas proximidades de  $1300\text{ cm}^{-1}$  representam o grupamento éter (C—O—C) presentes na estrutura química desses compostos. A vibração do estiramento C—O são representadas pela banda em  $1100\text{ cm}^{-1}$  e a presença do grupo alceno na cadeia carbônica dos tensoativos é observada pela banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, assim como no Capmul<sup>®</sup>, a banda em  $720\text{ cm}^{-1}$  representa a banda de cadeia longa (LI *et al.*, 2012; PAVIA *et al.*, 2010).

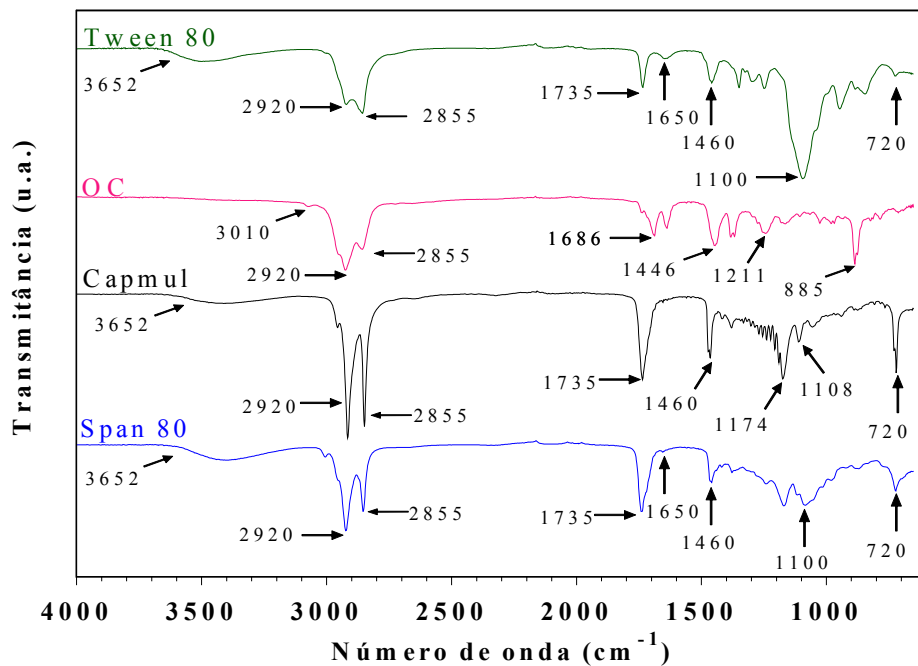
Em relação aos nanocarreadores, os espectros de absorção dos CLN-branco e CLN-OC (Figura 22c) apresentaram perfil muito semelhante entre si ( $r=0,992$ ), podendo-se inferir que provavelmente o OC foi incorporado na matriz lipídica. Exibindo estiramentos com bandas de absorção de C—H em  $2920$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$ , alongamento C=O em  $1735\text{ cm}^{-1}$  e a partir de  $1460\text{ cm}^{-1}$ , referente às vibrações  $\text{CH}_2$ . Não foram observadas alterações nas bandas características do Capmul<sup>®</sup>, quando comparadas aos espectros das formulações, o que pode

indicar a ausência de incompatibilidade entre os componentes dos nanocarreadores e encapsulação satisfatória dos compostos na matriz lipídica.

**Figura 22 – Espectros de absorção por FTIR do óleo de copaíba antes e após aquecimento a 85 °C (a), dos componentes das formulações (b) e das formulações de nanocarreadores contendo ou não OC (c).**

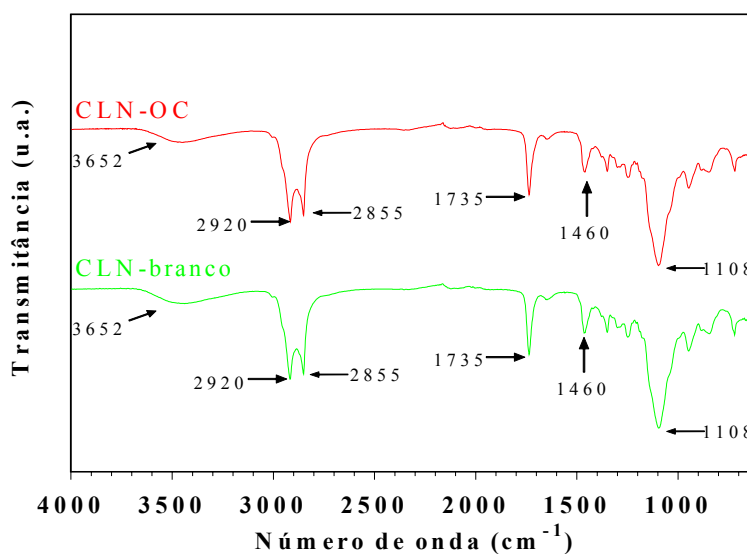


(a)



(b)





(c)

Fonte: Autor. CLN-branco: nanocarreador lipídico sem óleo de copaíba, CLN-OC: nanocarreador lipídico contendo óleo de copaíba, OC; óleo de copaíba.

### 3.3.3 Difração de raios X

Difração de raios-X (DRX) é uma técnica que pode ser usado para identificar o tipo de fase cristalina, grau de cristalinidade e orientação, natureza química do composto e tamanho dos cristalitos. Bandas de difração nítidas e largos são observados para materiais cristalinos e amorfos, respectivamente, com cristalitos menores produzindo bandas de difração mais amplos (MANAIA *et al.*, 2017). O DRX que avalia a forma que os lipídeos sólidos se organizam, seu comportamento de fase e a sua ordenação cristalina. CLNs são compostos de lipídeos sólidos e modificações na cristalinidade podem afetar diretamente sua estabilidade física (YANG *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013).

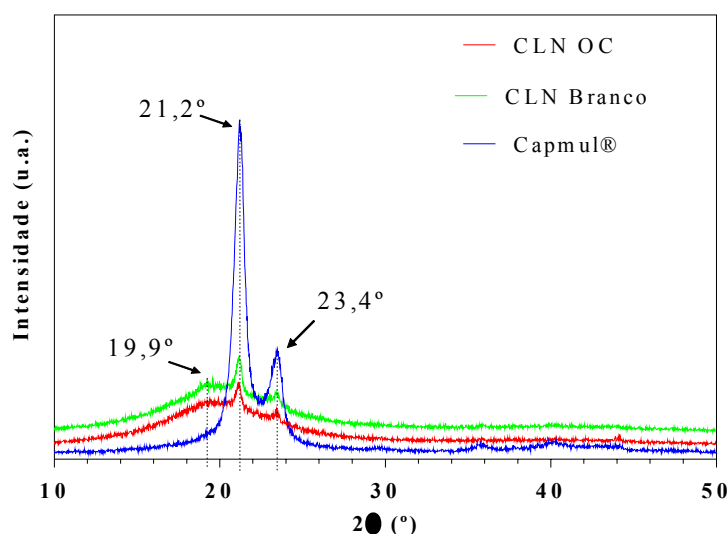
Os cristais lipídicos têm três formas polimórficas principais:  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$ , da menor para a maior estabilidade, respectivamente. A forma polimórfica  $\alpha$  é metaestável, com estrutura hexagonal, e é caracterizada na análise de difração de raios X por um pequeno espaçamento de aproximadamente 4,15 Å (22°). A forma  $\beta'$  tem uma estrutura ortorrômbica com estabilidade e espaçamentos curtos de 3,8 e 4,2 Å (23 a 24°). Os cristais que apresentam forma polimórfica  $\beta$ , de estrutura triclinica, são os mais estáveis, com estrutura ortorrômbica e distância interplanar característica de aproximadamente 4,6 Å (20°). O processo de transição para a forma polimórfica mais estável  $\beta$  resulta em maior ordenamento dos cristais, reduzindo o espaço entre eles, o que pode levar a maior expulsão do composto ativo. A forma  $\beta'$

demonstrou ser a que proporciona melhor acomodação do ativo, devido à organização espacial dos cristais na matriz (HEURTAULT *et al.*, 2003; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; PROCOPIO *et al.*, 2018).

O Capmul® apresenta dois bandas de difração bem definidos em  $2\theta$  próximos a  $21,2^\circ$  e  $23,4^\circ$ , característico da sua natureza cristalina construída por empacotamento de subcamada triclinico, forma polimórfica  $\beta'$  (Figura 23) (KUMAR; RANDHAWA, 2013; SHAH; SERAJUDDIN, 2012; ZHENG *et al.*, 2013). Uma menor intensidade dessas bandas em comparação com o Capmul® pode indicar a presença de uma trama lipídica menos ordenada (TAMJIDI *et al.*, 2013).

Nos espectros dos CLNs branco e contendo OC foi observada uma redução na intensidade das bandas de difração principais referente ao lipídeo sólido presente na formulação. De acordo com Tamjidi *et al.* (2013), essa redução pode ser atribuída a uma menor ordenação da matriz lipídica, resultando em uma redução na cristalinidade. Nota-se uma banda de menor intensidade em torno de  $19,9^\circ$  indicando a possível formação de formas  $\beta$ , que evidencia a presença de uma rede cristalina mais ordenada para essas amostras. A transição de forma  $\beta'$  para  $\beta$  pode ter sido favorecida, nas formulações das nanopartículas, devido aos seus componentes, tensoativos e OC, ricos em ácidos graxos insaturados (PROCOPIO *et al.*, 2018).

**Figura 23 – Difratoograma do Capmul® e das amostras de CLN-branco e CLN-OC após liofilização.**



Fonte: Autor. CLN-branco: nanocarreador lipídico sem óleo de copaíba, CLN-OC: nanocarreador lipídico contendo óleo de copaíba.

### 3.3.4 Colorimetria

A análise de cor visa detectar alterações de cor decorrentes de qualquer alteração ocorrida durante o armazenamento das formulações. Essa modificação na coloração pode indicar processos de degradação resultantes de reações de oxidação sofrida pelos lipídeos. O valor de  $L^*$  é uma indicação de luminosidade, resultante da quantidade de luz refletida, que pode variar de 0 (preto) a 100% (branco). As cores são representadas pela coordenada  $a^*$  (conteúdo de vermelho:  $+a^*$ , conteúdo de verde:  $-a^*$ ) e coordenada  $b^*$  (conteúdo de amarelo:  $+b^*$ , conteúdo de azul:  $-b^*$ ) (KRAMBECK *et al.*, 2021). Através do parâmetro  $\Delta E^*$ , pode-se confirmar se houve ou não a mudança efetiva de cor de uma amostra em relação a um padrão. Para o OC livre, observaram-se valores de luminosidade ( $L^*$ ) em  $6,5 \pm 0,1$ , indicativo de mais proximidade com cores escuras, entretanto para os CLN-OC foi observada luminosidade mais clara ( $36,4 \pm 0,1$ ) ( $p < 0,05$ ), justificado pela presença do Capmul® ( $L^* = 95,7 \pm 0,0$ ) em sua composição, um lipídeo sólido de coloração branca. No OC e CLN-OC, foram observadas características da cor no verde ( $a^*$  negativo para ambos,  $p < 0,05$ ) (Tabela 9) e pela coordenada  $b^*$  evidenciou-se a presença de cor predominantemente amarela em ambos, OC ( $0,2 \pm 0,1$ ) e CLN-OC ( $0,4 \pm 0,0$ ) ( $p < 0,05$ ). Comparando as formulações lipídicas contendo ou não OC, ambas apresentam luminosidade de baixa a intermediária, conteúdo verde ( $-a^*$ ) e amarelo ( $+b^*$ ). Por fim, apesar de estatisticamente diferente, o valor de  $\Delta E^*$  da CLN-OC apresentou um pequeno aumento em relação a formulação branco (Tabela 9).

**Tabela 9 – Parâmetros de cor CIE-Lab para os nanocarreadores lipídicos.**

Parâmetro	CLN-OC	CLN-branco	OC	Capmul®
$L^*$	$36,4 \pm 0,1$	$34,7 \pm 0,0$	$6,5 \pm 0,1$	$95,7 \pm 0,0$
$a^*$	$-1,0 \pm 0,01$	$-1,1 \pm 0,0$	$-0,8 \pm 0,1$	$-1,0 \pm 0,0$
$b^*$	$0,4 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,0$
$\Delta E^*$	$29,9 \pm 0,0$	$28,3 \pm 0,1$	-	-

Fonte: Autor. CLN branco: nanocarreador lipídico sem óleo de copaíba, CLN-OC: nanocarreador lipídico contendo óleo de copaíba, OC; óleo de copaíba. Apresentação: média da triplicata  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3.5 Conteúdo de umidade e atividade de água

Como esperado, após a liofilização das formulações, foi encontrado um baixo percentual de umidade no pó liofilizado tanto da CLN-branco quanto da CLN-OC (0,1 % em ambos). A  $a_w$  encontrada foi ideal para redução do processo de oxidação dos lipídeos (Tabela 10) A quantidade de água presente na matriz pode afetar a estabilidade oxidativa dos lipídios. Dados experimentais permitiram verificar que as velocidades mais baixas do processo de oxidação dos lipídios se observam para valores de atividade da água ( $a_w$ ) compreendidos entre 0,2 e 0,3. A velocidade de oxidação aumenta para valores inferiores a 0,2 e muito próximos de zero (estado de desidratação), ou superiores a 0,3 (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

**Tabela 10- Conteúdo de umidade e atividade de água.**

<b>Parâmetro</b>	<b>CLN-OC</b>	<b>CLN-branco</b>
<b>Conteúdo de umidade (%)</b>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
<b>Atividade de água (<math>a_w</math>)</b>	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0

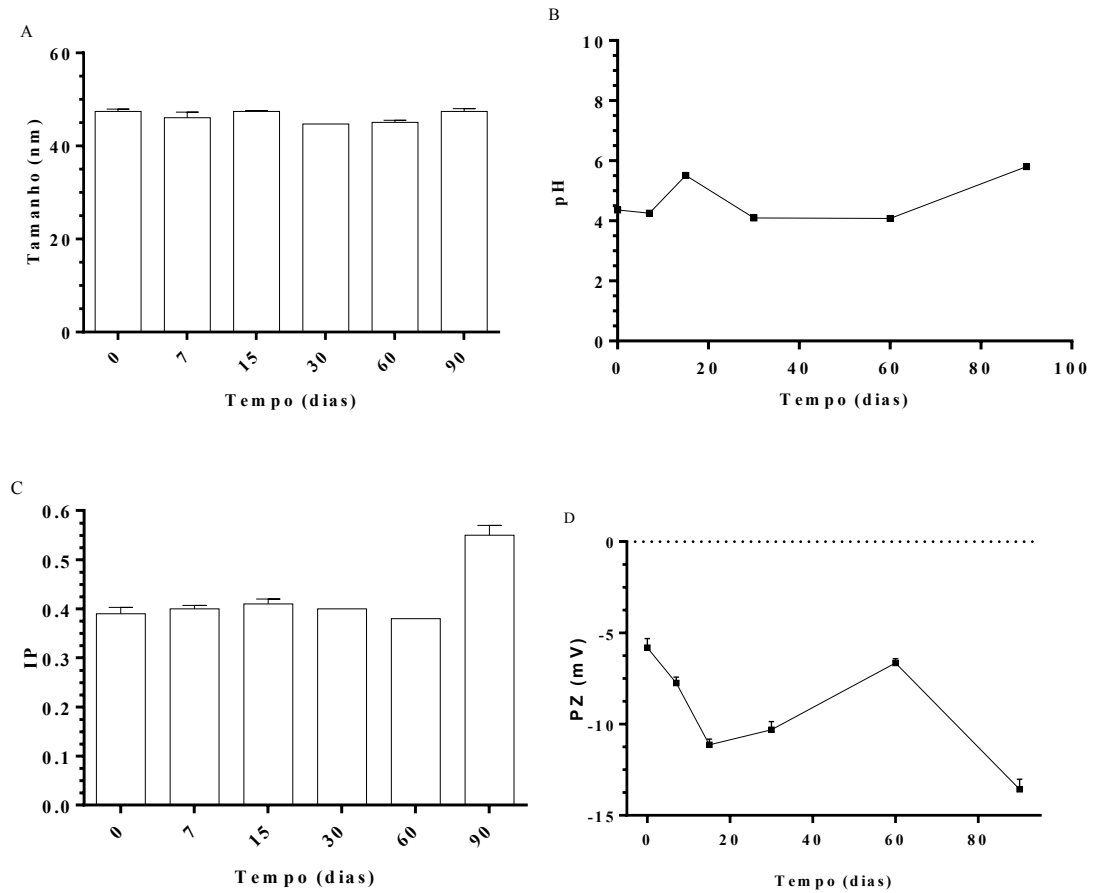
Fonte: Autor. Média da triplicata ± desvio padrão.

### 3.4 Estabilidade

A estabilidade dos CLN-OC, avaliados na forma de dispersão aquosa e armazenados em temperatura de 8 °C, se mostrou constante ao longo de 90 dias em relação a todos os parâmetros avaliados, diâmetro médio, IP, PZ e pH (Figura 24).

O diâmetro ao longo do estudo se manteve abaixo de 50,06 nm e o IP se manteve em torno de 0,39 (Figura 24A e B), indicando que o sistema não é polidisperso. Apesar da variação do PZ ao longo do estudo de estabilidade (Figura 24D), o tamanho das nanopartículas não apresentou variação significativa ( $p < 0.05$ ). Por fim, o pH da formulação se manteve em valores mais baixos ao longo dos 90 dias, variando de 4,25 a 5,80 (Figura 24C).

**Figura 24 – Avaliação da estabilidade dos CLN-OC ao longo de 90 dias, em relação ao diâmetro (A), IP (B), potencial zeta (C) e pH (D), armazenados à 8 °C.**



Fonte: Autor.

## 4 CONCLUSÃO

O DCCR aplicado no desenvolvimento das formulações de CLN-OC apresentou modelo estatisticamente significativo e preditivo para a variável resposta tamanho. Sugerindo que o modelo ajustado prevê o comportamento do tamanho ao se variar a proporção de óleo, total de tensoativo e total de lípidos presentes na composição dos CLN-OC. Como esperado, o aumento da concentração total de lípidos e a redução na concentração de tensoativos provocaram um aumento no tamanho médio dos CLN-OC. A validação experimental da CLN-OC foi satisfatória (DR = -1,24%) e o diâmetro médio obtido foi de  $50,06 \pm 1,17$  nm, comprovando assim alta preditividade e as características confiáveis do modelo ajustado.

Os estudos de características físico-químicas dos CLN-OC, indicam a influência da presença do OC no tamanho da partícula. Bem como, os valores de IP, PZ e pH, inferem um caráter relativamente neutro e uma estabilidade química dos seus componentes. A estabilidade em dispersão aquosa foi estimada para até 90 dias. A análise de FTIR permitiu certificar a manutenção das características do óleo de copaíba, mesmo após o aquecimento inerente ao processo utilizado para obtenção dos nanocarreadores. Os espectros no infravermelho indicam também a ausência de incompatibilidade entre os componentes das formulações e uma encapsulação satisfatória desses componentes na matriz lipídica. A partir da análise dos difratogramas das formulações foi possível averiguar a presença de bandas semelhantes aos do Capmul<sup>®</sup>, mas com intensidade menor, indicando a presença de uma trama lipídica menos ordenada, sugerindo a encapsulação do óleo bioativo.

