

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de flubendazol: preparação e caracterização físico-química

Débora de Souza Gonçalves

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araujo

SÃO PAULO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de flubendazol: preparação e caracterização físico-química

Débora de Souza Gonçalves

Versão original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araujo

SÃO PAULO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G635n	Gonçalves, Débora de Souza Nanocristais de flubendazol: preparação e caracterização físico-química / Débora de Souza Gonçalves. - São Paulo, 2018. 136 p.
	Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Araujo, Gabriel Lima Barros de
	1. nanocristal. 2. flubendazol. 3. câncer de pulmão. 4. microfluidização. I. T. II. Araujo, Gabriel Lima Barros de, orientador.

Débora de Souza Gonçalves

Nanocristais de flubendazol: preparação e caracterização físico-química

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araujo

Orientador/ Presidente

1.º Examinador

2.º Examinador

3.º Examinador

4.º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

DEDICATÓRIA

Primeiramente, a Deus. Para Ele, nada é impossível.

Aos meus amados pais, Lucila e Luis Carlos, que sempre foram meus alicerces nesta jornada.

À minha amada filha Isabela, que me deu forças e inspiração para o desenvolvimento e a finalização deste trabalho.

Ao meu companheiro Mazinho, pela empatia, pela paciência e pelo carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, por me dar saúde, sabedoria e força para o trabalho e por me presentear, no decorrer da jornada, com o símbolo mais doce e puro da esperança e do amor, minha filha Isabela.

Aos meus amados pais, **Lucila e Luis Carlos**, pela educação e pelo amor na minha criação, pelo incentivo e por serem sempre meu alicerce. Amarei vocês eternamente!

Ao meu eterno companheiro **Mazinho**, pelo carinho, pela renúncia e pelo apoio nos momentos difíceis. Juntos somos fortes. Te amo!

À minha amada filha **Isabela**. Você foi um presente de Deus enviado para me dar forças para vencer esta batalha. Não é mensurável o amor que sinto por você!

Aos meus filhinhos de quatro patas, pelos momentos de distração e alegria.

Ao meu amado irmão **Daniel**, pelo incentivo, por toda força e pela ajuda durante este trabalho.

À minha avó **Apparecida** (*in memoriam*), pelo carinho e pelas agradáveis memórias.

Ao meu orientador, professor **Dr. Gabriel Lima Barros de Araujo**, por acreditar no meu potencial, pela paciência, pelo incentivo, pela dedicação ao meu trabalho, pela compreensão nos momentos difíceis e pelos ensinamentos. Foi uma honra contar com uma pessoa tão humana e inteligente durante esta jornada.

À querida professora **Dra. Nádía Araci Bou-Chacra**, pelo acolhimento, pela orientação, pelo apoio, pelo carinho e pela dedicação ao meu trabalho.

À professora **Dra. Claudiana Lameu**, pela colaboração e pelo enriquecimento deste trabalho com ensaios para avaliação da atividade antitumoral do flubendazol.

Ao **Dr. Flávio Machado**, do Instituto de Geociências (USP), pelo apoio com os ensaios de difração de raio X.

À professora **Dra. Luciana Biagini Lopes** e ao professor **Dr. Savio Fujita Barbosa**, pelos valiosos ensinamentos durante o exame de qualificação.

A todos os professores e a todas as professoras do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, pela dedicação e pelo desempenho na formação dos alunos.

Aos colegas do laboratório, **Ivan, Megumi, Katharine, Mirla, Débora e João**, pela troca de experiências e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da FCF da USP, **David e Irineu**, pela competência e pelo suporte.

Agradeço a empresa Libbs e aos meus companheiros de trabalho por terem possibilitado a realização de um sonho.

Agradeço, em especial, ao **Cássio Yooiti Yamakawa** e à **Fabiana Flank Moscovici**, pela paciência, pelo apoio e pelo incentivo para o meu engrandecimento profissional e pessoal.

Agradeço a minha amada amiga **Thais Rosseto do Prado**, pela atenção, pelo carinho e por ter me dado forças para concluir este trabalho.

Agradeço aos companheiros do laboratório da Libbs, **Ivani, Jamile e Marcos**, pelo apoio nos testes realizados.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, pela honra de me tornar uma mestre.

Enfim, para todos que contribuíram para o desenvolvimento e a finalização deste trabalho.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita do que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

GONÇALVES, D. S. **Nanocristais de flubendazol: preparação e caracterização físico-química**. 2018. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os nanocristais são partículas de fármacos cristalinos, com tamanho médio na faixa de submicrons, geralmente entre 200 e 500 nm, estabilizados por agentes estéricos ou eletrostáticos adsorvidos na superfície das partículas do fármaco. Sua dimensão reduzida proporciona propriedades especiais, como a adesividade às mucosas e o aumento de área superficial e da solubilidade de saturação, o que melhora significativamente a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água. Outra aplicação emergente dos nanocristais é na melhoria da entrega e da retenção de fármacos em tecidos e células tumorais. Estudos demonstraram que o flubendazol é um fármaco capaz de induzir a morte celular em tumores malignos e retardar o seu crescimento, por meio da alteração que provoca na estrutura dos microtúbulos e pela inibição da polimerização da tubulina. Foi demonstrada sua atividade antiproliferativa em linhagens de leucemia, mieloma, câncer intestinal, câncer de mama e neuroblastoma. O flubendazol é também um fármaco eficaz contra os helmintos, demonstrando atividade superior na eliminação dos vermes adultos, quando comparado com a dietilcarbamazina. Embora o flubendazol pareça ser uma molécula promissora, é um fármaco praticamente insolúvel em água (0,005 mg/mL). Para atingir o efeito terapêutico desejado, é necessário o desenvolvimento de uma formulação com melhores solubilidade e biodisponibilidade. Nesse sentido, o presente trabalho apresenta o preparo e a caracterização físico-química de nanocristais de flubendazol por meio da microfluidização. Foram realizados ensaios exploratórios para avaliar a performance de diferentes agentes estabilizantes nas suspensões: o polissorbato 80, o polaxamer 188 e o D- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS). A avaliação da distribuição do tamanho de partícula foi realizada por espalhamento de luz *laser* (LLS), espalhamento de luz dinâmica (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A utilização do TPGS favoreceu a obtenção de uma nanossuspensão com o menor diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, de $253,9 \pm 3,0$ nm. Nos estudos exploratórios, também foram determinados os parâmetros ótimos de moagem do microfluidizador, sendo estabelecidos: 35.000 psi de pressão, temperatura do produto de $30^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$ e tempo de recirculação de 2 horas/100 gramas. Objetivando alcançar o menor diâmetro hidrodinâmico médio dos nanocristais, executou-se um planejamento estatístico no qual foi avaliada a influência da concentração de flubendazol (% p/p) e de TPGS (% p/p) na formulação. A análise revelou a significativa influência da concentração do TPGS na redução do tamanho de partícula e na estabilidade físico-química da nanossuspensão. Ensaio complementares de solubilidade demonstraram que o nanocristal proporcionou incremento na solubilidade de 2,3 e 3,2 e 5,2 vezes em HCl 0,1 N, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato salino pH 7,4, respectivamente. No ensaio de dissolução conduzido em HCl 0,1 N e 0,1% TPGS, observou-se significativo incremento, de 41% de fármaco dissolvido após 60 minutos, quando comparado com o flubendazol micronizado. As características do estado sólido do nanocristal foram avaliadas por meio de análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria) e difratometria de raios X, não sendo observadas significativas alterações da estrutura cristalina. O presente trabalho também avaliou a efetividade dos nanocristais de flubendazol em tumores de pulmão, demonstrando sua expressiva capacidade de retardar o crescimento e diminuir o tamanho desses tumores em camundongos xenotransplantados.

Palavras-chave: nanocristal, flubendazol, câncer de pulmão, microfluidização.

ABSTRACT

GONÇALVES, D. S. **Flubendazole nanocrystals: preparation and physical-chemical characterization.** 2018. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Nanocrystals are drug particles with an average size in the sub-micron range, generally between 200 and 500 nm, stabilized by steric or electrostatic agents adsorbed on the surface of the drug particles. The reduced size provides special properties such as mucosal adhesiveness, increase in surface area and saturation solubility, which significantly improves the bioavailability of poorly water-soluble drugs. Another emerging application of nanocrystals is in the enhancement of drug delivery and retention in tumor tissues. Studies have shown that flubendazole is a drug capable of inducing cell death in malignant tumors and decelerating their growth, by altering the structure of the microtubules and inhibiting the tubulin polymerization. Antiproliferative activity has been demonstrated in leukemia, myeloma, intestinal cancer, breast cancer and neuroblastoma lines. In addition, flubendazole is also an effective drug against helminths, demonstrating superior activity in eliminating adult worms when compared to diethylcarbamazine. Although flubendazole appears to be a promising molecule, it is an insoluble drug in water (0.005 mg / mL). To achieve the desired therapeutic effect, it is necessary the development of a formulation with better solubility and bioavailability. In this context, the present research reports the physico-chemical preparation and characterization of flubendazole nanocrystals through microfluidization. Exploratory experiments were carried out to evaluate the performance of different stabilizing agents in formulations: polysorbate 80, poloxamer 188 and D- α tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). The determination of the particle size distribution determination was performed by laser light scattering (LLS), dynamic light scattering (DLS), nanoparticle scanning (NTA) and scanning electron microscopy (SEM). The use of TPGS favored the preparation of a nanosuspension with the lowest mean hydrodynamic size of the particles, of 253.9 ± 3 nm. In the exploratory studies, the optimum grinding parameters were also determined: 35,000 psi of microfluidizer pressure, product temperature of 30°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) and recirculation time of 2 hours for each 100 grams of suspension. In order to reach the lowest average hydrodynamic diameter, a statistical design was applied in which the influence of flubendazole concentration (% w / w) and TPGS (% w / w) on the formulation was evaluated. The analysis revealed a significant influence of TPGS concentration on the particle size reduction and on the physicochemical stability of the nanosuspension. Complementary solubility tests showed that the nanocrystal provided an increase in solubility of 2.3, 3.2 and 5.2-fold in 0.1 N HCl, phosphate buffer pH 6.8 and phosphate buffer saline pH 7.4, respectively. In the dissolution test performed in 0.1 N HCl with 0.1% TPGS, a 41% increase of the drug dissolved after 60 minutes was achieved, when compared to micronized flubendazole. The solid-state characteristics of the nanocrystal were accessed through thermal analysis (differential scanning calorimetry and thermogravimetry) and X-ray diffraction and the results indicated that the crystal structure was not significantly altered. This research also evaluated the action of flubendazole nanocrystals in lung tumors, demonstrating expressive ability to retard growth and decrease the size of these tumors in xenotransplanted mice.

Keywords: nanocrystal, flubendazole, lung cancer, microfluidization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do flubendazol.....	25
Figura 2 - Demonstração da camada de difusão da partícula: com a diminuição do tamanho de partícula, há diminuição da camada de difusão (h) e aumento do gradiente de concentração $C_s - C_x/h$	30
Figura 3 - Relação entre a pressão de dissolução e o tamanho de uma partícula em escalas micrométrica e nanométrica.....	31
Figura 4 - Métodos de obtenção dos nanocristais.....	32
Figura 5 - Diagrama de causa e efeito que descreve vários fatores interdependentes que influenciam nos atributos de qualidade do processo de precipitação.....	33
Figura 6 - Ilustração do homogeneizador do tipo pistão-orifício.....	35
Figura 7 - Representação do sistema de microfluidização do equipamento Microfluidics®.....	37
Figura 8 - Espectro da varredura do flubendazol 10 $\mu\text{g/mL}$ no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	61
Figura 9 - Espectro da varredura do HCl 0,1 N no intervalo de comprimento de onda de 200 a 600 nm.....	62
Figura 10 - Espectro da varredura do tampão acetato pH 4,5 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	63
Figura 11 - Espectro da varredura do tampão fosfato pH 6,8 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	63
Figura 12 - Espectro da varredura do tampão fosfato salino pH 7,4 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	64
Figura 13 - Espectro da varredura da solução aquosa de TPGS no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	64

Figura 14 - Espectro da varredura da solução aquosa de manitol no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	65
Figura 15 - Espectro da varredura do placebo de TPGS e manitol no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.....	65
Figura 16 - Curva analítica do flubendazol obtida por espectrofotometria a 310 nm a partir de diluições volumétricas da solução padrão em HCl 0,1 N.....	68
Figura 17 - Gráficos dos resíduos relativos ao ajuste de uma reta de regressão dos dados de absorvância do flubendazol.....	69
Figura 18 - Foto do micronizador Microfluidics®.....	73
Figura 19 - Avaliação da redução do tamanho médio das partículas $d(0,5)$ pela técnica espalhamento de luz <i>laser</i> (LLS).....	74
Figura 20 - Avaliação da redução do $d(0,9)$ das partículas pela técnica de espalhamento de luz <i>laser</i> (LLS).....	75
Figura 21 - Avaliação gráfica do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das nanossuspensões de flubendazol por período de 30 dias, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	80
Figura 22 - Avaliação da distribuição de tamanho de partícula (em nm) da nanossuspensão de flubendazol (F3) utilizando a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	82
Figura 23 - Captura de tela da análise de vídeo obtido pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) da nanossuspensão de flubendazol (teste F3).....	82
Figura 24 - Análise morfológica e tamanho do cristal das formulações F1, F2 e F3 empregando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	84
Figura 25 - Curvas TG/DTG de flubendazol, polissorbato 80 e nanocristal estabilizado com polissorbato 80 sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 ml/min) e a $10^\circ C \text{ min}^{-1}$	89
Figura 26 - Curvas TG/DTG de flubendazol, poloxamer 188 e nanocristal estabilizado com poloxamer 188 sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 ml/min) e a $10^\circ C/\text{min}$	90

Figura 27 - Curvas TG/DTG de flubendazol, TPGS e nanocristal estabilizado com o TPGS sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 ml/min) e a 10°C/min.....	91
Figura 28 - Curvas TG/DTG de flubendazol, TPGS, manitol e o nanocristal estabilizado com TPGS e manitol (liofilizado) sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 ml/min) e a 10°C/min.....	92
Figura 29 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio das amostras: flubendazol, polissorbato 80 e nanocristal estabilizado com polissorbato	93
Figura 30 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, poloxamer 188 e nanocristal estabilizado com poloxamer 188.....	94
Figura 31 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min ,sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, TPGS e nanocristal estabilizado por TPGS.....	94
Figura 32 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, TPGS, manitol e nanocristal estabilizado com TPGS e manitol (liofilizado).....	95
Figura 33 - Difratoograma (método de pó) do flubendazol puro, manitol e nanocristal de flubendazol liofilizado.....	97
Figura 34 - Gráfico de cubo demonstrando o tamanho hidrodinâmico médio (DHM) das partículas obtidas no planejamento fatorial simples. A resposta aparece nos vértices do cubo.....	100
Figura 35 - Gráfico de efeitos principais da concentração do d-α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e da concentração do flubendazol (% p/p) no DHM dos nanocristais.....	101
Figura 36 - Gráfico de resíduos da avaliação do DHM de nanocristais de flubendazol contendo as variáveis: concentração do d-α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e concentração do flubendazol (% p/p).....	102
Figura 37 - Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de flubendazol contendo as variáveis: concentração de flubendazol	

(%p/p) e concentração do TPGS (% p/p). Comparativo com os pontos centrais.....	103
Figura 38 - Curva DSC da nanossuspensão de flubendazol à razão de aquecimento de 20°C/min, sob atmosfera dinâmica de N ₂ , na faixa de temperatura de -60°C a 45°C.....	105
Figura 39 - Imagem da nanossuspensão e do nanocristal de flubendazol liofilizado.....	106
Figura 40 - Solubilidade obtida através do método de equilíbrio do flubendazol micronizado e do nanocristal de flubendazol.....	109
Figura 41 - Foto do sistema adaptado para o ensaio de perfil de dissolução utilizando o equipamento espectrofotômetro da série SI400 da SI Photonics® com sonda óptica de 0,5 mm, 40 ml de meio HCl 0,1N, sob aquecimento a 37°C e agitação a 300 rpm.....	111
Figura 42 - Perfil de dissolução comparativo entre o flubendazol micronizado e o nanocristal, em HCl 0,1 N com 0,1% de TPGS, 300 rpm de agitação, 40 ml de meio HCl 0,1N em espectrofotômetro da série SI400 da SI Photonics® com sonda óptica de 0,5 mm.....	112
Figura 43 - Tumoresferas de células tumorais de pulmão A549: as figuras correspondem as tumoresferas de pulmão em tempos de cultivo de 24 horas e 96 horas, respectivamente. Microscópio EVOS. Aumento de 400X.....	114
Figura 44 - Ensaio de MTT: imagens de tumoresferas obtidas 96 horas após o plaqueamento em meio definido e após 48 horas de tratamento com o nanocristal (em concentrações de 200 µM e 600 µM). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência Zeiss Axio Image fluorescence (Oberkochen, Alemanha) acoplado.....	115
Figura 45 - Animais xenotransplantados com células A-549. Figura (A) Camundongo representando grupo de animais tratados com veículo (controle), tamanho do tumor 15 mm. Figura (B) Camundongo representando grupo de animais tratados com o flubendazol convencional, tamanho do tumor 17 mm. Figura (C) Camundongo representando grupo de animais tratados com flubendazol nanoestruturado, tamanho do tumor 9 mm.....	116

Figura 46 - Efeito do flubendazol convencional no crescimento do tumor. Gráfico do desenvolvimento do tumor pelo tempo (em dias). O gráfico representa a média \pm desvio padrão do tamanho dos tumores de 5 animais controle (vehicle) e 3 animais tratados com flubendazol convencional.....117

Figura 47 - Efeito do nanocristal de flubendazol no crescimento do tumor. Gráfico do desenvolvimento do tumor pelo tempo (em dias). O gráfico representa a média \pm desvio padrão do tamanho dos tumores de 5 animais controle (vehicle) e 5 animais tratados com flubendazol nanoestruturado.....118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas do flubendazol e solubilidade em diferentes solventes.....	26
Tabela 2 - Concentração das amostras de flubendazol obtidas a partir de uma solução padrão a 200µg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.....	48
Tabela 3 - Fórmulas dos ensaios exploratórios para obtenção dos nanocristais de flubendazol, utilizando-se a microfluidização.....	50
Tabela 4 - Matriz de ensaios para a otimização do processo de produção de nanocristais de flubendazol.....	51
Tabela 5 - Parâmetros utilizados durante a liofilização da nanossuspensão de flubendazol.....	56
Tabela 6 - Valores de absorbância obtidos na curva analítica do método para quantificação e solubilidade do flubendazol em HCl 0,1 N.....	67
Tabela 7 - Avaliação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ).....	69
Tabela 8 - Precisão de repetibilidade e reprodutibilidade do método analítico para a quantificação de flubendazol.....	70
Tabela 9 - Valores experimentais médios de porcentagem de recuperação obtidos para o teste de exatidão do flubendazol.....	70
Tabela 10 - Resultados do estudo de robustez do método analítico para quantificação de flubendazol.....	71
Tabela 11 - Valores de d(0,1), d(0,5) d(0,9), D[3,2], D[4,3] e polidispersividade (span) do flubendazol micronizado.....	72
Tabela 12 - Valores de d(0,5) em micras das formulações de flubendazol mensurados pela técnica espalhamento de luz <i>laser</i> (LLS).....	74

Tabela 13 - Valores de $d(0,9)$ em micras das formulações de flubendazol mensurados pela técnica espalhamento de luz <i>laser</i> (LLS).....	74
Tabela 14 - Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em intensidade e índice de polidispersividade (IP) das formulações F1, F2 e F3 de nanocristais de flubendazol por espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	75
Tabela 15 - Avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), do desvio padrão (DP) e do índice de polidispersibilidade (IP) das nanossuspensões de flubendazol armazenadas por período de 30 dias, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	79
Tabela 16 - Avaliação do tamanho de partícula (em nanômetros) da nanossuspensão de flubendazol utilizando a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	81
Tabela 17 - Comparativo dos resultados de tamanho de partícula (em nm) da nanossuspensão de flubendazol utilizando diferentes técnicas.....	83
Tabela 18 - T_{onset} (°C) e perda de massa (%) de flubendazol, polissorbato 80, poloxamer 188, TPGS e manitol.....	85
Tabela 19 - Valores de variação de temperatura dos eventos (ΔT , °C), T_{onset} de degradação (°C) e perda de massa (%) de excipientes, nanossuspensões e nanocristal liofilizado.....	88
Tabela 20 - Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersibilidade (IP) e potencial zeta da nanossuspensão de flubendazol na matriz de ensaios do planejamento fatorial simples.....	98
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para testar a significância da regressão para a resposta diâmetro hidrodinâmico médio das partículas no planejamento estatístico simples.....	99
Tabela 22 - Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM dos nanocristais de flubendazol obtidos no planejamento estatístico simples.....	99
Tabela 23 - Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersão das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de flubendazol.....	104

Tabela 24 - Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de flubendazol reconstituído após a liofilização.....	107
Tabela 25 - Solubilidade de saturação do flubendazol micronizado e do nanocristal ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$, \pm desvio padrão) demonstrando o incremento (em número de vezes) da solubilidade do nanocristal.....	108
Tabela 26 - Resultados de dissolução do flubendazol micronizado.....	110
Tabela 27 - Resultados de dissolução do nanocristal.....	111

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	Flubendazol.....	25
2.2	Nanocristais: considerações gerais	28
2.3	Tecnologias de obtenção de nanocristais.....	31
2.4	A importância dos agentes estabilizantes para nanocristais	38
2.5	O processo de liofilização no incremento da estabilidade dos nanocristais ...	39
2.6	Aumento da efetividade de fármacos.....	41
3.	OBJETIVO	43
3.1	Objetivo geral	43
3.2	Objetivos específicos	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Matérias-primas, solventes e reagentes.....	44
4.2	Equipamentos e acessórios	44
4.3	Métodos	46
4.3.1	Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria UV para a quantificação do flubendazol nas formulações	46
4.3.1.1	Preparo da solução padrão e das soluções de trabalho do flubendazol..	46
4.3.1.2	Determinação da absorbância máxima do flubendazol.....	46
4.3.1.3	Validação da metodologia analítica para a quantificação de flubendazol nos estudos de solubilidade e nas nanossuspensões	47
4.3.1.4	Especificidade	47
4.3.1.5	Linearidade.....	47
4.3.1.6	Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	48
4.3.1.7	Precisão	48
4.3.1.8	Exatidão	49

4.3.1.9 Robustez.....	49
4.3.2 Estudo exploratório: preparo da nanossuspensão de flubendazol empregando a microfluidização.....	50
4.3.3 Otimização da preparação dos nanocristais de flubendazol empregando-se planejamento estatístico.....	50
4.3.4 Determinação da distribuição do tamanho de partícula do flubendazol micronizado por espalhamento de luz <i>laser</i>	51
4.3.5 Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de flubendazol por espalhamento de luz <i>laser</i>	52
4.3.6 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e do índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão de flubendazol por espalhamento de luz dinâmica (DLS)	52
4.3.7 Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de flubendazol por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>).....	53
4.3.8 Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.3.9 Determinação do potencial zeta	53
4.3.10 Determinação do teor	54
4.3.11 Solubilidade de saturação/solubilidade cinética	54
4.3.12 Avaliação da dissolução dos nanocristais	54
4.3.13 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para determinação da temperatura de transição vítrea da nanossuspensão de flubendazol liofilizada.....	55
4.3.14 Liofilização da nanossuspensão de flubendazol	55
4.3.15 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/ DTG).....	56
4.3.16 Calorimetria Exploratória Diferencial para caracterização dos testes	57
4.3.17 Análise da estrutura cristalina dos nanocristais de flubendazol empregando-se difração de raio X (DRX).....	57
4.3.18 Avaliação da atividade antitumoral dos nanocristais de flubendazol em células da linhagem de câncer de pulmão humano A-549	58

4.3.18.1	Cultura de células de câncer de pulmão	58
4.3.18.2	Formação de tumoresferas	58
4.3.18.3	Ensaio de viabilidade celular – MTT	59
4.3.18.4	Xenotransplante a longo prazo nos animais BalbC/Nude.....	59
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por espectrofotometria UV-VIS para a quantificação do flubendazol.....	61
5.1.1	Determinação da absorbância máxima do flubendazol.....	61
5.1.2	Avaliação da especificidade do método.....	62
5.1.3	Avaliação da linearidade do método	66
5.1.4	Precisão e exatidão	70
5.1.5	Robustez.....	71
5.2	Caracterização da distribuição do tamanho de partícula do flubendazol micronizado por espalhamento de luz <i>laser</i> (LLS)	71
5.3	Ensaio exploratórios da nanossuspensão de flubendazol empregando o método microfluidização	72
5.3.1	Avaliação do tempo de moagem e do desempenho dos tensoativos polissorbato 80, poloxamer 188 e D- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato.....	72
5.3.2	Avaliação da estabilidade físico-química das nanossuspensões de flubendazol	76
5.3.3	Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)	81
5.3.4	Análise morfológica e tamanho do cristal empregando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	83
5.4	Caracterização térmica e estudo de interação entre o flubendazol e os excipientes	85
5.5	Análise e comparação da estrutura cristalina do flubendazol micronizado e dos nanocristais de flubendazol empregando-se a difração de raio X (DRX)	95

5.6	Otimização da preparação dos nanocristais de flubendazol empregando planejamento estatístico.....	97
5.7	Avaliação do modelo estatístico e dos parâmetros significativos que impactaram no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas	98
5.7.1	Validação da equação do modelo.....	103
5.8	Avaliação da temperatura de transição vítrea (T_g') da nanossuspensão de flubendazol por Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>DSC</i>) para o desenvolvimento da curva de liofilização.....	104
5.9	Aspectos físico-químicos do nanocristal liofilizado	106
5.10	Solubilidade de saturação dos nanocristais de flubendazol	107
5.11	Ensaio de dissolução comparativa: flubendazol micronizado <i>versus</i> o nanocristal	109
5.12	Avaliação da atividade antitumoral do nanocristal de flubendazol em células da linhagem de câncer de pulmão humano A-549	112
6.	CONCLUSÕES	119
7.	REFERÊNCIAS	122
	ANEXOS	129

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia conquistou posição de destaque para viabilizar o desenvolvimento de novos medicamentos contendo fármacos com baixa solubilidade em água, reduzida velocidade de dissolução e baixa biodisponibilidade (GEORGE e GHOSH, 2013). Em especial, grande atenção tem sido dada ao uso da tecnologia de nanocristais. Os nanocristais são partículas de fármacos cristalinos, com tamanho médio na faixa de submicrons, geralmente entre 200 a 500 nm, sem carreadores, sendo estabilizados por tensoativos e/ou estabilizadores estéricos ou poliméricos adsorvidos na superfície das partículas do fármaco. A dimensão reduzida proporciona propriedades especiais, como adesividade às mucosas e aumento de área superficial e da solubilidade de saturação. Tais propriedades conduzem ao aumento na velocidade de dissolução, de acordo com a equação de Noyes-Whitney, gerando elevação no gradiente de concentração nas barreiras e membranas biológicas, o que melhora significativamente a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (MÜLLER et al., 2011; RABINOW, 2004).

Outra aplicação emergente dos nanocristais é na melhoria da entrega e retenção de fármacos em tecidos e células tumorais (MIAO et al., 2008; LU et al., 2016). Os mecanismos envolvidos na maior eficiência dos nanocristais ainda estão sendo elucidados, mas o reduzido tamanho, a geometria da partícula, a carga e as características de superfície e hidrofobicidade são aspectos importantes. Agentes modificadores de superfície, como o ácido fólico e o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano, por exemplo, mostraram-se capazes de aumentar a captação dos nanocristais em estudos com linhagens celulares de diferentes tumores (LIU et al., 2010; LEE et al., 2014).

O mecanismo de transporte dos nanocristais diferem também do fármaco base. Enquanto macromoléculas são captadas por fagocitose ou macropinocitose, as nanopartículas podem ser capturadas por mecanismos múltiplos, endocitose não específica ou específica (mediada por um receptor), podendo até penetrar na membrana celular por difusão passiva. Em geral, os nanocristais, quando administrados parentalmente, são reconhecidos como materiais exógenos e capturados pelo sistema fagocitário mononuclear, sendo acumulados em órgãos como fígado e baço, atuando como região de depósito e sendo liberados gradativamente (MIAO et al., 2008).

Talekar e colaboradores (2013) reportam que nanocristais de PIK-75, um inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), produziram incremento de 5 a 10 vezes de acúmulo do fármaco no tumor, em estudos *in vitro* com linhagem de carcinoma de ovário humano, SKOV3, com aumento de citotoxicidade (o IC₅₀ reduziu de 301 nM da solução do fármaco para 58 nM com os nanocristais otimizados). Estudos *in vivo* com fármaco da mesma classe, o SN 30191, mostraram tolerabilidade quatro vezes maior da formulação nanocristalina frente ao fármaco em solução (SHARMA et al., 2011). Reporta-se também que uma formulação de nanocristais de paclitaxel apresentou menor toxicidade e maior especificidade, se acumulando e permanecendo no tumor mesmo após sete dias de uma injeção intravenosa em bolus. Nanocristais de camptotecina foram capazes de suprimir o crescimento tumores de MCF-7 em modelo xenográfico em camundongos BALB/c, propiciando aumento de 5 vezes da concentração do fármaco no tumor, quando comparada à administração na forma de solução (ZHANG et al., 2011). Yang e colaboradores (2016) prepararam nanocristais do alcaloide 10-hidroxicamptotecina (10-HCPT) com tamanho médio de 130 nm e trataram modelos *in vivo* de carcinoma mamário 4T1. Os autores presenciaram inibição de crescimento do tumor de, aproximadamente, 74,8% para os nanocristais contra 37,9% para a solução do fármaco frente ao grupo controle (solução salina).

Diante das inúmeras vantagens apresentadas para os nanocristais, o presente trabalho dispôs de uma plataforma nanotecnológica para o desenvolvimento de nanocristais de flubendazol. O flubendazol é um benzimidazol que, por meio do seu mecanismo de ação, alteração na estrutura dos microtúbulos celular e inibição da polimerização da tubulina, é capaz de induzir a morte celular em tumores malignos e retardar o seu crescimento. Foi demonstrada atividade antiproliferativa em linhagens de leucemia e de mieloma, nas quais foram constatados catástrofe mitótica e morte celular, câncer intestinal, câncer de mama, neuroblastoma e efeito sinérgico em terapias com vincristina, vimblastina e paclitaxel (HANUSOVA et al., 2015; CÁNOVÁ et al., 2018).

Adicionalmente, o flubendazol é também um fármaco eficaz contra os helmintos, demonstrando atividade superior na eliminação dos vermes adultos, quando administrado por via parenteral, e comparado com a dietilcarbamazina, embora tenha apresentado reações severas no local administrado (VAZQUEZ et al., 1983). Esse fármaco é considerado entre aqueles mais promissores do grupo dos benzimidazóis para eliminação das filaríoses (MACKENZIE; GEARY, 2011).

Embora o flubendazol pareça ser uma molécula promissora, é um fármaco praticamente insolúvel em água (0,005 mg/mL) e pertence à classe II (baixa solubilidade em água e alta permeabilidade) do sistema de classificação biofarmacêutica (AMIDOM, 1995). Recentemente, nosso grupo desenvolveu um sal de flubendazol com o ácido málico que apresentou impressionante melhora na solubilidade, sendo três vezes mais solúvel do que o flubendazol puro, proporcionando incremento de 2,6 vezes na taxa de absorção do flubendazol, 1,4 vezes no pico de concentração plasmática e de 60% na extensão de absorção, constatando melhora das propriedades farmacocinéticas avaliadas *in silico* (ARAUJO et al., 2018).

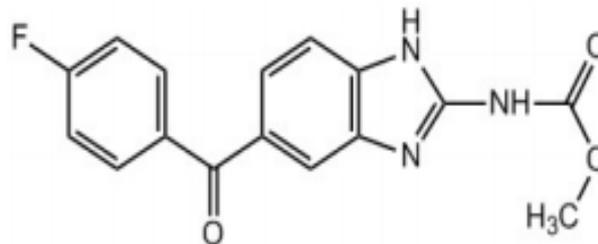
Buscando uma nova plataforma tecnológica, com a finalidade de melhorar as características do flubendazol, como o aumento da solubilidade de saturação, da velocidade de dissolução e, conseqüentemente, da biodisponibilidade e efetividade, o presente trabalho teve como objetivo a preparação e a caracterização físico-química de nanocristais de flubendazol, dispondo e explorando a tecnologia de microfluidização (JUNYAPRASERT; MORAKUL, 2015).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Flubendazol

O flubendazol (FB), methyl N-[6-(4-fluorobenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate, fórmula molecular $C_{16}H_{12}FN_3O_3$, com estrutura molecular ilustrada na **Figura 1**, é um benzimidazol que foi desenvolvido pela Janssen Pharmaceuticals® em meados da década de 70. O primeiro medicamento comercializado foi o Fluvermal®, um anti-helmíntico, existente nas formas farmacêuticas comprimido e suspensão oral, indicado no tratamento contra parasitas gastrointestinais, sem absorção sistêmica (VIALPANDO et al., 2016).

Figura 1 - Estrutura molecular do flubendazol



Fonte: ČÁŇOVÁ; ROZKYDALOVÁ; RUDOLF, 2017

As propriedades físico-químicas do flubendazol estão reportadas na **Tabela 1**. O fármaco é praticamente insolúvel em água e possui um log P (coeficiente de partição em octanol/água) que demonstra moderada permeabilidade nas membranas celulares; tais propriedades justificam a limitada absorção sistêmica das formulações existentes no mercado (NOBILIS et al., 2007; VIALPANDO et al., 2016).

Tabela 1 - Características físico-químicas do flubendazol e solubilidade em diferentes solventes.

Característica físico-química	Valor	Solvente	Solubilidade (mg/ml)
Massa molar / gmol/l	313,10	Água	0,005
T _{fusão} (forma cristalina) / °C	238,00	Metanol	0,11
T _g (forma amorfa) / °C	156,00	Acetona	0,18
pKa	3,6 (imidazol nitrogenado) 9,6 (carbamato hidrogenado)	Diclorometano	0,14
Log P	3,00	Dimetilsulfóxido	15,00
Log D _{7,4}	2,79	Dimetilformamida	5,60
		Ácido fórmico	340,50

O flubendazol inibe a atividade da enzima fumarato redutase mitocondrial, reduz o transporte de glicose e promove o desacoplamento da fosforilação oxidativa nas células. Entretanto, sua ação principal é a inibição da polimerização dos microtúbulos, por meio da ligação à β -tubulina, dificultando a formação dos túbulos citoplasmáticos e, assim, levando os nematodos à morte, uma vez que é indicado no tratamento das helmintíases (GOODMAN et al., 2012). Os benzimidazóis em geral podem afetar também a tubulina dos hospedeiros, causando efeitos tóxicos nas células dos mamíferos, embora apresentem preferência pela ligação à β -tubulina dos helmintos (MACKENZIE; GEARY, 2011).

Segundo Mackenzie et al. (2011), o flubendazol parece ser o fármaco mais efetivo contra os nematódeos adultos. Experimentos *in vitro* demonstram que concentrações abaixo de 100 ng/ml (incubadas por 32 horas) são capazes de desestruturar os tecidos dos helmintos. (MACKENZIE; GEARY, 2011). Em um estudo clínico duplo-cego, realizado no México entre o flubendazol e dietilcarbamazina, para o tratamento da oncocercose, foram administrados 750 mg de flubendazol na forma de suspensão intramuscular, uma vez na semana, por 5 semanas, e 100 mg de dietilcarbamazina, duas vezes ao dia, por 14 dias. Este estudo foi avaliado por período de doze meses. Os resultados demonstraram que o flubendazol apresentou maior eficácia no tratamento da oncocercose quando comparado ao fármaco dietilcarbamazina. Porém, as injeções de flubendazol ocasionaram efeito inflamatório no local administrado (VAZQUEZ et al., 1983).

O flubendazol também vem sendo avaliado em pesquisas de fármacos com ação antitumoral. Estudos recentes demonstram a efetividade do flubendazol contra certos tumores, como neuroblastoma, glioma, leucemias, mielomas e câncer intestinal, decorrente do seu mecanismo de ação que resulta na alteração da estrutura de microtúbulos e na inibição da polimerização da tubulina, induzindo a catástrofe mitótica e a morte celular (HANUSOVA et al., 2015; ZHOU et al., 2018; MICHAELIS et al., 2015). CÁNOVÁ et al. (2018) investigaram o efeito do flubendazol em três linhas celulares de melanoma, A-375, BOWES e RPMI-7951, representando diferentes tipos moleculares de malignidade, no qual foram constatadas a catástrofe mitótica e a morte celular nas três linhagens estudadas.

Embora o flubendazol pareça ser uma molécula promissora, é um fármaco praticamente insolúvel em água (0,005 mg/mL) e pertence à classe II (baixa solubilidade em água e alta permeabilidade) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica proposto por Gordon L. Amidom (1995). Para atingir o efeito terapêutico desejado, é necessário dispor de diferentes plataformas tecnológicas no desenvolvimento da formulação em busca de melhor biodisponibilidade. (CEBALLOS et al., 2014).

Com o objetivo de promover o aumento da solubilidade em água do flubendazol, CEBALLOS et al. (2012) desenvolveram uma formulação em solução base de ciclodextrina. A preparação obtida foi testada em ratos e meriones. Após administração subcutânea e oral, foi observado aumento da exposição sistêmica do fármaco. Entretanto, o autor do estudo ponderou que o elevado custo deste material pode tornar essa técnica economicamente inviável.

Recentemente, VIALPANDO et al. (2016) avaliaram três tecnologias diferentes envolvendo secagem por aspersão e o uso de sílica mesoporosa para obtenção de dispersões sólidas amorfas de flubendazol. Embora esses estudos tenham demonstrado que estas formulações promoveram aumento significativo na sua concentração plasmática, também se registrou a dificuldade da estabilização físico-química das formulações. Apesar de o uso de sílica mesoporosa apresentar características físicas superiores, quando comparada às demais, a dificuldade para a remoção do solvente ácido fórmico consistiu-se em clara desvantagem (VIALPANDO et al., 2016).

Louage et al. (2017) propuseram o método de deslocamento de solvente direto para a produção de nanopartículas de poli (glicerol sebacato) (PGS). Essas nanopartículas funcionam como carreadoras para fármacos hidrofóbicos como o flubendazol. O estudo revelou, por meio

de fluorescência, que as nanopartículas de PGS são endocitadas pelas células, apresentando citocompatibilidade.

Considerando a potencial atividade como fármaco antitumoral e a contribuição na melhora da atividade anti-helmíntica (com ação em microfilárias e macrofilárias), o trabalho propõe o desenvolvimento do nanocristal de flubendazol, por meio de uma plataforma nanotecnológica economicamente viável e de fácil escalonamento, com a finalidade de incrementar sua solubilidade de saturação em água, sua velocidade de dissolução e sua biodisponibilidade, além de possibilitar seu uso injetável.

2.2 Nanocristais: considerações gerais

A nanotecnologia conquistou posição de destaque na produção de novos medicamentos compostos de fármacos com baixa solubilidade em água, reduzida velocidade de dissolução e baixa biodisponibilidade. Exemplos de sucesso no mercado incluem Rapamune[®] (Wyeth), Emend[®] (Merck), TriCor[®] (Abbott Laboratórios), Triglide[®] (Skye Pharma) e Megace ES[®] (Bristol-Myers Squibb) (GEORGE; GHOSH, 2013).

Embora a *Food and Drug Administration* (FDA) não estabeleça definição regulatória para o termo nanotecnologia, o “*National Nanotechnology Initiative Program*” define como o conhecimento e o controle de materiais com dimensões entre 1 e 100 nm, no qual os fenômenos obtidos permitem novas aplicações. Além disso, a nanotecnologia pode ser utilizada para designar materiais em escala nanométrica, até 1.000 nm, que apresentem resposta inovadora ou fenômenos dependentes da dimensão da partícula, das características químicas e físicas e dos efeitos biológicos, quando comparado com o material de origem (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014).

De acordo com a equação de Noyes-Whitney (1897) (**Equação 1**), a redução do tamanho de partícula do material resulta em aumento de sua área superficial, que mantém contato com o meio externo, resultando em aumento da velocidade de dissolução. Em muitos casos, a baixa velocidade de dissolução está também relacionada com a baixa solubilidade de saturação (JUNGHANNS e MÜLLER, 2008).

$$\frac{dc}{dt} = A \cdot D \cdot \left[\frac{C_s - C_x}{h} \right] \quad \text{(Equação 1)}$$

A = área superficial

D = coeficiente de difusão

Cs = solubilidade de saturação

Cx = concentração em massa no limite da camada de difusão

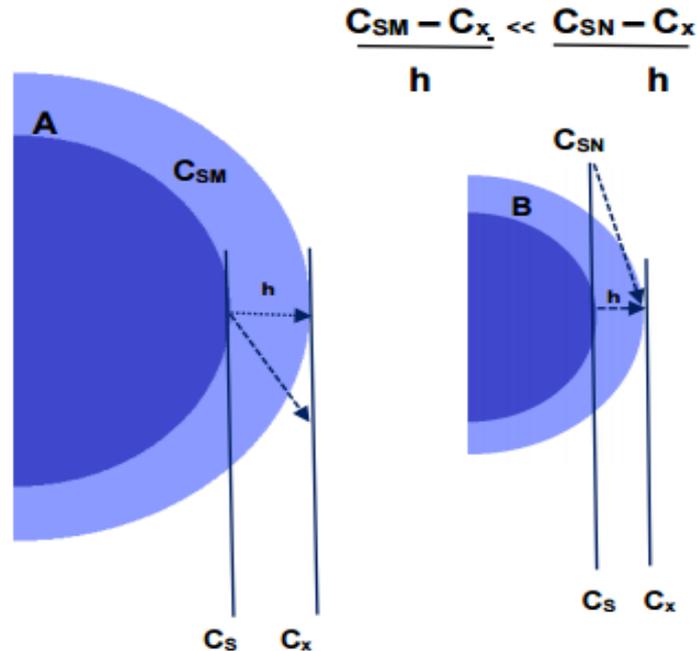
h = distância de difusão

dc/dt = velocidade de dissolução

Para materiais em escala micrométrica ou maior, a solubilidade de saturação é uma constante dependente das características do material, do meio de dissolução e da temperatura. No caso de materiais em escala nanométrica, a velocidade de saturação apresenta comportamento diferente, tornando-se um fator dependente do tamanho da partícula. A solubilidade de saturação aumenta com a diminuição do tamanho das partículas, fundamentando a maior solubilidade dos fármacos em escala nanométrica (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008).

Ainda avaliando-se a equação de Noyes-Whitney (1897), verifica-se que ela também estabelece relação entre a velocidade de dissolução e o tamanho da camada de difusão (conforme demonstrado na **Figura 2**), concentração do filme de solução saturada que se forma ao redor da partícula sólida. A velocidade de dissolução (dc/dt) de uma partícula é diretamente proporcional a sua área superficial e inversamente proporcional ao tamanho da camada de difusão (h). A redução do tamanho da camada de difusão resulta no aumento do gradiente de concentração ao redor das partículas menores $(C_s - C_x) / h$, sendo Cs a solubilidade de saturação, Cx a concentração do fármaco nos líquidos intersticiais e h a distância de difusão (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008).

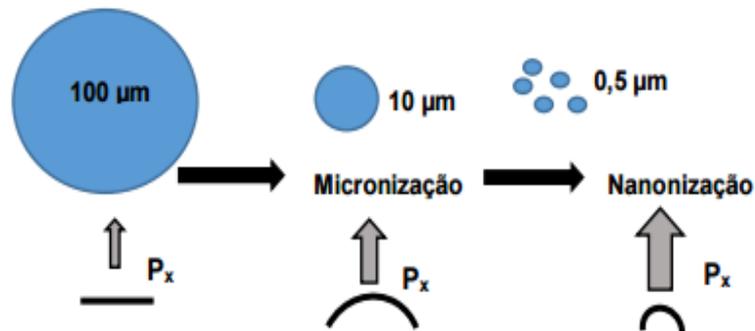
Figura 2 - Demonstração da camada de difusão da partícula: com a diminuição do tamanho de partícula, há diminuição da camada de difusão (h) e aumento do gradiente de concentração $C_s - C_x/h$.



Fonte: Adaptado (e reproduzido com permissão) de Mauludin; Müller; Keck, 2009

A equação de Ostwald-Freundlich descreve que o aumento da solubilidade de um material é dependente do aumento da pressão de dissolução (ilustrado na **Figura 3**). A equação baseia-se na transferência de moléculas da fase líquida para a fase gasosa, podendo ser utilizada a mesma relação na transferência de moléculas da fase sólida de um nanocristal para a fase líquida de um meio de dissolução. O aumento da área superficial de uma partícula promove o aumento da pressão de vapor, sendo essa pressão de vapor equivalente à pressão de dissolução. O aumento na pressão de dissolução pode ocasionar o aumento na velocidade de dissolução, uma vez que ocorre a desestabilização do equilíbrio entre moléculas dissolvendo-se e recristalizando-se (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008).

Figura 3 - Relação entre a pressão de dissolução e o tamanho de uma partícula em escalas micrométrica e nanométrica.

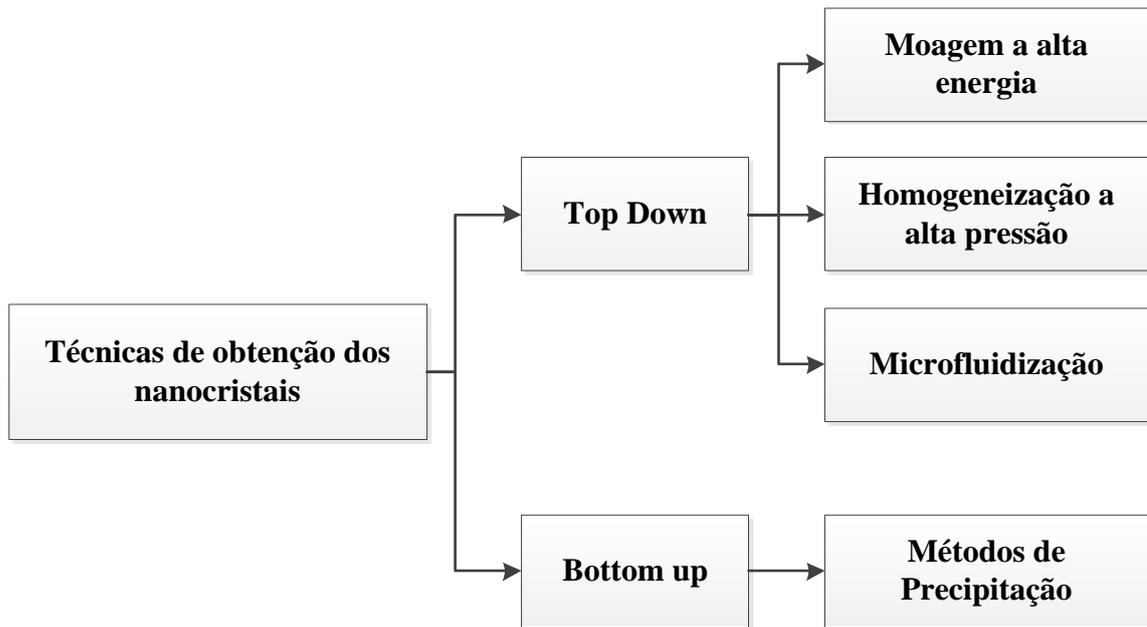


Fonte: Adaptado (e reproduzido com permissão) de Mauludin; Müller; Keck, 2009.

O aumento da solubilidade de saturação permite o aumento da concentração do fármaco no lúmen do intestino, favorecendo a absorção, principalmente pela difusão passiva (MÜLLER, et al., 1999). As nanopartículas possuem também melhor mucoadesividade, isto é, adesão às superfícies, contribuindo para o aumento da biodisponibilidade e da redução da variabilidade em estudos clínicos (MÜLLER et al., 2011). Esta característica é decorrente de quatro teorias descritas em literatura: a teoria eletrônica, decorrente de alterações eletrostáticas que ocorrem entre a superfície das nanopartículas com o muco; a teoria de absorção, referente à ação de forças como ponte de hidrogênio; a ligação de Van der Waals também entre a superfície da partícula e do muco; e a teoria da difusão, referente ao entrelaçamento físico dos nanocristais nas vilosidades (BARBOSA, 2014). A utilização de fármacos em escala nanométrica no tratamento de parasitas intestinais resultou em aumento do direcionamento da buparvaquona em cepas resistentes do *C. parvum*, o agente causador da diarreia grave em pacientes com HIV (MÜLLER et al., 2001).

2.3 Tecnologias de obtenção de nanocristais

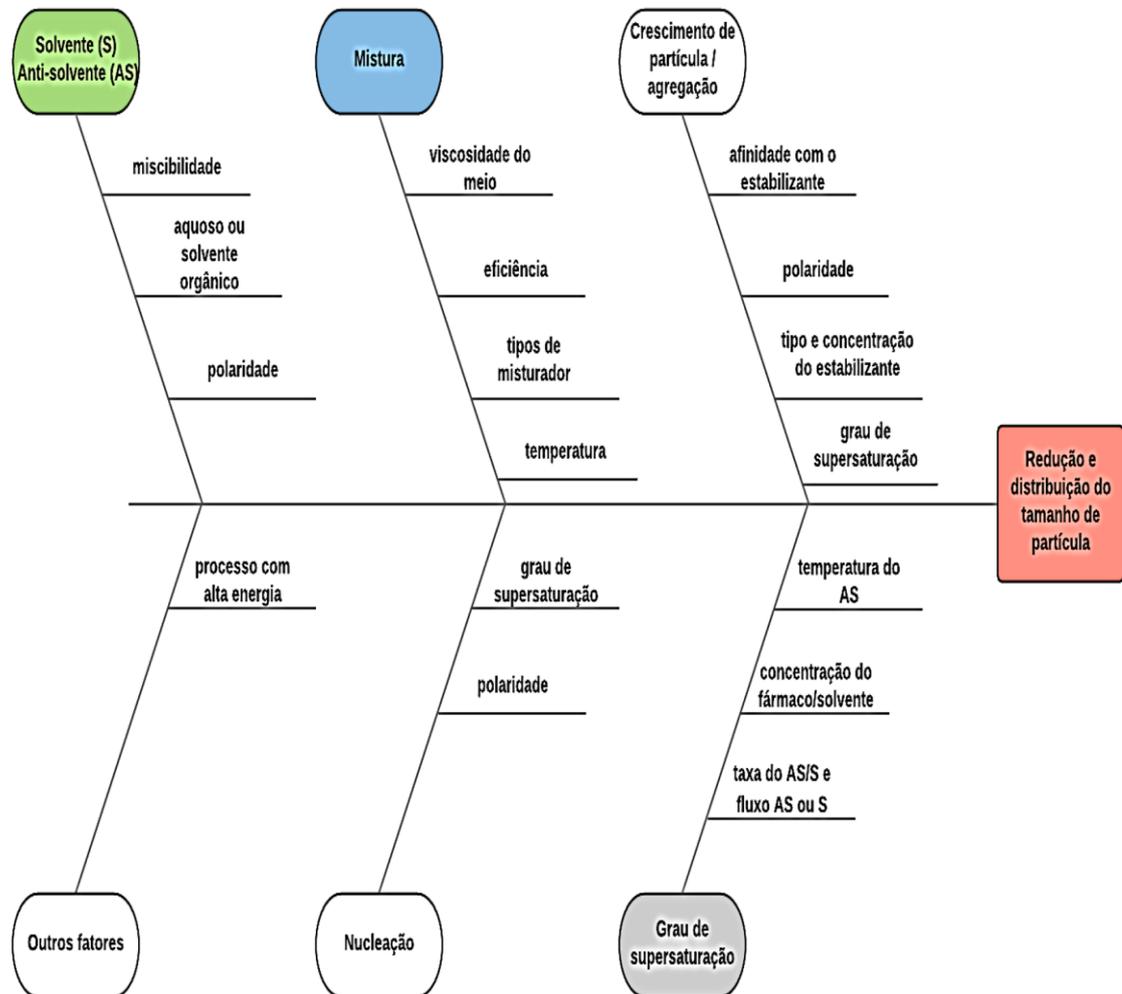
As técnicas de obtenção de nanocristais podem ser divididas em “bottom up” ou “top down” (Figura 4) (SALAZAR et al., 2014).

Figura 4 - Métodos de obtenção dos nanocristais

Fonte: Elaborado pelo autor

A abordagem “bottom up” é amplamente conhecida como processos de precipitação, que consiste basicamente na formação de sólidos do fármaco a partir de soluções supersaturadas, que podem ser provocadas por processos de evaporação do solvente, abaixamento brusco de temperatura ou a própria precipitação resultante da mistura com um anti-solvente (SINHA et al., 2013). Os fatores relacionados ao processo de precipitação, que influenciam na qualidade e no tamanho de partícula do nanocristal formado estão detalhados na **Figura 5**.

Figura 5 - Diagrama de causa e efeito que descreve vários fatores interdependentes que influenciam nos atributos de qualidade do processo de precipitação.



Fonte: Elaborado pelo autor

As vantagens desses métodos é que são de baixa complexidade, não requerem altos investimentos em equipamentos, são processos realizados sem necessitar do aquecimento do material e não geram elevada energia (SINHA et al., 2013). Embora a técnica reduza o tamanho de partícula e promova a amorfização do material, a dificuldade para a remoção de solventes orgânicos e para o controle da estrutura da partícula obtida (amorfa *versus* cristalina) torna a utilização desse método pouco atrativa. Assim, as tecnologias mais utilizadas são aquelas referentes ao método “top down”, que incluem a moagem à alta energia, a homogeneização à alta pressão, a microfluidização e/ou a combinação de métodos “bottom-up” com “top-down” para alcançar o tamanho de partícula desejado (FANGUEIRO et al., 2012; SINHA et al., 2013).

Recentemente, nanocristais de curcumina foram preparados por um método de precipitação: “nanoamorfização CO₂-assistido *in situ*”. O fármaco insolúvel, acrescido de ácido orgânico e estabilizante, foi disperso em solvente orgânico, passando pelo processo de evaporação com obtenção da fração sólida. A nanossuspensão de curcumina foi obtida adicionando-se carbonato aquoso nessa mistura sólida, ocorrendo reação ácido-base com a liberação de CO₂. As bolhas de CO₂ liberadas exercem efeito rápido de micromistura, suprimindo o crescimento dos cristais, enquanto os estabilizantes estão adsorvidos na superfície hidrofóbica do fármaco, evitando a agregação das partículas. O trabalho demonstrou também a utilização de diferentes estabilizantes e a relação com a taxa dissolvida da curcumina, indicando que o aumento do peso molecular do estabilizante impacta negativamente na solubilidade desta nanossuspensão. Adicionalmente, o estudo revelou que o novo método desenvolvido conseguiu promover o aumento da absorção do fármaco empregando testes *in vivo*, especialmente utilizando o Brij78 e o TPGS como estabilizantes (WANG et al., 2017).

Liversidge et al. (1995) utilizaram a tecnologia Nanocrystal[®] (moagem à alta energia) para a obtenção do nanocristal de danazol. O princípio do método é a redução do tamanho da partícula da substância ativa, dispersa geralmente em meio aquoso estabilizado com um polímero ou um tensoativo, por meio de movimentos de rotação e revolução simultâneos dentro de uma câmara de moagem contendo esferas de cerâmica (cério ou zircônio estabilizado com ítrio), aço inoxidável, vidro ou esferas revestidas com resina de poliestireno altamente reticulado. Essa técnica é utilizada também na fabricação dos medicamentos Rapamune[®], Emend[®], Tricor[®], Megace ES[®], Theralux[®] (BARBOSA et al., 2016; JUNGHANNIS et al., 2008).