Dessa forma, este estudo apresenta indícios da incorporação do OC nos nanocarreadores lipídicos, e a aplicação direcionada dessas estruturas se mostrou uma opção viável como alternativa para o tratamento tópico da *Acne vulgaris*.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA, A. N. DE V. S. Farmacopeia Brasileira. 6a Edição - Volume 1. **Anvisa**, v. 1, 2019.
- ARRUDA, C. *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. July 2018, p. 1–20, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.030>>.
- BAKHAI DAR, R. B. *et al.* Development and optimization of a tamsulosin nanostructured lipid carrier loaded with saw palmetto oil and pumpkin seed oil for treatment of benign prostatic hyperplasia. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 2579–2591, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2105448>>.
- BAŞARAN, E. *et al.* Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 1, p. 37–47, 2010.
- BELOQUI, A. *et al.* Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>>.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: An introduction to Design, Data analysis, and Model Building. Wiley ed. New York, 1978.
- CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016>>.
- CHENG, S. S. *et al.* Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 10, p. 1957–1967, 2004.
- CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). [S.l: s.n.], 2011. v. 697. p. 63–70.
- COLA, D. F. *et al.* Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034–1043, 2016.
- DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.
- DARABI, F. *et al.* Anti-CD44 and EGFR Dual-Targeted Solid Lipid Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin to Triple-Negative Breast Cancer Cell Line: Preparation, Statistical Optimization, and in Vitro Characterization. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1–13, 2022.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

- FALCÃO, D. Q. *et al.* Challenges in development of essential oil nanodelivery systems and future prospects. In: NAIK, J. (Org.). **Nano Based Drug Delivery**. Zagreb, Croatia: IAPC Publishing, 2015. p. 557–578.
- FUKUDA, I. M. *et al.* Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–16, 2018.
- GHASEMIYEH, P. *et al.* Cyproterone acetate-loaded nanostructured lipid carriers: effect of particle size on skin penetration and follicular targeting. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 24, n. 7, p. 812–823, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2019.1596133>>.
- GHATE, V. M. *et al.* Nanostructured lipid carriers for the topical delivery of tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 253–261, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.026>>.
- GHELARDINI, C. *et al.* Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. **Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 387–389, 2001.
- GOREN, A. C. *et al.* Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 448–453, 2011.
- GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, n. 3, p. 173–182, 2004.
- HEJRI, A. *et al.* Optimisation of the formulation of  $\beta$ -carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 117–123, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.080>>.
- HEURTAULT, B. *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.
- HIRRI, A. *et al.* Prediction of Polyphenol Fraction in Virgin Olive Oil Using Mid-Infrared Attenuated Total Reflectance Accessory-Mid-Infrared Coupled with Partial Least Squares Regression. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 7, p. 1504–1512, 2016.
- KHURI, A. J.; CORNELL, F. A. Response surfaces: design and analyses. 2nd. ed. New York, 1996.
- KORYCKA, P. *et al.* Effect of electrospinning process variables on the size of polymer fibers and bead-on-string structures established with a  $2^3$  factorial design. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 2466–2478, 2018.



- KRAMBECK, K. *et al.* Lipid nanocarriers containing *Passiflora edulis* seeds oil intended for skin application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. May, p. 1-6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111057>>.
- KRAMBECK, KAROLLINE *et al.* Design and characterization of Nanostructured lipid carriers (NLC) and Nanostructured lipid carrier-based hydrogels containing *Passiflora edulis* seeds oil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 600, n. February, p. 1–11, 2021.
- KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antimicrobial Activity of Green Tea Flavor Components and Their Combination Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 245–248, 1992.
- KUMARI, S. *et al.* Nanostructured Lipid Carriers for Topical Delivery of An Anti-Acne Drug: Characterization and ex vivo Evaluation. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 122–133, 2015.
- LAKSHMI, P.; KUMAR, G. A. Nanosuspension technology: A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. SUPPL. 4, p. 35–40, 2010.
- LAMMARI, N. *et al.* Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 1–34, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538>>.
- LEANDRO, L. M. *et al.* Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866–3889, 2012.
- MANAIA, E. B. *et al.* Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4991–5011, 2017.
- MASLAKCI, N. N. *et al.* Ibuprofen and acetylsalicylic acid loaded electrospun PVP-dextran nanofiber mats for biomedical applications. **Polymer Bulletin**, v. 74, n. 8, p. 3283–3299, 2017.
- MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of croton sonderianus, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1625–1633, 1991.
- MIKULCOVÁ, V. *et al.* Formulation, characterization and properties of hemp seed oil and its emulsions. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 1–15, 2017.
- MONTEIRO, L. M. *et al.* Buparvaquone Nanostructured Lipid Carrier: Development of an Affordable Delivery System for the Treatment of Leishmaniases. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n.

1–2, p. 121–128, 2002.

MÜLLERTZ, A. *et al.* New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1622–1636, 2010.

NORDIN, N. *et al.* Characterization and toxicity of citral incorporated with nanostructured lipid carrier. **PeerJ**, p. 1–17, 2018.

NOTTELET, B. *et al.* Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 89, n. 4, p. 865–875, 2009.

PATEL, R.; PRABHU, P. Nanocarriers as versatile delivery systems for effective management of acne. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 579, n. February, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119140>>.

PAVIA, D. L. *et al.* Introdução à espectroscopia. Washington: [s.n.], 2010.

PELLISSARI, F. M. *et al.* Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.011>>.

PROCOPIO, F. R. *et al.* Solid lipid microparticles loaded with cinnamon oleoresin: Characterization, stability and antimicrobial activity. **Food Research International**, v. 113, p. 351–361, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.026>>.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 386–392, 2007.

RAHMAN, H. S. *et al.* Zerumbone-loaded nanostructured lipid carriers: Preparation, characterization, and antileukemic effect. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2769–2781, 2013.

RAPALLI, V. K. *et al.* Curcumin loaded nanostructured lipid carriers for enhanced skin retained topical delivery: optimization, scale-up, in-vitro characterization and assessment of ex-vivo skin deposition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 152, p. 1–55, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105438>>.

RAVICHANDRAN, R. *et al.* Click chemistry approach for fabricating PVA/gelatin nanofibers for the differentiation of ADSCs to keratinocytes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 12, p. 2863–2871, 2013.

REIS, C. P. *et al.* Development and Evaluation of a Novel Topical Treatment for Acne with

- Azelaic Acid-Loaded Nanoparticles. **Microscopy and Microanalysis**, p. 1–10, 2013.
- SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S. Nanotecnologia Aplicada a Polímeros. São Paulo, 2022.
- SCHEIDT, D. T. Eletrofiação da quitosana e sua aplicação como curativo para feridas. 2018. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2018.
- SHAH, A. V.; SERAJUDDIN, A. T. M. Development of solid self-Emulsifying drug delivery system (SEDDS) I: Use of poloxamer 188 as both solidifying and emulsifying agent for lipids. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 10, p. 2817–2832, 2012.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.
- SILVA, L. C. *et al.* Antifungal activity of Copaíba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 125–134, 2020.
- SOLEIMANIAN, Y. *et al.* Propolis wax nanostructured lipid carrier for delivery of  $\beta$  sitosterol: Effect of formulation variables on physicochemical properties. **Food Chemistry**, v. 260, n. March, p. 97–105, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.145>>.
- SVETLICHNY, G. *et al.* Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: Development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Pharmazie**, v. 70, n. 3, p. 155–164, 2015.
- TAMJIDI, F. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>>.
- TEIXEIRA, F. B. *et al.* Copaiba oil-resin ( *Copaifera reticulata* Ducke ) modulates the inflammation in a model of injury to rats ' tongues. p. 1–8, 2017.
- TINCUSI, B. M. *et al.* Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 808–812, 2002.
- TUNG, Y. T. *et al.* Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3908–3913, 2008.
- UDAYABHASKAR, R. *et al.* Room temperature synthesis and optical studies on Ag and Au mixed nanocomposite polyvinylpyrrolidone polymer films. **Spectrochimica Acta - Part A:**

**Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 99, p. 69–73, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.08.066>>.

UTKARSH *et al.* Towards Analysis and Optimization of Electrospun PVP (Polyvinylpyrrolidone) Nanofibers. **Advances in Polymer Technology**, v. 2020, n. c, p. 1–9, 2020.

UYAR, T.; BESENBACHER, F. Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 4, p. 1032–1037, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.024>>.

VELMURUGAN, R.; SELVAMUTHUKUMAR, S. Development and optimization of ifosfamide nanostructured lipid carriers for oral delivery using response surface methodology. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 6, n. 2, p. 159–173, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13204-015-0434-6>>.

VIEIRA, R. *et al.* Sucupira Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Lipid Screening, Factorial Design, Release Profile, and Cytotoxicity. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 1–22, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25030685>>.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

YANG, X. *et al.* Preparation and characterization of 4-dedimethylamino sancycline (CMT-3) loaded nanostructured lipid carrier (CMT-3/NLC) formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1–2, p. 225–234, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.021>>.

ZHANG, C. *et al.* Preparation and optimization of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery with reduced gastric irritation. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13340–13356, 2013.

ZHENG, K. *et al.* The effect of polymer-surfactant emulsifying agent on the formation and stability of  $\alpha$ -lipoic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 72–78, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.006>>.

## CAPÍTULO 2

### MÉTODO DE BAIXO CUSTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA

#### 1. INTRODUÇÃO

A acne vulgar é uma doença inflamatória crônica que atua nas glândulas sebáceas da pele, causando aumento secreção de sebo (AMER *et al.*, 2019). Muito comum entre os jovens, a acne é caracterizada por comedões, pápulas, pústulas e nódulos, comumente na face, pescoço e costas. Pacientes com acne grave tendem a formar cicatrizes que pode levar à desfiguração facial (ZHENG *et al.*, 2018). As opções terapêuticas para o tratamento envolvem principalmente retinóides, antibióticos e terapia hormonal, cada um atuando contra a doença por mecanismos específicos (CHARNY; CHOI; JAMES, 2017). A aplicação tópica de retinóides é limitada devido à sua baixa estabilidade e irritação local, e os retinóides orais também causam ressecamento da pele e da mucosa. Embora os antibióticos sejam eficazes para a acne, a resistência subsequente aos medicamentos torna-se um grande desafio (ZHENG *et al.*, 2018).

Uma alternativa atual para o tratamento da acne leve e moderada é o ácido salicílico (AS). O AS é um beta-hidroxiácido comumente usado em *peeling* químico, pois atua como queratolítico, anti-inflamatório e reduz a produção de sebo, com efeito comedolítico. Assim, este agente tem sido utilizado no tratamento complementar da acne (KANTIKOSUM *et al.*, 2019). No entanto, AS é pouco solúvel em água, e tende a precipitar em soluções aquosas e alcoólicas de baixo pH, o que limita seu uso na forma de soluções aquosas ou hidrogéis. A recristalização do AS na formulação diminui sua biodisponibilidade e pode aumentar a irritação da pele (LU *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2018).

Formulações tópicas baseadas em nanocarreadores visando atuação direcionada para as unidades pilosebáceas podem reduzir consideravelmente os efeitos adversos dos fármacos encapsulados, como o AS. As nanopartículas lipídicas são nanocarreadores capazes de incorporar esses bioativos de interesse, direcionando-os ao alvo desejado e liberando-os em proporção controlada. Entre as nanopartículas lipídicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são nanoestruturas compostas por uma matriz lipídica contendo uma mistura de lipídios sólidos e líquidos estabilizados por tensoativos, capazes de promover a liberação controlada de moléculas encapsuladas e proteção contra a degradação, enquanto

aumenta a estabilidade a longo prazo (DANAEI *et al.*, 2018; GARCÊS *et al.*, 2018; GHATE *et al.*, 2016; KRAMBECK *et al.*, 2020; MU; HOLM, 2018; PATEL; PRABHU, 2020).

Nos últimos anos, os CLN têm sido amplamente utilizados para encapsulação de óleos vegetais. Como os óleos são principalmente lipofílicos, apresentam uma boa miscibilidade com os lipídios sólidos na matriz lipídica, resultando em uma grande quantidade de óleo encapsulado dentro do nanossistema (FALCÃO *et al.*, 2015). Assim, esses carreadores têm o potencial de proteger os componentes lábeis e sensíveis do óleo contra a degradação química, fotoquímica ou oxidativa, pois, devido à imobilização por lipídios sólidos, os nanocarreadores servem como barreira entre o óleo encapsulado e o meio ambiente. Outra característica pretendida do uso do CLN como carreador de óleos vegetais é proporcionar um padrão de liberação controlada, buscando melhorar sua biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e assim aumentar a adesão do paciente (LAMMARI *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2020).

A oleorresina de copaíba (OC) é um óleo vegetal amplamente utilizado na medicina popular, com indicações para a cicatrização de feridas, atividade inflamatória, antinociceptiva e antimicrobiana, que pode ser encapsulada em CLN para proteger seus componentes. Os principais componentes desta oleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke são os sesquiterpenos  $\alpha$ -copeano (3-4%),  $\beta$ -cariofileno (38-45%),  $\beta$ -elemeno (1-2%), cadineno (2-3%),  $\beta$ -bisaboleno (2-4%),  $\alpha$ -humuleno (5-7%) e ácidos diterpênicos (14-16%). Assim, como a formulação CLN possui óleos em sua constituição, uma estratégia interessante é a utilização de óleos vegetais bioativos como constituintes da matriz, principalmente aqueles de baixa toxicidade, como o OC. Essas formulações também podem ser enriquecidas com outros ativos encapsulados, como o AS, para obter um efeito combinado (ARRUDA *et al.*, 2019; SVETLICHNY *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Um dos principais desafios na pesquisa de novos sistemas de liberação de fármacos é o desenvolvimento de métodos analíticos que permitem não só a dosagem de medicamentos, mas também a sua quantificação inequívoca na presença de excipientes e outros aditivos em as formulações (FERREIRA-NUNES *et al.*, 2019). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que, aliada à detecção ultravioleta-visível (UV-Vis), tornou-se um dos métodos mais utilizados para análise quantitativa de diversos bioativos, devido à sua alta sensibilidade, seletividade e versatilidade. No entanto, HPLC requer preparação preliminar da amostra, como extração com solvente e separação de íons metálicos interferentes, o que torna esta análise mais demorada, de alto custo e que utiliza um equipamento caro, além de necessitar de uma formação específica para os analistas envolvidos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2020).

Essas limitações podem ser superadas com o emprego de técnicas mais simples, como a espectrofotometria de absorção UV-Vis. As determinações espectrofotométricas são simples e acessíveis, precisas, reprodutíveis e de baixo custo, pois não requerem o uso de instrumentos analíticos sofisticados, além de fornecer resultados rápidos, confiáveis e de fácil interpretação. No entanto, como essa técnica pode ter baixa seletividade, esse parâmetro deve ser controlado, principalmente quando o analito está na presença de uma matriz complexa, como é o caso de óleos vegetais (FERREIRA *et al.*, 2020; NALINI; KUMAR, 2020).

Poucos estudos propuseram o uso da espectrofotometria para quantificação direta de AS, incluindo a determinação direta de AS associada a ácido acetilsalicílico (AAS), salicilamida, cafeína e fenacetina em comprimidos, (CLAYTON; THIERS, 1966); determinação de AS em comprimidos de AAS com análise de segunda derivada (KITAMURA; MAJIMA, 1982; KOKOT; BURDA, 1998); em formulações farmacêuticas pela utilização de acetato de cobre (II) como revelador de cor (SAHA; BAKSI, 1985); em uma solução de resorcinol e ácido láctico (solução de Jessner), e em matriz de hidrogel, com análises de primeira e segunda derivada (RAMOS *et al.*, 2005); na associação de AS e dipiridamol em comprimidos, com análise de segunda derivada (EL-RAGEHY *et al.*, 2016). No entanto, não foram encontrados estudos relativos à quantificação espectrofotométrica de AS em nanopartículas lipídicas até o momento. Assim, o objetivo principal dessa etapa deste estudo, descrita neste capítulo, foi desenvolver e validar um método espectrofotométrico para a determinação de AS incorporado em CLN contendo OC, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação nacional e internacional.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

O ácido salicílico foi fornecido pela Xiamen Fine Chemical Import & Export Co. Ltd (Xiamen, China). O oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata Ducke*) foi obtido de Laszlo (Belo Horizonte, Brasil). Os outros componentes das nanopartículas lipídicas foram os tensoativos Span 80 (monooleato de sorbitano) e Tween 80 (polissorbato 80), gentilmente cedidos pela Croda Inc (Edison, EUA); e Capmul<sup>®</sup> GDB EP/NF (mistura de diglicerídeos, principalmente dibehenato de glicerila, juntamente com mono e triglicerídeos), gentilmente cedido por IMCD Brasil (São Paulo, Brasil). Tetrahidrofurano (THF) PA/ACS, utilizado para solubilizar as formulações de nanopartículas, foi fornecido pela Neon Comercial (Suzano, Brasil). O solvente utilizado nos estudos de validação foi etanol absoluto, da Ciclo Farma (São Paulo, Brasil) e Itajá (Goianésia, Brasil); e ácido fosfórico (85% de pureza), da ISOFAR (Rio de Janeiro, Brasil) e Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, Brasil).

### 2.2 Preparação das nanopartículas lipídicas

As formulações de CLN foram preparadas pelo método de emulsificação a quente seguida de ultrassom. Primeiro, a fase oleosa (FO), contendo 500 mg de Capmul<sup>®</sup> GDB (lípidio sólido), 100 mg de Tween 80 + 100 mg Span 80 (mistura de surfactante) e 500 mg de OC (óleo bioativo), foi aquecida a 85°C. Em seguida, a água pré-aquecida à mesma temperatura (quantidade suficiente para 20 mL) de lote foi vertida na FO, agitada por 2 minutos e imediatamente submetida à sonicação de alta intensidade (40% de amplitude) por 10 minutos em uma sonda de ultrassom (sonicador Q55; Qsonica, Church Hill Road, Newton, EUA). Após esse tempo, as formulações foram resfriadas à temperatura ambiente para a formação dos nanocarreadores lipídicos. Os CLN-AS foram preparados incluindo AS na FO e os CLN-branco (CLN sem AS) foram preparados sem a adição de AS no preparo.

### 2.3 Interferência do diluente na quantificação do AS

Para determinar a interferência do diluente na absorvância do AS, três solventes foram avaliados: água destilada, etanol absoluto e uma mistura de etanol absoluto e ácido fosfórico (Et:AF) na proporção de 99:1. As soluções de AS foram preparadas em cada solvente na



concentração nominal de 20,0 µg/mL e a absorvância foi determinada em um Cary 60 UV-Vis espectrofotômetro (Agilent Technologies, EUA) em comprimento de onda variando entre 200 – 400 nm, usando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

## **2.4 Validação do método analítico**

O método espectrofotométrico para a quantificação de AS nos nanocarreadores lipídicos foi desenvolvido e validado de acordo com critérios nacionais e internacionais: RDC 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Diretriz Q2 (R1) do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH, 2005); e os Procedimentos e Métodos Analíticos *Validation for Drugs and Biologics*, da *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA (FDA, 2015) . Assim, foram determinados os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (intra e inter-dias), exatidão e robustez.

### **2.4.1 Seletividade**

Para determinar a seletividade do método, foi obtido o espectro de absorção entre 200 – 400 nm de três preparações na mesma concentração: uma solução de AS e as formulações CLN-AS e CLN-branco, diluídos da mesma forma. A solução de AS foi preparada diretamente no diluente a 20 µg/mL. O CLN-AS foi primeiro solubilizado em THF e depois diluído a 20 µg/mL com o diluente. O CLN-branco foi diluído da mesma forma que o CLN-AS. Uma solução de THF foi preparada no diluente, na mesma concentração em que foi usada na solubilização das nanopartículas, como um controle negativo. Todos os espectros foram sobrepostos e a porcentagem de interferência em um comprimento de onda de 310 nm também foi determinada.

### **2.4.2 Linearidade**

Para a determinação da linearidade, preparou-se uma solução estoque de AS na concentração de 1 mg/mL. A partir dessa solução, foram obtidas 6 diluições independentes em triplicata, variando de 5,0 a 30,0 µg/mL, cuja absorvância foi determinada a 310 nm. A regressão linear foi realizada usando o método dos mínimos quadrados. Testes de desvio de

linearidade e de significância da regressão também foram realizados ( $\alpha = 0,05$ ). A curva analítica foi obtida, sua equação foi determinada e o a significância da inclinação também foi analisada ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados foram avaliados ( $\alpha = 0,05$ ) para a presença de *outliers* (Jackknife residuais), normalidade (teste de Ryan Joiner), homocedasticidade (teste de Levene modificado) e independência residual (teste de Durbin-Watson).

#### 2.4.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração detectável de AS, mas não necessariamente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade de AS que pode ser determinada quantitativamente com confiabilidade adequada. Os valores de LD e LQ foram estimados com base nas curvas analíticas, de acordo com as seguintes equações 11 e 12:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (11)$$

$$LQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (12)$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão residual da linha de regressão e  $S$  é a inclinação da curva de calibração.

#### 2.4.4 Exatidão e precisão

A exatidão do método foi avaliada a partir da recuperação do AS na presença dos demais componentes da matriz lipídica. Quantidades exatas de AS foram então adicionadas ao CLN-branco para obter diferentes níveis de concentração: 5,20; 20,40 e 30,60  $\mu\text{g/mL}$ . O teste foi realizado em triplicata e a porcentagem de recuperação foi determinada através da equação 13:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração medida}}{\text{Concentração nominal}} \times 100 \quad (13)$$

A precisão foi avaliada em dois níveis: intra- e inter-dias. A repetibilidade intra-ensaio foi determinada a partir da análise de seis soluções de AS preparadas no mesmo dia e sob idênticas condições experimentais, na concentração de 20,0  $\mu\text{g/mL}$ . A precisão inter-dias foi determinada a partir da análise de 12 soluções de AS a 20,0  $\mu\text{g/mL}$ , cada grupo de 6 soluções

preparados em dias diferentes e sob condições experimentais idênticas. Todos os resultados foram registrados e o desvio-padrão relativo foi calculado, o qual deve ser inferior a 5% (ANVISA, 2003).

#### 2.4.5 Robustez

A robustez foi determinada usando o método proposto por Youden e Steiner (YOUTEN; STEINER, 1975). Sete parâmetros analíticos foram selecionados e pequenas variações foram induzidas nos valores nominais do método (Tabela 11): o espectrofotômetro utilizado nas medições (A/a), comprimento de onda (B/b), fornecedor de Et (C/c), fornecedor do AF (D/d), razão de solvente (Et:AF) (E/e), temperatura ambiente (F/f) e tempo de leitura (G/g).

Em seguida, os parâmetros foram combinados em 8 testes espectrofotométricos (s a z), conforme a matriz de combinação fatorial (Tabela 11), que foram realizados em ordem aleatória, a fim de determinar a influência de cada parâmetro no resultado final. Uma solução padrão na concentração nominal de 20,0 µg/mL foi preparada e sua absorvância foi determinada em triplicata nas condições expressas em cada combinação. A equação da curva-padrão foi usada para determinar a concentração obtida.

**Tabela 11 – Parâmetros avaliados no ensaio de robustez com suas condições nominais e alternativas. Os ensaios (s a z) foram realizados de acordo com a matriz de combinação fatorial.**

Parâmetro Analítico	Condição Nominal	Condição Alternativa	Combinação fatorial							
			1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Espectrofotômetro</b>	Agilent Cary 60 (A)	Tecnal UV 5100 (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
<b>Comprimento de onda</b>	310 nm (B)	311 nm (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
<b>Fornecedor de Et</b>	Itajá (C)	Ciclo Farma (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
<b>Fornecedor do AF</b>	Isofar (D)	Dinâmica (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
<b>Razão de solvente (Et:AF)</b>	99:1 (E)	98:2 (e)	E	e	E	e	e	E	e	E
<b>Temperatura</b>	22 °C (F)	25 °C (f)	F	f	f	F	F	f	f	F

---

<b>ambiente</b>										
<b>Tempo de leitura</b>	1 s (G)	10 s (g)	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Ensaio</b>			<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

---

Fonte: Autor.

A influência de cada parâmetro na variação do resultado final foi determinada pela comparação da média dos quatro valores correspondentes às condições nominais (letras maiúsculas) com a média dos quatro valores correspondentes a as condições alteradas (letras minúsculas). Por exemplo, para avaliar o efeito da mudança do espectrofotômetro na análise (A/a), os resultados das combinações *s*, *t*, *u* e *v* (com condições nominais para “A”) foram comparados com os resultados do combinações *w*, *x*, *y* e *z* (com condições alternativas para “a”), conforme expresso na seguinte Equação 14:

$$E(A/a) = \left( \frac{s+t+u+v}{4} \right) - \left( \frac{w+x+y+z}{4} \right) \quad (14)$$

O efeito foi considerado relevante quando seu valor absoluto foi superior ao valor crítico definido pela expressão  $s \times 2^{1/2}$ , onde *s* é o desvio padrão obtido dos 8 ensaios de combinação (ENÉAS *et al.*, 2020; FERREIRA-NUNES *et al.*, 2019). Assim, realizando o teste de Youden, é possível identificar os parâmetros com maior influência nos resultados finais e assim ter um controle mais rigoroso para evitar variações de parâmetros críticos durante a análise de rotina (CÉSAR; PIANETTI, 2009; FERREIRA-NUNES *et al.*, 2019).

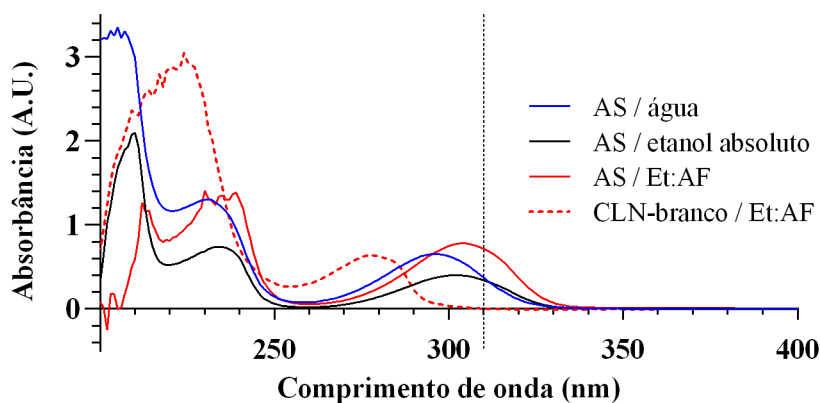
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Seletividade

A quantificação de substâncias ativas puras em uma matriz complexa composta por múltiplos constituintes, como é o caso de nanopartículas lipídicas, é uma grande preocupação durante o desenvolvimento deste tipo de formulações, devido à necessidade de um método de análise capaz de quantificar o ativo na presença dos demais componentes da matriz. Quando um óleo bioativo como o óleo de copaíba é incluído nessa matriz, essa preocupação se torna ainda maior, pois os óleos vegetais bioativos por si só já são suficientemente matrizes complexas (FERREIRA-NUNES *et al.*, 2019; LEANDRO *et al.*, 2012). Assim, neste estudo é proposto o uso de um método analítico espectrofotométrico como uma ferramenta de baixo custo para a quantificação de AS em uma matriz lipídica complexa de CLN contendo óleo de copaíba.

A seletividade foi então o primeiro parâmetro a ser avaliado, ou seja, a capacidade de quantificar o analito na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005). O espectro de absorção do AS foi avaliado em conjunto com o CLN-branco (matriz lipídica sem AS) entre 200 e 400 nm, realizado em três diluentes diferentes. O espectro de absorção do AS apresentou um perfil com duas regiões em todos os solventes avaliados (Figura 25): algumas bandas de absorção na faixa de 200-250 nm e um banda com absorção máxima definida em torno de 300 nm. A absorção máxima da banda foi a 301 nm em água destilada, a 302 nm em etanol absoluto e a 304 nm na mistura de Et:AF (99:1). Comparado com o espectro do etanol absoluto, observa-se um deslocamento batocrômico com a adição de ácido fosfórico na mistura Et:AF (99:1), provavelmente associado ao maior número de espécies AS protonadas. Nesta banda, o maior coeficiente de absorção específica para AS foi observado na mistura Et:AF (39,15 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), seguido de água destilada (30,65 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e etanol absoluto (20,20 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Figura 25 – Espectro de absorção no ultravioleta-visível entre a faixa de 200-400 nm do AS realizado em três diluentes diferentes e do CLN-branco no solvente com menor interferência em 310 nm (mistura de Et:AF).**



Fonte: Autor.

A menor porcentagem de interferência da matriz lipídica foi encontrada em 310 nm (destacado na Figura 25) usando a mistura Et:AF como diluente (0,37%), em comparação com o etanol absoluto (14,8%) e com a água destilada (165,1%). A banda de absorção observado no espectro de absorção do CLN-branco em Et:AF apresentou máximo em 280 nm. No entanto, uma interferência mínima foi observada no comprimento de onda de 310 nm, que foi a razão pela qual este diluente e este comprimento de onda foram definidos para prosseguir com a validação do método. Devido a esta baixa interferência, não houve necessidade de aplicar primeira e segunda derivadas ou métodos quimiométricos para avaliar esses dados, obtendo assim uma metodologia espectrofotométrica simples e direta.

Estudos anteriores obtiveram um perfil semelhante nos espectros de absorção de AS, com bandas em 200-250 nm e próximo de 300-310 nm (CLAYTON; THIERS, 1966; EL-RAGEHY *et al.*, 2016). No entanto, a maioria desses métodos exige algumas ações adicionais, como como complexação com cobre II (SAHA; BAKSI, 1985), o uso de primeira e segunda derivadas (KITAMURA; MAJIMA, 1982; KOKOT; BURDA, 1998; RAMOS *et al.*, 2005), ou ferramentas quimiométricas (EL-RAGEHY *et al.*, 2016). Mesmo assim, o comprimento de onda de detecção proposto foi semelhante: 316 nm em solução de 1% de ácido cloroacético-etanol (KITAMURA; MAJIMA, 1982), 328 nm em solução de acetonitrila-ácido fórmico (99:1) (KOKOT; BURDA, 1998), 320 nm para etanol absoluto e 317 nm para matriz de hidrogel em ácido sulfúrico 0,1 N (RAMOS *et al.*, 2005).

### 3.2 Linearidade

Um método analítico apropriado deve apresentar a melhor correlação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito na amostra. Assim, a regressão linear usando o método dos mínimos quadrados foi aplicada para ajustar a curva padrão (Figura 26A) e mostrou uma excelente correlação ( $r > 0,99$ ) na faixa de 5 – 30  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 12), conforme recomendado por diretrizes como o ICH (ICH, 2005). Como o coeficiente de regressão encontrado é maior que 0,99, a dispersão do conjunto de pontos experimentais é considerada baixa, com baixa incerteza dos coeficientes de regressão estimados (ABRÃO *et al.*, 2020; ANVISA, 2017; ICH, 2005).

**Tabela 12 – Parâmetros de linearidade e regressão.**

<b>Parâmetros de regressão</b>	<b>Resultados</b>
Inclinação $\pm$ desvio padrão	0,0271 $\pm$ 0,00024
Interseção no eixo Y $\pm$ desvio padrão	0,0233 $\pm$ 0,0046
Coefficiente de correlação (r)	0,99948
Faixa de concentração	5 a 30 $\mu\text{g/mL}$
Número de pontos	6
<b>Análise estatística</b>	<b>Resultado (valor P)</b>
Significância da regressão	Significativo ( $8,67 \times 10^{-21}$ )
Desvio de linearidade	Não significativo (0,63)
Inclinação significativamente diferente de zero	Significativo ( $< 0,0001$ )
Teste de Ryan Joiner (normalidade)	Distribuição normal ( $> 0,05$ )
Teste de Levene modificado (homocedasticidade)	Homocedasticidade (0,27)
Teste de Durbin-Watson (independência residual)	Significativo ( $< 0,05$ )

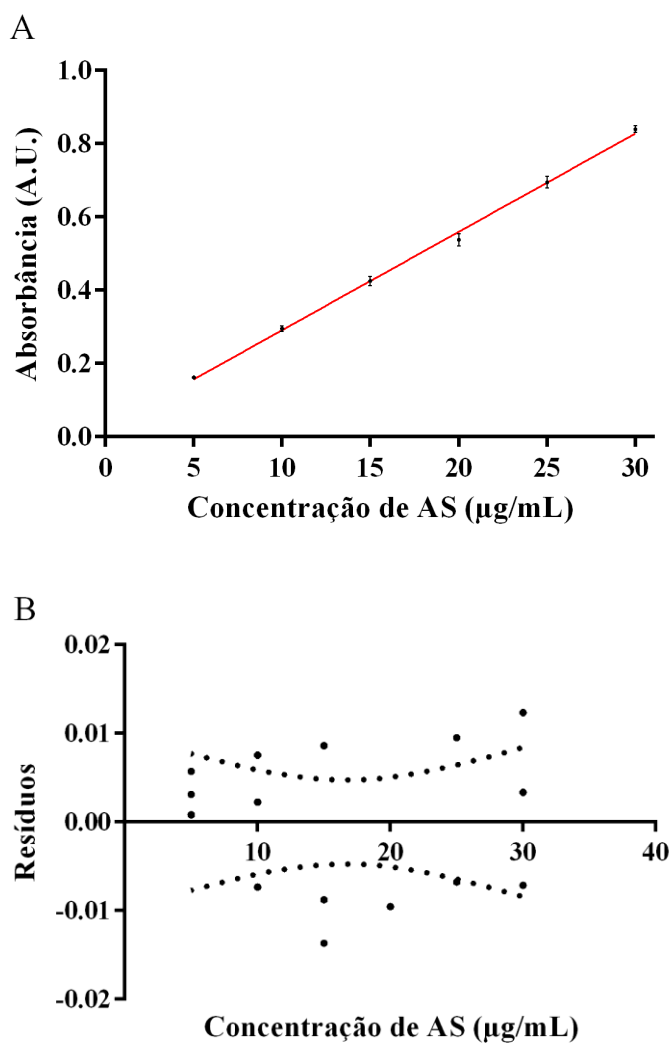
Fonte: Autor.

Assim, a equação de regressão linear foi  $y = 0,02711x + 0,0233$ , onde  $y$  é a absorbância e  $x$  é o valor nominal concentração de AS ( $\mu\text{g/mL}$ ). A regressão foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e não foi observada falta de ajuste ao modelo linear ( $p > 0,05$ ), e a inclinação foi considerada significativamente diferente de zero ( $p < 0,05$ ).

No teste de resíduos padronizados de Jackknife, três valores excederam o valor  $t$  crítico e, portanto, foram excluídos, que é inferior ao limite estabelecido pelo teste (22% dos dados). Além disso, os resíduos foram aleatoriamente distribuídos (Figura 26B) e

independentes ( $p < 0,05$ ), e as respostas do método espectrofotométrico apresentaram distribuição normal ( $p > 0,05$ ) e homocedasticidade ( $p > 0,05$ ) (ALMEIDA *et al.*, 2017; ICH, 2005; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

**Figura 26 – Resultados da linearidade. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos (B) do método desenvolvido para detecção de AS em concentrações de 5 a 30  $\mu\text{g/mL}$ .**



Fonte: Autor.

### 3.3 Limites de detecção e quantificação

LD e LQ foram estimados a partir da relação entre o desvio-padrão da regressão linear e a inclinação da curva-padrão. Os valores de LD e LQ obtidos neste estudo foram respectivamente 0,51 e 1,70  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que o método espectrofotométrico proposto foi sensível para pequenas quantidades de AS (ICH, 2005). Estudos anteriores mostraram LD e



LQ valores na mesma faixa de concentração: 0,51 e 1,71  $\mu\text{g/mL}$  (LD e LQ) em hidrogel (RAMOS *et al.*, 2005), 0,19 e 0,65  $\mu\text{g/mL}$  (LD e LQ) usando análise de segunda derivada em solução de Jessner e 0,12  $\mu\text{g/mL}$  (LD) também usando segunda derivada para quantificar AS em comprimidos de ácido acetilsalicílico (KITAMURA; MAJIMA, 1982).

### 3.4 Exatidão, precisão intra e inter-dias

A exatidão de um método analítico indica sua capacidade de fornecer respostas experimentais o mais próximo possível dos valores reais e esperados. A recuperação média, a relação entre a concentração experimental obtida como resposta de o método e a concentração esperada, é uma das formas de demonstrar a exatidão do método. A recuperação média das soluções de AS a 5,0, 20,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$  estavam próximas de 100% (Tabela 13), e dentro da faixa de 80-120%, limites geralmente considerados na literatura e estabelecido por agências reguladoras (FDA, 1994; ICH, 2005), o que reforça a exatidão do método. Estudos anteriores envolvendo diferentes matrizes e faixas de concentração considerados válidos os métodos que apresentaram recuperação na faixa de 99,7-100,1% para a concentração de 1-3  $\mu\text{g/mL}$  (EL-RAGEHY *et al.*, 2016), 99,3-103,0% para solução etanólica na concentração de 2-5  $\mu\text{g/mL}$  e 98,0-100,8% para hidrogel em 4-10  $\mu\text{g/mL}$  (RAMOS *et al.*, 2005).

A precisão indica a capacidade do método analítico de manter uma resposta constante de uma determinada solução de analito dentro da faixa linear independentemente de quando a quantificação é realizada e/ou do analista responsável pelo experimento. Os resultados obtidos para precisão intra- e inter-dias foram expressos como desvio padrão relativo de seis determinações obtidas no mesmo dia (repetibilidade) e de doze determinações obtidas em dois dias diferentes (precisão intermediária). Todos esses valores de desvio-padrão relativo ficaram abaixo de 5% (Tabela 13), conforme estabelecido pelos órgãos reguladores (ANVISA, 2003).

**Tabela 13 - Exatidão, precisão intra-dia e inter-dias para quantificação do AS.**

Concentração de AS adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração de AS medida ( $\mu\text{g/mL}$ ) *	Recuperação (%)
5,20	5,00 $\pm$ 0,15 [3,04%]	96,1 $\pm$ 2,92 [3,04%]
20,40	21,12 $\pm$ 0,61 [2,90%]	103,5 $\pm$ 3,00 [2,90%]
30,60	30,20 $\pm$ 0,17 [0,57%]	98,7 $\pm$ 0,57 [0,57%]
<b>Precisão</b>		

<b>Inter-dias (n=6)</b>	<b>Intra-dia (n=12)</b>
$20,25 \pm 0,63$ [3,13%]	$19,82 \pm 0,47$ [2,39%]
	$20,04 \pm 0,30$ [1,51%]

Fonte: Autor. \*Resultados expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão [desvio padrão relativo].

### 3.5 Robustez

A robustez indica a capacidade do método analítico de resistir a pequenas e deliberadas variações na análise. A metodologia proposta por Youden e Steiner (1975) foi utilizada para verificar o efeito de cada variação na absorvância do AS (Tabela 14), através de uma combinação fatorial. As diferenças mais relevantes indicaram que os fatores correspondentes têm uma influência maior do que os outros na resposta do método. Diferenças maiores que o valor crítico ( $s \times 2^{1/2}$ , onde  $s$  é o desvio padrão das 8 determinações) em valores absolutos foram consideradas significativas nos efeitos analisados (ANVISA, 2017; ENÉAS *et al.*, 2020; YOUDEN; STEINER, 1975). O valor crítico de absorvância obtido para este método foi igual a 0,07, então nenhum dos parâmetros analíticos avaliados apresentou efeito maior que este valor e, portanto, influência significativa na quantificação do AS através da espectrofotometria UV-Vis (Tabela 14).

**Tabela 14 – Efeitos dos parâmetros analíticos sobre a absorvância do método espectrofotométrico para a quantificação de AS.**

<b>Parâmetro Analítico</b>	<b>Condição Nominal</b>	<b>Condição Alternativa</b>	<b>Efeito na absorvância</b>
<b>Espectrofotômetro</b>	Agilent Cary 60 (A)	Tecnal UV 5100 (a)	-0,01
<b>Comprimento de onda</b>	310 nm (B)	311 nm (b)	0,01
<b>Fornecedor de Et</b>	Itajá (C)	Ciclo Farma (c)	0,02
<b>Fornecedor do AF</b>	Isofar (D)	Dinâmica (d)	-0,08
<b>Razão de solvente (Et:AF)</b>	99:1 (E)	98:2 (e)	0,00
<b>Temperatura ambiente</b>	22 °C (F)	25 °C (f)	-0,01
<b>Tempo de leitura</b>	1 segundo (G)	10 segundos (g)	-0,04

Fonte: Autor.