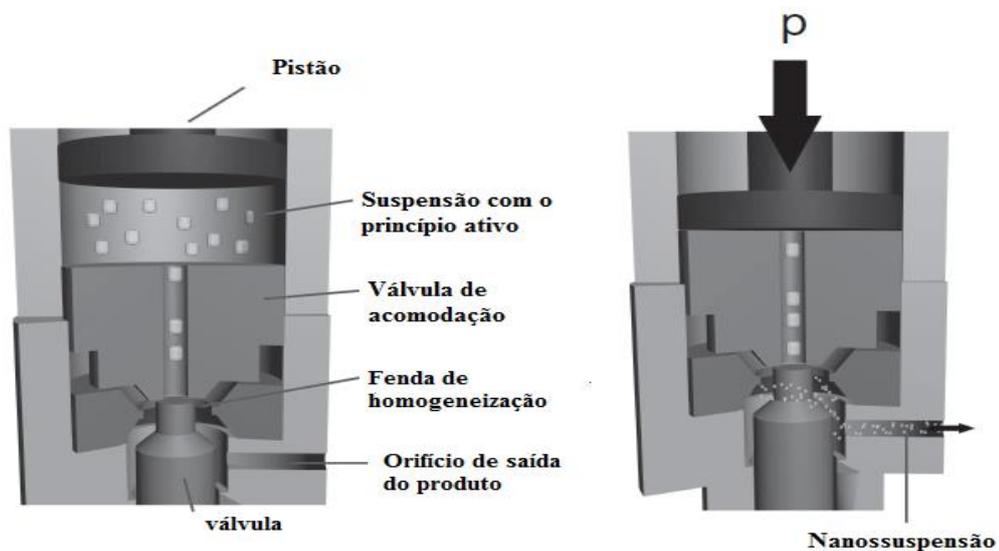
Referentemente aos métodos de homogeneização à alta pressão, o preparo pode ser realizado em homogeneizadores à alta pressão do tipo pistão-orifício, utilizando um meio de dispersão aquoso (método Dissocubes[®]) ou uma mistura não aquosa com diferentes solventes (método Nanopure[®]) (JUNGHANNIS et al., 2008).

Müller et al. (1999) desenvolveram a tecnologia Dissocubes[®]. Neste método, o princípio ativo é disperso em uma solução aquosa estabilizada com tensoativos ou polímeros. Essa suspensão é forçada por um pistão, sob pressão de até 4.000 bar (usualmente de 1.500 a 2.000 bar), a passar em um fino orifício do homogeneizador. A largura deste orifício depende da viscosidade da suspensão e da pressão aplicada e pode variar de 5 a 20 µm. De acordo com a lei de Bernoulli, a alta velocidade na qual a suspensão passa pelo orifício causa aumento da

pressão dinâmica, que é compensada pela redução na pressão estática abaixo da pressão de vapor da fase aquosa. Assim, o veículo aquoso entra em ebulição, à temperatura ambiente, formando bolhas de ar que implodem quando a suspensão passa pelo orifício. Esse fenômeno é conhecido como cavitação (MÜLLER et al., 1999; MÜLLER et al., 2003). O fluxo da suspensão e a implosão das bolhas de ar geram um curso turbulento que favorece o choque das partículas, ocasionando altas forças de cisalhamento, responsáveis pela redução de tamanho de partícula do material (JUNGHANNS et al., 2008).

Outra tecnologia que utiliza o homogeneizador do tipo pistão-orifício (**Figura 6**) é a Nanopure[®]. O meio de dispersão do princípio ativo possui baixa pressão de vapor (como o óleo e o polietilenoglicol) e o processo de homogeneização é realizado em baixas temperaturas. A cavitação é praticamente inexistente, mas a turbulência, a força de cisalhamento e a colisão das partículas são suficientes para promover a redução do tamanho do material. Essa tecnologia permite trabalhar com princípios ativos termolábeis e que sofrem hidrólise (JUNGHANNS et al., 2008).

Figura 6 – Ilustração do homogeneizador do tipo pistão-orifício



Fonte: Adaptado de Junghanns et al. (2008)

O desenvolvimento dos nanocristais de flubendazol foi realizado utilizando a microfluidização. Este método foi patenteado por Cook e Lagace (1985). A redução do tamanho da partícula por essa técnica é dependente das forças de impacto, cisalhamento e cavitação. O microfluidizador (**Figura 7**) possui uma bomba que força, sob alta pressão (podendo chegar até

40.000 psi), a passagem da suspensão em microcanais até uma câmara de interação, a qual é uma zona turbulenta com líquido à baixa pressão, que pode possuir o formato interno de Y ou Z – sua escolha depende do tipo de material utilizado. Com o aumento da turbulência nos microcanais, ocorre o choque da suspensão nas paredes e nos vértices da câmara, a implosão das bolhas de ar e a colisão entre o fluido, ocasionando a mudança na sua velocidade e na sua direção e, conseqüentemente, o aumento da força de cisalhamento, resultando na redução do tamanho da partícula (LI et al., 2011). A alta precisão na geometria dos microcanais proporciona uniformidade, reprodutibilidade de emulsões, geralmente superiores aos homogeneizadores convencionais, gerando também menor calor durante o processo. Geralmente, são necessárias várias passagens da suspensão no sistema até que seja suficiente para atingir o tamanho de partícula desejado. O processo de microfluidização resulta em aumento instantâneo da temperatura do produto, podendo ser controlado rapidamente, uma vez que o tempo de residência dentro da câmara é de 1 a 5 milissegundos. É estimado que a cada 1.000 psi de pressão aplicada sobre a água, resulte em aumento de temperatura de 1,0 a 1,7° C (LI et al., 2011; JUNYAPRASERT; MORAKUL, 2015; ODETADE; VLADISAVLJEVIC, 2016).

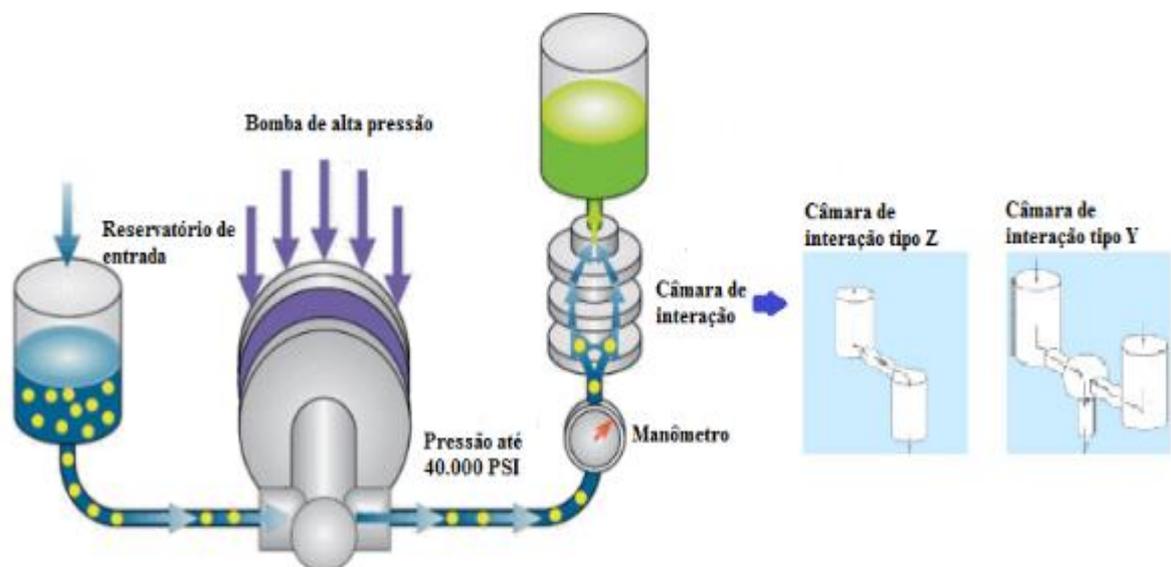
Nanoemulsões transparentes de octadecano estabilizadas com dodecilssulfato de sódio foram produzidas pela microfluidização. Neste estudo, foi possível observar que gotículas em nanoescala influenciaram o comportamento de cristalização e fusão. Além disso, constatou-se que o tamanho das partículas também influenciou a mudança na aparência das nanoemulsões. Segundo a teoria de espalhamento de *Rayleigh*, partículas abaixo de 50 nm são transparentes, pois possuem tamanho menor que dez vezes o comprimento de luz (HELGASON et al., 2015).

Nanopartículas de sílica mesoporosa oca, com diâmetro na faixa de 100 a 500 nm e espessura de parede com cerca de 50 nm, foi sintetizada por moldes de brometo de cetiltrimetilamônio, sob processo de microfluidização. Esta sílica foi utilizada como carreador para facilitar a entrega da doxorubicina. Neste estudo, foram avaliados o efeito do número de ciclos no processo microfluidização e o impacto na estrutura desta sílica (LI et al., 2013). Avaliando-se a estrutura por microscopia eletrônica de transmissão, foram observados apenas nanobastões de sílica mesoporosa quando não utilizado o processo de microfluidização. Para a amostra que passou por um ciclo, a microscopia identificou mistura de esferas sólidas e partículas ocas irregulares com a estrutura de mesoporos, com diâmetros de cerca de 300 a 400 nm. Quando a amostra passou por dois ou mais ciclos de microfluidização, as imagens exibiram uma nuvem de esferas ocas irregulares agregadas, com espessura de parede de 50 nm (LI et al.,

2013). O estudo também demonstrou que a competição das três forças envolvidas no processo de microfluidização (cavitação, cisalhamento e turbulência) afetam de forma significativa a estrutura final da sílica mesoporosa. O processo de cavitação contribui na formação dos espaços ocultos, pois as bolhas de ar geradas são estabilizadas pelo surfactante na interfase do líquido-gás, funcionando como modelo da estrutura. Com o aumento de número de ciclos, mais bolhas são empacotadas dentro das micelas, formando núvens de sílica mesoposa, embora muitos ciclos possam gerar muitas bolhas e acabar quebrando a estrutura das sílicas (LI et al., 2013; MÜLLER et al., 1999).

O método de microfluidização, seguido da evaporação de solvente, foi empregado para preparar nanopartículas, na faixa de 40 a 260 nm, de poli (metacrilato de metila) (PMMA) contendo a coenzima Q10 encapsulada. O estudo demonstrou que a escolha do estabilizante (laurilsulfato de sódio) e o número de ciclos utilizados no processo de microfluidização impactaram significativamente no tamanho das partículas obtidas e que o encapsulamento promoveu melhor estabilidade estrutural da coenzima Q10 frente à luz e à alta temperatura (KWON et al., 2002).

Figura 7 – Representação do sistema de microfluidização do equipamento Microfluidics®



Fonte: Adaptado de Microfluidics (2018)

2.4 A importância dos agentes estabilizantes para nanocristais

Nanocristais são partículas nanométricas de fármaco sólido rodeadas por uma camada estabilizadora. A seleção do agente estabilizante é crítica no preparo dos nanocristais, uma vez que estes excipientes possuem papel importante na formulação, podendo impactar também na biodisponibilidade do fármaco. Beirovski et al. (2011) estudaram o efeito dos estabilizantes na nanossuspensão de itraconazol e a influência dos crioprotetores na estabilidade dos nanocristais durante o processo de liofilização. Eles notaram que, se a camada estabilizadora estérica ao redor das partículas é densa o suficiente, os nanocristais não sofrem agregação durante a secagem e a ação das forças de van der Waals; neste caso, não foi necessária nenhuma crioproteção extra durante o processo de secagem. Sharma et al. (2015) demonstraram o impacto dos estabilizantes funcionais na eficiência *in vivo* e na biodisponibilidade de nanocristais de paclitaxel. A análise *in vitro* com Caco-2 revelou que o acúmulo de paclitaxel dentro das células foi maior nos nanocristais em comparação com Taxol[®]; isto foi devido ao efeito inibitório do metabolismo de efluxo P-gp do estabilizante de quitosana enxertada com plurônico presente nos nanocristais. Também foi notado que o estabilizante foi responsável por promover a abertura reversível das junções celulares, contribuindo no transporte paracelular do paclitaxel. Os testes *in vivo* comprovaram tais efeitos, uma vez que os nanocristais apresentaram 12,6 vezes melhor biodisponibilidade relativa quando comparados com Taxol[®] (TUOMELA et al., 2016).

A porção hidrofóbica da estrutura molecular dos estabilizantes deve adsorver-se ao fármaco em uma nanossuspensão. Polímeros exercem estabilização estérica na suspensão, pois revestem a partícula, formando uma barreira mecânica que impede a agregação do fármaco. Compostos com cargas são responsáveis pela estabilização eletrostática na qual correntes formadas na superfície das moléculas adsorvidas geram movimento térmico contínuo, evitando a coalescência via forças entrópicas repulsivas (WANG et al., 2017). Os surfactantes não iônicos, frequentemente utilizados no preparo dos nanocristais, são os poloxâmeros e o polissorbato 80, já o lauril sulfato de sódio é um típico tensoativo iônico utilizado em formulações orais, uma vez que não pode ser utilizado em injetáveis. Além destes, surfactantes naturais, como lecitinas e derivados de ácido cólico, também são frequentemente aplicados. Os polímeros utilizados incluem os celulósicos (hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose) e os álcoois polivinílicos, como a povidona (EERDENBRUGH et al., 2008).

Para o preparo dos nanocristais de flubendazol, foi realizado um estudo exploratório com três diferentes estabilizantes: o estabilizante polimérico poloxamer 188, o surfactante não iônico polissorbato 80 e o tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS). A seleção do estabilizante é principalmente empírica e baseada nas experiências anteriores descritas em literatura. Os fatores que determinam o efeito de estabilização não são totalmente elucidados, mas, quando se considera a estabilização dos nanocristais, não podemos levar em consideração apenas as forças de interação (sejam hidrofílicas/hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, iônicas ou outras forças fracas) entre a superfície do fármaco e a molécula estabilizadora; é necessária a avaliação do comprimento da cadeia do estabilizante, que deve ser longa suficiente para criar uma barreira estérica ou proporcionar um potencial zeta suficientemente alto, acima de 30 mV, para a criação de barreira elétrica (TUOMELA et al., 2016).

Existe uma correlação positiva entre o tamanho das partículas e o valor do balanço hidrofílico lipofílico (HLB) de um surfactante não iônico; assim, o valor de HLB pode ser uma diretriz útil para a seleção de um surfactante. Para a estabilização de nanocristais hidrofóbicos, geralmente, um tensoativo com baixo valor de HLB (lipofílico) é escolhido. A cobertura adequada da superfície da partícula por estabilizantes é fundamental e muitas vezes está relacionada à afinidade do tensoativo pelo fármaco. Não é interessante acrescentar excesso de estabilizante em uma suspensão, pois pode impactar negativamente na estabilização. Uma vez que se exceda a concentração micelar crítica (CMC), a formação de micelas competirá com a adsorção à superfície da partícula (SUN ; YEO, 2012).

2.5 O processo de liofilização no incremento da estabilidade dos nanocristais

O processo de liofilização é utilizado em nanossuspensões com a finalidade de remover a água do sistema, garantindo melhor estabilidade física e química do nanocristal. Basicamente, consiste no congelamento da água e sua remoção por sublimação e dessorção à pressão reduzida. É caracterizado pelas etapas de congelamento, secagem primária e secagem secundária, sendo importante o estudo aprofundado de cada uma dessas etapas, uma vez que os parâmetros utilizados podem influenciar na qualidade do liofilizado, no tempo de sua reconstituição, na conservação das características físico-químicas (como no tamanho de partícula), no residual de umidade e na estabilidade durante o período de armazenamento (ABDELWAHED et al., 2006; CHUNG; LEE; LEE, 2012).

A etapa de maior criticidade do processo de liofilização é o congelamento. Este passo, além de afetar a estrutura do liofilizado, impacta nas etapas subsequentes do processo de liofilização, como nas secagens primária e secundária (BEIROWSKI et al., 2011). Em temperaturas reduzidas, inicia-se o processo de nucleação dos cristais de gelo, que aumentam progressivamente com o declínio da temperatura até alcançar a temperatura ótima, na qual não há mais a formação de gelo na fase intersticial (REY; MAY, 2007). Dependendo da composição do produto, soluções que contêm sal ou solutos orgânicos cristalizam facilmente, a fase intersticial irá cristalizar abruptamente como um eutético ou uma mistura eutética rígida; neste ponto, o sistema terá alcançado a temperatura máxima da completa solidificação (ponto eutético, T_e) (BEIROWSKI et al., 2011). Há produtos, como polióis, açúcares ou polímeros, que não se cristalizam após o congelamento, ganham viscosidade e adquirem apenas uma aparência vítrea após atingirem a temperatura de transição vítrea (T_g). Na fase de congelamento, é imprescindível que o produto sofra completa solidificação da fase intersticial, uma vez que o congelamento incompleto irá resultar em uma fusão parcial ou no colapso durante a liofilização (CHUNG et al., 2012). A velocidade com que ocorre este congelamento é também outro fator importante, pois afeta diretamente a estrutura do liofilizado. O congelamento rápido resulta em pequenos cristais de gelo com poros reduzidos, o que diminui e prolonga a remoção do vapor de água durante a etapa de secagem primária. Em contrapartida, o congelamento lento pode favorecer a degradação do fármaco (REY; MAY, 2007).

Após o congelamento, o produto segue para a secagem primária, onde há a remoção da água congelada. A taxa de sublimação é dependente do calor aplicado no produto e não deve exceder a temperatura de colapso (T_g para sistemas vítreos ou T_{eu} para sistemas cristalinos), (REY; MAY, 2007). Para formulações de matriz cristalina, com temperatura de transição vítrea muito baixa e, conseqüentemente, grande período de secagem primária, é comum adicionar uma etapa de tratamento térmico (“annealing”), no qual a amostra é congelada, depois aquecida vagarosamente, até ultrapassar a temperatura de transição vítrea, e congelada novamente. Após esse tratamento térmico, o evento referente à transição vítrea, observado originalmente, não é mais encontrado, podendo surgir, em temperaturas mais elevadas, um evento referente à fusão do eutético formado (ABDELWAHED et al., 2006).

Tratando-se de liofilização de nanossuspensões, alguns problemas decorrentes do processo são mais evidentes, como a desestabilização das nanopartículas devido ao aumento da sua concentração durante o congelamento, ocasionando maiores interação e aglomeração ou fusão do sistema. Os componentes da formulação também podem influenciar na estabilidade

das nanopartículas durante o processo de liofilização, como o tipo e a concentração do crioprotetor, a natureza do surfactante, os grupamentos químicos de superfície das nanopartículas e o polímero utilizado no seu preparo. Os lioprotetores formam pontes de hidrogênio com os grupos polares da superfície da nanossuspensão no processo final de secagem, mantendo a estrutura inicial das nanopartículas e agindo como substitutos da água. Os crioprotetores, como os açúcares, promovem o isolamento das partículas individuais da fração não congelada, prevenindo a agregação durante o congelamento acima da T_g (ABDELWAHED et al., 2006).

Os polímeros utilizados para a estabilização da nanossuspensão podem também contribuir para a boa resistência na fase de congelamento. Foi reportado o sucesso da liofilização de nanoesferas estabilizadas com PVA (álcool polivinílico), não sendo necessária a adição de um crioprotetor. Por outro lado, a utilização de polaxamer não teve bom desempenho no processo de liofilização. Pode ser observada a agregação de partículas provenientes do aumento da solubilidade do polaxamer presente na solução durante o processo de congelamento (CHUNG et al., 2012).

O xilitol foi utilizado para estabilizar uma nanossuspensão liofilizada de everolimo, além de possuir a função antioxidante, promovendo aumento da estabilidade química desse material. O estudo demonstrou que diferentes concentrações do xilitol impactam no perfil de dissolução do everolimo, indicando que concentrações abaixo de 0,5% (p/p) não impedem a agregação das partículas, apresentando melhor desempenho quando foi utilizado 1,0 % (p/p) na formulação (SEOK et al., 2016).

2.6 Aumento da efetividade de fármacos

Em diversas situações, a tecnologia de nanocristais é reportada como muito propícia para o aumento de efetividade. A nanossuspensão de buparvaquona resultou em aumento do direcionamento da buparvaquona em cepas resistentes de *C. parvum*, o agente causador da diarreia grave em pacientes com HIV. Esta nanossuspensão de buparvaquona foi formulada com polímeros mucoadesivos e resultou no aumento do tempo de residência da substância ativa no trato gastrointestinal durante as crises de diarreia, aumentando, dessa forma, sua eficácia (JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2001).

A literatura também destaca que partículas de até 1.000 nm são internalizadas, preferencialmente, por células que possuem atividade fagocitária, como, por exemplo, os macrófagos do sistema fagocitário mononuclear (MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011). De modo geral, os macrófagos são responsáveis por engolfar os patógenos e destruí-los. Alguns patógenos, entretanto, subvertem esse sistema e, ao serem fagocitados, se escondem dos mecanismos de defesa do sistema imune, vivendo e se multiplicando dentro dos macrófagos. São exemplos, doenças como a tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e a leishmaniose (*Leishmania sp*) (CONTRERAS et al., 2014). Nesse sentido, Kayser (2000) demonstrou, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, que as nanossuspensões são eficientemente capturadas pelas células fagocitárias. Em seu estudo envolvendo o antibiótico tetracíclico afidicolina, veiculado na forma de nanossuspensão, com tamanho de partícula médio de 400 nm, foi possível obter atividade 140 vezes maior contra *Leishmania donovani* quando comparado ao mesmo fármaco puro veiculado na forma de solução em dimetilsulfóxido (DMSO), indicando a importância da atividade fagocitária para a eficácia terapêutica e a potencialidade das nanossuspensões (KAYSER, 2000).

Outra característica emergente dos nanocristais que se mostra muito promissora é o aumento da permeabilidade e da retenção de fármacos em tecidos tumorais, por possuir melhor capacidade de penetrar no tumor ou mesmo nas células tumorais individuais (MIAO et al., 2008 e LU et al., 2016). No processo de inflamação/hipóxia existente em tecidos tumorais, o revestimento endotelial da parede do vaso sanguíneo se torna mais permeável do que o normal, favorecendo o acúmulo de fármacos no espaço intersticial. Tal acúmulo espontâneo ou ocasionado por direcionamento passivo é intensificado pela ineficiência da drenagem linfática – que está comprometida. Os nanocristais parecem favorecer este acúmulo do fármaco, além de assegurar a circulação por período de tempo estendido, contribuindo na manutenção do fármaco acumulado no alvo (MIAO et al., 2008). Foi evidenciado que a formulação de nanocristais de paclitaxel apresentou menor toxicidade e maior especificidade, se acumulando e permanecendo no tumor após sete dias de uma injeção intravenosa em bolus (WANG et al., 2011).

Desse modo, o desenvolvimento de nanossuspensões poderá aumentar a atividade em estudos de reposicionamento de fármacos e, conseqüentemente, as chances de sucesso de diversas terapias.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi o preparo e a caracterização físico-química do nanocristal de flubendazol por microfluidização, demonstrando a efetividade desta tecnologia no incremento da velocidade de dissolução do fármaco e na potencialização da atividade antitumoral do flubendazol.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção e otimização da formulação dos nanocristais de flubendazol preparados pela técnica de microfluidização e liofilização.
- Avaliação do tamanho de partícula do nanocristal por diferentes técnicas: espalhamento de luz *laser* (LLS), espalhamento de luz dinâmica (DLS), rastreamento de nanopartículas e microscopia.
- Caracterização do nanocristal de flubendazol por análise térmica e difratometria de raio-x de pó.
 - Avaliação da solubilidade e da dissolução dos nanocristais.
 - Avaliação da atividade antitumoral do flubendazol em células da linhagem de câncer de pulmão humano A-549 xenotransplantadas em camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

Para o desenvolvimento do projeto, foi utilizado o flubendazol (Changzou, Jiangsu, China); os tensoativos polissorbato 80 (Oxiten, Brasil), D- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) (BASF Corporation, EUA), poloxamer 188 (BASF Corporation, EUA), manitol (Ingredion Brasil Ingredientes, Brasil); e a água ultrapura Milli-Q[®].

No desenvolvimento da metodologia analítica, foram utilizados os reagentes e os solventes: acetato de sódio triidratado (Sigma-Aldrich Co. Missouri, EUA), acetonitrila (J.T. Baker, México), ácido acético (Sigma-Aldrich Co. Missouri, EUA), ácido clorídrico 37% PA (Fmaia, Brasil), dimetilsulfóxido (Fmaia, Brasil, e Sigma-Aldrich, França), fosfato de potássio monobásico (J.T. Baker, México), fosfato hidrogenado de sódio (Sigma-Aldrich Co. Missouri, EUA), hidróxido de sódio (Merck, Alemanha), cloreto de sódio (Merck, Alemanha) e cloreto de potássio (J.T. Baker, México).

4.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador de hélice mecânico – IKA[®]
- Analisador termogravimétrico (TGA-50) – Shimadzu[®]
- Balança analítica AX200 – Shimadzu[®]
- Balança analítica – Metler Toledo[®]
- Balões volumétricos de 5, 10, 20, 50, 250, 1000 ml – Laborglas Ltda.[®]
- Banho ultrassônico[®] – Unique[®]
- Calorímetro de varredura diferencial (DSC-50) – Perkin Elmer[®], EUA
- Centrífuga 5810 R Eppendorf[®]
- Cubetas de quartzo – Thermo Fischer Scientific[®]
- Difrátômetro Siemens[®] / Bruker modelo D5000, EUA
- Dispensor Ultra Turrax – IKA[®]
- Espectrofotômetro Evolution series 201 – Thermo Scientific[®], EUA
- Espectrofotômetro S.I Photonics – Photonics[®], EUA

- Espectrofotômetro FlexStation 3, Molecular Devices®
- Incubadora TE 420 Tecinal®
- Liofilizador IMA Life®, Itália
- M-110P Microfluidizer – Microfluidics®, EUA
- Mastersizer 2000 – Malvern®, Reino Unido
- Microscópio eletrônico de varredura ZEISS Sigma 300, Carl Zeiss Microscopy®, Alemanha
- Microscópio de fluorescência Zeiss Axio Image fluorescence, Oberkochen®, Alemanha
- Nanosight NS300 – Malvern®, Reino Unido
- Software NTA v.3.1, Malvern Instrument – Malvern®
- pHmetro Metler Toledo®
- Zetasizer Nano ZSP – Malvern®, Reino Unido
- Minitab 17, EUA

4.3 Métodos

4.3.1 Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria UV para a quantificação do flubendazol nas formulações

O método para quantificação do flubendazol foi desenvolvido e validado no espectrofotômetro Evolution 201 (Thermo Fischer Scientific Inc., EUA), com cubeta de quartzo modelo 18UV10, utilizando flubendazol 99,9 % (Changzou, Jiangsu, China) como padrão. Foram realizadas varreduras na região de 200 a 600 nm para escolha do pico de absorção. Levando em consideração interferências dos excipientes e meios, o comprimento de onda de 310 nm foi o escolhido e o utilizado na validação do método analítico.

4.3.1.1 Preparo da solução padrão e das soluções de trabalho do flubendazol

Para o preparo da solução padrão, foi determinada a concentração exata de 200 µg/mL de flubendazol. Para isso, foram pesados 50 mg de flubendazol, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 20 ml (2,5 mg/ml). Completou-se o volume do balão com dimetilsulfóxido e a amostra ficou sob ultrassom até a completa solubilização. Após a completa solubilização do flubendazol, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 ml e o volume foi ajustado com uma solução de acetonitrila: água (60:40, v: v). Posteriormente, diluições desta solução foram preparadas para a validação do método.

4.3.1.2 Determinação da absorbância máxima do flubendazol

Para a determinação da absorbância do flubendazol, foi utilizado o espectrofotômetro UV-vis Evolution 201, com o software *Insight* no modo varredura. Foi preparada uma solução de 10 µg/mL de flubendazol, a partir da diluição em água ultrapura da solução padrão 200 µg/mL, e realizada a varredura no comprimento de onda de 200 a 600 nm.

4.3.1.3 Validação da metodologia analítica para a quantificação de flubendazol nos estudos de solubilidade e nas nanossuspensões

A validação foi conduzida com a finalidade de demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade requerida. Essa validação foi realizada de acordo com a RDC 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, intervalo, precisão intracorrida (repetibilidade) e intercorrida (intermediária) exatidão e robustez.

4.3.1.4 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método de medir exatamente um composto em presença de outros componentes da formulação ou de produtos de degradação (BRASIL, 2017). Foi avaliada a especificidade do método realizando-se varreduras entre 200 e 600 nm da solução de flubendazol 10 µg/mL, preparada a partir da diluição da solução padrão em HCl 0,1 N, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8, tampão fosfato pH 7,4 e dos excipientes d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e manitol em solução. Tal abordagem permitiu a escolha do comprimento de onda adequado, que não possuísse interferência dos solventes e dos excipientes na quantificação do fármaco.