#### 4. CONCLUSÃO

Mesmo após vários anos, a espectrofotometria UV-Vis ainda é uma técnica útil na identificação e quantificação de fármacos e outros bioativos, devido à sua simplicidade e agilidade. O método espectrofotométrico proposto neste estudo foi desenvolvido e validado de acordo com critérios estabelecidos por agências reguladoras nacionais e internacionais e foi capaz de quantificar o ácido salicílico presente em CLN contendo óleo de copaíba, um óleo vegetal bioativo. O método foi seletivo para a quantificação do AS na presença da matriz lipídica complexa do nanocarreador contendo óleo vegetal, com linearidade demonstrada na faixa de 5 - 30  $\mu\text{g/mL}$ , e sensibilidade para sua detecção e quantificação em concentrações baixas. Os requisitos de precisão, exatidão e robustez também foram alcançados nas condições testadas.

O método proposto é simples de executar, rápido, de baixo custo e capaz de obter resultados confiáveis na qualidade de rotina análises de controle. Além da análise do conteúdo total e eficiência de encapsulamento do AS nas nanopartículas lipídicas, este método analítico ainda pode ser aplicado a outros testes, como a determinação da liberação controlada de AS e análise da estabilidade da formulação. Além disso, esta técnica de identificação e quantificação de AS tem potencial para aplicação em outras matrizes de formulações farmacêuticas, como óleos cosmecêuticos, nanoemulsões e lipossomas.

**REFERÊNCIAS**

- ABRÃO, Lailah Cristina de Carvalho *et al.* Toxicological analyses: analytical method validation for prevention or diagnosis. **Toxicology Mechanisms and Methods** v. 31, n. 1, p. 18–32, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2020.1839612>>.
- ALBUQUERQUE, Victória Júlya Alves *et al.* Development and validation of a method for quantification of sildenafil citrate in UV-HPLC. **Brazilian Journal of Health Review** v. 3, n. 1, p. 286–299, 2020.
- ALMEIDA, Osmar P. *et al.* Validation of a chromatographic analytical method for quantification of benznidazole incorporated in nanostructured lipid formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 28, n. 2, p. 236–241, 2017.
- AMER, Sandra Sherif *et al.* Insights on the Use of Nanocarriers for Acne Alleviation. **Current Drug Delivery** v. 16, n. 1, p. 18–25, 2019.
- ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - rdc nº 166, de 24 de julho de 2017. **Official Diary of the Union**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>., 2017
- ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 ementa. 2003.
- ARRUDA, Caroline *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy** v. 109, n. July 2018, p. 1–20, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.030>>.
- CÉSAR, Isabela Da Costa; PIANETTI, Gerson Antônio. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 45, n. 2, p. 235–240, 2009.
- CHARNY, J. W.; CHOI, J. K.; JAMES, W. D. Spironolactone for the treatment of acne in women, a retrospective study of 110 patients. **International Journal of Women's Dermatology** v. 3, n. 2, p. 111–115, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijwd.2016.12.002>>.
- CLAYTON, A. W.; THIERS, R. E. Direct spectrophotometric determination of salicylic acid, acetylsalicylic acid, salicylamide, caffeine, and phenacetin in tablets or powders. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 55, n. 4, p. 404–407, 1966.
- DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics** v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.
- EL-RAGEHY, Nariman A. *et al.* Chemometrics tools in detection and quantitation of the

main impurities present in aspirin/dipyridamole extended-release capsules. **Journal of AOAC International** v. 99, n. 4, p. 948–956, 2016.

ENÉAS, Paula C. R. *et al.* Simultaneous quantitation of efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate in fixed dose combination tablet by high performance liquid chromatography. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy** v. 2, n. 4, p. 38–50, 2020.

FALCÃO, Deborah Quintanilha *et al.* Challenges in development of essential oil nanodelivery systems and future prospects. In: NAIK, Jitendra (Org.). **Nano Based Drug Delivery**. Zagreb, Croatia: IAPC Publishing, 2015. p. 557–578.

FDA, Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. 2015

FDA, Food and Drug Administration. Reviewer Guidance - Validation of chromatographic methods. **CDER. Center for Drug Evaluation and Research** v. 22, n. 3, 1994.

FERREIRA-NUNES, Ricardo *et al.* Stability-indicating analytical method of quantifying spironolactone and canrenone in dermatological formulations and iontophoretic skin permeation experiments. **Biomedical Chromatography** v. 33, n. 11, p. 1–10, 2019.

FERREIRA, Cirley Pinheiro *et al.* Application of the UV–vis spectrophotometry method for the determination of glutamate in the cerebrospinal fluid of rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 186, p. 1–9, 2020.

GARCÊS, A. *et al.* Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 112, n. September 2017, p. 159–167, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>>.

GHATE, Vivek M. *et al.* Nanostructured lipid carriers for the topical delivery of tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 108, p. 253–261, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.026>>.

KANTIKOSUM, Kornphaka *et al.* The efficacy of glycolic acid, salicylic acid, gluconolactone, and licochalcone a combined with 0.1% adapalene vs adapalene monotherapy in mild-to-moderate acne vulgaris: A double-blinded within-person comparative study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology** v. 12, p. 151–161, 2019.

KITAMURA, Keisuke; MAJIMA, Ryo. Determination of Salicylic Acid in Aspirin Powder by Second Derivative Ultraviolet Spectrometry. **Analytical Chemistry** v. 55, n. 1, p. 54–56, 1982.

KOKOT, Zenon; BURDA, Kinga. Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV

- spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 18, n. 4–5, p. 871–875, 1998.
- KRAMBECK, K. *et al.* Lipid nanocarriers containing *Passiflora edulis* seeds oil intended for skin application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 193, n. May, p. 111057, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111057>>.
- LAMMARI, Narimane *et al.* Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. **International Journal of Pharmaceutics** v. 601, p. 1–34, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538>>.
- LEANDRO, Lidiam Maia *et al.* Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules** v. 17, n. 4, p. 3866–3889, 2012.5592990367.
- LU, Jin *et al.* Salicylic acid treats acne vulgaris by suppressing AMPK/SREBP1 pathway in sebocytes. **Experimental Dermatology** v. 28, n. 7, p. 786–794, 2019.
- MU, Huiling; HOLM, René. Solid lipid nanocarriers in drug delivery: characterization and design. **Expert Opinion on Drug Delivery** v. 15, n. 8, p. 771–785, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1504018>>.
- NALINI, C. N.; KUMAR, Vinoth. A Review of Different Analytical Techniques for Fexofenadine Hydrochloride and Montelukast Sodium in Different Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry** v. 51, n. 3, p. 232–245, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1709410>>.
- PATEL, Rinaldo; PRABHU, Priyanka. Nanocarriers as versatile delivery systems for effective management of acne. **International Journal of Pharmaceutics** v. 579, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119140>>.
- RAMOS, Tatiane Rodrigues *et al.* Validação de um método analítico para a determinação de substâncias ativas em formulações farmacêuticas empregadas em “peelings” químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 41, n. 2, p. 229–235, 2005.
- SAHA, Utpal; BAKSI, Kalyan. Spectrophotometric determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations using copper (II) acetate as a colour developer. **The Analyst** v. 110, n. 6, p. 739–741, 1985.
- SOUZA, Scheilla V.C.; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta** v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.
- SVETLICHNY, G. *et al.* Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: Development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Pharmazie** v. 70, n. 3, p. 155–164, 2015.

TEIXEIRA, Francisco Bruno *et al.* Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC Complemento Med.** p. 1–8, 2017.

ICH, International Council for Harmonization. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). 4 v, 2005.

VIEIRA, Raquel *et al.* Sucupira Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Lipid Screening, Factorial Design, Release Profile, and Cytotoxicity. **Molecules** v. 25, n. 3, p. 1–22, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25030685>>.

YOUNG, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC**. Washington, 1975. 88 p.

ZHENG, Yue *et al.* Efficacy and safety of 2% supramolecular salicylic acid compared with 5% benzoyl peroxide/0.1% adapalene in the acne treatment: a randomized, split-face, open-label, single-center study. **Cutaneous and Ocular Toxicology** v. 38, n. 1, p. 48–54, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15569527.2018.1518329>>.

## CAPITULO 3

### DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA

#### 1 INTRODUÇÃO

Nanofibras (NFs) poliméricas podem ser utilizadas para potencializar a aplicabilidade de nanocarreadores bioativos. As NFs se destacam devido seu elevado número de possíveis aplicações, como, por exemplo, em sistemas de liberação de bioativos, devido sua bioabsorbilidade e capacidade de controlar a velocidade de liberação substâncias encapsuladas. A incorporação de bioativos no *scaffold* de NFs pode proporcionar um sistema de administração muito bastante eficiente com uma área superficial elevada para uma liberação controlada, dependendo do tamanho e densidade dos poros, bem como da taxa de degradação do biopolímero. Materiais com baixa toxicidade e biocompatibilidade podem ser utilizados para a produção de nanofibras com o objetivo de proporcionar uma liberação controlada e direcionada ao tecido lesado (DREYER, 2015; GONÇALVES, 2015; LU *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2009; SCHEIDT, 2018).

As NFs podem ser obtidas por diferentes métodos os quais podem envolver processos físicos, químicos, térmicos ou eletrostáticos. Os métodos mais tradicionais envolvem processos de fiação (do inglês, *spinning*), e incluem as técnicas de fiação em solução (do inglês, *wet spinning*), eletrofiação (do inglês, *electrospinning*), fiação por fusão (do inglês, *melt spinning*) e fiação por sopro em solução (do inglês, *solution blow spinning*) (SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022). Dentre as diferentes técnicas de fiação, a eletrofiação se evidencia como uma técnica de síntese versátil capaz de produzir fibras com uma larga variedade de composições, morfologias e diâmetros que variam de micrometros a nanômetros, podendo levar à produção de fibras com diâmetro inferior a 1 nm. As nanofibras obtidas pela técnica de eletrofiação são altamente atrativas para um amplo número de aplicações devido à combinação única de elevada razão área superficial/volume, porosidade, flexibilidade, desempenho mecânico, simplicidade de processamento e custo relativamente baixo. Destaca-se, ainda, a possibilidade de obtenção de nanoestruturas poliméricas, cerâmicas ou metálicas e, da incorporação de outros nanomateriais (MERCANTE *et al.*, 2021).



Diversos polímeros são utilizados em produções de fibras por eletrofiação, para aplicações diversas (ARAÚJO, 2015). Dos quais se destacam poli (vinil álcool) (PVA), o poli (vinil pirrolidona) (PVP) e o poli (óxido de etileno) (PEO), por suas aplicações farmacológicas sendo utilizados como matrizes para o carreamento de nanopartículas e fármacos (LIU *et al.*, 2011; LIU; ANTAYA; PELLERIN, 2008; WU, Y. G. *et al.*, 2008).

O poli (álcool vinílico) (PVA) tem uma estrutura química relativamente simples com um grupo hidroxila pendente ( $[-CH_2CHOH-]_n$ ). O PVA é produzido pela polimerização do acetato de vinila em poli (acetato de vinila), seguida da hidrólise convertendo em PVA. A tensão superficial e a solubilidade do PVA em solução dependem da sua concentração, da temperatura, da sua hidrólise e da sua massa molar (PEPPAS; HASSAN, 2000). Soluções aquosas de PVA são utilizadas como matrizes poliméricas em aplicações biológicas e farmacêuticas devido as suas características como, não-toxicidade, não-carcinogênicas, biodegradáveis e transparentes (ARAÚJO, 2015). Nanofibras eletrofiadas de PVA e poli (acetato de vinila) carregada com cloridrato de ciprofloxacina foram estudadas como curativos para feridas e foi demonstrado que a adição de poli (acetato de vinila) às nanofibras de PVA diminuiu a taxa de liberação do fármaco em estágios iniciais, prolongando a liberação do fármaco (JANNESARI *et al.*, 2011). O PVA também é amplamente utilizado na indústria de medicamentos tópicos como estabilizantes em emulsões e em formulações medicamentosas orais (ZAMANI; PRABHAKARAN; RAMAKRISHNA, 2013).

O poli (vinil pirrolidona) (PVP) é um polímero biodegradável, solúvel em água, derivado de seu monômero N-vinilpirrolidona ( $[-C_6H_9NO-]_n$ ). Além de ser um polímero hidrofílico, o PVP possui excelente solubilidade em solventes de diferentes polaridades, boas propriedades de ligação e efeito estabilizador para suspensões e emulsões. O PVP é um polímero biocompatível e não tóxico e, por esta razão, é amplamente utilizado em aplicações medicinais e cosméticas (FOGAÇA; CATALANI, 2013; FRANCO; DE MARCO, 2020; MARTINS *et al.*, 2013; RASEKH *et al.*, 2014). No campo farmacêutico, esse polímero tem sido utilizado para desenvolver diferentes sistemas de administração de fármacos, como administração oral, tópica, transdérmica e ocular (FRANCO; DE MARCO, 2020). Ultimamente também vem sendo estudado de forma ampla como matriz polimérica nos processos de eletrofiação como compósitos PVP/nanopartículas metálicas, para aplicações antibacterianas, e PVP/fármacos no encapsulamento e na liberação rápida de drogas por via oral, sublingual, vaginal e cutânea (ARAÚJO, 2015).

O poli (óxido de etileno) (PEO) é um poliéster semicristalino, possui baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e é muito solúvel em água através de ligação de hidrogênio (BABADI

*et al.*, 2021; BHATTARAI *et al.*, 2005). Além disso, devido à existência de ligações C-O em sua estrutura ( $[-CH_2CH_2O-]_n$ ), este polímero pode se complexar com outros, dando origem a misturas poliméricas homogêneas (DE VRIEZE *et al.*, 2007; NETO *et al.*, 2005). O PEO é amplamente aplicado em diversos setores como a indústria farmacêutica e médica, onde é usado como matriz para o controle de liberação de fármacos para a formulação de cápsulas de ativos farmacêuticos (HARRIS; ZALIPSKY, 1997). A viscosidade das soluções de PEO depende fortemente da massa molar média do polímero. Polímeros com maiores massas molares médias apresentam maiores viscosidades em comparação a um mesmo solvente (COSTA, R. G. F. *et al.*, 2012).

O PEO é muito explorado em estudos de eletrofiação. Não apenas pela sua aplicabilidade na medicina e farmacologia, mas também por apresentar diversas propriedades relativas às diferentes massas molares médias disponíveis comercialmente. Esse polímero tem sido avaliado como base para o processo de eletrofiação utilizando diversos solventes, tais como DMF, água, etanol, metanol, acetona, entre. Muitas pesquisas também são desenvolvidas com sucesso no sentido de usar o PEO, dada suas propriedades favoráveis à eletrofiação, como um polímero carregador, para polissacarídeos como quitosana e alginato de sódio outros (BONINO *et al.*, 2011; DEITZEL *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2006; PAKRAVAN; HEUZEY; AJJI, 2011; RIEGER; SCHIFFMAN, 2014; TAYMOURI *et al.*, 2021).

A escolha do polímero a ser utilizado na produção de nanofibras carreadoras deve levar em conta as propriedades do polímero, uma vez que esse influencia na morfologia da nanofibras e, por consequência, na ação do bioativo (SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022). Diante de todas as propriedades favoráveis ao processo de eletrofiação e aplicabilidade farmacológica, o PVA, o PVP e o PEO foram selecionados para serem testados na produção de nanofibras contendo carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de copaíba (CLN-OC) através do processo de eletrofiação. Assim, o objetivo final deste trabalho, descrita neste capítulo, foi a produção e caracterização de nanofibras contendo CLN-OC, visando a aplicação tópica desse bioativo como uma possível estratégia para aplicações farmacológicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Para o preparo das nanofibras eletrofiadas foram utilizados os polímeros polivinil pirrolidona (PVP-40.000g/mol), fornecido pela Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), acetato de polivinila (PVA-146.000-186.000 g/mol) fornecido pela Sigma–Aldrich (Buenos Aires, Argentina), polióxido de etileno (PEO–Mv,900.000) foi fornecido pela Aldrich Chemistry (Milwaukee, EUA) e o solvente foi utilizado água recém destilada. Os nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba já produzidos foram utilizados como bioativos nesta etapa.

### 2.2 Delineamento experimental do preparo das nanofibras

#### 2.2.1 Testes preliminares

Os testes preliminares foram realizados com o objetivo de determinar a composição básica da solução polimérica para a formação das nanofibras contendo o CLN-OC otimizado, bem como os parâmetros de processo de eletrofiação. As variáveis testadas preliminarmente foram: o polímero a ser utilizado, a concentração polimérica e os parâmetros de eletrofiação. Para cada polímero analisado, foram realizados levantamentos bibliográficos para obter os parâmetros, essas referências foram adaptadas (HASHEMIKIA *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2021; LIN; DAI; CUI, 2017; MASLAKCI *et al.*, 2017; MORAIS *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2017; PEBDENI; SADRI; HOSSEINI, 2016; RAVICHANDRAN *et al.*, 2013).

##### 2.2.1.1 Eletrofiação com PVP

O primeiro polímero a ser testado foi o polivinil pirrolidona (PVP). Nestes testes, três ensaios foram realizados variando a composição da solução polimérica, a voltagem e a vazão a ser utilizada no processo de eletrofiação (Tabela 15). A variação da concentração corresponde ao percentual de CLN-OC em relação aos sólidos totais (PVP + CLN-OC) e o percentual de PVP em relação a solução polimérica final. O solvente (água destilada), a distância entre a agulha e o coletor (10 cm) e o tempo de fiação (15 minutos) foram mantidos fixos.

**Tabela 15 - Testes preliminares para a produção de nanofibras a partir do PVP.**

Variável	Ensaio		
	1	2	3
CLN-OC / PVP (%)	10,00	12,50	40,00
PVP (%)	9,00	9,38	9,00
Voltagem (kV)	10,00	12,50	15,00
Vazão (mL/h)	1,00	1,50	2,00

Fonte: Autor. PVP = polivinil pirrolidona, CLN-OC = nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba.

### 2.2.1.2 Eletrofiação com PVA

O segundo polímero a ser testado foi o acetato de polivinila (PVA). Neste momento, foi avaliado apenas a composição da solução polimérica, variando também o percentual de CLN-OC em relação aos sólidos totais (PVA + CLN-OC) e o percentual de PVA em relação a solução polimérica final. As condições do processo de eletrofiação fixas (Tabela 16) foram: tensão de 15 kV, vazão de 1,00 mL/h, a distância entre a agulha e o coletor de 10 cm e o tempo de fiação de 15 minutos.

**Tabela 16 - Testes preliminares para a produção de nanofibras a partir do PVA.**

Variável	Ensaio		
	4	5	6
CLN-OC / PVA (%)	5,00	10,00	15,00
PVA (%)	5,00	7,50	10,00

Fonte: Autor. PVA = acetato de polivinila, CLN-OC = nanocarreador lipídico de óleo de copaíba.

### 2.2.1.3 Eletrofiação com PEO

Por fim, o polióxido de etileno (PEO) foi testado como polímero utilizado no preparo da solução polimérica. De forma similar aos testes preliminares do PVA, aqui também foi avaliado apenas a composição da solução polimérica, variando o percentual de CLN-OC em relação aos sólidos totais (PEO + CLN-OC) e o percentual de PEO em relação a solução polimérica final (Tabela 17), mantendo fixas as condições do processo de eletrofiação: tensão

de 15 kV, vazão de 0,50 mL/h, a distância entre a agulha e o coletor de 10 cm e o tempo de fiação de 15 minutos.

**Tabela 17 - Testes preliminares para a produção de nanofibras a partir do PEO.**

Variável	Ensaio		
	7	8	9
CLN-OC / PEO (%)	20,00	22,50	25,00
PEO (%)	3,50	3,75	4,00

Fonte: Autor. PEO = polióxido de etileno, CLN-OC = nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba.

### 2.2.2 Planejamento fatorial

A partir dos ensaios preliminares, para a composição da solução polimérica, foi utilizado o PEO como polímero, água recém destilada como solvente e a CLN-OC como bioativo, essa por sua vez, composta por Capmul<sup>®</sup>, OC e uma mistura os tensoativos Tween 80 e Span 80. Para otimizar as condições de diâmetro das nanofibras (média e desvio padrão), foi utilizado um planejamento fatorial completo  $2^2$ , incluindo 3 repetições do ponto central, com o total de 7 experimentos (Tabela 18). As variáveis independentes, PEO ( $X_1$ ) e a razão entre CLN-OC e PEO ( $X_2$ ) foram analisadas em três níveis equidistantes de variação e codificadas com -1, 0 e +1. Sendo a variável  $X_1$  corresponde ao percentual de PEO em relação ao total de solução polimérica e a variável  $X_2$  corresponde ao percentual de CLN-OC em relação PEO, ou seja, avalia os sólidos totais presentes na solução polimérica. Foram utilizadas duas variáveis resposta, média do diâmetro de 20 fibras ( $Y_1$ ) e desvio padrão do diâmetro de 20 fibras (DP;  $Y_2$ ), que foram analisadas em conjunto. As faixas de concentração utilizadas no estudo foram determinadas em testes preliminares.

**Tabela 18 – Planejamento fatorial da composição das formulações das soluções poliméricas de PEO contendo CLN-OC.**

Ensaio	PEO	CLN-OC / PEO
1	-1,00	4,25%
2	1,00	4,75%
3	-1,00	17,50%
4	1,00	25,00%

<b>5</b>	<b>0,00</b>	4,50%	<b>0,00</b>	21,25%
<b>6</b>	<b>0,00</b>	4,50%	<b>0,00</b>	21,25%
<b>7</b>	<b>0,00</b>	4,50%	<b>0,00</b>	21,25%

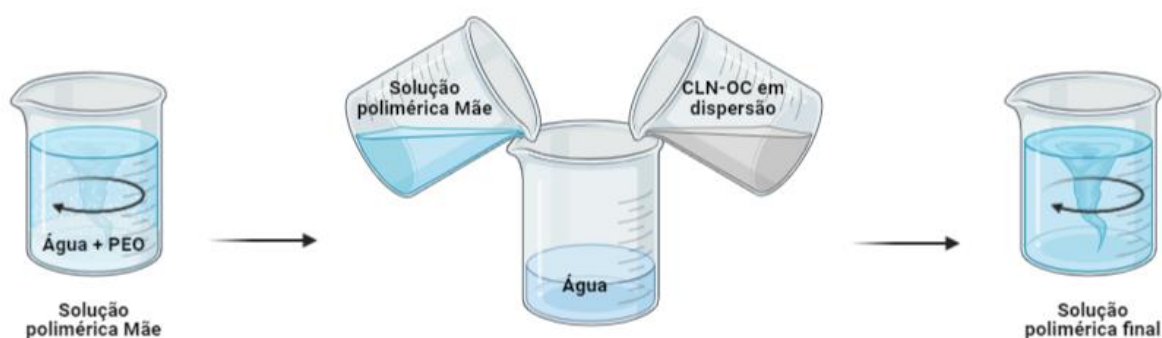
Fonte: Autor. PEO = polióxido de etileno, CLN-OC = nanocarreadores lipídicos contendo óleo de copaíba.

Após a produção dos 7 experimentos, os testes de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados nas amostras fiadas, com o intuito de quantificar as variáveis respostas. Utilizando o software ImageJ, a média e DP dos diâmetros de 20 unidades de fibras de cada amostras foram coletados.

### 2.3 Preparo das soluções poliméricas

Para a produção das soluções poliméricas, foi utilizada uma solução polimérica mãe de 6,7% de PEO em água recém destilada. Essa solução mãe foi produzida por agitação de baixa intensidade e a temperatura ambiente por 24 horas. A partir dessa solução polimérica mãe, cada ensaio foi obtido adicionado a CLN-OC otimizado em dispersão e a água destilada submetendo essa mistura a agitação de baixa intensidade, a temperatura ambiente, por 5 minutos (Figura 27).

**Figura 27 – Representação esquemática das soluções poliméricas de PEO contendo CLN-OC.**

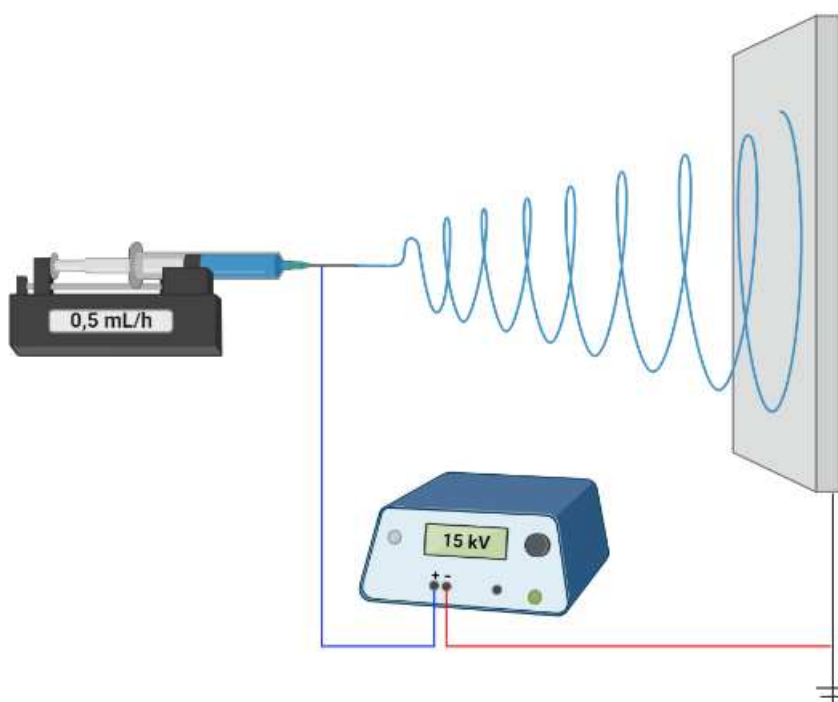


Fonte: Autor.

## 2.4 Eletrofição das nanofibras

As soluções poliméricas foram eletrofiadas imediatamente após a preparação usando um dispositivo de eletrofição horizontal disponibilizado pelo laboratório de tecnologia de materiais do ICT/UFVJM. O procedimento de eletrofição foi realizado durante 15 minutos, a temperatura ambiente com a umidade relativa do ar em aproximadamente 65 %, utilizando-se uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 22 GA (0,64 mm) de diâmetro. Esta seringa foi colocada em uma bomba de infusão de seringas para assegurar a alimentação constante utilizando uma vazão de 0,5 mL/h. A ponta da agulha foi ligada à uma fonte de alimentação de alta tensão, com 15 kV aplicados diretamente na saída positiva e com uma placa coletora sendo aterrada na saída negativa, a 10 cm de distância (Figura 28). Estes parâmetros de processo foram levantados na literatura e determinados em testes preliminares (HASHEMIKIA *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2021; LIN; DAI; CUI, 2017; MASLAKCI *et al.*, 2017; MORAIS *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2017; PEBDENI; SADRI; HOSSEINI, 2016; RAVICHANDRAN *et al.*, 2013).

**Figura 28 – Representação esquemática do preparo das nanofibras por eletrofição.**



Fonte: Autor.

## 2.5 Caracterizações da nanofibra otimizada

### 2.5.1 MEV

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para o estudo das estruturas superficiais das nanofibras obtidas nos testes preliminares e da nanofibra otimizada, pois possui alta profundidade de foco, podendo obter diferentes relevos da superfície da amostra em foco. Para a realização deste teste, a amostra foi fixada em um suporte de amostra (*stub*), utilizando uma fita condutora dupla face de carbono marca TEDPELLA. A morfologia superficial foi examinada usando um Microscópio Eletrônico de Varredura da HITACHI modelo TM-3000, uma tensão de aceleração de 15kV, com ampliação de 10.000x. O equipamento para realização do MEV esteve disponível no departamento de química da UFVJM.

### 2.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Foram obtidos espectros de absorção FTIR (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) dos componentes da solução polimérica e da nanofibra otimizada. Para a análise foi utilizado o espectrofotômetro com transformada de Fourier Varian modelo 640-IR (Santa Clara, United States), equipado com modo de reflectância total atenuada (ATR; Pike Technologies, modelo GladiATR), na região de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras. O equipamento para realização do FTIR esteve disponível no departamento de engenharia química da UFVJM.

### 2.5.4 Análise termogravimétrica

As curvas TG das nanofibras otimizadas foram obtidas na termobalança DTG60 Shimadzu® (Tóquio, Japão) com razão de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , aquecimento de 30 a 600  $^{\circ}\text{C}$ , atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50  $\text{mL}/\text{min}$ , em cadinho de alumínio. As massas das nanofibras de PEO puro e PEO + CLN-OC utilizada neste ensaio foi de 2,336 e 4,424 mg, respectivamente. O equipamento para realização do TG esteve disponível no departamento de química da UFMG.



## 2.6 Delineamento estatístico das nanofibras

A influência da composição das soluções poliméricas nos diâmetros das nanofibras, foram avaliados por um modelo de primeira ordem (Equação 15), com o objetivo de as variáveis respostas:

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (15)$$

Onde  $Y_i$  é a variável dependente,  $X_i$  e  $X_j$  são variáveis independentes codificadas,  $\beta_0$  é a constante,  $\beta_i$  é coeficiente linear e  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação (PELLISSARI *et al.*, 2013).

A análise estatística dos dados experimentais e da metodologia de superfície resposta foi realizada pelo software Statistica 7.0 (StatSoftInc, Oklahoma, USA). Os valores ótimos para a composição da nanopartícula e da nanofibra foram obtidos pela função desejabilidade, uma análise multi-resposta, conforme proposto por Derringer and Suich (1980). Este método envolve a transformação de cada variável de resposta ( $Y_i$ ) para uma função individual de desejabilidade ( $d_i$ ) (Equação 16); a escala de desejabilidade varia de 0 a 1. Se a resposta estivesse fora de uma região aceitável, ela era definida como  $d_i = 0$ ; se a resposta fosse totalmente desejável (em seu objetivo ou alvo), ela era definida como  $d_i = 1$ .

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}} \quad (16)$$

Onde,  $Y_{min}$  é o valor mínimo e  $Y_{max}$  é o valor máximo da variável resposta.

As funções de desejabilidade individuais das respostas preditivas são então combinadas, para obter a desejabilidade global (D), definida como a média geométrica dos desejos individuais (DERRINGER; SUICH, 1980; PELLISSARI *et al.*, 2013).

Valores de médias e desvios-padrão (DP) foram calculados em todas as etapas dos experimentos e o software utilizado no tratamento dos dados foi o GraphPad Prism 6.0. O estudo estatístico foi realizado por meio de análise de variância (ANOVA) one-way seguido de teste Tukey ao nível de 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Testes preliminares de eletrofiação das nanofibras

O processo de eletrofiação consiste, experimentalmente, em aplicar um campo elétrico, de alta tensão, sobre gotas da solução polimérica, injetada por meio de uma agulha (acoplada em uma seringa). Se a tensão elétrica aplicada é aumentada de modo que seu efeito supere a tensão superficial da gota, deformando-a, forma-se o cone de Taylor. A partir desse momento, o jato enfrenta um processo de alongamento. Concomitantemente, há a evaporação de grande parte do solvente, formando fibras que são atraídas pelo coletor metálico aterrado. Assim, obtém-se fibras praticamente secas que se depositam na superfície do coletor (LURAGHI; PERI; MORONI, 2021).

Diversos fatores influenciam o processo de eletrofiação e podem modificar alguns aspectos das nanofibras, como morfologia, diâmetro e a presença de grânulos (ou *beads*) nas fibras formadas. Estes fatores são agrupados em três categorias distintas:

- (a) parâmetros da solução: concentração, viscosidade, tensão superficial, peso molecular e tipo de solvente;
- (b) parâmetros de processamento: tensão, taxa de fluxo da solução, distância do coletor da agulha, design da ponta da agulha, geometria do coletor e velocidade;
- (c) parâmetros ambientais: temperatura e umidade.

Portanto, a morfologia desejada das fibras pode ser alcançada otimizando e modelando os parâmetros de eletrofiação (UTKARSH *et al.*, 2020).

A etapa preliminar deste trabalho teve como foco testar os parâmetros básicos da solução polimérica, bem como alguns parâmetros do processo de eletrofiação. Diante disso, neste estudo, os parâmetros ambientais foram mantidos fixos, sendo a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar em aproximadamente 65%. O solvente (água destilada), o *design* da agulha (0,64 mm de diâmetro interno), a geométrica do coletor e a distância entre a agulha e o coletor (10 cm) também foram mantidos constantes. Imagens com amplitude de 10.000x, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, foram utilizadas para verificar se houve a formação de fibras e avaliar sua morfologia. Desta forma, foram realizados nove ensaios preliminares.

Os três primeiros ensaios (1, 2 e 3) foram realizados utilizando o PVP como polímero. O PVP é um homopolímero de natureza anfifílica, formado em sua estrutura química por um grupo amida que atua como um surfactante. É utilizado amplamente na indústria farmacêutica

como excipiente (ligante) na formulação de comprimidos (oral e sublingual), de revestimentos de cápsulas para encapsulamento e liberação rápida de fármacos no organismo humano (CHOI *et al.*, 2013; UDAYABHASKAR *et al.*, 2012; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

As variáveis avaliadas nesta primeira etapa foram três diferentes concentrações de PVP em relação à solução polimérica final e três concentrações de CLN-OC em relação aos sólidos totais, bem como a voltagem e vazão utilizadas no processo de eletrofiação (Tabela 15). Para que as fibras possam ser formadas de maneira uniformes, é necessário obter um determinado grau de emaranhamento de cadeias na solução polimérica. Este grau de emaranhamento está ligado a concentração do polímero e conseqüentemente à viscosidade da solução polimérica. Existe uma faixa de viscosidade adequada para a eletrofiação para que se obtenham nanofibras, faixa essa que pode ser ajustada através da variação da concentração de polímero ou variando a massa molar. No caso da tensão aplicada ao processo, seu valor deve ser suficiente tal que o campo elétrico supere a tensão superficial na gota da solução e permita a formação do cone de Taylor. Se a tensão aplicada for muito alta, pode provocar jatos instáveis e até mesmo múltiplos jatos podem ser criados durante o processo (COSTA *et al.*, 2012; LI; WANG, 2013). Por fim, um alto fluxo da vazão pode favorecer a formação de *beads* além do aumento do diâmetro e tamanho de poro das fibras, devido ao curto intervalo de tempo necessário para que o solvente evapore até a fibra chegue ao coletor e a baixa força de alongamento. Além de baixa, a vazão de alimentação da solução deve ser constante, uma vez que se deseja a presença de uma gota estável na ponta da agulha durante o processo para a formação do cone de Taylor através do campo elétrico (LI; WANG, 2013; MITCHELL, 2015).

Nos ensaios 1 e 3, durante o processo de eletrofiação foi possível observar a deposição um material similar ao de nanofibras a olho nu, no entanto ao obter as morfologias destes ensaios (Figura 29a e c, respectivamente), percebe-se que não houve a formação de fibras poliméricas. Este resultado pode ser explicado pela baixa viscosidade das soluções poliméricas provocada pela baixa concentração de polímero e/ou pela sua baixa massa molar. Neste caso, o processo ocorrido é denominado *elektrospray* (espalhamento eletrostático) com um grau de emaranhamento pequeno das cadeias poliméricas, causando uma instabilidade capilar na extremidade do jato, podendo causar um espalhamento eletrostático ao invés da eletrofiação (COSTA *et al.*, 2012; LI; WANG, 2013).

Para o ensaio 2, não foi observada uma formação do cone de Taylor, bem como não houve a formação do jato de solução polimérica durante o processo de eletrofiação. O

material depositado na placa coletora se tratava de um aglomerado de solução polimérica ainda tão úmida que escorreu pela placa, o que implica que não houve a evaporação suficiente do solvente durante o processo. As imagens do ensaio 2 foram obtidas após a completa secagem do material depositado na placa coletora (Figura 29b), apenas para comprovar a não formação de fibras.

Dentre os polímeros avaliados, o PVP possui a menor massa molar (40.000 g/mol), podendo influenciar na viscosidade da solução polimérica. Para uma dada concentração polimérica fixa, a solução preparada com polímero de massa molar menor possui menor viscosidade quando comparado a uma solução produzida com um polímero de massa molar maior. É necessário que a solução polimérica tenha um polímero de massa molar e concentração adequadas para obter a viscosidade suficiente para ocorrer a formação de fibras na eletrofiação. A redução dessa massa molar tende a criar *beads* ao invés de fibras lisas, como foi observado nos ensaios 1 e 3 (Figura 29 a e c, respectivamente), e com o aumento da massa molar do polímero, há a tendência de formar fibras lisas (COSTA *et al.*, 2012).

A segunda etapa dos testes preliminares avaliou diferentes concentrações de PVA em relação a solução polimérica final e três concentrações distintas de CLN-OC em relação aos sólidos totais. O PVA é um polímero sintetizado através da polimerização do acetato de vinila em acetato poli vinílico com posterior hidrólise para gerar a forma ácida, o PVA. Sua aplicabilidade, dadas as características físico-químicas, abrange diversas áreas como a biomédica e farmacêutica, como a elaboração de coberturas e curativos. Sua não-toxicidade, biodegradabilidade e solubilidade em água são propriedades atraentes para aplicações em humanos (JIANG; LIU; FENG, 2011; KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017; KIM *et al.*, 2008) Portanto, para os ensaios 4 a 6, foi variado o percentual de CLN-OC em relação aos sólidos totais (PVA + CLN-OC) e o percentual de PVA em relação a solução polimérica final (Tabela 16). Os parâmetros de processo da eletrofiação foram mantidos constantes, sendo eles, tensão de 15 kV, vazão de 1,0 mL/h, a distância entre a agulha e o coletor de 10 cm e o tempo de fiação de 15 minutos.

Nestes ensaios, foi possível observar a formação de fibras de PVA + CLN-OC para as três condições avaliadas (Figura 29 d-f), porém com uma deposição extremamente baixa de fibras com diâmetros variados. Em comparação com o PVP, o PVA utilizado possui uma maior massa molar (146.000-186.000 g/mol), o que favoreceu a formação da fita, mesmo utilizando uma baixa concentração polimérica (LI; WANG, 2013). O MEV obtido a partir do ensaio 4 (Figura 29d), mostrou aparentemente a formação de um filamento fibroso e com sentido desordenado, com diâmetros que variaram aproximadamente de 946 a 1622 nm (DP =

387). Essa faixa de diâmetro não é interessante para a liberação de bioativos, uma vez que as fibras de menor diâmetro têm maior área de superfície e taxa de dissolução, portanto tendem a possuir uma taxa de liberação mais rápida em relação às demais (THAKKAR; MISRA, 2017).

No ensaio 5 (Figura 29e) também foi possível observar a formação de filamentos fibrosos desalinados, no entanto com uma variação média de diâmetro maior ( $DP = 673$ ), com valores de 149 a 1490 nm. Essa alta variação no desvio padrão dos diâmetros não favorece a liberação estável de bioativos, pois a liberação do material encapsulado não será constante (THAKKAR; MISRA, 2017). Quando comparada ao ensaio 4, notou-se um pequeno aumento na deposição de fibras obtidos no ensaio 5, que pode ser explicado pelo aumento da viscosidade da solução polimérica ocasionado pelo aumento do percentual de polímero e de sólidos totais presente na solução. Este aumento da viscosidade proporciona um melhor emaranhamento das cadeias poliméricas o que é essencial para manter um jato contínuo no processo da eletrofiação (LI; WANG, 2013). As imagens obtidas pelo MEV do ensaio 6 (Figura 29f) apresentam aparentemente uma deposição de fibras bem próxima ao ensaio 5, no entanto com uma orientação mais ordenada das fibras e um menor desvio padrão em relação aos diâmetros ( $DP = 285$ ). Apesar de menor, quando comparada ao ensaio 5, uma variação de 285 nm no diâmetro das nanofibras ainda não favorece uma liberação estável.