4.3.1.5 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método analítico em demonstrar que os valores obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2017).

A partir da solução padrão de flubendazol, foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 25 ml e o volume foi completado com solução de HCl 0,1 N, obtendo-se soluções com concentrações definidas do fármaco. A **Tabela 2** apresenta as diluições utilizadas para o preparo de cada solução e as concentrações finais obtidas. A absorbância da amostra foi medida a 310 nm contra o branco. Em seguida, a curva de calibração do flubendazol foi construída na faixa de concentração entre 5 e 80 µg/mL. As curvas analíticas foram preparadas em triplicatas.

Tabela 2 - Concentração das amostras de flubendazol obtidas a partir de uma solução padrão a 200 µg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.

Concentrações (µg/ml)	Alíquota do padrão (ml)	Volume final (ml)
5	0,625	25
10	1,250	25
20	2,500	25
40	5,000	25
60	7,500	25
80	10,000	25

4.3.1.6 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram cálculos considerando o desvio padrão residual da linha de regressão (σ) e o coeficiente angular ou inclinação da curva de calibração (IC). O LQ e LD foram calculados de acordo com as equações abaixo (**Equação 2** e **Equação 3**):

Equação 2: $LD = 3,3 \cdot \sigma / IC$

Equação 3: $LQ = 10 \cdot \sigma / IC$

4.3.1.7 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados de uma amostra por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (BRASIL 2017). A precisão pode ser expressa através da avaliação do desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas, de acordo com a **Equação 4**, não devendo exceder o valor de 5% (BRASIL, 2017).

$$DPR (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

CV (%) = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

A precisão do método foi avaliada por meio da precisão de repetibilidade e da precisão de reprodutibilidade. No ensaio de repetibilidade, foram avaliadas as amostras sob as mesmas condições de operação, o mesmo analista e a mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Foram realizadas nove determinações, 3 concentrações preparadas independentemente (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL), com 3 réplicas em cada nível.

Na determinação da reprodutibilidade, foi expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em dois dias diferentes, realizada por analista diferente. Foram realizadas, também, nove determinações, 3 concentrações (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL), com 3 réplicas em cada nível e em cada dia. Os valores foram comparados inter-dias.

As precisões nas duas condições foram expressas em termos de desvio padrão relativo (%), conforme a **Equação 4**, sendo o critério mínimo de aceitação menor ou igual a 5% (BRASIL, 2017).

4.3.1.8 Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico e pelo valor esperado (BRASIL, 2017). Para determinar a exatidão do método, foi calculada, após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, a porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas de flubendazol de pureza conhecida (16, 20 e 24 µg) adicionado à solução de flubendazol a 20 µg/mL, sendo que o preparo de cada ensaio foi realizado em triplicata, dentro do intervalo linear estabelecido no método. A exatidão foi expressa como percentual de recuperação pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente.

4.3.1.9 Robustez

A robustez determina a confiança do método e avalia sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. O ensaio para determinação da robustez foi realizado a partir da variação do fabricante do dimetilsulfóxido (Fmaia[®], Brasil, e Sigma-Aldrich[®], França). A avaliação da robustez foi realizada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR %) entre as medidas obtidas.

4.3.2 Estudo exploratório: preparo da nanossuspensão de flubendazol empregando a microfluidização

Para o preparo das nanossuspensões, foi utilizado o microfluidizador Microfluidics M-110P[®], da Microfluidics Corporation, com câmara de interação no formato Y (F12Y, 75 µm), com módulo de processamento auxiliar, para estabilização do fluxo de fluido, agindo como um alívio de pressão. A **Tabela 3** apresenta as formulações do estudo exploratório. O flubendazol foi adicionado na solução aquosa contendo o tensoativo polissorbato 80 ou o poloxamer 188 ou o D-α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) (tensoativos indicados para utilização oral e injetável) e submetido ao alto cisalhamento em agitador ultraturrax por 5 minutos. O tamanho das partículas foi reduzido por microfluidização no microfluidizador (LIU et al., 2011).

Durante a microfluidização, foram utilizados os seguintes parâmetros, para todas as formulações: 35.000 psi de pressão, câmara no formato Y e temperatura do produto de 30°C ± 5°C. Para todos os testes, foram preparadas 100 gramas de suspensão. Alíquotas foram coletadas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, para avaliar a influência do tempo do processo na redução do tamanho da partícula. Foi avaliada a estabilidade física das nanossuspensões armazenadas em câmara climática de 30°C (± 5°C), 75%UR (± 5) nos tempos 0, após 30 dias, 60 dias e 90 dias do preparo.

Tabela 3 - Fórmulas dos ensaios exploratórios para obtenção dos nanocristais de flubendazol utilizando-se a microfluidização.

Fórmula	Flubendazol (g)	Polissorbato 80 (g)	Poloxamer 188 (g)	TPGS (g)	Água purificada qsp (g)
F1	28	2,8	-	-	100
F2	28	-	2,8	-	100
F3	28	-	-	2,8	100

4.3.3 Otimização da preparação dos nanocristais de flubendazol empregando-se planejamento estatístico

Após determinação do tempo de passagens da suspensão no microfluidizador e da escolha do tensoativo TPGS, por meio de estudo exploratório, foi avaliada a influência da concentração do d-α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato e da concentração do

flubendazol no diâmetro hidrodinâmico médio da partícula (DHM) e no índice de polidispersão (IP). Foi utilizado planejamento fatorial simples empregando-se duas variáveis independentes em dois níveis (máximo e mínimo), adicionados de 4 pontos centrais e totalizando 8 ensaios. Os ensaios foram executados de forma aleatória.

A **Tabela 4** apresenta a matriz de ensaios com a concentração do TPGS (nível mínimo: 2,0 e nível máximo: 3,0 % em p/p) e a concentração de flubendazol (nível mínimo: 20 e nível máximo: 30 % p/p) na nanossuspensão. A matriz de ensaios e a análise dos resultados foram realizadas empregando-se o *software* Minitab 17.

Tabela 4 - Matriz de ensaios para a otimização do processo de produção de nanocristais de flubendazol.

Formulação	Ordem dos ensaios	Ponto central	Blocos	Flubendazol (% p/p)	TPGS (% p/p)
F4	8	1	1	20	2
F5	3	1	1	30	2
F6	2	1	1	20	3
F7	4	1	1	30	3
F8	1	0	1	25	2,5
F9	5	0	1	25	2,5
F10	7	0	1	25	2,5
F11	6	0	1	25	2,5

4.3.4 Determinação da distribuição do tamanho de partícula do flubendazol micronizado por espalhamento de luz *laser*

Para a determinação do tamanho de partícula do insumo farmacêutico ativo flubendazol, foi utilizado o equipamento Mastersizer 2000[®], da Malvern Instruments, pelo método via úmida.

Foram pesados 100 mg de flubendazol e transferidos para um béquer, no qual foi adicionada uma alíquota de 10 ml do meio de dispersão (solução aquosa contendo 1 % de polissorbato 80). A amostra ficou sob agitação por 3 minutos, sendo preparada em triplicata. O índice de refração utilizado para o flubendazol foi de 1,685 (GLOBAL CHEMICAL

NETWORK, 2017); o índice de refração da solução dispersante determinada foi de 1,33. A velocidade de agitação utilizada durante a leitura foi de 1.500 rpm, não sendo utilizado ultrassom na amostra, a fim de evitar a quebra das partículas e a leitura inadequada. A obscuração do teste foi mantida no range de 5 a 10 % e o tempo de análise foi de 10 segundos para cada leitura.

4.3.5 Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de flubendazol por espalhamento de luz *laser*

Foi utilizado o equipamento Mastersizer 2000[®], Malvern Instruments. As amostras foram diluídas (dispersas) somente em água purificada. O índice de refração utilizado para o flubendazol foi de 1,685 (GLOBAL CHEMICAL NETWORK, 2017) e o do dispersante foi de 1,33. A agitação utilizada durante a leitura foi de 2.000 rpm, não sendo utilizado ultrassom na amostra, a fim de evitar a quebra das partículas e a leitura inadequada. A obscuração do teste manteve-se menor do que 5% e o tempo de análise foi de 10 segundos para cada leitura. Foram avaliados o diâmetro médio ponderado pelo volume (D[4,3]) e o diâmetro médio ponderado pela superfície (D[3,2]) – d_{0,1}, d_{0,5} e d_{0,9}.

4.3.6 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e do índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão de flubendazol por espalhamento de luz dinâmica (DLS)

As amostras foram diluídas em água purificada, em balão volumétrico, na concentração de 30 µl/50 ml, filtradas em membrana de 5 micras. A leitura foi realizada imediatamente após a diluição. Foi observado o espalhamento de luz dinâmica através do equipamento Zetasizer Nano (Malvern Instruments LTD). As leituras foram realizadas nas seguintes condições: dispersante água com IR de 1,330, temperatura de 25 °C, tempo de equilíbrio de 30 segundos, cubeta (DTS0012), ângulo de medida de 173° por retrodifusão, medidas com seleção automática do atenuador em modelo normal de resolução.

4.3.7 Determinação da distribuição do tamanho de partícula da nanossuspensão de flubendazol por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*)

As amostras foram diluídas em água purificada na concentração de 70 µL/50 ml. Desta solução, foi coletada alíquota de 1 ml, diluída novamente em 50 ml de água purificada. Posteriormente, foi realizada a filtração em filtro de 5 micras. Aproximadamente 700 µL foram injetados, logo após a diluição, no porta-amostra do NanoSight NS300. Através do *software* NTA v3.1, foram conduzidas medidas em triplicata, com duração de 60 segundos, em temperatura de 25 ° C. A média destas análises foi utilizada para realizar o comparativo com a média de tamanho de partícula obtido pela técnica DLS.

4.3.8 Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da morfologia das nanossuspensões produzidas no estudo exploratório (testes F1, F2 e F3) foi realizada por microscópio eletrônico de varredura ZEISS Sigma 300, Carl Zeiss Microscopy[®], Alemanha. As nanossuspensões foram secas sob nitrogênio e foram metalizadas com ouro paládio (AuPd), não influenciando na resolução e na qualidade da análise. As imagens foram captadas em modelo de vácuo sob tensão de aceleração de 5.00 KV In Lens.

4.3.9 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nanossuspensões foi determinado por espalhamento de luz eletroforético utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZSP, da Malvern Instruments LTD. As amostras foram diluídas em água purificada na concentração de 15µL/50 ml, as leituras foram realizadas em cubeta específica, na temperatura de 25 ° C. Foi verificado também que, para o método desenvolvido, não há interferências da condutividade na determinação do potencial zeta, através da construção da curva de condutividade *versus* potencial zeta, na faixa de 5 a 70 µS/cm, empregando solução de NaCl 0,9% (m/v).

4.3.10 Determinação do teor

O flubendazol foi quantificado por espectrofotometria no UV-visível no comprimido de onda de 310 nm. No preparo das amostras foram adicionados 3,85 ml de água purificada, no frasco contendo o nanocristal liofilizado, e o pó foi ressuspendido sob agitação. Alíquota de 0,25 ml foi transferida para um balão de 20 ml e o volume foi completado com DMSO. O balão ficou sob ultrassom durante 10 minutos. Após, alíquota de 2 ml foi transferida para balão de 25 ml e o volume foi completado com solução de acetonitrila/água purificada (60:40). Alíquota de 5 ml foi transferida para um balão de 25 ml e o volume foi completado com solução de acetonitrila/água purificada (60:40). As amostras foram filtradas em filtro de 0,45 micras (PVDF). O preparo foi realizado em triplicata e foi calculado o desvio padrão das amostras.

4.3.11 Solubilidade de saturação/solubilidade cinética

Utilizando a metodologia Shake Flask, foi avaliada a solubilidade do flubendazol e de seu nanocristal liofilizado em diferentes meios, dentro da faixa de pH fisiológico (HCl 0,1 N, solução tampão pH 6,8) e solução tampão salina pH 7,4 (BRASIL, 2013). O ensaio foi realizado adicionando-se o excesso de flubendazol (20 mg) e de seu nanocristal liofilizado (contendo 20 mg de flubendazol) em 10 ml do meio escolhido. As amostras ficaram sob agitação no *shaker*, por 24 horas, na velocidade de 200 rpm, a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Após agitação, as amostras foram centrifugadas, a 2.000 rpm por 60 minutos, para decantação (KIM et al., 2011). O sobrenadante foi filtrado, em membrana de 0,45 micras (PVDF). A quantificação do fármaco em solução foi realizada por espectrofotometria no UV-visível. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo efetuado o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação.

4.3.12 Avaliação da dissolução dos nanocristais

Os dados de dissolução foram adquiridos utilizando o espectrofotômetro da série SI400 da SI Photonics (Tucson, Arizona, USA). O equipamento possui um dispositivo de carga acoplado (CCD) com matriz de detectores, que apresenta melhor eficiência e menor ruído do que os convencionais de fotodiodo. O dispositivo de amostragem desse equipamento consiste

em fibra óptica. Possui uma lâmpada de tungstênio para leituras no visível, na faixa de comprimento de onda de 350 a 1.000 nm, enquanto as lâmpadas de deutério são utilizadas para comprimentos de onda UV abaixo de 350 nm. Nos experimentos realizados, as leituras foram registradas no intervalo de 1 em 1 minuto. A faixa de comprimento de onda trabalhada foi de 200 a 950 nm, embora os dados tenham sido tratados no comprimento de onda de 300 nm. A sonda de fibra óptica utilizada nos ensaios foi a de 0,5 mm. O ensaio foi realizado no meio de dissolução HCl 0,1 N acrescido de 0,1% TPGS. Foram adicionados 40 ml do meio em uma cuba, o sistema foi mantido sob aquecimento em chapa de aquecimento até a temperatura de 37°C (± 1 °C) e foram adicionados 5,1 mg do nanocristal (equivalente a 4,4 mg de flubendazol) sob agitação constante de 300 rpm. As leituras foram iniciadas logo após a adição do flubendazol na cuba. Para avaliar a dissolução do flubendazol micronizado, foram adicionados, no meio de dissolução, 4,4 mg do flubendazol convencional. Os testes foram realizados em triplicata. O tempo de dissolução avaliado foi de 60 minutos.

4.3.13 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para determinação da temperatura de transição vítrea da nanossuspensão de flubendazol liofilizada

As curvas DSC dos estudos foram obtidas em equipamento DSC, marca Perkin Elmer, modelo Diamond, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de 50 mL/min, razão de aquecimento de 20 °C/min, efetuando-se o congelamento da amostra até -60 °C, seguido do aquecimento até 45 °C. Foi utilizado cadinho de alumínio parcialmente fechado. A massa da amostra foi de 3 mg. O equipamento foi previamente calibrado com índio (PF 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54$ J/g).

4.3.14 Liofilização da nanossuspensão de flubendazol

A formulação F3, que consta descrita na **Tabela 2**, foi liofilizada no liofilizador da IMA Life, Itália. Com a finalidade de se avaliar o impacto da utilização de um crioprotetor na estabilização do nanocristal, o produto foi liofilizado com 5% (p/p da formulação) de manitol. Uma alíquota de 5 ml foi transferida manualmente para frascos de vidro âmbar de 23 mL, os quais foram parcialmente fechados com tampas de borracha e adicionados no liofilizador. Na

Tabela 5, seguem os parâmetros de liofilização utilizados durante as etapas de congelamento, tratamento térmico, secagem primária e secundária. O fechamento dos frascos foi realizado no modo automático do equipamento.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados durante a liofilização da nanossuspensão de flubendazol.

Etapa do processo	Temperatura da prateleira (°C)	Vácuo (µbar)	Tempo da etapa
Estabilização das prateleiras	0	0	30 minutos
Congelamento lento	-45	0	1 hora
Congelamento da amostra	-45	0	3 horas
Tratamento térmico (<i>annealing</i>)	-20	0	3 horas
Congelamento da amostra	-45	0	3 horas
Evacuação	-45		
Secagem primária	-22	850	30 horas
Secagem secundária	0	80	2 horas
Secagem secundária	25	30	4 horas

4.3.15 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/ DTG)

A caracterização dos nanocristais por termogravimetria foi realizada no equipamento Discovery TGA (TA Instruments[®], EUA). Pesaram-se as respectivas massas em cadinhos de alumínio selados: 1,706 mg de flubendazol puro; 3,664 mg de manitol; 17,510 mg de polissorbato 80; 6,207 mg de poloxamer 188; 3,372 mg de TPGS; 7,214 mg do nanocristal estabilizado com o polissorbato 80 (formulação F1); 7,156 mg do nanocristal estabilizado com poloxamer 188 (formulação F2); 6,068 mg do nanocristal estabilizado com o TPGS (formulação F3) – secos sob nitrogênio; 24,672 mg de placebo contendo TPGS e manitol; e 3,542 mg do nanocristal estabilizado com TPGS e manitol – liofilizado. O ensaio foi realizado em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 ml/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 20 a 600 °C.

4.3.16 Calorimetria Exploratória Diferencial para caracterização dos testes

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial foi realizada com o equipamento Discovery DSC 2500 (TA Instruments[®], EUA) previamente calibrado com índio metálico (ponto de fusão: 156,6 °C, $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J/g}$), na faixa de temperatura de trabalho de -90 a 550 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min. Para a realização dos ensaios, foram pesadas as respectivas massas em cadinhos de alumínio: 2,240 mg de flubendazol puro; 2,160 mg de manitol; 5,160 mg de polissorbato 80; 2,480 mg de poloxamer 188; 2,300 mg de TPGS; 2,18 mg do nanocristal estabilizado com polissorbato 80 (formulação F1); 2,210 mg do nanocristal estabilizado com poloxamer 188 (formulação F2); 2,160 mg do nanocristal estabilizado com TPGS (formulação F3) – secos sob nitrogênio; e 2,070 mg do nanocristal estabilizado com TPGS e manitol – liofilizado. Os cadinhos foram fechados e inseridos no equipamento. As amostras foram submetidas à velocidade de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 ml/min.

4.3.17 Análise da estrutura cristalina dos nanocristais de flubendazol empregando-se difração de raio X (DRX)

A análise de difração de raio X foi realizada para avaliar a cristalinidade do flubendazol micronizado e do nanocristal de flubendazol estabilizado com TPGS e manitol. O método de pó foi utilizado. O material foi adicionado em um suporte de amostra, escaneado entre 10° a 80° (2 θ), exposto à radiação CuK α 40 Kv e tempo de passo de 0,01. Com os dados brutos obtidos, foi construído o histograma para melhor demonstração. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Difração de Raios X do NAP-Geoanalítica USP (Instituto de Geociências da USP), em colaboração com o Dr. Flávio Machado de Souza Carvalho.

4.3.18 Avaliação da atividade antitumoral dos nanocristais de flubendazol em células da linhagem de câncer de pulmão humano A-549

Os ensaios de viabilidade celular (MTT) e atividade antitumoral em modelo xenográfico de câncer de pulmão humano foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Claudiana Lameu, no Laboratório de Estudos dos Mecanismos Moleculares da Metástase, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Química da USP no âmbito do projeto “Mecanismos de Metástase de Tumores Infantis para a Medula Óssea”, conforme metodologia descrita a seguir (CEUA 63/2017).

4.3.18.1 Cultura de células de câncer de pulmão

Foi utilizada, neste estudo, a linhagem de câncer de pulmão humano A-549. A linhagem A-549 foi cultivada em garrafas apropriadas *cellplus* (Sarstedt) no tamanho T-25 a 37 °C em estufa com atmosfera composta por 5% de CO₂ em meio de manutenção constituído de DMEM *high glucose* (LGC-Biotecnologia), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB -LGC-Biotecnologia) e penicilina/estreptomicina (1%). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

4.3.18.2 Formação de tumoresferas

Após as células atingirem a confluência de 80% de preenchimento na garrafa, foi adicionado 1mL de TrypleTM Express (Gibco) e a garrafa foi mantida em estufa a 37 °C por 5 minutos. A contagem de células foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer. Feito isto, as células foram transferidas para garrafas não aderentes (Sarstedt[®]), para a formação das tumoresferas. Foram utilizados 2X10⁶ de células, para as garrafas hidrofóbicas de 75cm² (T-75), com meio definido, contendo DMEM high glucose, penicilina e estreptomicina (1%), fatores de crescimento epidermal EGF (Sigma-Aldrich - 20 ng/mL) e de crescimento de fibroblasto básico-b FGF (Sigma-Aldrich - 20 ng/mL) e um conjunto de suplementos N₂ (1x - Life Technologies). As células foram mantidas por 4 dias sem a troca do meio, para a formação

das tumoresferas, e foram acompanhadas no microscópio EVOS (ThermoFisher Scientific) diariamente.

4.3.18.3 Ensaio de viabilidade celular – MTT

Para determinar a IC₅₀ (concentração inibitória necessária para levar à morte 50% da população celular) do nanocristal de flubendazol, foi realizado o ensaio de MTT em tumoresferas da linhagem de adenocarcinoma pulmonar, A549. O MTT é um teste colorimétrico que avalia a viabilidade celular por meio da mensuração da atividade metabólica. A presença de enzimas oxidoredutases mitocondriais reflete a quantidade de células viáveis, pois essas enzimas são capazes de reduzir o composto MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil tetrazoliumbromide), que é solúvel, em formazan – que é insolúvel. O ensaio de MTT foi realizado em duas condições: as células foram tratadas com o flubendazol no momento do plaqueamento (em meio definido) e a leitura de absorbância foi feita após 48 horas. As células foram tratadas com o flubendazol 96 horas após o plaqueamento (em meio definido); a leitura de absorbância foi feita 48 horas após o tratamento.

4.3.18.4 Xenotransplante a longo prazo nos animais BalbC/Nude

Os camundongos BalbC/Nude foram mantidos em ambiente controlado, com sistema de ar condicionado central, para ventilação e exaustão, iluminação controlada 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura mantida em 22 °C, com ração e água. Neste estudo, foram utilizados camundongos BalbC/Nude machos, pois esses animais são modelos biológicos que apresentam deficiência imunológica. As tumoresferas foram centrifugadas em baixa rotação, em 900 g por 5 minutos, e dissociadas mecanicamente. Feito isto, o meio foi descartado e o pellet ressuspenso em 1mL de tampão fosfato salino (TBS) 1X para a contagem de células na câmara de Neubauer. Foram injetadas, por animal, cerca de 2×10^6 células na região subcutânea do dorso – o que permitiu o acompanhamento do crescimento do tumor, bem como a comparação entre os diferentes tratamentos. Após 48 horas da injeção de células tumorais, foi aplicada a primeira injeção do fármaco no peritônio dos animais; a partir de então, os fármacos foram administrados uma vez por semana, enquanto que o peso dos animais e o tamanho dos tumores

foram monitorados duas vezes na semana. Os camundongos foram divididos em 3 grupos de 5 animais: grupo A que recebeu o veículo, solução na qual o flubendazol foi diluído; grupo B, de animais que receberam 50mg/kg de flubendazol micronizado, e grupo C, de animais que receberam 50mg/kg de nanocristais de flubendazol.

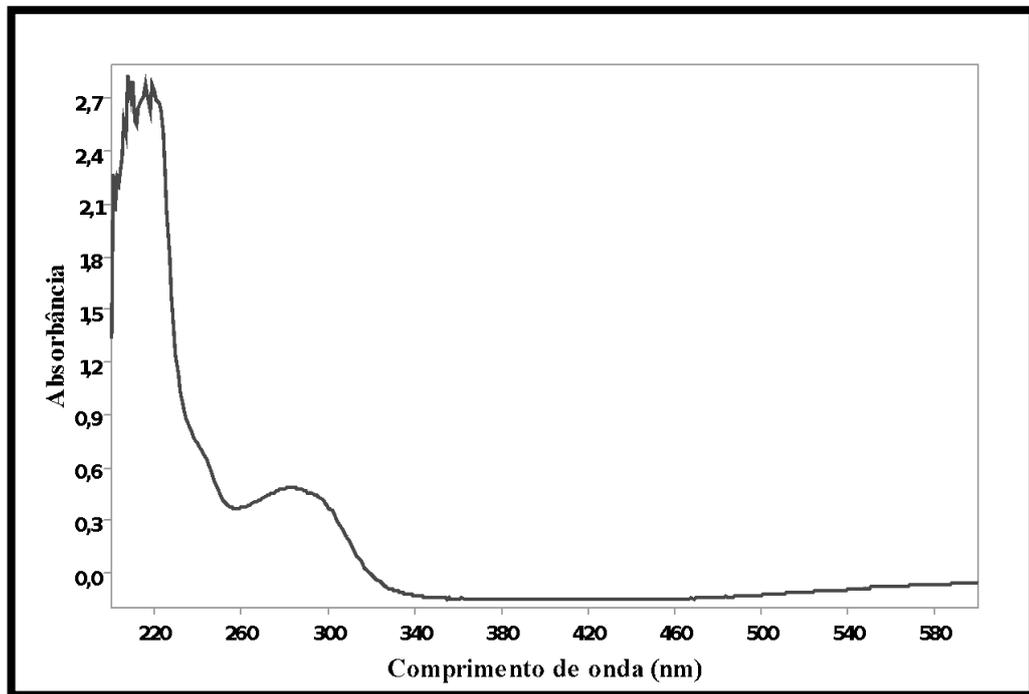
5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por espectrofotometria UV-VIS para a quantificação do flubendazol

5.1.1 Determinação da absorbância máxima do flubendazol

Após varredura no comprimento de onda de 200 a 600 nm, foi verificado que o flubendazol apresenta pico bem característico na faixa de 260 a 330 nm (**Figura 8**).

Figura 8 - Espectro da varredura do flubendazol 10 µg/mL no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.

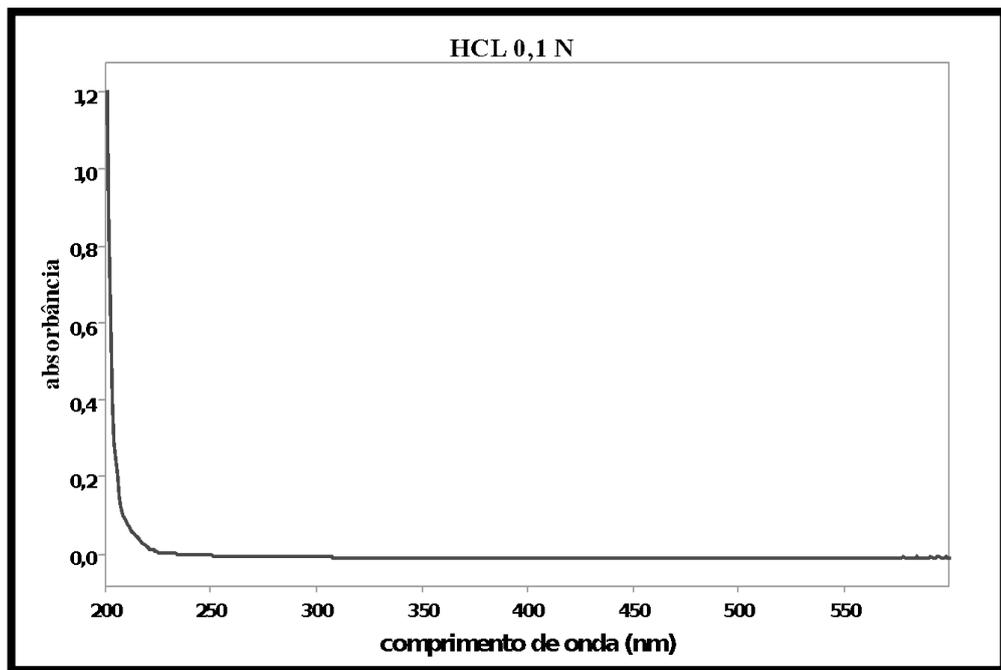


Fonte: Elaborado pelo autor

5.1.2 Avaliação da especificidade do método

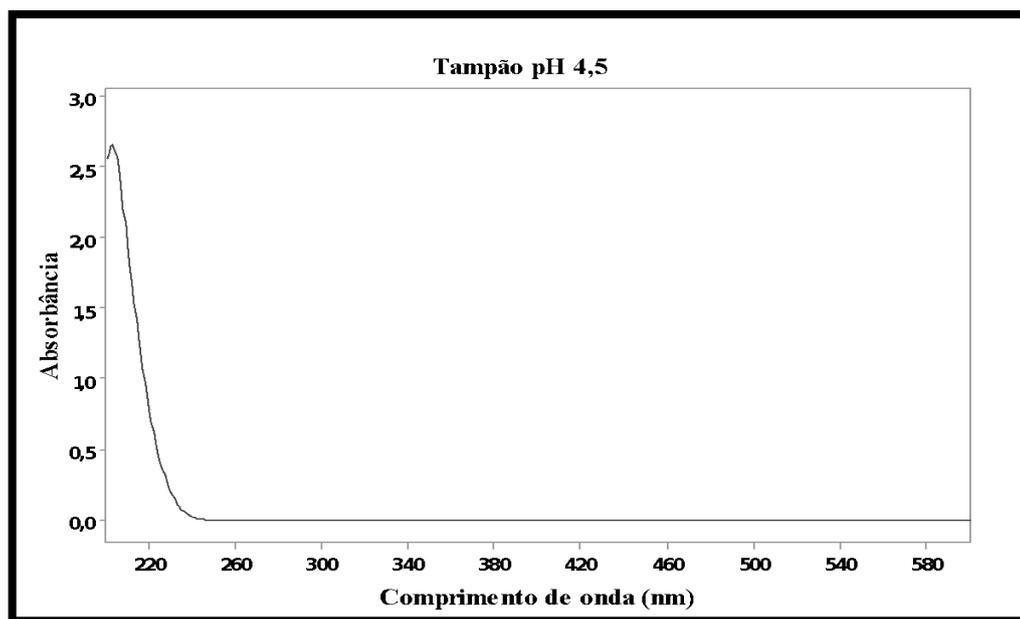
Na avaliação da especificidade, foi demonstrado que os solventes utilizados para o desenvolvimento do método analítico, assim como os excipientes que compõem a formulação, não têm interferência na longitude de onda de 310 nm, comprovando a especificidade do método em HCl 0,1 N, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato 7,4, na presença dos excipientes D- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e manitol (**Figuras 9 a 15**).