Os testes preliminares utilizando PVA foram úteis para reforçar que os parâmetros de processo e ambientais utilizados podem levar à formação de fibras através da eletrofiação, portanto, os mesmos foram mantidos nos testes preliminares realizados para o óxido de polietileno. O PEO é um polímero sintético biocompatível, biodegradável, não imunogênico e não tóxico. Este polímero não interage com proteínas e a maioria das outras moléculas biológicas e é favorável ao desenvolvimento de novos tecidos, como demonstrado em estudos em camundongos. Além disso, a capacidade de retenção de água das nanofibras de PEO estimula a cicatrização de feridas (AHIRE *et al.*, 2017).

A fase final dos testes preliminares foi então composta pela variação do percentual de CLN-OC em relação aos sólidos totais (PEO + CLN-OC) e o percentual de PEO em reação à solução polimérica final (Tabela 17). Para os ensaios 7 a 9, sob a vazão de 1,0 mL/h, foi observada uma instabilidade na formação da conta na ponta da agulha. Apesar da formação do cone de Taylor, o jato de solução polimérica não apresentou constância, a gota pesava na ponta da agulha e gotejava. Para solucionar essa situação a vazão foi alterada para 0,5 mL/h.

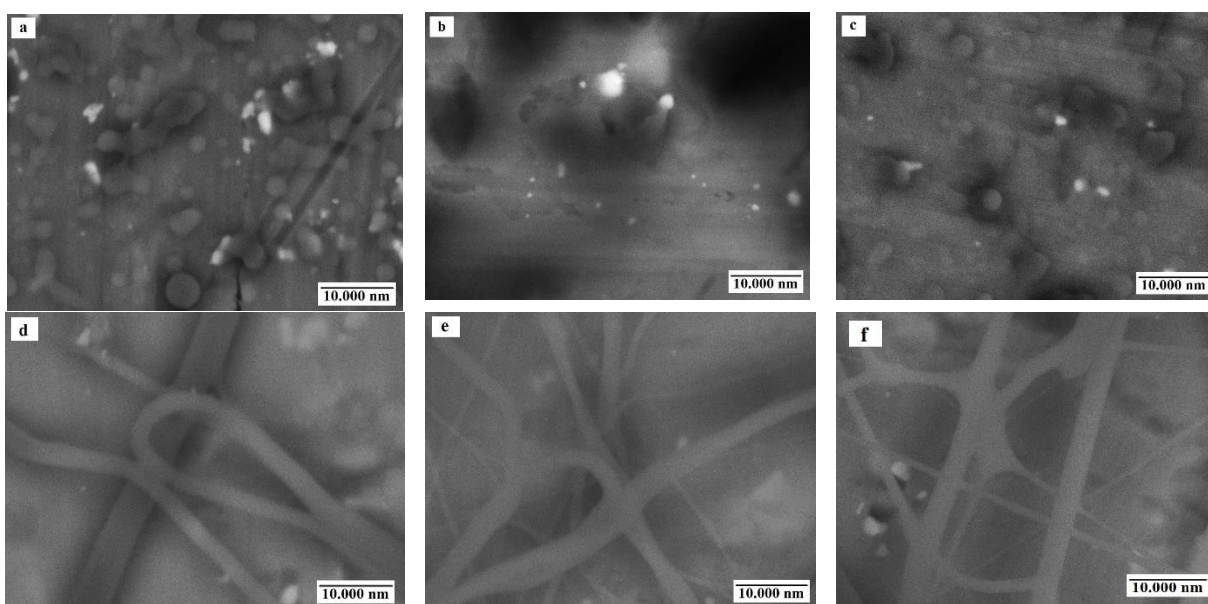
Os ensaios 7, 8 e 9 (Figura 29g, h e i) promoveram uma grande deposição de fibras na placa coletora. Esse aumento considerável na quantidade de fibras formadas, quando comparado aos ensaios do PVP e PVA, pode ser também explicado pelo fato do PEO possuir

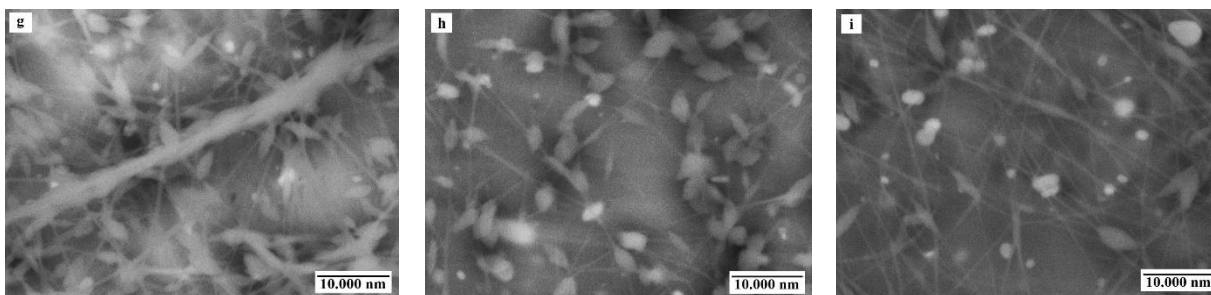
o maior peso molecular testado neste estudo (900.000 g/mol). Apesar da redução da concentração de PEO presente na solução polimérica, sua grande massa molar pode provocar um aumento considerável na viscosidade da solução, permitindo um melhor emaranhamento das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, um jato contínuo na eletrofiação. Apesar da formação de *beads*, a melhoria na estabilidade do jato beneficiou também formação de fibras com diâmetros menores, em torno de 100 a 500 nm.

Dentre os ensaios preliminares do PEO, o ensaio 7 (Figura 29g) apresentou a maior formação de *beads* ao longo das fibras, seguida pelo ensaio 8 (Figura 29h) e 9 (Figura 29i). Esse comportamento, pode ter ocorrido, porque, apesar da alta massa molar do PEO, as alterações realizadas na concentração da solução afetaram consideravelmente sua viscosidade. Dentre os três, o ensaio 9 possui maior percentual de CLN-OC e de PEO (Tabela 17), proporcionando a sua solução um melhor emaranhamento das cadeias poliméricas e, portanto, a formação de fibras com menor número de *beads*.

Diante dos ensaios realizados nesta etapa preliminar, o PEO foi o polímero que, nas condições ambientais e de processo determinadas, produziu nanofibras com menor diâmetro e maior taxa de deposição. Com o intuito de evitar a presença dos *beads* observados no ensaio 9, o percentual de PEO foi aumentado para composição da solução polimérica do planejamento fatorial realizado neste trabalho.

**Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura dos ensaios 1 (a), 2(b), 3(c), 4(d), 5(e), 6(f), 7(g), 8(h) e 9(i) realizados nos testes preliminares.**





Fonte: Autor.

### 3.2 Influência dos parâmetros da solução polimérica no diâmetro médio das nanofibras

A eletrofição é um método bem estabelecido e direto de fabricação de nanofibras de diferentes materiais, como polímeros, cerâmicas e metais. O processo é realizado na presença de alto campo elétrico que resulta no estiramento da solução polimérica que produz fibras que estão em micro/nanoescala. A nanofibra eletrofiada produzida a partir desta técnica oferece propriedades excepcionais, como alta relação entre área superficial e volume, flexibilidade, alta porosidade e melhor relação de aspecto, o que a torna adequada para várias aplicações industriais (UTKARSH *et al.*, 2020).

Foram eletrofiadas as 7 soluções poliméricas de PEO contendo CLN-OC conforme determinado pelo planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 19), em relação aos parâmetros de formulação pré-determinados. As variáveis respostas analisadas de acordo com o desenho experimental foram o diâmetro médio e o desvio padrão do diâmetro de 20 fibras medidas em cada ensaio (Tabela 19). Para a determinação dessas variáveis, as estruturas morfológicas das nanofibras foram obtidas por MEV com uma amplitude de 10.000x (Figura 30).

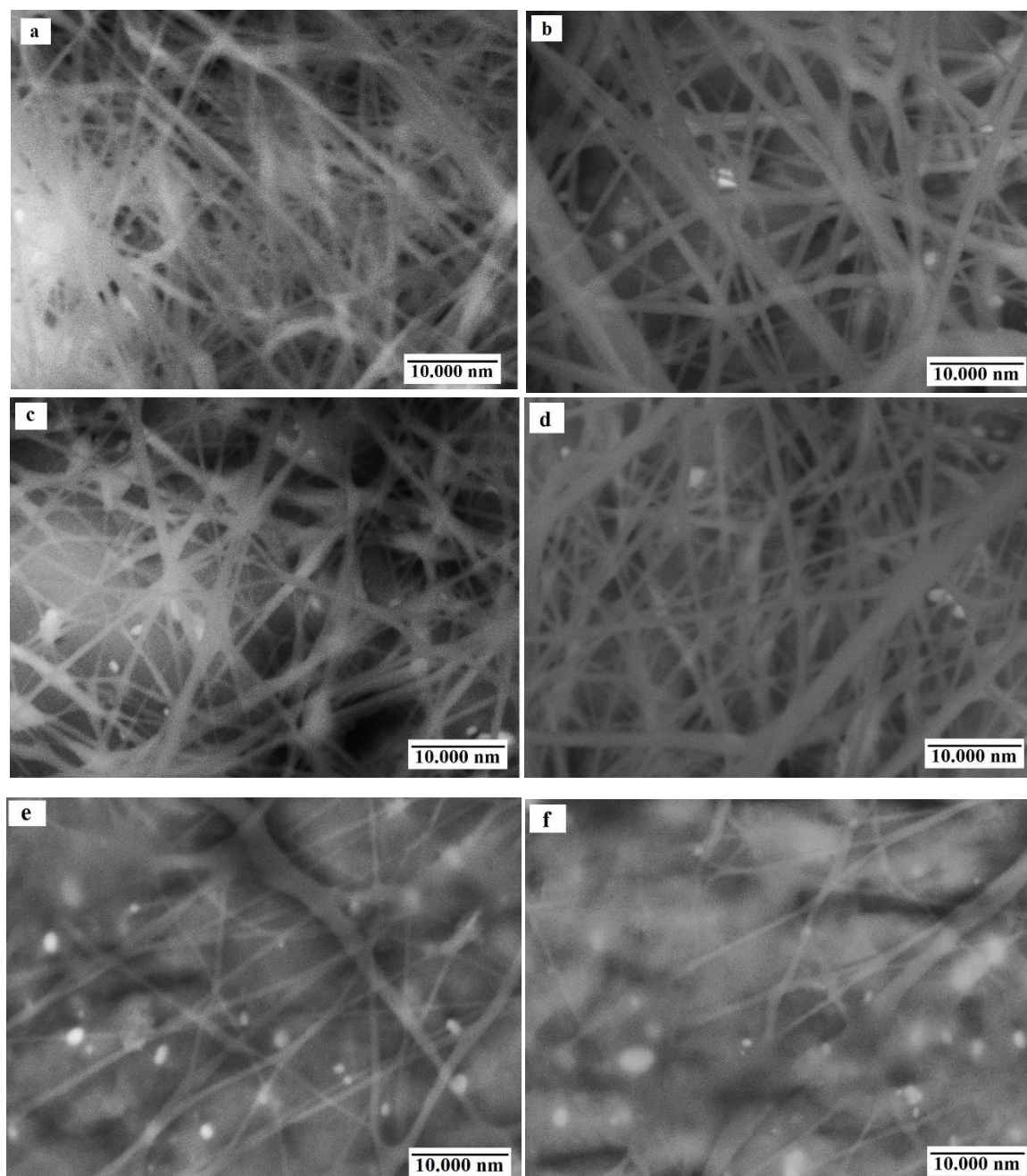
**Tabela 19 - Matriz do planejamento fatorial e valores do diâmetro e desvio padrão obtidos como variáveis respostas.**

Ensaio	Variáveis independentes		Média dos diâmetros (nm)	DP dos diâmetros
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>		
1	-1,00(4,25)	-1,00(17,50)	127,55	15,19
2	1,00(4,75)	-1,00(17,50)	450,25	58,67
3	-1,00(4,25)	1,00(25,00)	210,53	47,13
4	1,00(4,75)	1,00(25,00)	531,18	147,66
5	0,00(4,50)	0,00(21,25)	313,00	76,39

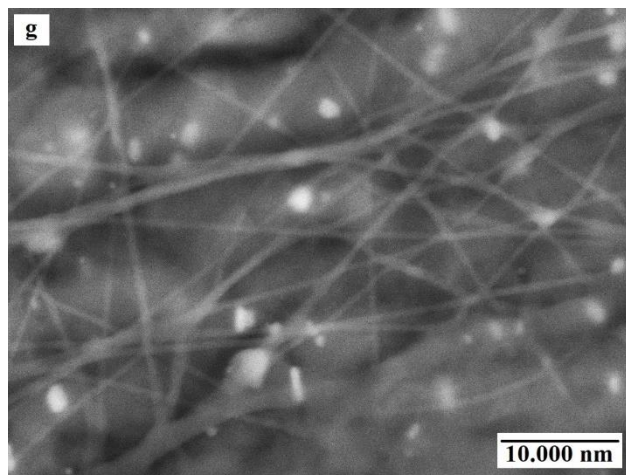
6	0,00(4,50)	0,00(21,25)	313,34	87,71
7	0,00(4,50)	0,00(21,25)	313,87	71,31

Fonte: Autor.  $X_1$  = PEO,  $X_2$  = CLN-OC / PEO e DP = desvio padrão.

**Figura 30 – Morfologia das nanofibras eletrofiadas a partir das soluções estabelecidas dos ensaios 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f) e 7 (g) do planejamento fatorial.**







Fonte: Autor.

Os resultados obtidos para o diâmetro médio das nanofibras variaram entre 127,55 e 531,18 nm (Tabela 19). A concentração da solução polimérica afeta diretamente no diâmetro médio das fibras, uma vez que o aumento dessa concentração provoca um aumento na viscosidade da solução, levando um melhor emaranhamento das cadeias poliméricas, o que pode provocar um aumento do diâmetro das fibras. Em geral, uma viscosidade mais baixa favorece a formação de fibras mais finas e homogêneas (COSTA *et al.*, 2012; MERCANTE *et al.*, 2021). Esse comportamento pode ser observado nos ensaios 4 (Tabela 19), onde a maior concentração de sólidos (PEO e CLN-OC) estudada resultou no maior diâmetro médio das nanofibras. De forma análoga, porém oposta, o ensaio 1 obteve o menor diâmetro, provocado pela sua baixa concentração em relação aos outros ensaios. As imagens do MEV mostram nitidamente essa distinção do diâmetro das fibras (Figura 30), é possível visualizar fibras com diâmetros aparentemente maiores nos ensaios 2 e 4, quando comparados com os demais ensaios.

Para o desvio padrão (DP) dos diâmetros foi medido para avaliar a homogeneidade das fibras obtidas. Nanofibras mais homogêneas, ou seja, com menor DP dos diâmetros e com a ausência de *beads*, proporcionam uma liberação mais estável. Os *beads* são aglomerações poliméricas, formando gotas na extensão da fibra (COSTA *et al.*, 2012; LI.; WANG, 2013). As imagens obtidas pelo MEV (Figura 30) possibilita observar a ausência de *beads* ao longo das fibras, ou seja, a formação de fibras lisas e homogêneas. Para as nanofibras obtidas neste estudo, os DPs variaram entre 15,19 e 147,66 (Tabela 19), sendo o menor DP obtido pelo ensaio 1 e o maior obtido pelo ensaio 4, sendo coerentes com os diâmetros médios obtidos nestes experimentos.

Assim como no delineamento dos nanocarreadores, os dados obtidos para as nanofibras (Tabela 19) foram então submetidos à análise estatística, incluindo adequação à equação (Equação 15), seguida de ANOVA com nível de confiança de 90%. O comportamento dos modelos ajustados foi verificado apenas para os parâmetros estatisticamente significativos. A ANOVA permitiu determinar os coeficientes de regressão para a equação polinomial de primeira ordem codificada, os  $R^2$ , os valores F e p-valores (Tabela 20). Por fim, para avaliar a preditividade das equações ajustadas, elas devem satisfazer o critério baseado nos valores de  $F_{\text{teste}}$ , valor este que deve ser maior que 3 (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

**Tabela 20 – Resultados dos coeficientes de regressão da equação ajustada e da ANOVA para a média do diâmetro e o DP das nanofibras.**

Parâmetro	Coeficiente	Média	DP
		Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
<b>Linear</b>	$\beta_0$	322,8171 (0,000007)	72,00857 (0,000415)
<b>X<sub>1</sub></b>	$\beta_1$	160,8375 (0,000127)	36,00250 (0,007168)
<b>X<sub>2</sub></b>	$\beta_2$	40,9775 (0,001618)	30,23250 (0,011720)
<b>Interação</b>			
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	$\beta_{12}$	-	14,26250 (0,080140)
<b>F<sub>calculado</sub></b>	-	472,22	26,81
<b>F<sub>listado</sub></b>	-	4,32	5,39
<b>F<sub>teste</sub> = F<sub>calculado</sub>/F<sub>listado</sub></b>	-	109,31	4,97
<b>p-valor</b>		1,78 x 10 <sup>-5</sup>	1,15 x 10 <sup>-2</sup>
<b>R<sup>2</sup></b>		0,99	0,96

Fonte: Autor. X<sub>1</sub> = PEO, X<sub>2</sub> = CLN-OC/PEO, Y<sub>1</sub> = média dos diâmetros, Y<sub>2</sub> = DP = desvio padrão dos diâmetros, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação e p-valor = p-valor da equação. Apresentação: coeficiente (p-valor do coeficiente).

### 3.3 Efeito sobre a média e o DP do diâmetro das nanofibras

A média (Y<sub>1</sub>) e do DP (Y<sub>2</sub>) dos diâmetros das nanofibras foram as variáveis respostas avaliadas neste estudo, com o intuito de verificar suas significâncias diante do modelo ajustado. Os valores de  $F_{\text{teste}}$  foram iguais a 109,31 e 4,97 para Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub>, respectivamente

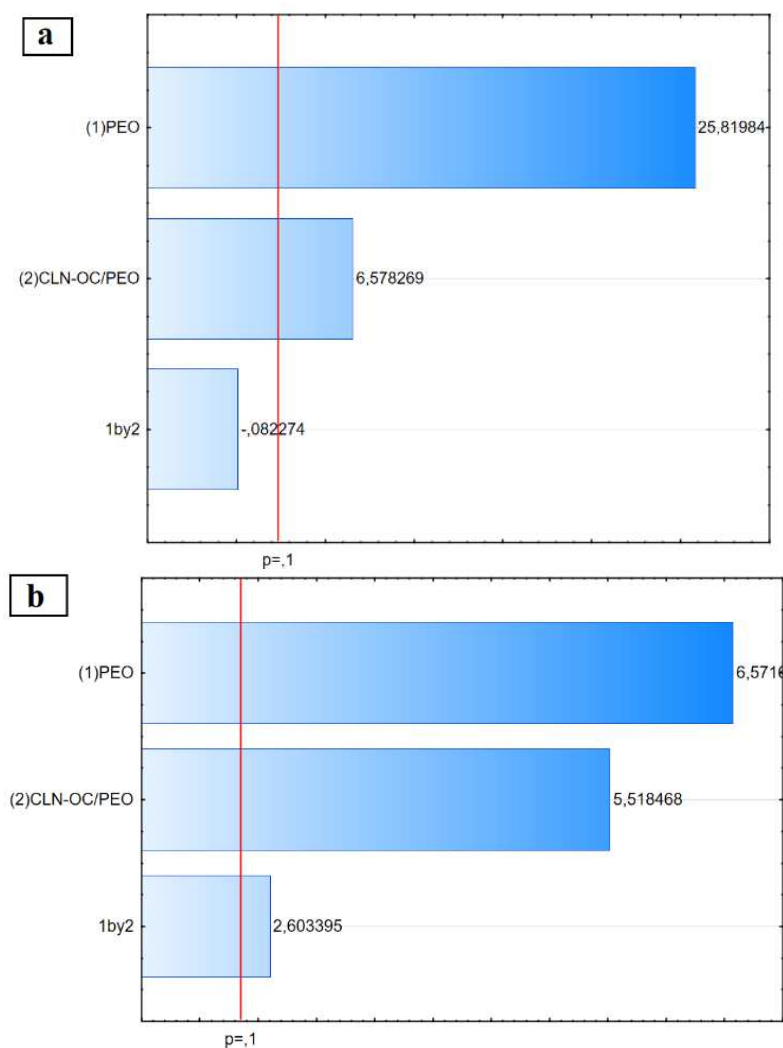
(Tabela 20) e as equações para essas variáveis foram consideradas preditivas, uma vez que estes valores são maiores que 3. Isso sugere que, tanto para a variável diâmetro médio quanto para o DP, o modelo ajustado foi adequado (significativo e preditivo) e possuiu uma regressão significativa. Além disso, os valores residuais foram baixos, sem falta de ajuste e o coeficiente de determinação foi satisfatório. O  $R^2$  obtido para  $Y_1$  foi igual a 0,99 e para  $Y_2$  foi igual a 0,96, indicando que 99% e 96% da variação observada nos dados é explicada pelos modelos das variáveis média e DP do diâmetro, respectivamente (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; FUKUDA *et al.*, 2018; KHURI; CORNELL, 1996; PELISSARI *et al.*, 2013).

Comprovada a significância estatística para as variáveis  $Y_1$  e  $Y_2$ , as equações de primeira ordem para esses parâmetros são determinadas (Equação 17 e 18, respectivamente). Um sinal positivo mostra um efeito sinérgico, enquanto um negativo representa um efeito antagônico. Os diagramas de Pareto (Figura 31) obtidos para esses parâmetros exibem de forma clara os fatores de entrada, PEO e CLN-OC/PEO (e suas interseções) em ordem de importância, bem como destaca os fatores insignificantes. Para a média dos diâmetros, foi observado que a variável de entrada PEO ( $X_1$ ) é consideravelmente mais significativa que a CLN-OC/PEO ( $X_2$ ), e que a interação entre elas não possui significância para esse modelo (Figura 31a). Por outro lado, para o DP do diâmetro, notou-se a significância da variável  $X_1$ , seguida da  $X_2$  e da interação entre elas, nesta ordem (Figura 31b).

$$Y_1 = 322,8171 + 160,8375X_1 + 40,9775X_2 \quad (17)$$

$$Y_2 = 72,00857 + 36,00250X_1 + 30,23250X_2 + 14,26250 X_1X_2 \quad (18)$$

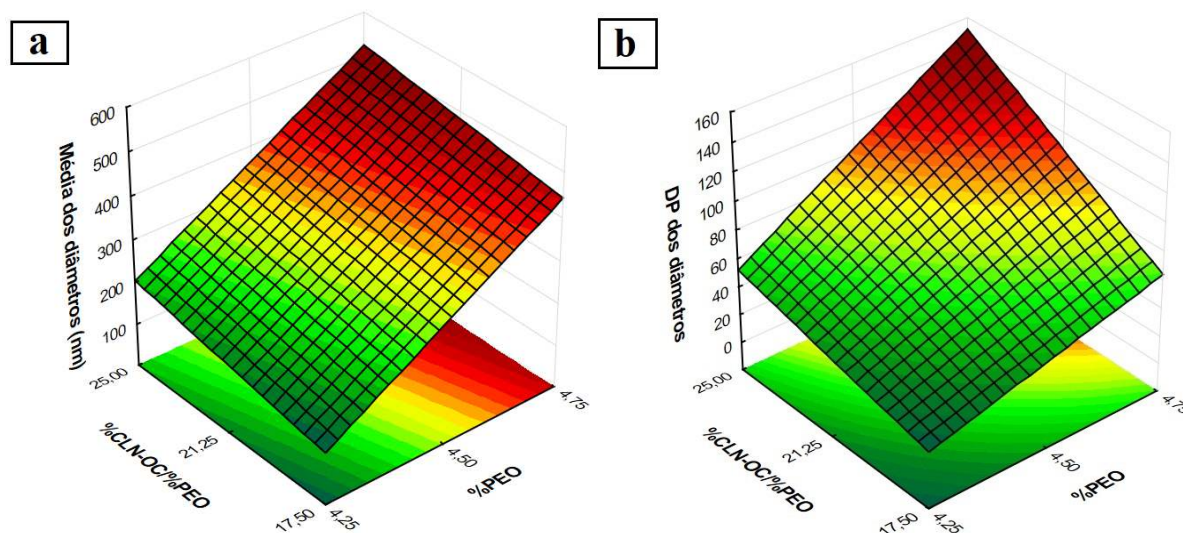
**Figura 31 - Diagramas de Pareto das variáveis resposta: média (a) e DP (b) do diâmetro das nanofibras, obtido a partir das variáveis de entrada: PEO, CLN-OC/PEO e interação entre as mesmas.**



Fonte: Autor. 1by2 = interação entre PEO e CLN-OC/PEO, p = p-valor, PEO = Polióxido de etileno, CLN-OC= nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba.

Com a preditividade das variáveis respostas comprovadas, foi possível correlacionar influência dos fatores de entrada nestas variáveis, traçando as superfícies respostas tridimensionais (Figura 32).

**Figura 32 - Superfícies respostas das variáveis resposta média (a) e DP (b) diâmetro médio das nanofibras em função do percentual de PEO e CLN-OC/PEO.**



Fonte: Autor.

A concentração de polímero na solução polimérica é um dos parâmetros de maior importância para formação de fibras na eletrofiação. É necessário obter um determinado grau de emaranhamento de cadeias na solução polimérica para que as fibras possam ser formadas de maneira uniformes. Normalmente, o aumento da concentração de polímero na solução leva ao aumento da viscosidade, levando também ao melhor emaranhamento das cadeias poliméricas, o que é essencial para manter um jato contínuo na eletrofiação. O aumento do diâmetro das fibras também pode ocorrer com o aumento da concentração de polímero na solução (COSTA *et al.*, 2012; LI; WANG, 2013).

Pode-se observar três comportamentos devido a concentração da solução polimérica na eletrofiação. Quando há uma concentração baixa de polímero, por consequência uma baixa viscosidade na solução polimérica, o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas pode ser pequeno, causando uma instabilidade capilar na extremidade do jato, podendo causar um espalhamento eletrostático ao invés da eletrofiação. Para uma concentração um pouco maior, obtém-se a formação de uma mistura de contas (*beads*) e fibras. Portanto, uma solução polimérica a uma concentração apropriada proporciona a formação adequada do jato e produz nanofibras lisas e homogêneas (COSTA *et al.*, 2012; LI; WANG, 2013).

O aumento do percentual de PEO nas soluções poliméricas ocasionou um aumento no diâmetro médio das nanofibras eletrofiadas (Figura 32a), o que pode ser explicado pelo aumento no grau de emaranhamento das cadeias poliméricas. Um aumento no diâmetro também pode ser observado com o acréscimo de CLN-OC na solução polimérica. Esse

comportamento pode ser explicado devido ao efeito que esse aumento de CLN-OC provoca na concentração das soluções. Além disso, o aumento da viscosidade da solução polimérica, seja através da adição de PEO ou de CLN-OC, resultou em um aumento considerável no desvio padrão dos diâmetros das fibras (Figura 32b). Este é o efeito consequente da formação de um jato de solução polimérica constante e estável durante o processo de eletrospinação. O aumento da viscosidade levou ao aumento da força viscoelástica e da resistência à extensão, com afinamento do jato causado por forças de repulsão eletrostática e coulombiana (TARUS *et al.*, 2016).

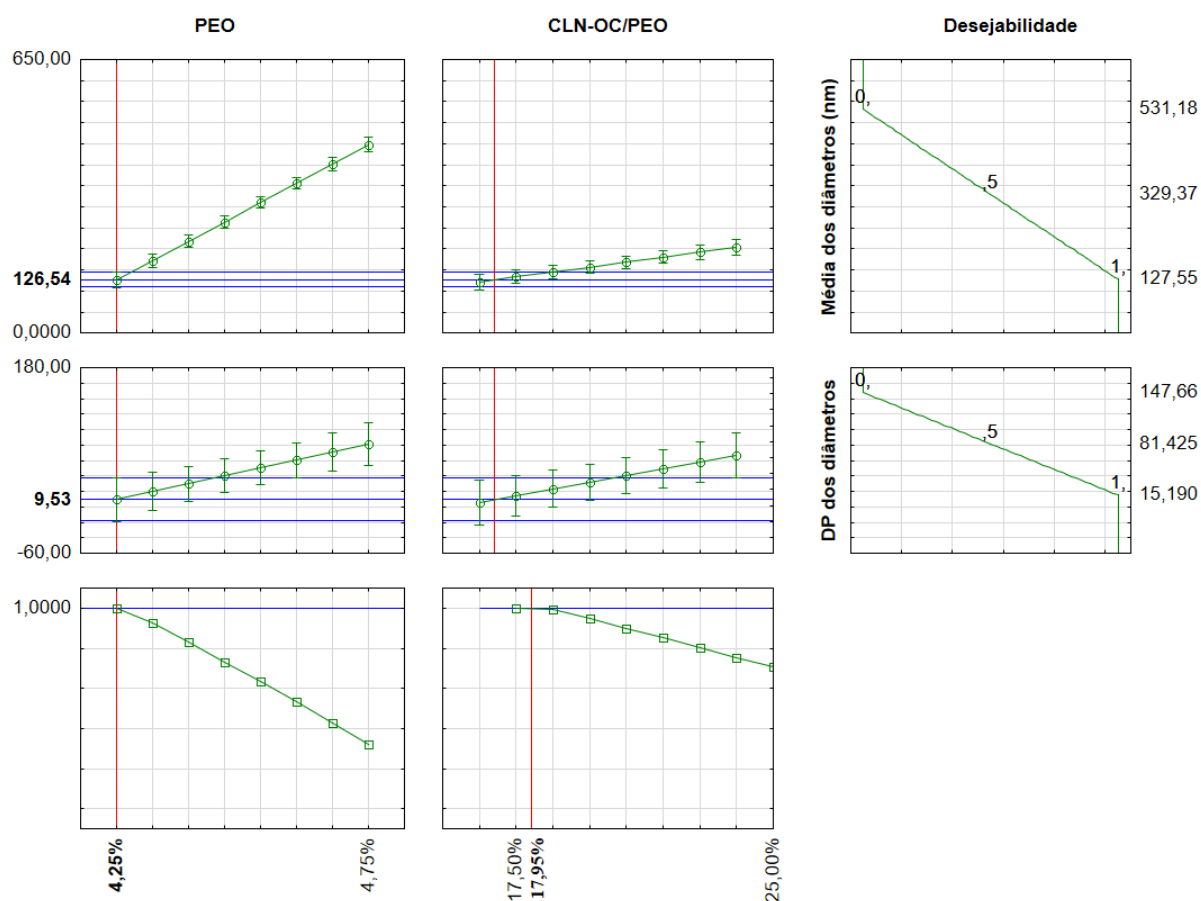
Um comportamento parecido foi observado em nanofibras de PEO funcionalizadas com ciclodextrina. A adição de ciclodextrina facilitou a capacidade de eletrospinação do PEO, mesmo em soluções com baixa concentração de polímero, produzindo fibras livres de *beads*. Neste estudo, também foi possível observar um aumento na média dos diâmetros das fibras, ao aumentar o percentual de PEO, bem como ao adicionar a ciclodextrina nas soluções (UYAR; BESENBACHER, 2009). Outro estudo utilizou nanofibras híbridas de quitosana/PEO/sílica contendo ciprofloxacina para acelerar o processo de cicatrização de feridas. Este estudo também observou um aumento no diâmetro médio das fibras, de 320 nm para 387 nm, com a introdução do precursor de sílica, e para 422 nm adicionado o ativo (HASHEMIKIA *et al.*, 2021). De forma similar, nanofibras híbridas de quitosana/PEO carregadas com vancomicina foram fabricadas para avaliação de sua atividade cicatrizante. O diâmetro das fibras complexo quitosana/PEO (360 nm) apresentaram-se relativamente menores do que ao adicionar 2,5 % (428 nm) e 5,0 % (823 nm) de vancomicina (KALALINIA *et al.*, 2021).

### 3.4 Otimização das nanofibras através da função desejabilidade

A otimização da composição da solução polimérica foi realizada através do método multi-resposta, denominado função desejabilidade (BAKHAI DAR *et al.*, 2022; DERRINGER; SUICH, 1980). Este método foi aplicado para as duas variáveis resposta, média e DP do diâmetro, uma vez que o modelo foi considerado válido para essas duas variáveis. O perfil de função de desejabilidade da média e DP foi exibido para cada um dos fatores de entrada examinados (Figura 33). Assim, as condições mais adequadas para obter o menor valor de diâmetro médio (126,54 nm) e menor DP (9,53) são PEO = 4,258% e CLN-OC/PEO = 17,95 %. Um estudo obteve nanofibras otimizadas com diâmetro similar (126,14 nm). Neste trabalho as nanofibras eletrospinnadas de poliácridonitrila/PEO carregadas com

hesperidina foram preparadas para uso como curativo. Um planejamento fatorial completo foi aplicado para avaliar a influência das variáveis de formulação, incluindo quantidade de PEO, quantidade de hesperidina e quantidade total de polímero nas características da nanofibra. De acordo com os resultados da análise de regressão, o impacto da concentração de polímero foi maior do que a concentração de PEO e concentração de hesperidina (TAYMOURI *et al.*, 2021). Outros trabalhos também utilizam o planejamento fatorial e otimização para encontrar condições ideais para produção de nanofibras eletrofiadas (ALEMOMEN *et al.*, 2022; KORYCKA *et al.*, 2018; NOTTELET *et al.*, 2009).

**Figura 33 - Otimização das condições de processo para a produção de nanofibras eletrofiadas em função das variáveis de entrada, variáveis respostas previstas e perfil de desejabilidade.**



Fonte: Autor.

A validação experimental foi realizada em triplicata, a partir do preparo das soluções poliméricas de acordo com a composição fornecida na função desejabilidade. O valor esperado e o resultado experimental para a variável resposta média dos diâmetros foram de

126,54 nm e 116,86 nm, respectivamente. Da mesma maneira, os valores esperados e experimentais obtidos para a variável DP dos diâmetros foram 9,53 e 9,60, respectivamente (Tabela 21). Com base nos desvios relativos obtidos (Tabela 21), a otimização e a metodologia empregada puderam ser consideradas satisfatórias, assim como os valores experimentais alcançados para as duas variáveis respostas indicam alta preditividade e características confiáveis dos modelos ajustados (DARABI *et al.*, 2022).

**Tabela 21 - Validação experimental das condições otimizadas para a produção de nanofibras de PEO contendo CLN-OC.**

Variável resposta	Valor preditivo	Valor experimental	Desvio relativo <sup>a</sup> (%)
Média do diâmetro (nm)	126,54	116,86	- 8,29
DP do diâmetro	9,53	9,60	0,47

Fonte: Autor. <sup>a</sup>Desvio relativo = [(Valor experimental – Valor previsto) / Valor experimental] x 100; DP = desvio padrão.

A incorporação de compostos com propriedades bioativos em nanofibras de PEO tem sido relatado em alguns estudos, como por exemplo o uso de nanofibras eletrofiadas de sílica/quitosana/PEO eletrofiadas contendo cefepima, um agente antibacteriano. Neste estudo foram discutidas as propriedades antibacterianas e a síntese e caracterização de uma fibra antibiótica elaborada a partir desses compostos. O diâmetro médio das nanofibras obtidos neste estudo foi de 112 nm (PEBDENI; SADRI; HOSSEINI, 2016). Em outro estudo, nanofibras de PEO, contendo canamicina e ácido hialurônico, foram preparadas por eletrofiação e obtiveram um diâmetro médio de  $83 \pm 20$  nm (AHIRE *et al.*, 2017).

### 3.5 Caracterização da nanofibra otimizada

#### 3.5.1 MEV

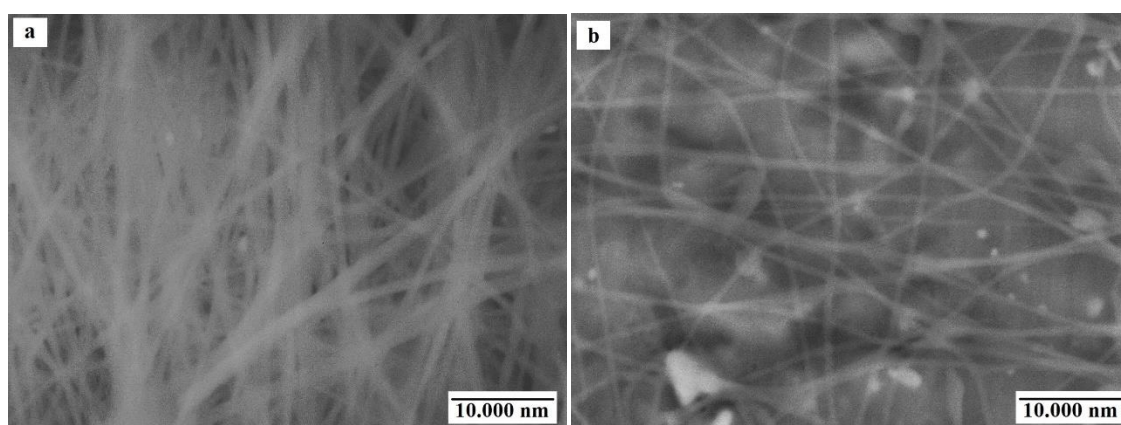
A estrutura da nanofibra otimizada contendo ou não CLN-OC em sua formulação foi avaliada com a finalidade de avaliar a influência da presença dos carreadores nas nanofibras (Figura 34). A morfologia das nanofibras de PEO puro (Figura 34b) apresentam-se lisas e homogêneas, livres da presença de *beads*, assim como as nanofibras de PEO contendo CLN-OC (Figura 34a). Entretanto é perceptível que, para as mesmas condições do processo de eletrofiação, ocorreu uma maior deposição de fibras contendo CLN-OC quando comparada



com a fibra de PEO puro. Isso pode ser explicado através da viscosidade das soluções poliméricas que, por sua vez está relacionada com a concentração da solução. Sabendo que o polímero utilizado nas duas soluções não foi alterado, a viscosidade da solução contendo CLN-OC pode ter sido alterada na presença dos nanocarreadores. Quando a viscosidade se apresenta muito baixa, pode não ocorrer a formação de fibras, pois o jato eletrofiado rompe-se e há formação de gotículas de polímero (*electrospraying*), ou mesmo pode ocorrer formação de um material fibroso com a presença de *beads*. Soluções mais viscosas propiciam maior deposição de fibras, bem como fibras mais uniformes e com diâmetro maior (LI, Z.; WANG, 2013; MERCANTE *et al.*, 2021; MITCHELL, 2015).

O diâmetro médio e o DP obtidos nas fibras de PEO puro apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com as fibras contendo CLN-OC. Um aumento, mesmo que pequeno, no diâmetro médio pode ser observado nas fibras contendo CLN-OC, de aproximadamente 22 nm (Tabela 22). As fibras contendo os nanocarreadores também se apresentam mais uniformes e lineares (Figura 34), com um o DP menor do que das fibras de PEO puro.

**Figura 34 - Morfologia da nanofibra otimizada de PEO, sendo (a) contendo CLN-OC e (b) PEO puro.**



Fonte: Autor.