Figura 9 - Espectro da varredura do HCl 0,1 N no intervalo de comprimento de onda de 200 a 600 nm.



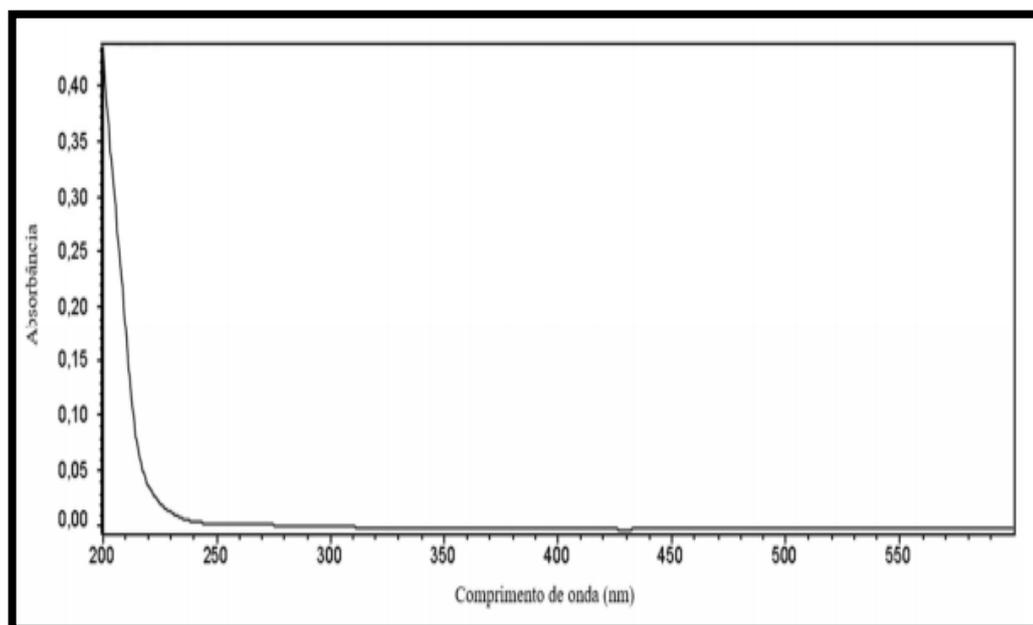
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10 - Espectro da varredura do tampão acetato pH 4,5 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.



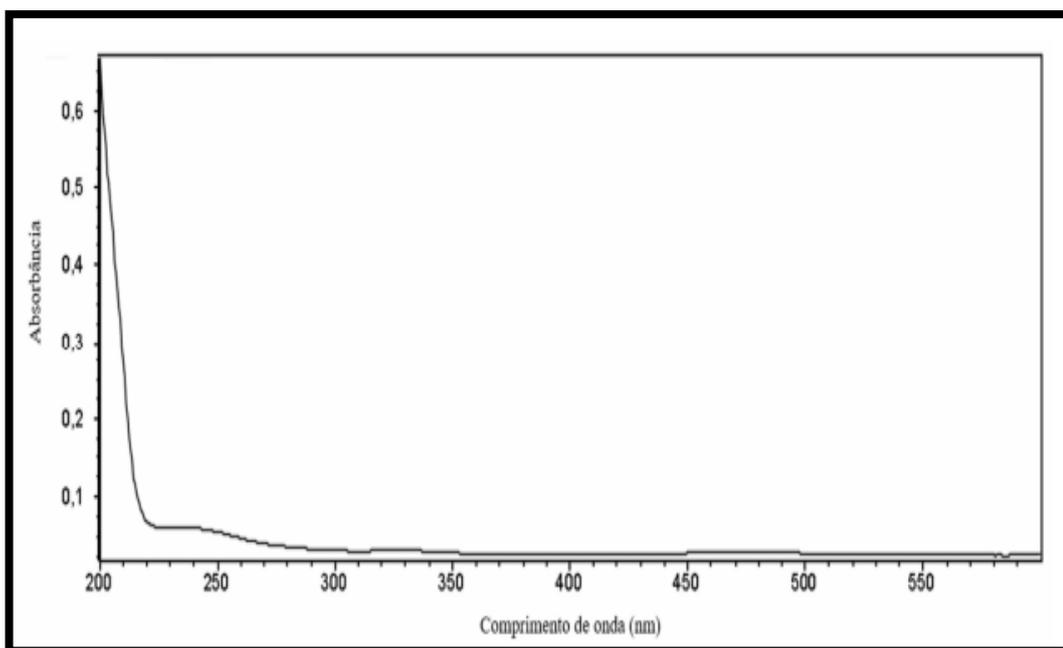
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11 - Espectro da varredura do tampão fosfato pH 6,8 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.



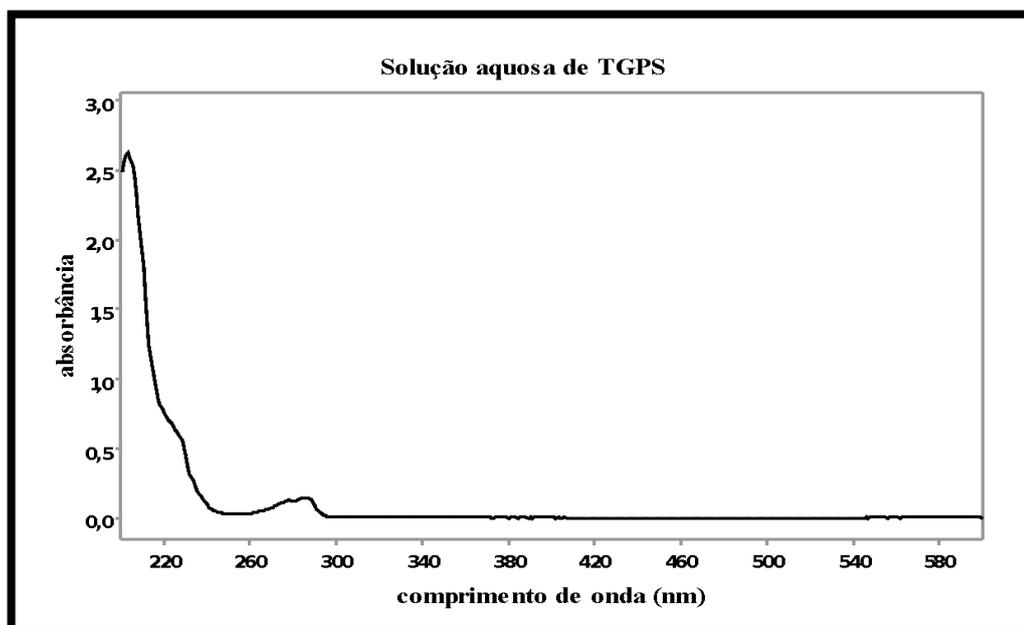
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12 - Espectro da varredura do tampão fosfato salino pH 7,4 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.



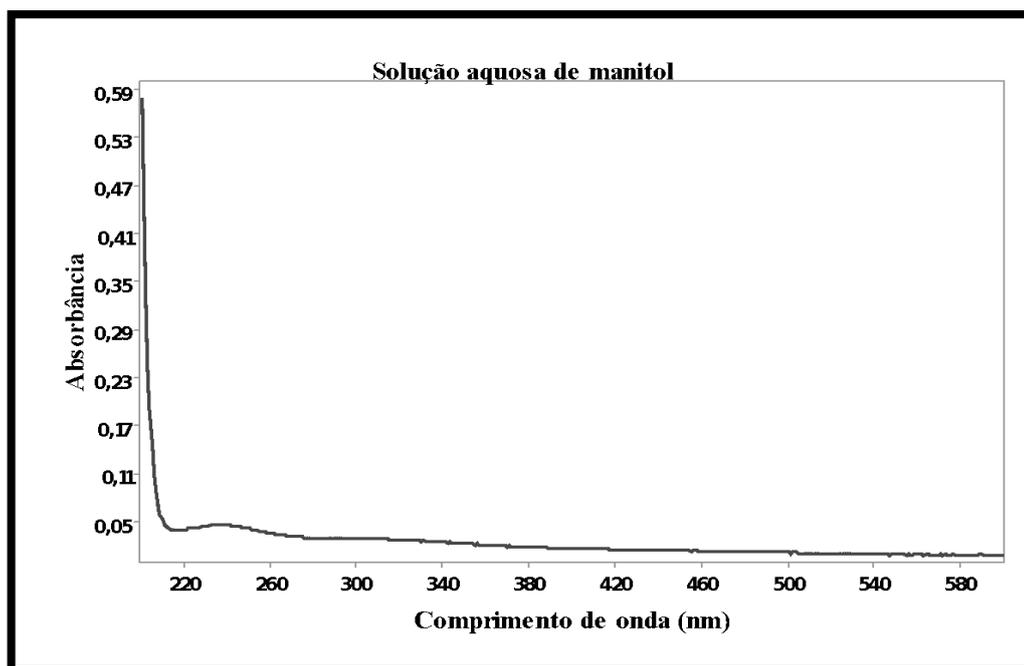
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13 - Espectro da varredura da solução aquosa de TPGS no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.



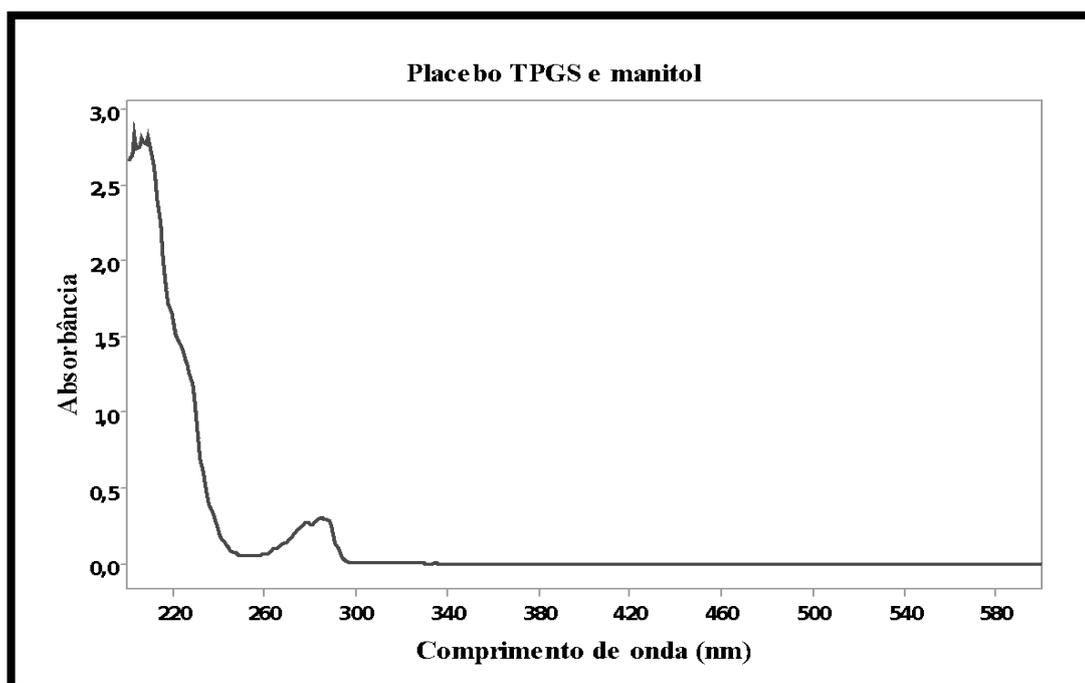
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 14 - Espectro da varredura da solução aquosa de manitol no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15 - Espectro da varredura do placebo de TPGS e manitol no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 600 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.1.3 Avaliação da linearidade do método

A avaliação da linearidade do método foi determinada a partir da construção de gráficos de concentração ($\mu\text{g/ml}$) *versus* absorvância (**Figura 16**), também chamados de curva de calibração do método. Foram determinadas as curvas analíticas e a equação da reta pela regressão linear usando-se o método de mínimos quadrados, assim como seu correspondente coeficiente de regressão linear (r^2).

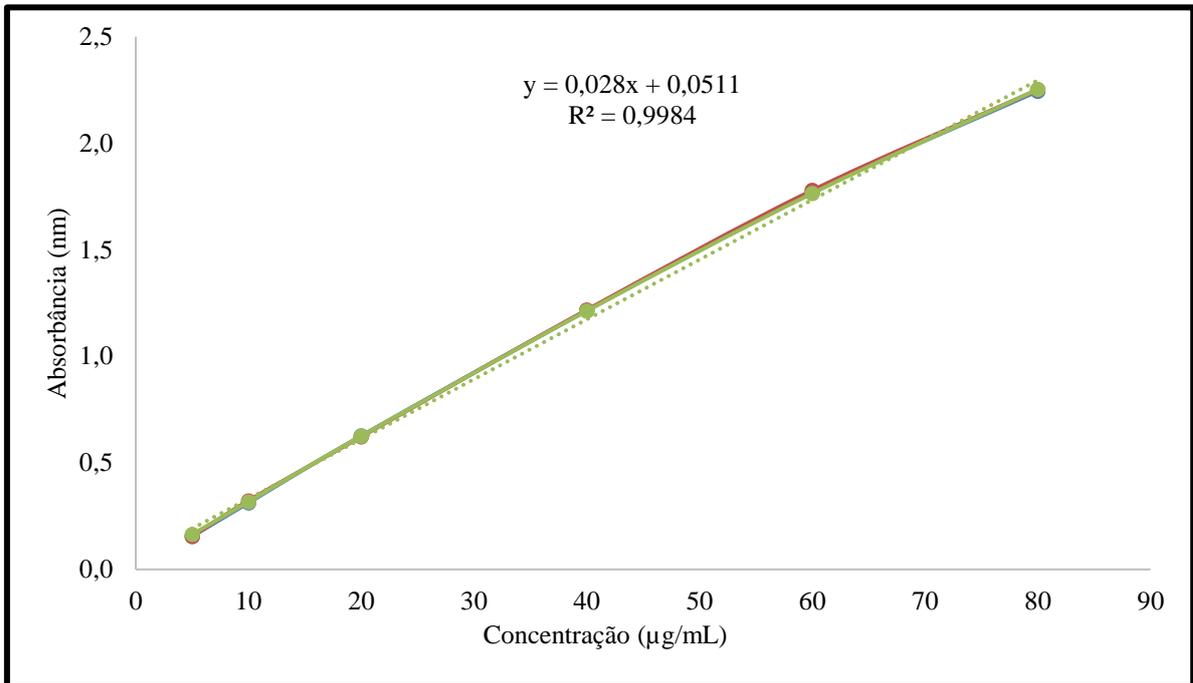
Foram determinados o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação dos pontos das absorvâncias para cada nível de concentração da curva de linearidade, sendo considerados, como aceitáveis, todos aqueles que apresentem valor abaixo de 5% (**Tabela 6**) (BRASIL, 2017).

Tabela 6 - Valores de absorvância obtidos na curva analítica do método para quantificação e solubilidade do flubendazol em HCl 0,1 N.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância			Média	DP	CV%
	1	2	3			
5	0,1551	0,1555	0,1640	0,1582	0,0050	3,16
10	0,3126	0,3221	0,3175	0,3174	0,0047	1,48
20	0,6267	0,6231	0,6261	0,6253	0,0019	0,31
40	1,2142	1,2173	1,2128	1,2148	0,0023	0,19
60	1,7700	1,7785	1,7644	1,7710	0,0071	0,40
80	2,2440	2,2506	2,2524	2,2490	0,0044	0,20

DP: desvio padrão (n=3), DPR (%) = desvio padrão relativo (n=3).

Figura 16 - Curva analítica do flubendazol obtida por espectrofotometria a 310 nm a partir de diluições volumétricas da solução padrão em HCl 0,1 N.



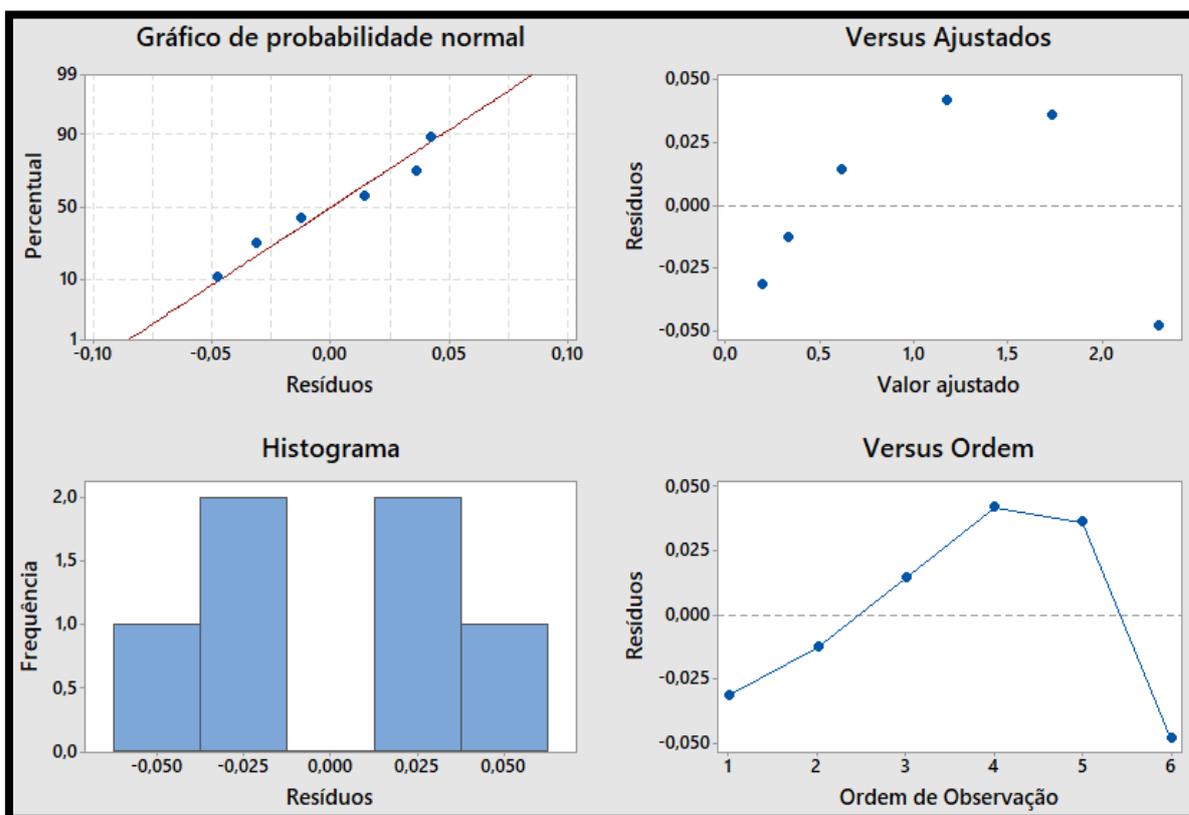
Fonte: Elaborado pelo autor

O gráfico de resíduos foi utilizado para examinar a qualidade de ajuste da regressão e de ANOVA, uma vez que auxilia na determinação se as suposições de mínimos quadrados comuns estão sendo atendidas. Se essas suposições forem satisfeitas, a regressão de mínimos quadrados comum produzirá estimativas de coeficientes não viciadas com variância mínima. Na **Figura 17**, é possível observar, no gráfico de probabilidade normal de resíduos, a distribuição uniforme ao redor de uma linha reta. Já no gráfico de resíduos *versus* ajustes, os pontos estão distribuídos em ambos os lados do 0, pressupondo que os resíduos possuem variância constante. Já o histograma não foi capaz de representar a amostra, devido à insuficiência de pontos (menor do que 20). Quando o tamanho de amostra é pequeno, cada barra no histograma pode não conter pontos de dados suficientes para demonstrar precisamente a distribuição dos dados; quanto maior a amostra, mais o histograma se parecerá com a forma da distribuição da população. O gráfico de resíduo *versus* ordem demonstra que os resíduos são independentes e não mostram tendências nem padrões quando exibidos em ordem temporal.

O modelo de quantificação do flubendazol no intervalo de confiança de 5 a 80 µg/ml demonstrou linearidade (coeficiente de correlação acima de 0,990) e coeficiente angular diferente de zero, atendendo os critérios da RDC 166/17 (BRASIL, 2017).

O limite de detecção é demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação demonstra a quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Na **Tabela 7**, constam os resultados de LQ (limite de quantificação) e LD (limite de detecção) obtidos a partir da avaliação do desvio residual da linha de regressão e da inclinação da curva de calibração.

Figura 17 – Gráficos dos resíduos relativos ao ajuste de uma reta de regressão dos dados de absorbância do flubendazol.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 7 - Avaliação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ)

Parâmetro	Valores
Desvio Padrão dos Resíduos	0,04090
Coefficiente Angular	0,0281
Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)	4,80
Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	14,55

5.1.4 Precisão e exatidão

A **Tabela 8** apresenta os resultados obtidos no teste de precisão de repetibilidade e de reprodutibilidade, expressos em desvio padrão relativo (%), cujos valores encontraram-se compreendidos entre o mínimo de 0,523% e o máximo de 1,743% (BRASIL, 2017).

Tabela 8 - Precisão de repetibilidade e reprodutibilidade do método analítico para a quantificação de flubendazol.

Concentração teórica de flubendazol (µg/ml)	Precisão	Concentração média de flubendazol (µg/ml)	Desvio padrão	DPR (%)
10	repetibilidade	9,943	0,057	0,573
	reprodutibilidade	10,124	0,105	1,037
20	repetibilidade	20,092	0,105	0,523
	reprodutibilidade	20,194	0,352	1,743
40	repetibilidade	39,468	0,461	1,168
	reprodutibilidade	39,961	0,53	1,326

A exatidão do método analítico representa o grau de proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2017). Os resultados apresentados na **Tabela 9** revelam que a exatidão variou no intervalo de 97,306 a 98,909 %, com média de recuperação de 98,330 %, demonstrando adequada exatidão em relação ao valor esperado, de 100%.

Tabela 9 - Valores experimentais médios de porcentagem de recuperação obtidos para o teste de exatidão do flubendazol (FZB).

Concentração inicial de FZB (µg/ml)	Quantidade conhecida adicionada (µg/ml)	Concentração de FZB obtida (µg/ml)	Desvio padrão	DPR (%)	Recuperação (%)	Média da recuperação (%)
20	16	35,030	0,530	1,513	97,306	
20	20	39,510	0,360	0,911	98,775	98,330
20	24	43,520	0,560	1,287	98,909	

5.1.5 Robustez

A avaliação de robustez foi determinada pela variação do fabricante do dimetilsulfóxido (Fmaia, Brasil e Sigma-Aldrich, França). A absorbância média e o desvio padrão relativo (DPR %) estão apresentados na **Tabela 10**. Avaliando os resultados, concluímos que a alteração do fabricante de dimetilsulfóxido não afeta significativamente a absorbância do flubendazol. O DPR (%) foi menor do que 5 %, demonstrando que o método é robusto.

Tabela 10 - Resultados do estudo de robustez do método analítico para quantificação de flubendazol.

Concentração teórica de flubendazol (µg/ml)	Concentração de flubendazol (µg/ml) fabricante 1	Concentração de flubendazol (µg/ml) fabricante 2	Média (µg/ml)	Desvio padrão	DPR (%)
20	20,092	19,592	19,842	0,354	1,760

5.2 Caracterização da distribuição do tamanho de partícula do flubendazol micronizado por espalhamento de luz *laser* (LLS)

Para a avaliação da distribuição do tamanho das partículas do flubendazol micronizado, foi empregado o método espalhamento de luz *laser* (LLS) e foram mensurados o diâmetro médio ponderado pelo volume (D[4,3]), o diâmetro médio ponderado pela superfície (D[3,2]), o d(0,1), o d(0,5) (mediana), o d(0,9) e o índice de polidispersividade (span).

O diâmetro médio ponderado pelo volume, ou a média de DeBrouckere (**Equação 5**), constitui um parâmetro para avaliação do tamanho das partículas, no qual o diâmetro médio é avaliado pelo volume das partículas consideradas esféricas, sendo mais sensível a partículas grandes existentes na amostragem. **A Equação 5** representa o diâmetro médio ponderado pelo volume (MERKUS, 2009).

$$D[4,3] = \frac{(\sum niDi^4)}{(\sum niDi^3)} \quad \text{(Equação 5)}$$

No qual ni significa a frequência das partículas e Di o diâmetro respectivo.

O diâmetro médio ponderado pela superfície (D[3,2]), ou o diâmetro médio de *Sauter*, avalia a proporção de finos existentes na amostra, sendo representado pela **Equação 6**.

$$D[3,2] = \frac{(\sum niDi^3)}{(\sum niDi^2)} \quad \text{(Equação 6)}$$

Os valores d(0,1), d(0,5) e d(0,9) indicam que 10%, 50% e 90% da população de partículas, respectivamente, estão abaixo destes valores. A **Tabela 11** apresenta a distribuição granulométrica do flubendazol, confirmando que o mesmo se encontra na forma micronizada.

Tabela 11 - Valores de d(0,1), d(0,5) d(0,9), D[3,2], D[4,3] e polidispersividade (span) do flubendazol micronizado.

d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)	D[3,2]	D[4,3]	span
1,377 ± 0,03	2,866 ± 0,09	10,381 ± 2,41	2,583 ± 0,08	8,506 ± 2,03	3,133 ± 0,77

5.3 Ensaios exploratórios da nanossuspensão de flubendazol empregando o método microfluidização

5.3.1 Avaliação do tempo de moagem e do desempenho dos tensoativos polissorbato 80, poloxamer 188 e D-α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato

A microfluidização é uma técnica utilizada para redução do tamanho de partícula de princípios ativos de baixa solubilidade, sendo de fácil escalonamento e baixo risco de contaminação. Neste método, há a redução drástica do tamanho de partícula do fármaco em suspensão, dependente das forças de impacto, cisalhamento e cavitação, nas câmaras do microfluidizador. O tempo de moagem é uma variável crítica deste processo, assim como a temperatura do produto, a pressão de microfluidizador e as características da formulação, como o tipo e a concentração do estabilizante e a concentração do fármaco na suspensão (VERMA et al., 2009).

Para determinação do tempo total de moagem de duas horas no microfluidizador (**Figura 18**) com câmara de interação tipo F12Y (75 µm), foi realizado um estudo exploratório com três diferentes tensoativos – polissorbato 80 (F1), poloxamer 188 (F2) e D-α tocoferol

polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) (F3) – e foi avaliada a distribuição do tamanho de partícula nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, utilizando a técnica espalhamento de luz *laser* (LLS) (Tabela 12, Tabela 13, Figura 19 e Figura 20). O diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) também foi avaliado, por intensidade, após 120 minutos de moagem (Tabela 14). A temperatura de todos os ensaios foi mantida em $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, devido à inexistência de controles no microfluidizador que possibilitassem ajustes diferentes. A pressão adotada foi de 35.000 psi, uma vez que, quanto maior a pressão, mais eficiente é a quebra das partículas.

Figura 18 – Foto do micronizador Microfluidics®



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 12 - Valores de d(0,5) em micras das formulações de flubendazol mensurados pela técnica espalhamento de luz *laser* (LLS).

Tempo (min.)	F1 d (0,5) μm	F2 d (0,5) μm	F3 d (0,5) μm
0	2,866 \pm 0,088	2,866 \pm 0,088	2,866 \pm 0,088
15	0,804 \pm 0,073	1,002 \pm 0,005	0,810 \pm 0,073
30	0,464 \pm 0,025	0,558 \pm 0,086	0,468 \pm 0,004
60	0,442 \pm 0,013	0,351 \pm 0,007	0,336 \pm 0,001
90	0,335 \pm 0,012	0,345 \pm 0,034	0,291 \pm 0,001
120	0,289 \pm 0,001	0,308 \pm 0,009	0,258 \pm 0,005

Tabela 13 - Valores de d(0,9) em micras das formulações de flubendazol mensurados pela técnica espalhamento de luz *laser* (LLS).

Tempo (min.)	F1 d (0,9) μm	F2 d (0,9) μm	F3 d (0,9) μm
0	10,381 \pm 2,408	10,381 \pm 2,408	10,381 \pm 2,408
15	2,984 \pm 0,286	2,610 \pm 0,009	2,803 \pm 0,059
30	3,211 \pm 0,621	2,015 \pm 0,183	1,970 \pm 0,008
60	1,992 \pm 0,011	1,385 \pm 0,029	1,365 \pm 0,004
90	1,592 \pm 0,344	1,424 \pm 0,252	1,043 \pm 0,014
120	1,139 \pm 0,003	1,398 \pm 0,150	0,822 \pm 0,022

Figura 19 - Avaliação da redução do tamanho médio das partículas (d(0,5)) pela técnica espalhamento de luz *laser* (LLS).

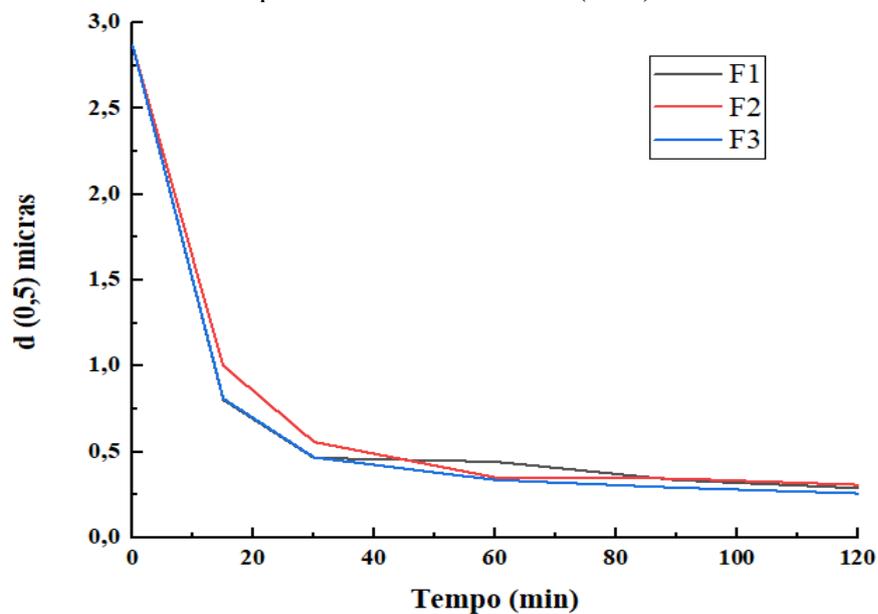
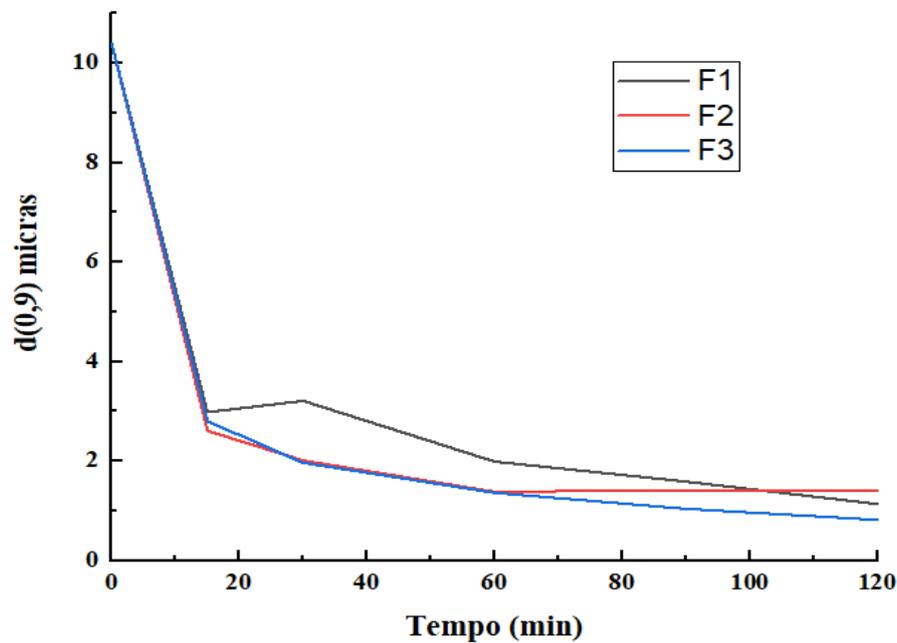


Figura 20 - Avaliação da redução do $d(0,9)$ das partículas pela técnica de espalhamento de luz *laser* (LLS).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 14 - Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em intensidade e índice de polidispersividade (IP) das formulações F1, F2 e F3 de nanocristais de flubendazol por espalhamento de luz dinâmica (DLS).

Testes	DHM (nm)	DP	IP	DP
F1	336	5,100	0,249	0,008
F2	613	6,600	0,336	0,017
F3	254	3,000	0,300	0,004

DP = desvio padrão

De acordo com os dados apresentados, conclui-se que a formulação F3, estabilizada com $d\text{-}\alpha$ tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS), apresentou o menor diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em intensidade quando comparada com as demais formulações, estabilizadas com polissorbato 80 (F1) e polaxamer 188 (F2).

Em sequência, temos que considerar o índice de polidispersão, que nada mais é do que o valor que indica o quanto a dispersão está homogênea. Quanto maior o índice, mais

variabilidade existe no tamanho das partículas presentes na dispersão. Se o índice de polidispersão encontra-se entre 0 e 0,05, temos uma população monodispersa, pois significa que temos uma população quase 100% homogênea com partículas todas do mesmo tamanho. Entre 0,08 e 0,3, temos uma população com baixa polidispersidade, e entre 0,3 e 0,6, uma população com média polidispersidade. Para índices acima de 0,7, considera-se a população como sendo muito polidispersa. Na prática, quanto menor o índice, melhor; no entanto, índices de até a média de 0,3 são considerados ainda aceitáveis para que se prossigam com os experimentos.

O TPGS é um surfactante anfifílico, podendo adsorver na superfície das partículas do princípio-ativo hidrofóbico por meio de interações eletrostáticas e reduzir significativamente a tensão superficial das partículas, com efeito de estabilização estérica, prevenindo a agregação. Para estabilização e redução do diâmetro hidrodinâmico médio de uma nanossuspensão de celecoxibe produzida por homogeneização à alta pressão, o TPGS também apresentou resultados superiores quando comparado com outros estabilizantes – como hidroxipropilmetilcelulose E15, polaxamer 188, povidona K30, lauril sulfato de sódio, hidroxipropilmetilcelulose E15/lauril sulfato de sódio, polaxamer 188/lauril sulfato de sódio, povidona K30/ lauril sulfato de sódio, TPGS/lauril sulfato de sódio – resultando no aumento das taxas de dissolução, absorção intestinal e biodisponibilidade oral (HE et al., 2017).

5.3.2 Avaliação da estabilidade físico-química das nanossuspensões de flubendazol

O tipo de estabilizante, o tamanho das nanopartículas e a concentração dos componentes podem afetar a qualidade e a estabilidade físico-química de uma nanossuspensão. Geralmente, suspensões homogêneas coloidais não possuem tendência de separação, pois partículas em submicrons sedimentam-se vagarosamente e são influenciadas pelos efeitos de difusão e convecção. Na difusão, as moléculas movimentam-se constantemente de uma região de maior concentração para uma de menor concentração. Na convecção, o movimento de um fluido é caracterizado pelo transporte de massa de materiais com diferentes densidades (ABDELWAHED et al., 2006).

Essa motilidade térmica das partículas coloidais é conhecida como movimento browniano. As partículas suspensas permanecem em movimentação aleatória contínua, de uma

região de maior concentração para uma região de menor concentração, por meio do choque de uma partícula com outra, com outras moléculas suspensas no meio ou até mesmo com a parede do próprio frasco de armazenamento. A força gravitacional se opõe ao movimento browniano e pode desestabilizar a suspensão, resultando na sedimentação. A velocidade de sedimentação está diretamente relacionada ao tamanho de uma partícula (ABDELWAHED et al., 2006).

A escolha de um tensoativo ideal que promova maior estabilização da suspensão é fundamental para garantir a estabilidade físico-química, evitando a agregação das partículas com o decorrer do tempo. A porção hidrofóbica da estrutura molecular dos estabilizantes deve adsorver-se ao fármaco da nanossuspensão. Polímeros resultam em estabilização estérica de uma suspensão, pois a partícula é revestida com uma barreira mecânica que impede sua aproximação. Compostos com cargas são responsáveis pela estabilização eletrostática na qual correntes formadas na superfície das moléculas adsorvidas geram movimento térmico contínuo, evitando a coalescência via forças entrópicas repulsivas (WANG et al., 2017).

Outro fenômeno que pode contribuir para agregação das partículas é o amadurecimento de Ostwald, no qual as partículas crescem devido a redissolução das partículas finas, provenientes da transferência de massa. Para reduzir a agregação, os fármacos formulados devem ser pouco solúveis no meio disperso e a distribuição de tamanho de partícula deve ser o mais uniforme possível, a fim de evitar diferenças na solubilidade de saturação de cristais de diferentes tamanhos (WANG et al., 2017).

Uma nanossuspensão aquosa de everolimo, preparada pela técnica de homogeneização à alta pressão, apresentou redução considerável do tamanho de partícula e baixa polidispersão com a utilização do poloxamer P407 como estabilizante, quando comparada com formulações que utilizaram lauril sulfato de sódio, poloxamer 188, polissorbato 60 e polissorbato 80. Segundo o autor do estudo, o baixo peso molecular do tensoativo lauril sulfato de sódio, a presença de cargas negativas na sua parte polar e a maior solubilidade em água tornaram a nanossuspensão mais propensa ao amadurecimento de Ostwald, ocasionando a agregação das partículas menores. Já entre os estabilizantes estéricos polissorbato 60, polissorbato 80, poloxamer 188 e P407, justificou-se o melhor desempenho do poloxamer P407, pelo fato de este estabilizante ser um polímero com o maior peso molecular, portanto, mais adsorvido na superfície da partícula, apresentando melhor estabilização do sistema (SEOK et al., 2016).

Contudo, nem sempre um estabilizante de maior peso molecular será o que proporcionará melhor estabilidade na nanossuspensão, pois o insumo farmacêutico ativo deve

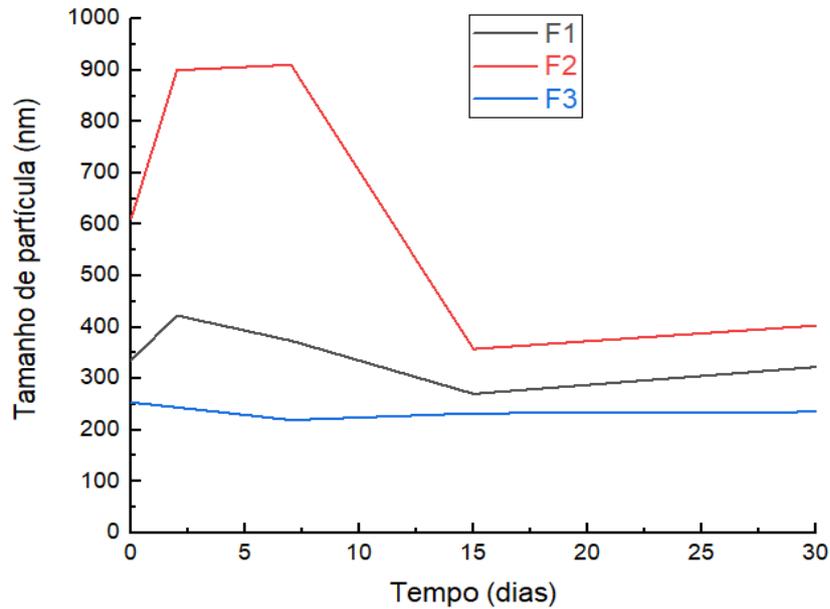
possuir energia de superfície similar ao estabilizante utilizado. Em um estudo avaliando onze fármacos distintos, formulados com cinco diferentes estabilizantes (hidroxipropilcelulose, povidona, poloxamer 188, poloxamer 407 e polietilenoglicol – PEG), constatou-se que o poloxamer 188 foi o que apresentou melhor desempenho, embora não fosse o de maior peso molecular (LEE et al., 2000).

Com a finalidade de avaliar a influência dos tensoativos d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (peso molecular (PM) de 574,843 g/mol), do polaxamer 188 (PM de 102,133 g/mol) e do polissorbato 80 (PM de 604,822 g/mol) na estabilidade das nanossuspensões (testes F1, F2 e F3), foi realizado o acompanhamento do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas nos tempos inicial, 2, 7, 15 e 30 dias após o preparo, sendo as amostras armazenadas sob temperatura e umidade controladas ($30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR). A **Tabela 15** e a **Figura 21** apresentam os resultados obtidos.

Tabela 15 - Avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), do desvio padrão (DP) e do índice de polidispersibilidade (IP) das nanossuspensões de flubendazol armazenadas por período de 30 dias, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS).

Tempo (dias)	F1				F2				F3			
	DHM (nm)	DP	IP	DP	DHM (nm)	DP	IP	DP	DHM (nm)	DP	IP	DP
0	336,1	5,1	0,249	0,008	613,0	6,6	0,336	0,017	253,9	3,0	0,363	0,004
2	422,8	3,9	0,386	0,035	900,2	149,4	0,287	0,039	244,2	9,8	0,294	0,047
7	373,9	3,2	0,228	0,012	910,7	111,8	0,335	0,026	219,6	9,5	0,244	0,014
15	270,6	2,8	0,227	0,008	357,6	59,5	0,303	0,077	232,5	3,7	0,317	0,016
30	322,7	5,6	0,255	0,027	403,2	81,1	0,271	0,068	235,5	1,9	0,263	0,029

Figura 21 - Avaliação gráfica do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das nanossuspensões de flubendazol por período de 30 dias, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS).



Fonte: Elaborado pelo autor

Avaliando os resultados obtidos, conclui-se que o teste F3, nanossuspensão estabilizada com d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS), apresentou melhor estabilidade quando comparado com o teste F2 (nanossuspensão estabilizada com poloxamer 188 – o estabilizante de menor peso molecular), uma vez que foi possível observar aumento considerável do diâmetro hidrodinâmico médio do teste F2 no período de 2 a 7 dias de estudo, sendo decorrente da aglomeração das partículas, demonstrando menor eficácia na estabilização da nanossuspensão de flubendazol.

Referente ao teste F1 (estabilizado com polissorbato 80), apesar de apresentar resultados satisfatórios na estabilização da nanossuspensão durante o período do estudo, ele demonstrou maior diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) quando comparado com o teste F3.

5.3.3 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*)

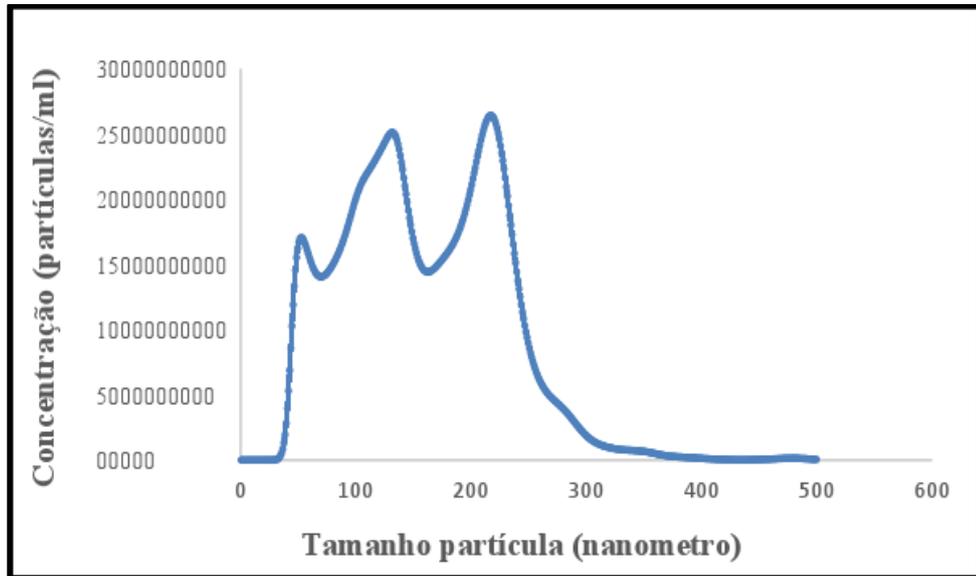
A análise de rastreamento de nanopartículas é uma técnica que utiliza um sistema de dispersão de luz para avaliação do tamanho das partículas em tempo real, no qual se destaca na apresentação de tamanho baseada em número e estima-se a concentração de partículas presente em uma formulação. A técnica NTA identifica a partícula individualmente, de forma direta, e acompanha o seu movimento browniano, no qual o coeficiente de difusão é obtido e utilizado para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico. Em uma câmara de amostra que comporta o mínimo de 300 µl de volume, o feixe de *laser* ilumina as partículas e detecta o movimento de forma individual e simultânea, utilizando uma câmara de alta resolução para capturar as imagens e gerar o perfil de distribuição de tamanho de partícula e as variações ao longo do tempo. A metodologia partícula a partícula produz distribuição de tamanho mais detalhada e com maior resolução quando comparada com a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS) (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

A **Tabela 16** e a **Figura 22** apresentam os resultados de tamanho de partícula obtidos no teste F3, referente à nanossuspensão estabilizada com d-α tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS). A **Figura 23** demonstra a captura de tela da análise de vídeo realizada.

Tabela 16 - Avaliação do tamanho de partícula (em nanômetros) da nanossuspensão de flubendazol utilizando a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA).

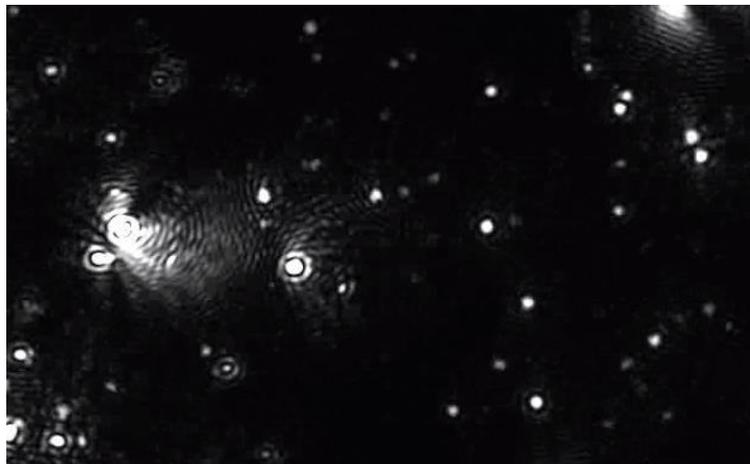
Tamanho de partícula (nm)	F3
Média	158,6 ± 2,7
Moda	157,5 ± 17,6
d (0,1)	68,8 ± 2,8
d (0,5)	151,8 ± 4,1
d (0,9)	242,6 ± 6,6

Figura 22 - Avaliação da distribuição de tamanho de partícula (em nm) da nanossuspensão de flubendazol (F3) utilizando a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 23 - Captura de tela da análise de vídeo obtido pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) da nanossuspensão de flubendazol (teste F3).



Fonte: Elaborado pelo autor

O NTA pode ser utilizado ortogonalmente com a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS), no entanto, é possível observar diferenças no tamanho hidrodinâmico médio entre as técnicas, uma vez que o DLS tende a deslocar os resultados de DHM para valores mais altos (MEHRABI et al., 2017). Essa tendência pode ser explicada devido à contribuição de

algumas partículas grandes ou agregados de amostras polidispersas. A vantagem da técnica de análise de rastreamento de nanopartículas é a alta resolução de picos de partículas menores independentemente da presença de partículas maiores. A **Tabela 17** apresenta o comparativo dos resultados de tamanho de partícula obtidos por técnicas ortogonais.

Tabela 17 - Comparativo dos resultados de tamanho de partícula (em nm) da nanossuspensão de flubendazol utilizando diferentes técnicas.

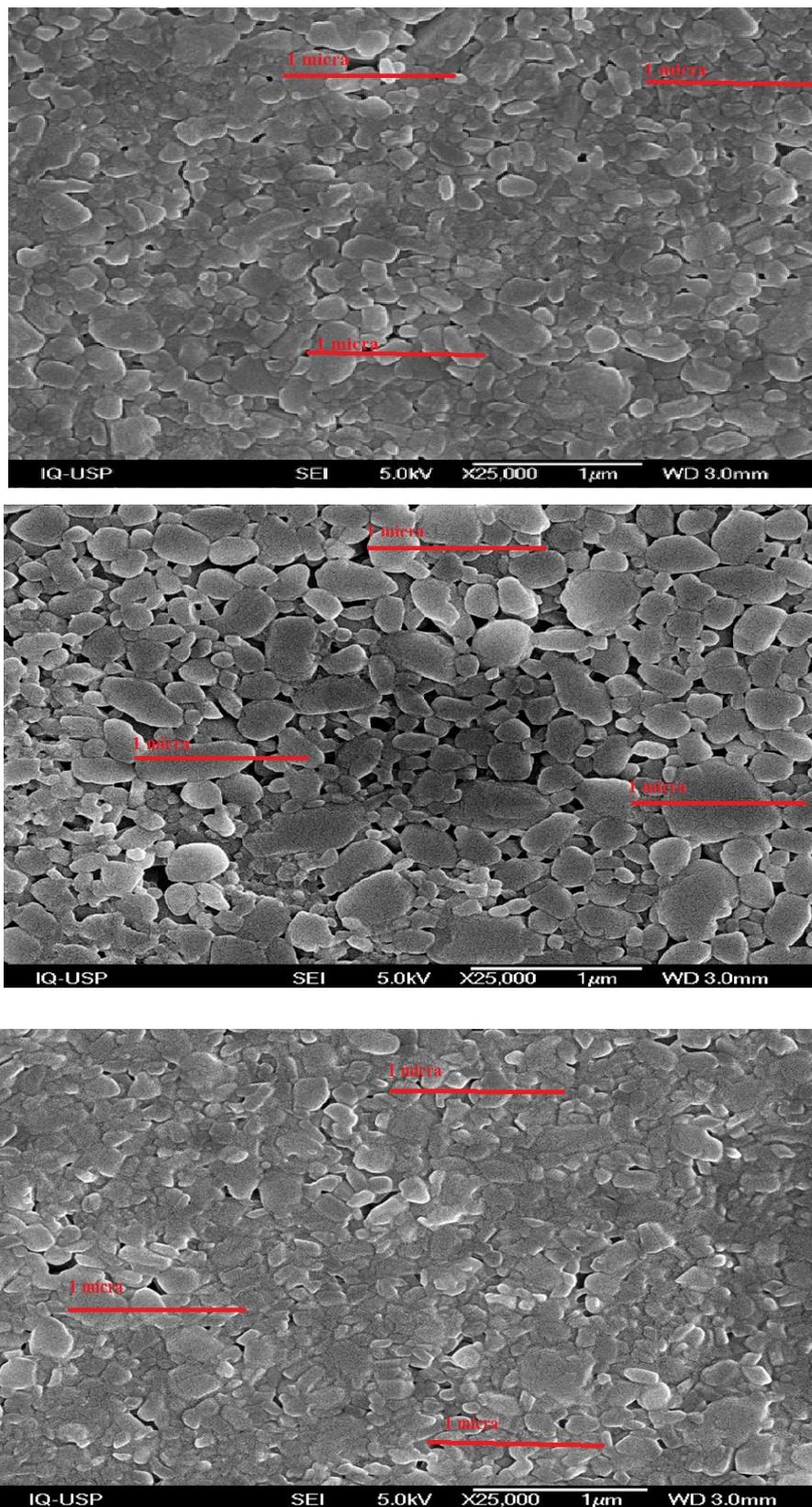
Técnica utilizada	Resultados do teste F3 (nm)	
Rastreamento de nanopartículas (NTA)	média	158,6 ± 2,7
	d (0,1)	68,8 ± 2,8
	d (0,5)	151,8 ± 4,1
	d (0,9)	242,6 ± 6,6
Espalhamento de luz dinâmica (DLS)	DHM	253,9 ± 3,0
Espalhamento de luz laser (LLS)	d (0,5)	258,0 ± 0,005
	d (0,9)	822,0 ± 0,022

Foi possível observar o deslocamento do resultado do tamanho médio das partículas para maiores valores na técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e espalhamento de luz *laser* (LLS) quando comparado com os resultados obtidos pela técnica NTA. Pela determinação do tamanho de partícula através da técnica NTA, obtivemos, com maior precisão, o tamanho de cada partícula obtida no teste F3, confirmando a expressiva redução pela técnica de microfluidização.

5.3.4 Análise morfológica e tamanho do cristal empregando a microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A **Figura 24** apresenta as imagens do nanocristal de flubendazol estabilizado com polissorbato 80 (F1), poloxamer 188 (F2) e TPGS (F3), respectivamente. Em todas as imagens, é possível visualizar partículas menores que 1 µm, comprovando a eficiência do processo de microfluidização. Comparando-se os três estabilizantes, observa-se que a imagem referente à formulação F2 apresenta partículas com diâmetro próximo a 1 µm e número menor de partículas/área. Tal dado está em acordo com os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio (nm) já constatado no estudo de estabilidade da nanossuspensão (**Tabela 15**).

Figura 24 - Análise morfológica e tamanho do cristal das formulações F1, F2 e F3 empregando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 Caracterização térmica e estudo de interação entre o flubendazol e os excipientes

O estudo da temperatura de decomposição térmica do flubendazol e dos excipientes é importante para prever possíveis degradações durante a microfluidização, pois a alta pressão dentro da câmara de interação durante o processo de redução do tamanho das partículas resulta no aquecimento da suspensão. Estima-se que a cada 1.000 psi de pressão aplicada na água há o aumento de 1 a 1,7 °C (MICROFLUIDICS, 2018). Embora a microfluidização promova aumento da temperatura do material, o resfriamento pode ser realizado rapidamente após sua passagem pela câmara de interação, uma vez que o tempo de residência dura, em média, de 1 a 5 milissegundos (MICROFLUIDICS, 2018).

A **Tabela 18** apresenta os dados das curvas de TG/DTG dos componentes individuais, a temperatura de início extrapolado do evento térmico (T_{onset}) e a perda de massa após aquecimento até a temperatura de 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. O T_{onset} dos materiais encontra-se na faixa de 225 a 420 °C, demonstrando que nenhum deles é susceptível à degradação pelo calor gerado durante a microfluidização, uma vez que, no decorrer do processo, o produto não atinge tais temperaturas.

Tabela 18 - T_{onset} (°C) e perda de massa (%) do flubendazol, polissorbato 80, poloxamer 188, TPGS e manitol.

Material	T_{onset} degradação (°C)	Perda de massa (%)
Flubendazol (1º. evento)	225	12,3
Flubendazol (2º. evento)	319	13,6
Flubendazol (3º. evento)	420	7,4
Manitol	332	99,9
Polissorbato 80	393	96,2
Poloxamer 188	379	99,4
TPGS	383	99,5

As técnicas termoanalíticas também têm sido utilizadas para prever possíveis incompatibilidades entre os componentes de uma formulação. A análise é realizada comparando as curvas termogravimétricas das substâncias puras com a mistura e, no caso da ausência de incompatibilidade, a curva da mistura mostra-se como um somatório das curvas

relativas aos componentes individuais puros. Alterações nos perfis termoanalíticos, como o deslocamento ou o desaparecimento de picos no DSC e o deslocamento de eventos de perda de massa no TG podem caracterizar interação entre as espécies ou decomposição proveniente do processo (STORPIRTIS et al., 2009).

Com a finalidade de avaliar a existência de interações entre os excipientes utilizados nos estudos exploratórios e o flubendazol e de alterações físico-químicas provenientes do processo de microfluidização e liofilização, foram realizados experimentos por TG/DTG e DSC. A **Tabela 19** relata a variação de temperatura dos eventos, a temperatura de início de decomposição térmica (T_{onset}) e a perda de massa (%) dos materiais individuais, dos nanocristais obtidos nos estudos exploratórios, estabilizados com polissorbato 80 (F1), poloxamer 188 (F2) e TPGS (F3) – secos sob nitrogênio – e do nanocristal liofilizado estabilizado com TPGS e manitol. As **Figuras 25 a 28** apresentam o comparativo das curvas TG/DTG desses materiais, aquecidos até 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. O flubendazol apresenta perda de massa de 0,2 %, referente à umidade superficial e três estágios de degradação: o primeiro entre 100 e 250 °C ($T_{\text{onset}} = 224$ °C, $\Delta m = 11,8$ %); o segundo entre 250 e 380 °C ($T_{\text{onset}} = 317$ °C, $\Delta m = 13,9$ %) e o terceiro com início em 380 °C, com perda de massa total de 33,3 % até a temperatura de 600 °C. Nos estudos de Al-Nahary e colaboradores (2013), o flubendazol também apresentou três estágios de degradação térmica: o primeiro estágio (entre 100 e 275 °C, $\Delta m = 14,66\%$) referente à perda de CO₂, o segundo estágio (275 a 380 °C, $\Delta m = 13,56\%$) referente à perda de CHNCH₃ e o terceiro estágio (380 a 950 °C, $\Delta m = 72,52\%$ de massa) referente à perda de C₁₃H₈FN₂₀; a identificação da massa perdida foi realizada após os autores correlacionarem a curva termogravimétrica com o espectro de massa e o cálculo molecular orbital do flubendazol (AL-NAHARY et al., 2013). Os tensoativos polissorbato 80, poloxamer 188 e TPGS apresentaram apenas uma etapa de perda de massa, com início extrapolado (T_{onset}) em 393 °C, 378 °C e 381 °C, respectivamente.

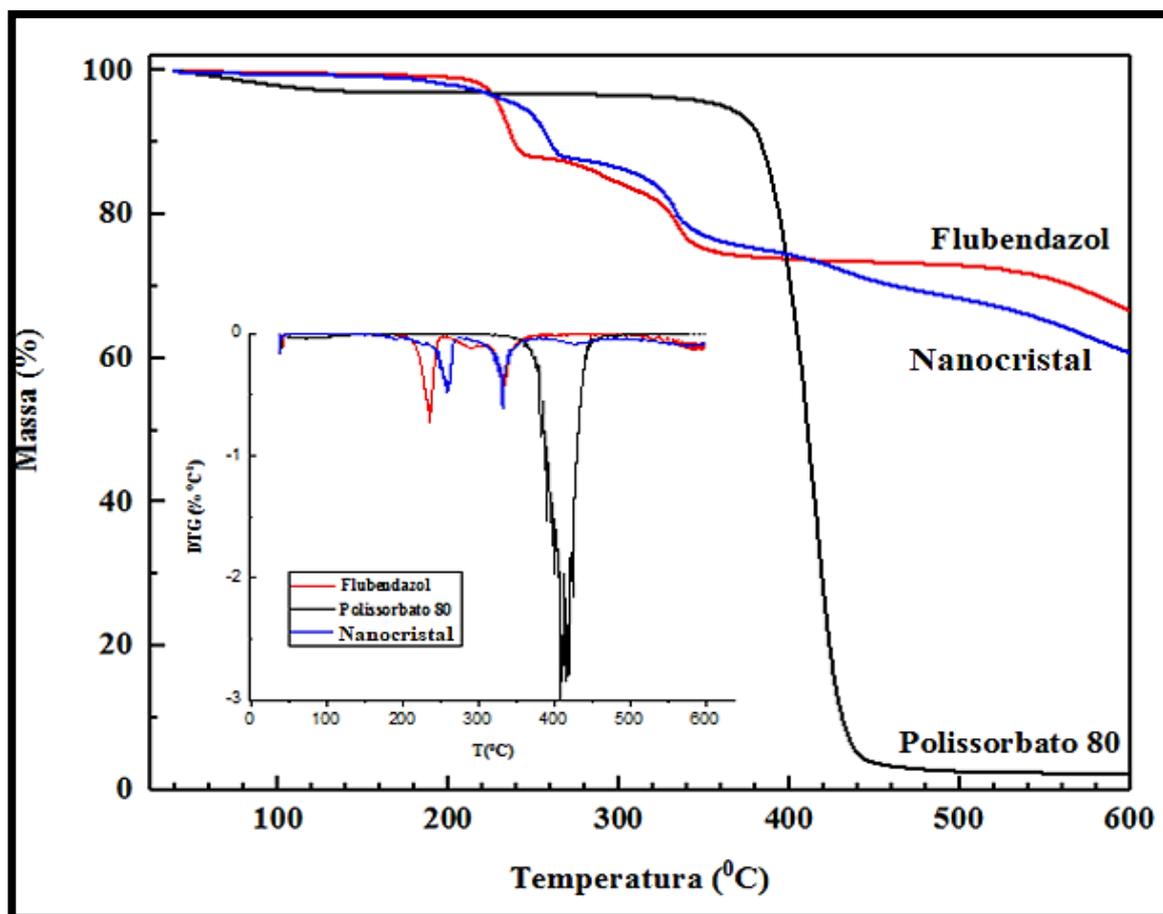
As curvas termogravimétricas referentes aos nanocristais preservaram os três eventos de perda de massa característicos do flubendazol. A curva TG/DTG do nanocristal estabilizado com polissorbato 80 (**Figura 25**) apresentou quatro perdas de massas: a primeira, de 0,5 %, associada à perda de água superficial, a segunda e a terceira, de 11,7% e 12,6%, correspondentes à decomposição térmica do flubendazol, e a quarta, de 14,5%, correspondente à decomposição térmica do flubendazol somado com o polissorbato 80. A curva TG/DTG do nanocristal estabilizado com o poloxamer 188 (**Figura 26**) apresentou quatro perdas de massas: a primeira, de 3,7 %, associada à perda de água superficial, a segunda e a terceira, de 10,3% e 11,1%,

correspondentes à decomposição térmica do flubendazol, e a quarta, de 12,1%, correspondente à decomposição térmica do flubendazol somado com o poloxamer 188. A curva TG/DTG do nanocristal estabilizado com TPGS (**Figura 27**) apresentou quatro perdas de massas: a primeira, de 0,8 %, associada à perda de água superficial, a segunda e a terceira, de 11,1% e 14,0%, correspondentes à decomposição térmica do flubendazol, e a quarta, de 14,3%, correspondente à decomposição térmica do flubendazol somado com o TPGS. No nanocristal liofilizado estabilizado com TPGS e manitol (**Figura 28**), há uma perda de massa acentuada no segundo evento térmico, sendo possivelmente atribuída à degradação do manitol (KUMARESAN; VELRAJ; INIYAN, 2011); porém, ainda é possível visualizar os três eventos de perda de massa característicos do flubendazol. Em todas as curvas, é possível verificar o adiantamento do início da degradação térmica do flubendazol, o que possivelmente decorre do aumento da área superficial em função da redução de tamanho de partícula.

Tabela 19 - Valores de variação de temperatura dos eventos (ΔT , °C), T_{onset} de degradação (°C) e perda de massa (%) dos excipientes e das nanossuspensões de nanocristal liofilizado.

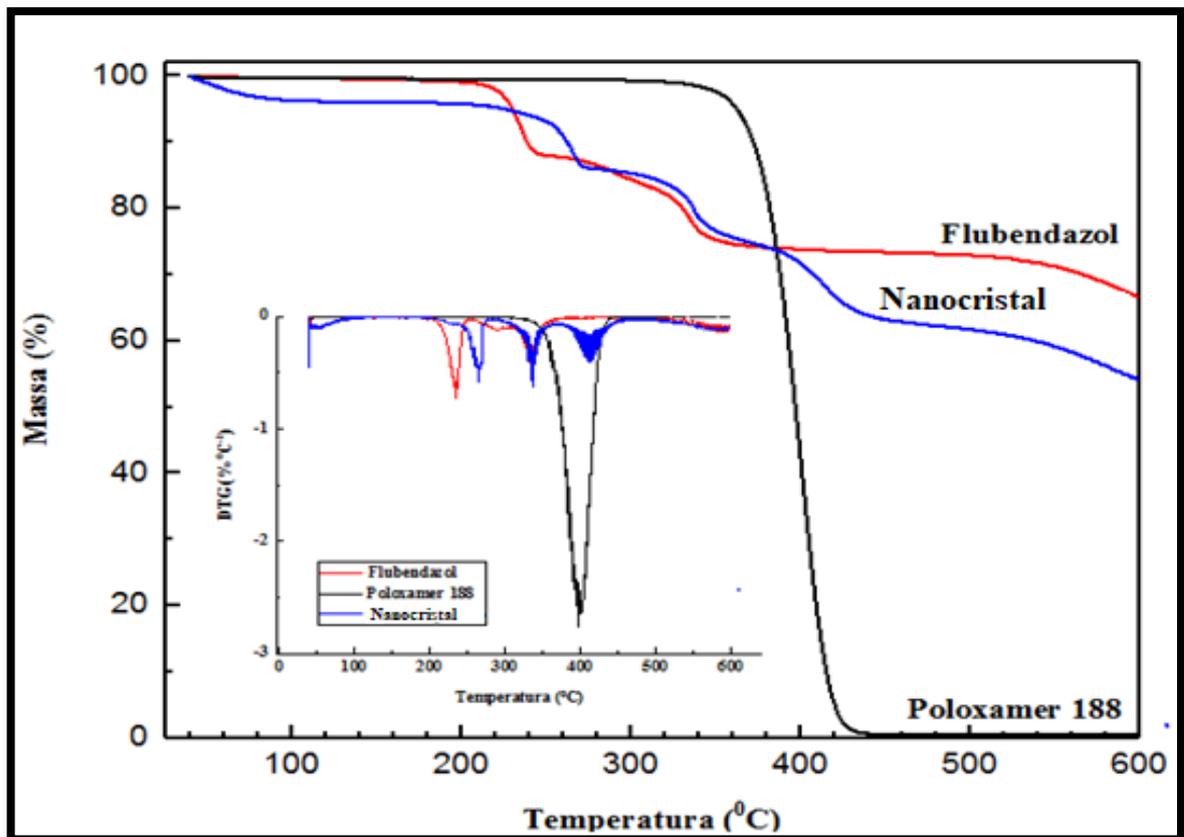
Material	ΔT (°C)	T_{onset} degradação (°C)	Perda de massa (%)
Flubendazol puro	40 - 100	---	0,2
	100 - 250	224	11,8
	250 - 380	317	13,9
	380 - 600	---	7,4
Polissorbato 80	40 - 100	---	2,1
	100 - 500	393	95,4
Nanocristal estabilizado com polissorbato 80	40 - 100	---	0,5
	100 - 270	240	11,7
	270 - 380	322	12,6
	380 - 600	----	14,5
Poloxamer 188	40 - 100	----	0,3
	100 - 440	378	99,1
Nanocristal estabilizado com poloxamer 188	40 - 100	---	3,7
	100 - 280	251	10,3
	280 - 370	328	11,1
	370 - 460	398	12,1
	460 - 600	543	8,7
TPGS	40 - 100	---	0,4
	100 - 440	381	99,0
Nanocristal estabilizado com TPGS	40 - 100	---	0,8
	100 - 280	256	11,1
	280 - 380	324	14,0
Manitol	380 - 600	---	14,3
	40 - 100	---	0,2
Nanocristal estabilizado com TPGS e manitol (liofilizado)	100 - 400	330	99,8
	40 - 100	---	0,2
	100 - 230	202	9,7
	230 - 370	289	57,8
	370 - 600	---	8,1

Figura 25 - Curvas TG/DTG de flubendazol, polissorbato 80 e nanocrystal estabilizado com polissorbato 80 sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 ml/min) e a 10 °C/min.



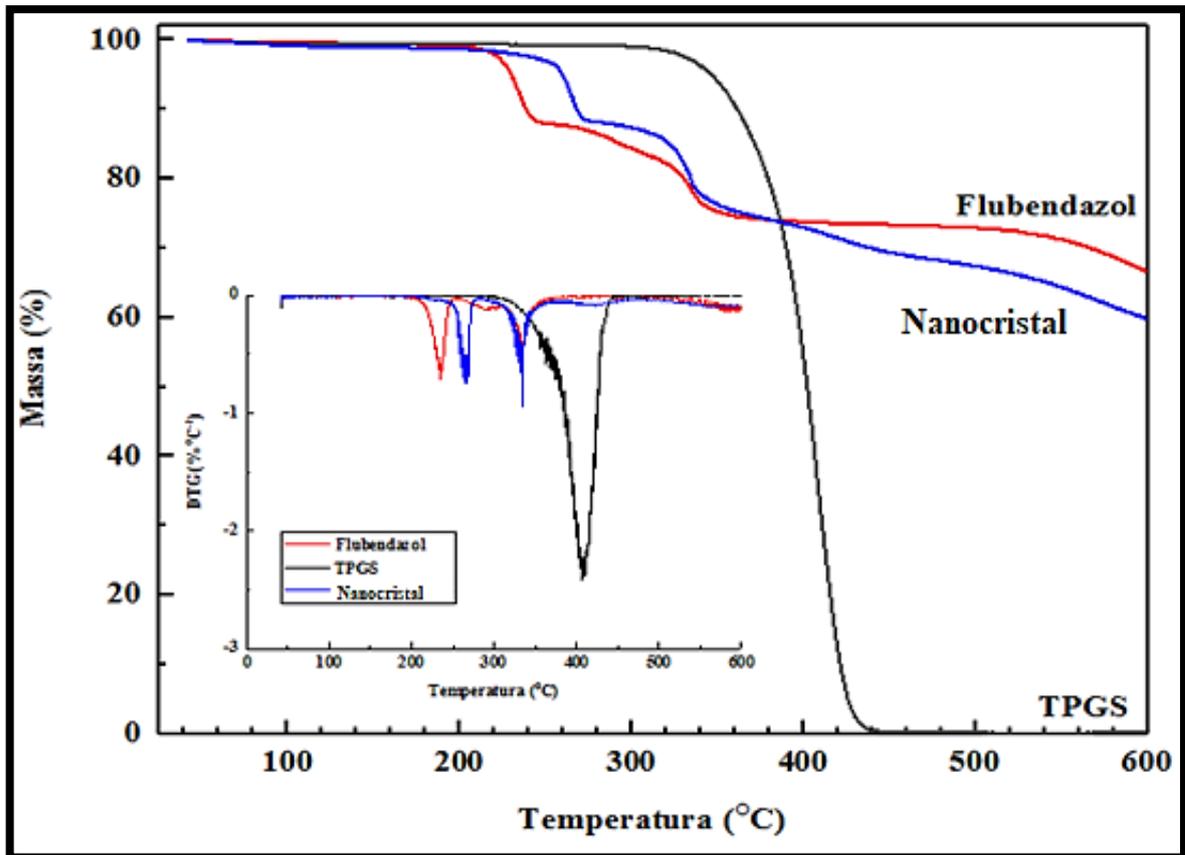
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 26 - Curvas TG/DTG de flubendazol, poloxamer 188 e nanocrystal estabilizado com poloxamer 188 sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 ml/min) e a 10 °C/min.



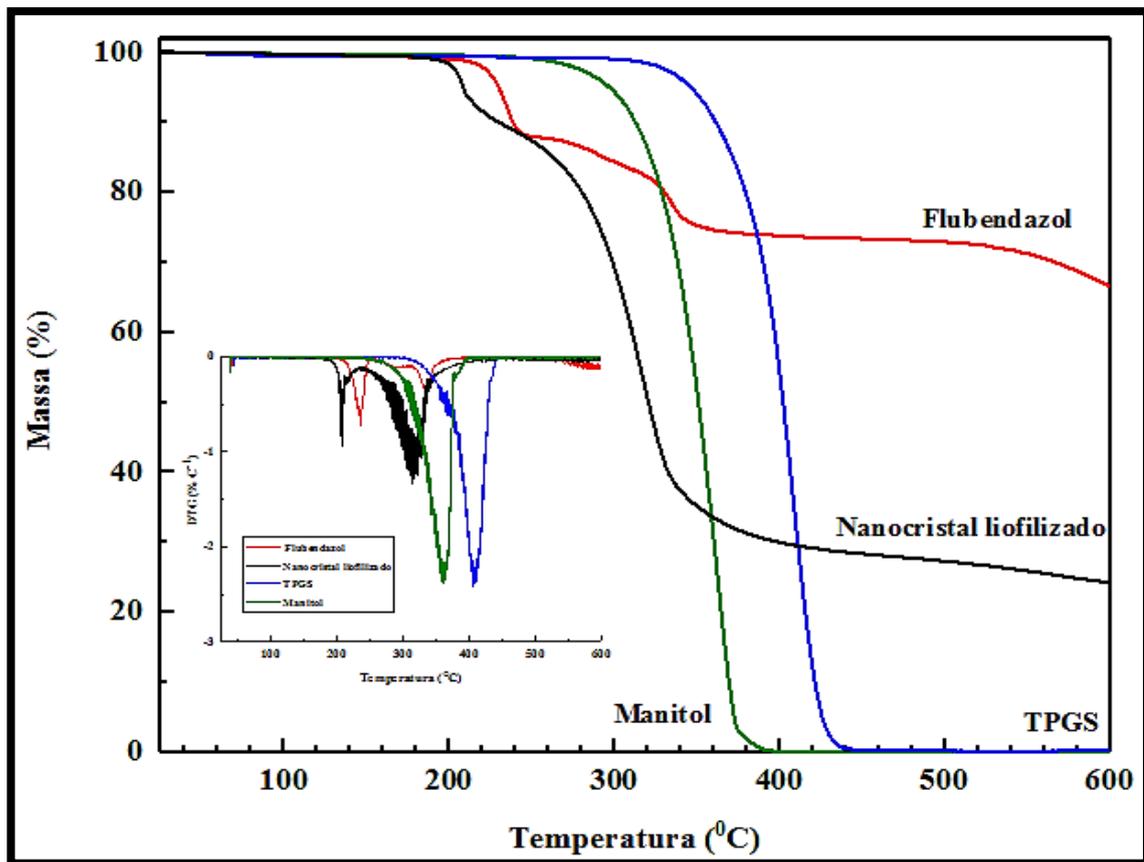
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 27 - Curvas TG/DTG de flubendazol, TPGS e nanocristal estabilizado com TPGS sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 ml/min) e a 10 °C/min.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 28 - Curvas TG/DTG de flubendazol, TPGS, manitol e o nanocristal estabilizado com TPGS e manitol (liofilizado) sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 ml/min) e a 10 °C/min.

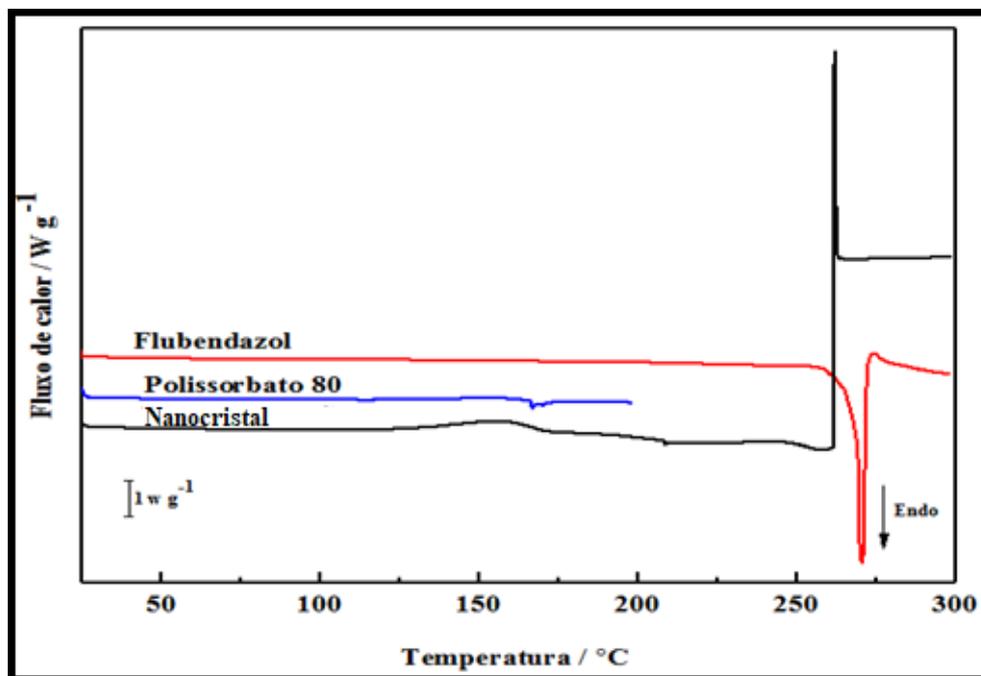


Fonte: Elaborado pelo autor

Para complementar o estudo térmico, foram realizados ensaios de DSC das espécies individuais e dos nanocristais (**Figuras 29 a 32**). As curvas DSC do flubendazol apresenta endoterma de fusão, seguida do início da decomposição térmica ($T_{\text{onset}} = 269^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{pico}} = 271^{\circ}\text{C}$). Para a curva DSC do nanocristal estabilizado com o polissorbato 80 (**Figura 29**), é possível observar que os eventos foram preservados, com leve variação da linha de base no sentido exotérmico, na temperatura aproximada de 150°C , seguido por variação no sentido endotérmico, que antecede aos eventos de decomposição térmica característicos do flubendazol. Tais eventos podem estar relacionados com a recristalização de pequena fração amorfa do FBZ e com os eventos de decomposição térmica do estabilizante. A presença de um pico exotérmico característico poloxamer 188 (**Figura 30**), em torno de 160°C , indica que a estrutura do polímero foi preservada, sem interações significativas com o fármaco. Nas **Figuras 29, 30 e 31**, é possível observar o deslocamento de pico característico da fusão do flubendazol. Esse adiantamento da temperatura de fusão é esperado e ocorre em função da significativa

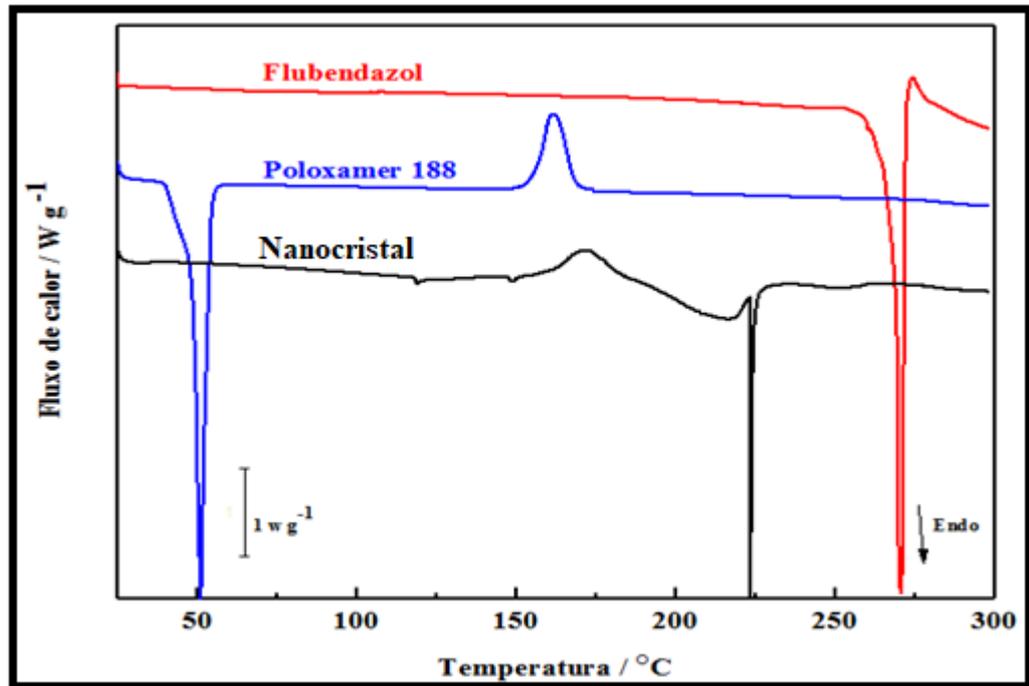
redução do tamanho de partícula (DWYER et al., 2015). A curva DSC do TPGS (**Figura 31**) apresenta um primeiro evento endotérmico com T_{pico} de 33,85 °C, T_{onset} de 30,17 °C e ΔH 207,74 J/g – que é característico da fusão desse tensoativo. Shetia e colaboradores (2002) também encontraram um único evento endotérmico (T_{pico} 39,7 °C) correspondente à temperatura de fusão do TPGS. Para a curva DSC do nanocrystal estabilizado com o TPGS, é possível observar pequena variação da linha de base entre 140 e 180 °C, que pode ser atribuída à transição vítrea, indicando a presença de pequena fração amorfa de flubendazol (ASSIS, 2017); na sequência, há a fusão e a decomposição térmica característica do flubendazol. Na curva DSC do nanocrystal liofilizado estabilizado com o TPGS e manitol (**Figura 32**), observamos um evento exotérmico ($T_{\text{pico}} = 152^{\circ}\text{C}$) indicando a recristalização, potencialmente atribuído à presença de uma fração amorfa de manitol (pela proximidade ao pico de fusão do manitol e pela não observância do evento na ausência do manitol), seguida de um evento endotérmico com $T_{\text{onset}} = 161^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{pico}} = 165^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H = 179,4 \text{ J/g}$, representativo do processo de fusão do manitol; nessa amostra, o adiantamento da fusão e a decomposição do flubendazol também ocorreram.

Figura 29 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, polissorbato 80 e nanocrystal estabilizado com polissorbato 80.



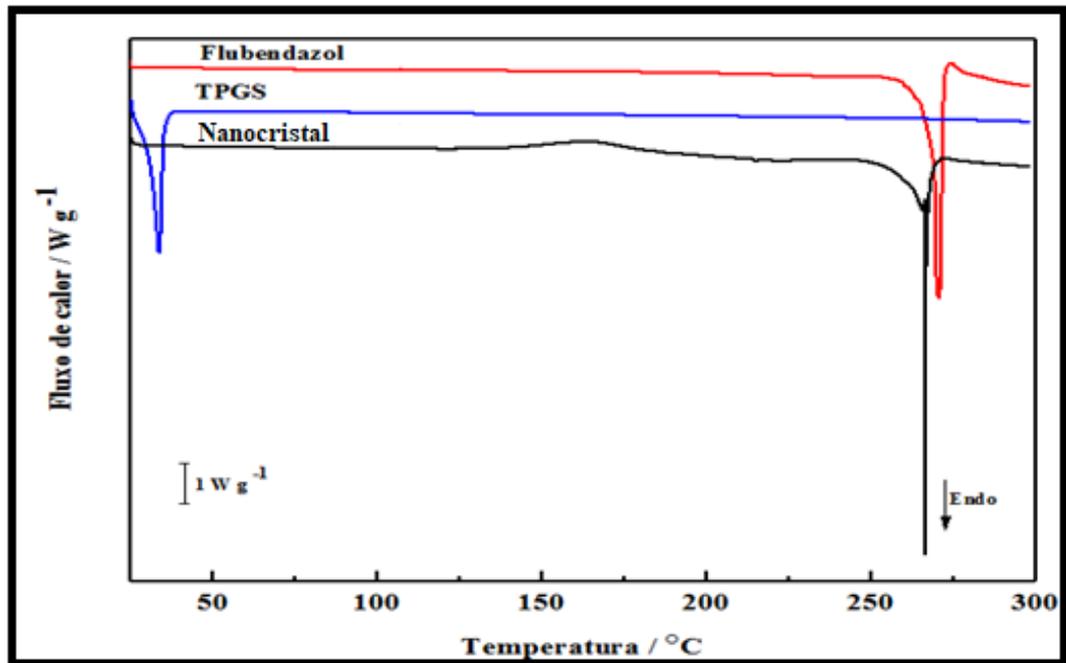
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 30 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, poloxamer 188 e nanocrystal estabilizado com poloxamer 188.



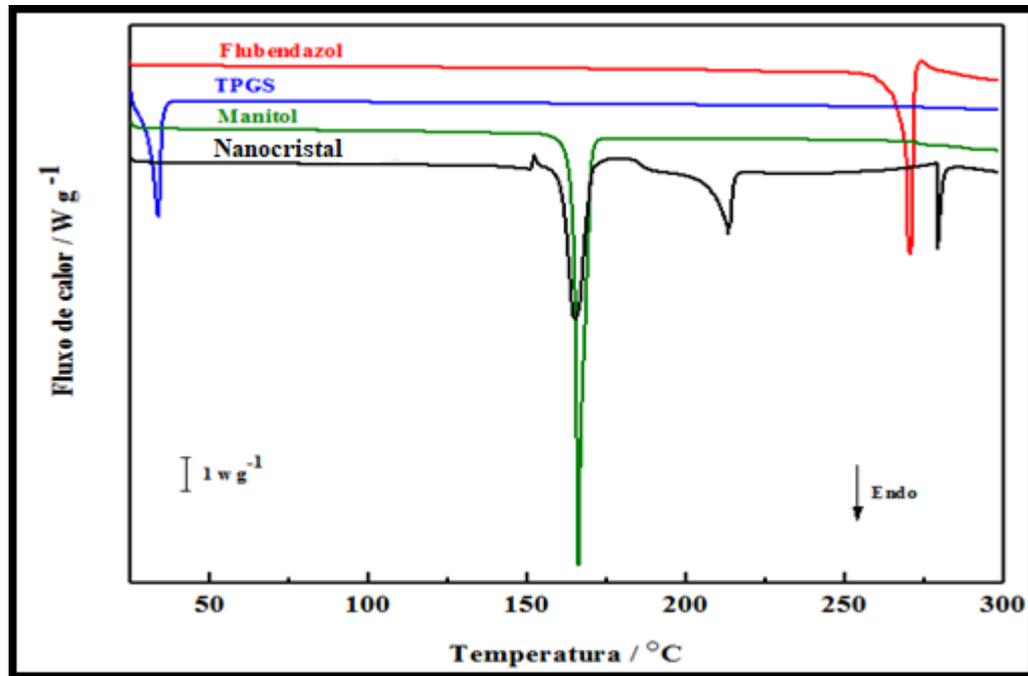
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 31 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, TPGS e nanocrystal estabilizado por TPGS.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 32 - Sobreposição das curvas DSC obtidas a 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, das amostras: flubendazol, TPGS, manitol e nanocrystal estabilizado com TPGS e manitol (liofilizado).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 Análise e comparação da estrutura cristalina do flubendazol micronizado e dos nanocristais de flubendazol empregando-se a difração de raio X (DRX)

A difração de raio X foi utilizada para avaliar possíveis alterações na estrutura cristalina do flubendazol antes e após o processo de microfluidização seguido da liofilização.

Todo sólido cristalino possui distribuição periódica dos seus átomos ou moléculas, o que lhe confere um padrão de difração característico quando da incidência de um feixe de raios X. A difração de raios-X é explicada pela teoria de Bragg. O fundamento da técnica está baseado na interação de feixes de raio X com os elétrons dos átomos de uma estrutura cristalina, ordenados em planos cristalinos separados por uma distância interplanar (d). O feixe de raios X incide sobre um conjunto destes planos cristalinos, à angulação θ , e os feixes refletidos por dois planos subsequentes apresentam o fenômeno da difração. Se a diferença entre seus caminhos ópticos for um número inteiro de comprimento de onda haverá superposição construtiva (um feixe de raios X será observado); caso contrário, haverá superposição destrutiva e não se observará qualquer sinal de raios X (BRITTAIN, H.G., 2009). Estruturas cristalinas

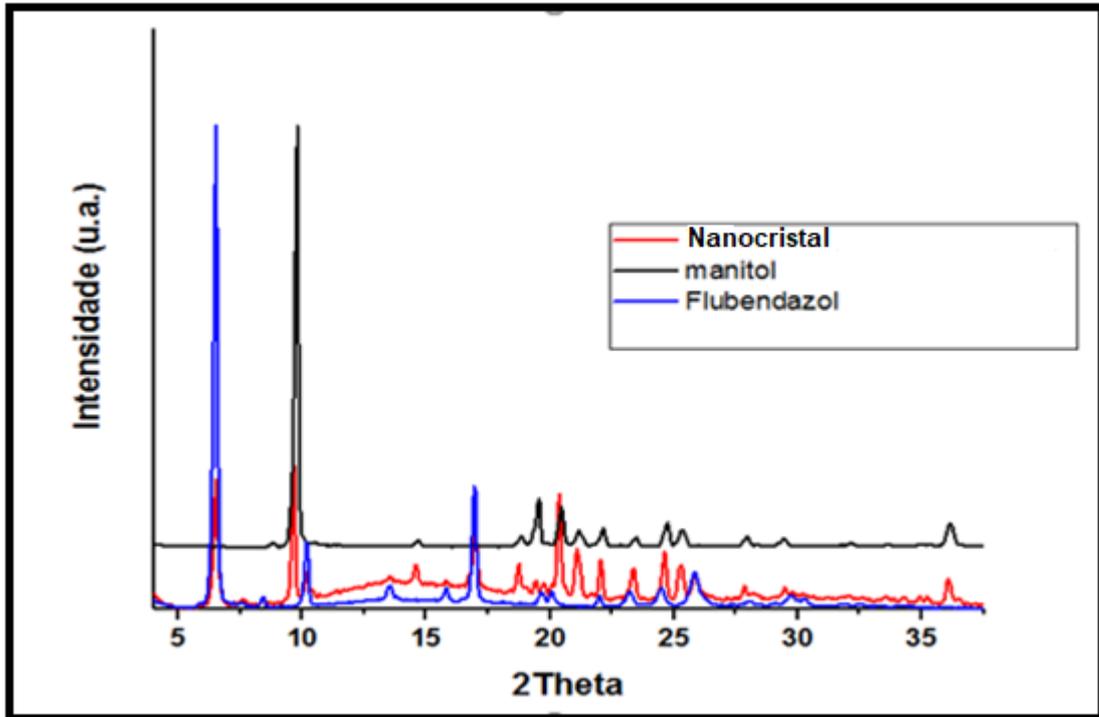
diferentes possuem diferenças nos picos do histograma do padrão de difração (STORPIRTIS et al., 2009).

Liu et al. (2018) utilizaram a técnica de DRX para avaliar o estado sólido do resveratrol modificado antes de passar pelo processo de nanonização. Com a finalidade de otimizar o processo de homogeneização à alta pressão (reduzir o número de ciclos), foram testados três diferentes pré-tratamentos: secagem por pulverização, evaporação rotativa e resfriamento (no qual o resveratrol foi fundido em uma placa de metal, vertido em nitrogênio líquido e moído manualmente para produzir o fármaco micronizado). Estes processos podem modificar as características físicas do pó, como o estado sólido e a morfologia das partículas. Os resultados de DRX demonstraram que o resveratrol é um material cristalino e que o processo de secagem por pulverização aplicado ao fármaco puro não alterou sua cristalinidade, mas, quando foi adicionado o colato de sódio em diferentes concentrações, foi possível observar a redução da sua cristalinidade com o aumento da sua concentração. Já, no processo de evaporação rotativa, a ausência dos picos nos resultados de DRX confirmou os resultados de DSC, demonstrou-se que a produção de dispersões sólidas amorfas do resveratrol está relacionada com o aumento da concentração de HPMC na dispersão (2:1; 1:1 e 1:2). Já o processo de resfriamento não foi capaz de alterar as características do material. O estudo revelou que o pré-tratamento mais efetivo para redução do tamanho de partícula do resveratrol foi a secagem por pulverização, a qual resultou em material parcialmente cristalino e com partículas mais esféricas, apresentando melhor desempenho do que as amostras amorfas.

Tanto o DRX do flubendazol puro quanto do nanocristal estabilizado com TPGS e manitol e liofilizado (**Figura 33**) apresentaram picos característicos em 6,5, 10,2 e 16,9 ° (2θ). A posição dos picos característicos permaneceu inalterada no difratograma do nanocristal, diferindo apenas na altura, quando comparada com o padrão, indicativo de diferentes tamanhos de cristal e cristalinidade (VARSHOZAZ et al., 2008). Apesar da elevada cristalinidade dos nanocristais, observa-se pequena elevação da linha base entre 10° e 20° (2θ), indicando o que poderia ser a presença de diminuta fração amorfa (conforme indicado nas curvas DSC) ou mesmo provocada pela fração de nanocristais com tamanho inferior a 100 nm.

A quantificação dessa fração não foi realizada, pois exigiria o desenvolvimento de uma metodologia específica para tal, que foge ao objetivo desse trabalho. Os resultados demonstram que não houve diferenças significativas no padrão de difração entre os espectros de DRX, indicando que o flubendazol não alterou a forma polimórfica mesmo depois do processo de microfluidização seguido da liofilização.

Figura 33 - Difratoograma (método de pó) do flubendazol puro, manitol e nanocrystal de flubendazol estabilizado com TPGS e manitol (liofilizado).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.6 Otimização da preparação dos nanocristais de flubendazol empregando planejamento estatístico

De maneira diferente da abordagem de tentativa e erro, na qual apenas uma variável é testada por vez, o planejamento fatorial é uma abordagem estatística que permite determinar ou até mesmo quantificar, de forma confiável, a influência das variáveis de um processo ou formulação sobre as respostas desejadas, incluindo a influência das interações dessas variáveis (RODRIGUES et al., 2014).

Os fatores e os níveis para o experimento fatorial do presente trabalho foram selecionados a partir de conjunto de variáveis da formulação que podem impactar no processo de redução do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e do índice de polidispersão (IP) da nanossuspensão preparada pela técnica de homogeneização à alta pressão, sendo: a concentração (% p/p) do estabilizante d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e a concentração do flubendazol na nanossuspensão (% p/p). As variáveis do processo de preparo foram avaliadas e pré-estabelecidas durante o estudo exploratório das formulações, sendo fixadas as condições ótimas: 35.000 psi de pressão, tempo de preparo de 2 horas (para 100 gramas) e temperatura média do produto de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para o presente trabalho, foram efetuados 8 experimentos (incluindo 4 pontos centrais) correspondentes ao planejamento fatorial de dois fatores com dois níveis, alto e baixo (2^2). Os níveis mínimo e máximo, para a concentração do d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e para a concentração de flubendazol, foram, respectivamente, de 2 a 3% (p/p) e de 20 a 30% p/p. A **Tabela 20** apresenta os resultados de DHM, PDI e PZ obtidos para os 8 ensaios.

Tabela 20 - Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersibilidade (IP) e potencial zeta da nanossuspensão de flubendazol na matriz de ensaios do planejamento fatorial simples.

F	Ordem	PC	FZB (% p/p)	TPGS (% p/p)	DHM (nm)	DP DHM	IP	DP IP	PZ
1	8	1	20	2	351,4	6,6	0,165	0,037	-27,47
2	3	1	30	2	348,7	3,7	0,232	0,018	-27,03
3	2	1	20	3	214,7	12,7	0,389	0,021	-25,5
4	4	1	30	3	217,8	1,5	0,213	0,014	-30,57
5	1	0	25	2,5	273,9	17,4	0,205	0,015	-34,27
6	5	0	25	2,5	280,0	2,0	0,205	0,015	-23,77
7	7	0	25	2,5	254,6	9,9	0,205	0,026	-32,63
8	6	0	25	2,5	235,2	4,5	0,184	0,028	-24,83

F: formulação; PC: ponto central; FZB: flubendazol; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio de partícula; IP: índice de polidispersão; DP: desvio padrão; PZ: potencial zeta.

5.7 Avaliação do modelo estatístico e dos parâmetros significativos que impactaram no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas

A avaliação da adequação do modelo estatístico foi realizada pela análise de variância (ANOVA), a qual testou a importância dos fatores d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e flubendazol em diferentes níveis, na redução do diâmetro médio hidrodinâmico das partículas. Na ANOVA, a hipótese nula afirma que todas as médias das populações são iguais, enquanto a hipótese alternativa afirma que pelo menos uma é diferente (MYERS; MONTGOMERY; COOK, 2009).

Na análise de variância realizada, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores do que 0,05 ($\alpha=0,05$). Avaliando-se os resultados estatísticos obtidos nas **Tabelas 21 e 22**, concluiu-se que a concentração do estabilizante TPGS é significativa (valor-p igual 0,002; $\alpha=0,05$). Já a concentração de flubendazol não foi significativa, sendo

incorporada aos resíduos para o cálculo da ANOVA. Como o valor de F para a regressão foi altamente significativo para TPGS (quanto maior o valor, maior a diferença entre grupos), a porcentagem de variação explicada (r^2) pelo modelo foi satisfatória, 93,83% (valores maiores do que 80% indicam que os dados previstos pelo modelo são muito próximos ao valor real), e a falta de ajuste apresentou um p-valor não significativo (0,895). Assim, o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, sendo caracterizado pela **Equação 7**.

$$\text{DHM (nm)} = 617,2 - 133,8 \cdot \text{TPGS (\% p/p)} \quad \text{(Equação 7)}$$

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para testar a significância da regressão para a resposta diâmetro hidrodinâmico médio das partículas no planejamento estatístico simples.

Fonte	GL	SQ (aj)	MQ (aj)	Valor F	Valor-p
Modelo	8	18.896,80	6.298,90	20,29	0,007
Linear	2	17.908,40	8.954,20	28,84	0,004
FZB (% p/p)	1	0	0	0	0,992
TPGS (% p/p)	1	17.908,40	17.908,40	57,68	0,002
Curvatura	1	988,3	988,3	3,18	0,149
Erro	4	1.241,80	310,5		
Falta de ajuste	1	8,5	8,5	0,02	0,895
Erro puro	3	1.233,40	411,1		
Total	7	20.138,60			

GL: graus de liberdade; SQ (aj): soma dos quadrados ajustados; MQ (aj): média quadrática ajustada; valor F: estatística F e valor-p: nível de significância.

Tabela 22 - Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM dos nanocristais de flubendazol obtidos no planejamento estatístico simples.

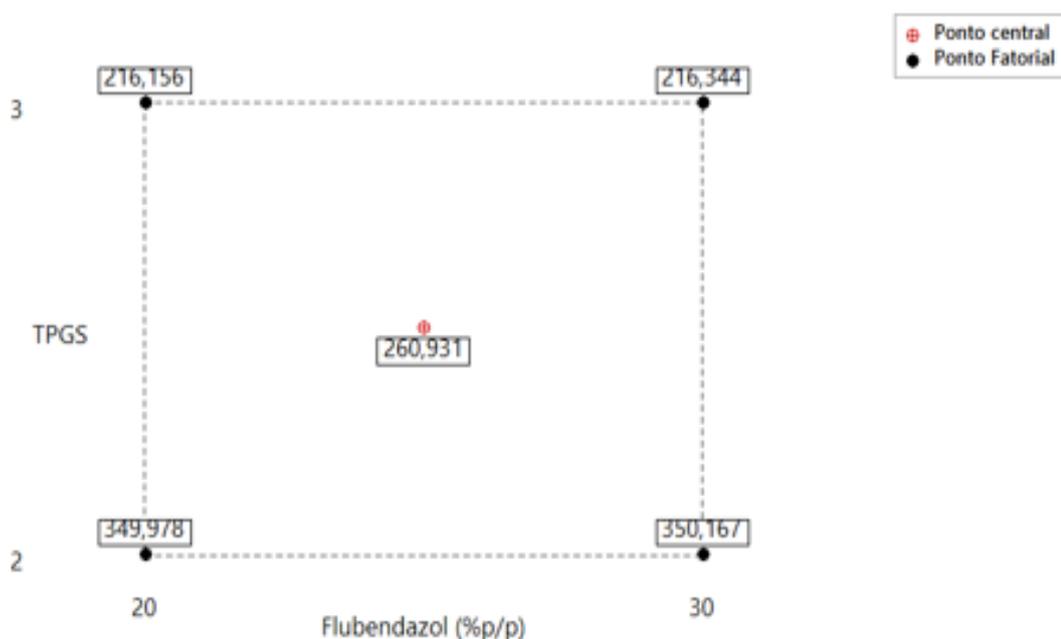
Termos	Efeito	Coefficientes	C-DP	Valor T	Valor de P	VIF
Constante		283,16	8,81	32,14	0	
FZB % p/p	0,19	0,09	8,81	0,01	0,992	1
TPGS % p/p	-133,82	-66,91	8,81	-7,6	0,002	1
ponto central		-22,2	12,5	-1,78	0,149	1

$$\text{dp} = 17,6198 \quad r^2 = 93,83\% \quad r^2(\text{aj}) = 89,21\% \quad r^2(\text{prev}) = 88,44\%$$

Índices de ajuste do modelo: dp: desvio padrão; r^2 coeficiente de determinação, $r^2(\text{aj})$: coeficiente de determinação ajustado, $r^2(\text{prev})$: coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; C-DP: coeficiente de desvio padrão; valor de p: nível de significância.

A **Figura 34** ilustra, com o gráfico de cubo, que quanto maior a concentração (% p/p) de TPGS, menor o tamanho de partícula obtido com o processo de microfluidização.

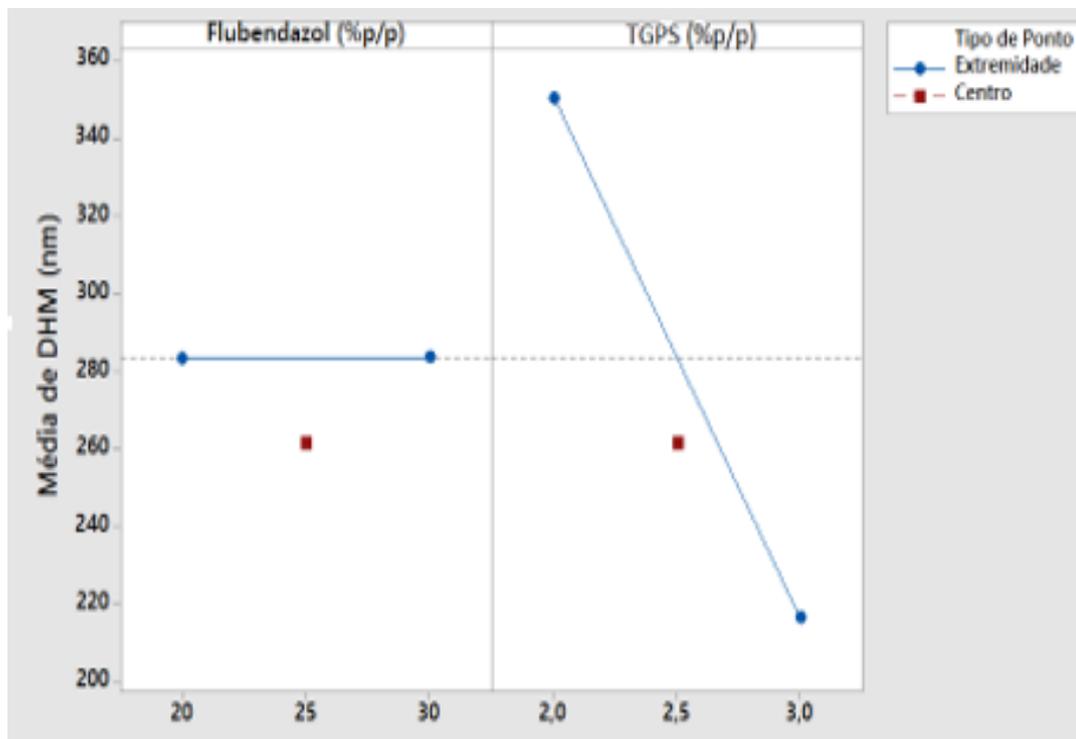
Figura 34 - Gráfico de cubo demonstrando o tamanho hidrodinâmico médio (DHM) das partículas obtidas no planejamento fatorial simples. A resposta aparece nos vértices do cubo.



Fonte: Elaborado pelo autor

A **Figura 35** apresenta o gráfico de efeitos principais das variáveis: concentração do d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e concentração do flubendazol (%p/p). Avaliando essa figura, é possível concluir que apenas a concentração do TPGS influencia significativamente, de maneira inversamente proporcional, no DHM das nanopartículas.

Figura 35 - Gráfico de efeitos principais da concentração do d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e da concentração do flubendazol (% p/p) no DHM dos nanocristais.

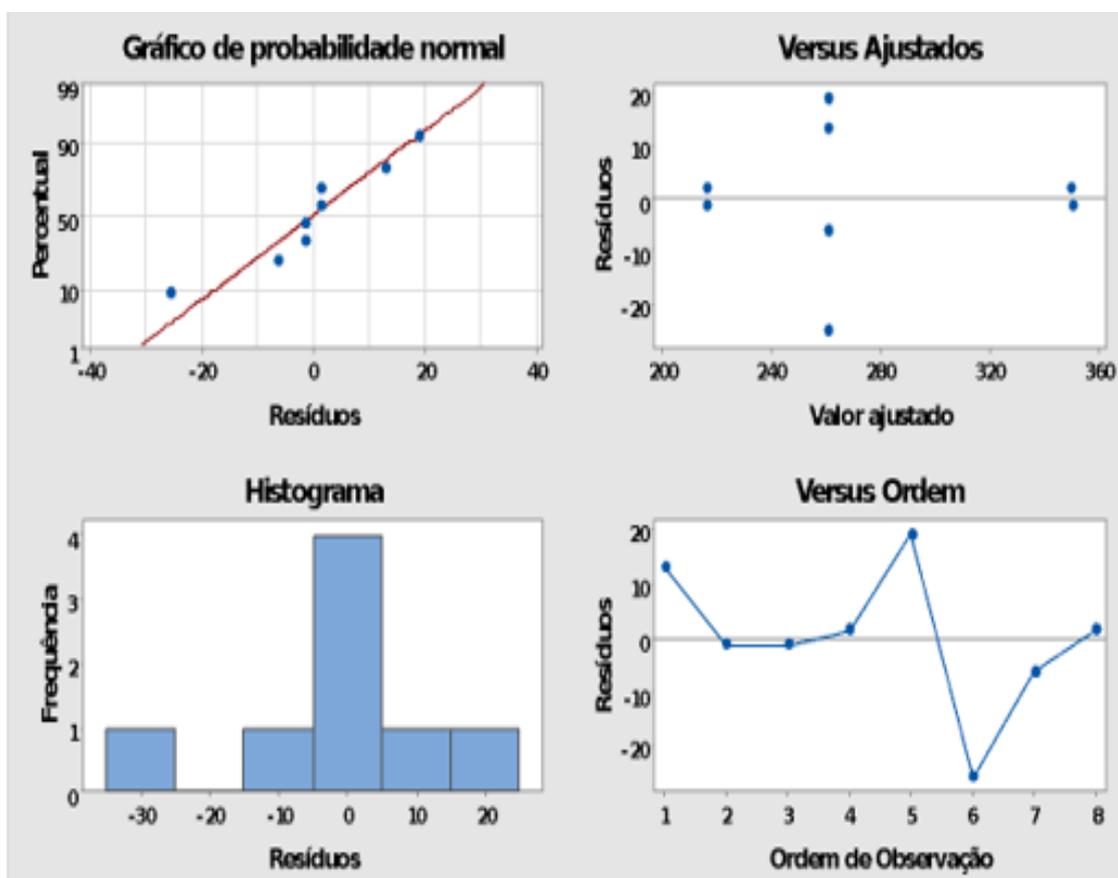


Fonte: Elaborado pelo autor

Com a finalidade de examinar a qualidade do ajuste da ANOVA, foram avaliados os gráficos de resíduos: o gráfico de probabilidade normal e o histograma (**Figura 36**). No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que segue a distribuição normal; avaliando-se os dados obtidos, constatou-se normalidade válida em função de os valores se localizarem próximos à reta (MYERS; MONTGOMERY; COOK, 2009).

No gráfico de resíduos *versus* valores ajustados, os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno do zero, indicando a variância constante e a relação linear entre as variáveis. Avaliando-se o histograma, nota-se também a distribuição normal.

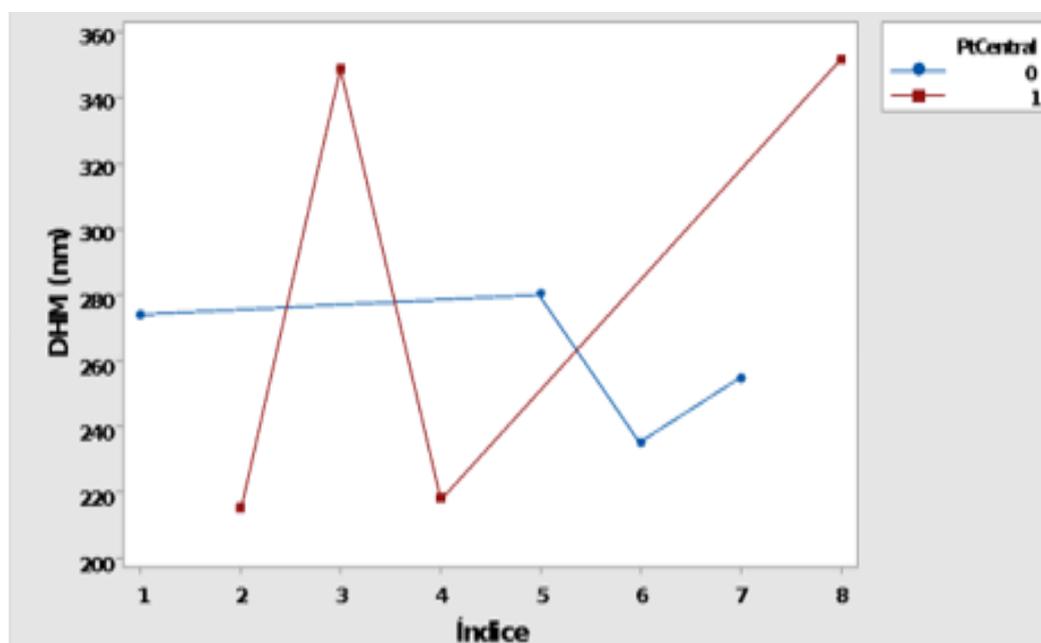
Figura 36 - Gráfico de resíduos da avaliação do DHM de nanocristais de flubendazol contendo as variáveis: concentração do d- α tocoferol polietilenoglicol 1.000 succinato (TPGS) e concentração do flubendazol (% p/p).



Fonte: Elaborado pelo autor

A replicação dos pontos centrais permite obter estimativa do erro experimental independente. Os pontos centrais do delineamento fatorial simples apresentaram valores iguais a $273,9 \pm 17,4$; $280,0 \pm 2,0$; $254,6 \text{ nm} \pm 9,9$; $235,2 \pm 4,5$ (**Figura 37**). A diferença entre o maior e o menor valor foi de 44,8 nm.

Figura 37 - Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de flubendazol contendo as variáveis concentração de flubendazol (%p/p) e concentração do TPGS (% p/p). Comparativo com os pontos centrais.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.7.1 Validação da equação do modelo

Para validar a adequação da equação do modelo, foram conduzidos experimentos de verificação, desafiando duas concentrações diferentes de TPGS, 2,25 % (p/p) e 2,75% (p/p), mantendo-se a concentração fixa de flubendazol (30 % p/p). Nessas condições, os DHM práticos foram de $328,8 \pm 11,9$ nm, para a formulação contendo 2,25% (p/p) de TPGS, e de $255,0 \pm 3,6$, para a formulação contendo 2,75% (p/p) TPGS. Esses valores estão dentro da faixa de valor previsto, calculado com $\alpha=0,05$