**Tabela 22 - Caracterização das nanofibras otimizadas.**

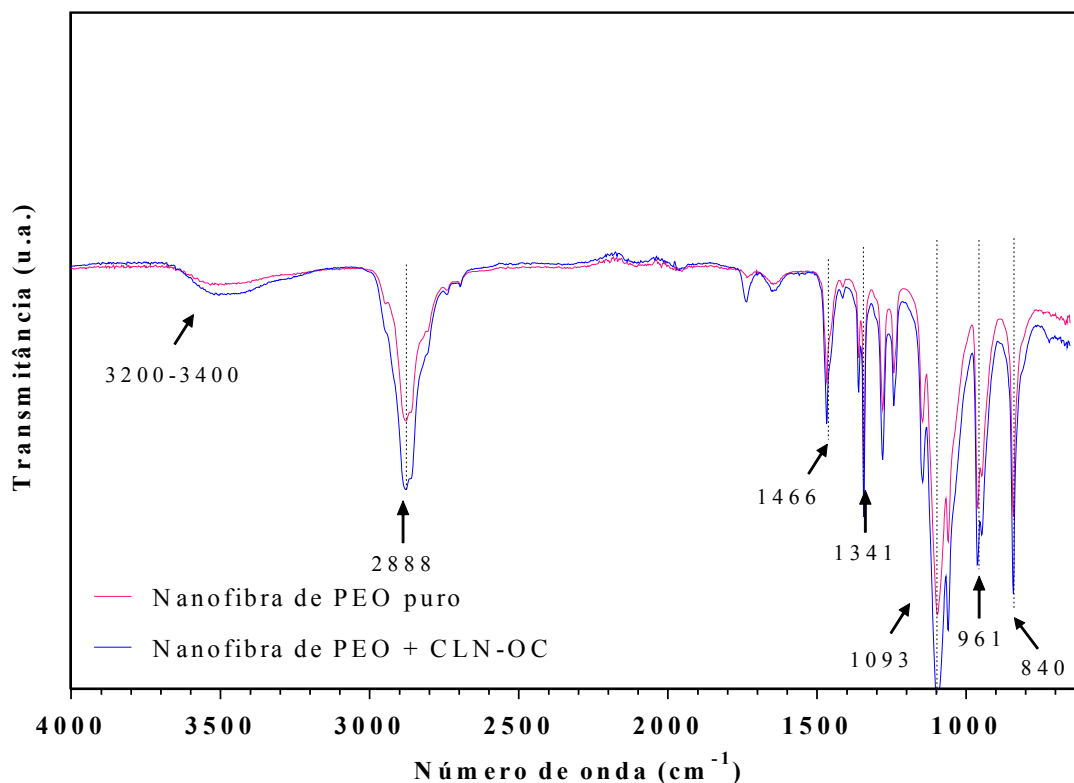
Parâmetro	Nanofibras	
	PEO puro	Contendo CLN-OC
Diâmetro médio (nm)	94,92	116,86
DP dos diâmetros	11,84	9,60

Fonte: Autor. PEO: polióxido de etileno, CLN-OC: nanocarreador lipídico contendo óleo de copaíba, DP: desvio padrão.

### 3.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Foram realizadas análises de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) nas nanofibras de PEO puro e nanofibras de PEO contendo CLN-OC (Figura 35), com o intuito de fornecer informações sobre a inclusão da matriz complexa dos nanocarreadores nas nanofibras. O PEO é um homopolímero sintetizado a partir do monômero óxido de etileno ( $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}-]_n$ ). Este polímero é altamente hidrofílico, portanto, uma banda larga é observada entre 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$  devido a hidratação deste polímero durante a produção da solução polimérica. O comprimento de onda 2888  $\text{cm}^{-1}$  é observada uma banda relativa aos estiramentos as ligações carbono-hidrogênio ( $\text{C-H}_2 \text{ sp}^3$ ). As bandas em 1466 e 1341  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações e deformações angulares simétricas da ligação carbono-hidrogênio (C-H) no grupo metil no plano, respectivamente. As bandas em 1093 e 961  $\text{cm}^{-1}$  são referentes às vibrações de estiramento (C-O-C) e em 840  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a vibrações de torção  $\text{CH}_2$  em  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$  (HE *et al.*, 2022; MANATUNGA *et al.*, 2022; TAYMOURI *et al.*, 2021). Devido à baixa porcentagem de nanocarreadores na estrutura da nanofibra, suas bandas características podem se sobrepor e não serem claramente visíveis. No entanto, apesar dos aspectos apresentarem uma diferença estatisticamente significativa entre si ( $p < 0,5$ ), pode-se observar um perfil muito semelhante entre eles, podendo-se inferir que provavelmente o CLN-OC foi incorporado na rede polimérica. Em outras palavras, as bandas associadas ao PEO mantiveram suas posições nos espectros das nanofibras contendo ou não nanocarreadores. Da mesma forma, outros estudos não encontraram distinção entre os espectros das nanofibras de PEO contendo ou não ativos (KAJDIČ *et al.*, 2020).

**Figura 35 - Espectros de absorção por FTIR das nanofibras de PEO contendo ou não CLN-OC.**



Fonte: Autor.

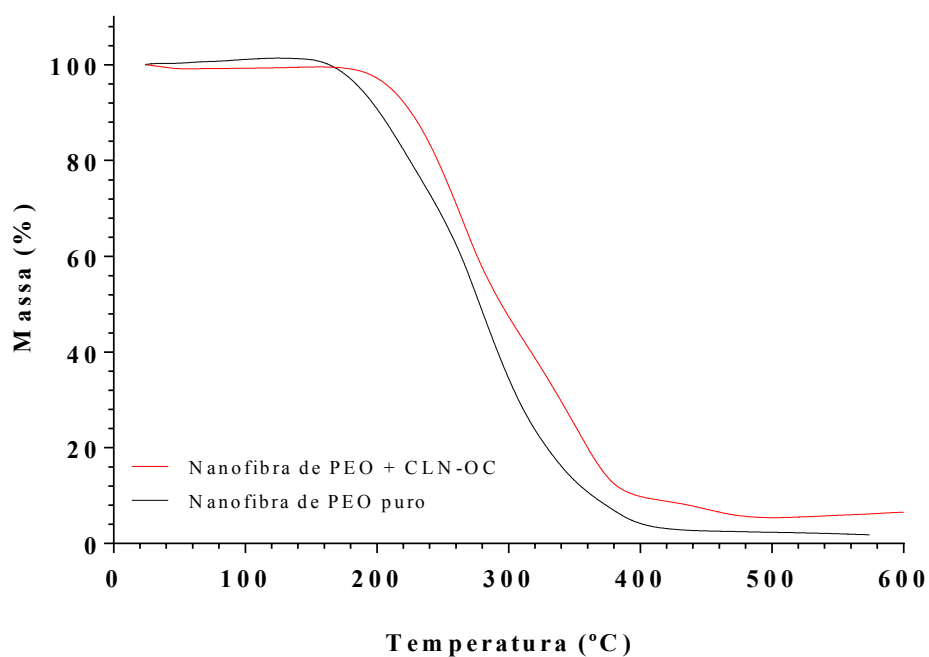
### 3.5.3 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que mede a mudança de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo devido à decomposição, oxidação e perda de voláteis sob um programa de temperatura especificado e condições atmosféricas. A TGA pode ser realizada aumentando gradualmente a temperatura da amostra sob uma taxa de aquecimento constante (condições não isotérmicas) ou mantendo uma temperatura constante e registrando a perda de massa em função do tempo a uma temperatura fixa (condições isotérmicas) (GERASSIMIDOU *et al.*, 2020). Neste estudo foi realizada a análise de TGA das nanofibras de PEO contendo ou não CLN-OC, com o intuito de verificar a variação de massa dessas amostras em função da variação da temperatura.

Os resultados obtidos pela TGA (Figura 36) mostram que, para as nanofibras de PEO puro, foi observada uma perda de peso única iniciada em 160 °C totalizando 96% de perda de massa. Com a adição de CLN-OC ao PEO, a nanofibra apresentou um início de decomposição

em 200 °C, com perda de massa total de 94% e o evento acontece em duas etapas. Ainda, apesar dos perfis de perda de massa terem apresentado uma semelhança entre si ( $r^2=0,988$ ), a amostra das nanofibras de PEO contendo CLN-OC apresentaram uma estabilidade térmica ligeiramente superior quando comparada das nanofibras de PEO puro.

**Figura 36 - Análise termogravimétrica (TGA) das nanofibras.**



Fonte: Autor.

## 4 CONCLUSÃO

O planejamento fatorial empregado para na produção das NFs eletrofiadas de PEO contendo CLN-OC apresentou modelos estatisticamente significativos e preditivos para as variáveis resposta analisadas, média e DP do diâmetro das fibras. Insinuando que os modelos ajustados prenunciam a conduta dessas variáveis resposta à medida que o percentual de PEO e CLN-OC da solução polimérica é alterado. A validação experimental da NFs contendo CLN-OC foi satisfatória para a média e o DP ( $DR = -8,29\%$  e  $0,47\%$ , respectivamente), comprovando assim alta preditividade e as características confiáveis dos modelos ajustados.

A morfologia das NFs otimizadas apresenta-se lisas e homogêneas, livres da presença de *beads*, com um diâmetro médio de 116,86 nm. Um aumento considerável na deposição de fibras no coletor foi observado para as soluções de PEO contendo CLN-OC, quando comparada com as NFs de PEO puro. Esse comportamento pode ser explicado pela alteração da viscosidade da solução polimérica em virtude da adição dos CLN-OC, sugerindo que a viscosidade pode ter reduzido. Os espectros no infravermelho indicam também a ausência de incompatibilidade entre os componentes das NFs e apontam a possível encapsulação dos CLN-OC nas fibras poliméricas. Bem como a análise termogravimétrica sugere uma maior estabilidade térmica das NFs contendo CLN-OC.

Dessa forma, as análises apresentam indícios da incorporação do CLN-OC nas nanofibras de PEO, tornando-as estruturas viáveis para o carreamento e a liberação desses nanocarreadores para aplicações tópicas.

## REFERÊNCIAS

- AHIRE, J. J. *et al.* Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 143–148, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.006>>.
- ALEMOMEN, M. *et al.* Preparation, optimization, and in vitro–in vivo evaluation of sorafenib-loaded polycaprolactone and cellulose acetate nanofibers for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Delivery and Translational Research**, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13346-022-01250-2>>.
- BAKHAI DAR, R. B. *et al.* Development and optimization of a tamsulosin nanostructured lipid carrier loaded with saw palmetto oil and pumpkin seed oil for treatment of benign prostatic hyperplasia. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 2579–2591, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2105448>>.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters: An introduction to Design, Data analysis, and Model Building*. Wiley ed. New York, 1978.
- CHOI, S. *et al.* PVP-assisted synthesis of dense silica-coated graphite with electrically insulating property. **Materials Letters**, v. 90, p. 87–89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2012.09.035>>.
- COSTA, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.
- DARABI, F. *et al.* Anti-CD44 and EGFR Dual-Targeted Solid Lipid Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin to Triple-Negative Breast Cancer Cell Line: Preparation, Statistical Optimization, and in Vitro Characterization. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1–13, 2022.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.
- DREYER, J. P. Eletrofiação do poli(óxido de etileno) e acetato de celulose e a influência da incorporação de aromatizantes no processo de eletrofiação. 2015. 109 f. 2015.
- FUKUDA, I. M. *et al.* Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–16, 2018.
- GERASSIMIDOU, S. *et al.* Characterisation and composition identification of waste-derived fuels obtained from municipal solid waste using thermogravimetry: A review. **Waste**

**Management and Research**, v. 38, n. 9, p. 942–965, 2020.

GONÇALVES, N. A. Nanofibras De Poli (  $\epsilon$  -Caprolactona ) Emprego Das Aberrações E Poli ( Óxido De Etileno ): Fabricação Cromossômicas Instáveis E Efeitos Radiolíticos. 2015. 134 f. 2015.

HASHEMIKIA, S. *et al.* Fabrication of ciprofloxacin-loaded chitosan/polyethylene oxide/silica nanofibers for wound dressing application: In vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, n. February, p. 1-13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120313>>.

HE, X. *et al.* Polyethylene Oxide Assisted Fish Collagen-Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Nanofiber Membranes by Electrospinning. **Nanomaterials**, v. 12, n. 6, p. 1–14, 2022.

HU, Z. *et al.* Composite film polarizer based on the oriented assembly of electrospun nanofibers. **Nanotechnology**, v. 27, n. 13, 2016.

JIANG, S.; LIU, S.; FENG, W. PVA hydrogel properties for biomedical application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1228–1233, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>>.

KAJDIČ, S. *et al.* The potential of nanofibers to increase solubility and dissolution rate of the poorly soluble and chemically unstable drug lovastatin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, n. October 2019, 2020.

KALALINIA, F. *et al.* Evaluation of wound healing efficiency of vancomycin-loaded electrospun chitosan/poly ethylene oxide nanofibers in full thickness wound model of rat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 100–110, 2021.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. R. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 3, p. 217–233, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>>.

KHURI, A. J.; CORNELL, F. A. Response surfaces: design and analyses. 2nd. ed. New York, 1996.

KIM, J. O. *et al.* Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1–2, p. 79–86, 2008.

KIM, W. T. *et al.* Effects of electrospinning parameters on the microstructure of pvp/tio<sub>2</sub> nanofibers. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, p. 26–28, 2021.

KORYCKA, P. *et al.* Effect of electrospinning process variables on the size of polymer fibers and bead-on-string structures established with a 2<sup>3</sup> factorial design. **Beilstein Journal of**

**Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 2466–2478, 2018.

LI, H. J. *et al.* Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 10, p. 1–13, 2012.

LI, Z.; WANG, C. One-Dimensional Technique and Electrospinning Nanostructures Unique Nanofibers. **Springer**, 2013.

LIN, L.; DAI, Y.; CUI, H. Antibacterial poly(ethylene oxide) electrospun nanofibers containing cinnamon essential oil/beta-cyclodextrin proteoliposomes. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 131–140, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.043>>.

LU, X. *et al.* One-dimensional conducting polymer nanocomposites: Synthesis, properties and applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 5, p. 671–712, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.07.010>>.

LURAGHI, A.; PERI, F.; MORONI, L. Electrospinning for drug delivery applications: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 334, p. 463–484, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.033>>.

MANATUNGA, D. C. *et al.* Enhancement of Release and Solubility of Curcumin from Electrospun PEO-EC-PVP Tripolymer-Based Nanofibers: A Study on the Effect of Hydrogenated Castor Oil. **ACS Omega**, v. 7, n. 42, p. 37264–37278, 2022.

MASLAKCI, N. N. *et al.* Ibuprofen and acetylsalicylic acid loaded electrospun PVP-dextran nanofiber mats for biomedical applications. **Polymer Bulletin**, v. 74, n. 8, p. 3283–3299, 2017.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, p. 2322–2330, 2009.

MERCANTE, L. A. *et al.* Nanofibras eletrofiadas e suas aplicações: avanços na última década. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 717–736, 2021.

MITCHELL, G. *Electrospinning: Principles, Practice and Possibilities*. London: Royal Society of Chemistry, 2015.

MORAIS, M. G. DE *et al.* Desenvolvimento de nanofibras bioativas com incorporação da microalga Spirulina. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, v. 10, p. 2–7, 2006.

NAM, S. *et al.* Angelica gigas Nakai extract-loaded fast-dissolving nanofiber based on poly(vinyl alcohol) and Soluplus for oral cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 225–234, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.004>>.



- NOTTELET, B. *et al.* Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 89, n. 4, p. 865–875, 2009.
- PEBDENI, A. B.; SADRI, M.; HOSSEINI, H. Preparation of Biopolymeric Nanofiber Containing Silica and Antibiotic. **Journal of Nanostructures**, v. 6, n. 1, p. 96–100, 2016.
- PELISSARI, F. M. *et al.* Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.011>>.
- RAVICHANDRAN, R. *et al.* Click chemistry approach for fabricating PVA/gelatin nanofibers for the differentiation of ADSCs to keratinocytes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 12, p. 2863–2871, 2013.
- SCHEIDT, D. T. Eletrofição da quitosana e sua aplicação como curativo para feridas. 2018. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2018.
- TARUS, B. *et al.* Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats. **Alexandria Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 2975–2984, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aej.2016.04.025>>.
- TAYMOURI, S. *et al.* Fabrication and evaluation of hesperidin loaded polyacrylonitrile/polyethylene oxide nanofibers for wound dressing application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 15, p. 1944–1965, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2021.1952380>>.
- THAKKAR, S.; MISRA, M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. June, p. 148–167, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.001>>.
- UDAYABHASKAR, R. *et al.* Room temperature synthesis and optical studies on Ag and Au mixed nanocomposite polyvinylpyrrolidone polymer films. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 99, p. 69–73, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.08.066>>.
- UTKARSH *et al.* Towards Analysis and Optimization of Electrospun PVP (Polyvinylpyrrolidone) Nanofibers. **Advances in Polymer Technology**, v. 2020, n. c, p. 1–9, 2020.
- UYAR, T.; BESENBACHER, F. Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene

oxide (PEO) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 4, p. 1032–1037, 2009.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.024>>.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polimeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

## CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A encapsulação de ativos e bioativos como ácido salicílico e o óleo de copaíba em nanocarreadores lipídicos se apresentou como alternativa para o aproveitamento de diversas propriedades medicinais e farmacológicas destes componentes, que ainda são pouco exploradas na área de cosmetologia. A técnica de nanoencapsulação possibilitaram a utilização do óleo de copaíba como agente anti-inflamatório e antibacteriano para a elaboração de estratégias alternativas no tratamento da *Acne vulgaris*. Uma vez que os nanocarreadores protegem os componentes lábeis e sensíveis do óleo da degradação química, bem como potencializam a solubilidade em água e biodisponibilidade dos compostos encapsulados.

O método de baixo custo foi validação para a quantificação de AS em CLN-OC. Demonstrando-se seletivo, linear, exato, preciso, robusto e com baixos limites de detecção e quantificação. Afirmando sua eficácia na estimação de AS em nanopartículas lipídicas de matriz complexa.

Os delineamentos experimentais empregados na produção dos nanocarreadores (DCCR) e das nanofibras (planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>) apresentaram modelos significativos ( $R^2 > 0,9$ ) e preditivos ( $F_{teste} > 3$ ) para o tamanho do CLN-OC e a média e DP dos diâmetros das NFs. A validação experimental foi satisfatória para ambas as variáveis resposta, sendo o desvio relativo obtido para o tamanho do CLN-OC, para a média e DP das NFs iguais a -1,24%, -8,29% e 0,47%, respectivamente. Comprovando assim alta preditividade e as características confiáveis dos modelos ajustados.

As caracterizações físico-químicas e os estudos FTIR e DRX do CLN-OC indicam a incorporação do óleo na matriz polimérica do nanocarreador, bem como sua influência no tamanho do CLN ( $50,06 \pm 1,17$  nm). As propriedades apresentadas, conferem um caráter relativamente neutro e uma estabilidade química e em dispersão aquosa ao CLN-OC. A morfologia das NFs otimizadas contendo CLN-OC apresentaram-se lisas e homogêneas, livres da presença de *beads*, com um diâmetro médio de 116,86 nm. Bem como, um considerável aumento na deposição de fibras no coletor, causada possivelmente pela influência do CLN-OC na viscosidade da solução polimérica. Os estudos de caracterização das NFs apontam a possível encapsulação dos CLN-OC e maior estabilidade termina das NFs contendo CLN-OC.

De forma geral, a produção de nanofibras poliméricas contendo nanocarreadores lipídicos de óleo de copaíba foi viabilizada e as caracterizações deste produto apresentam

resultados coerentes e satisfatórios. Portanto, essas nanofibras bioativas surgem como uma nova alternativa par aplicações dermatológicas.

De forma a complementar aos resultados obtidos, para a verificação da incorporação do OC nos CLNs, sugere-se a realização da análise posterior de teor de encapsulação. Bem como, investigar se as propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e cicatrizantes do OC se matem ativas nos CLN-OC. Para melhor compreender as características morfológicas das NFs, sugere-se a realização de análises de viscosidade e condutividade elétrica da solução polimérica. Bem como, investigar a liberação do óleo pelos carreadores e pelas fibras. Ou até mesmo apurar a necessidade de incorporação de aditivos que potencializem a incorporação dos CLN-OC nas nanofibras, no intensão de favorecer suas aplicações farmacológicas.

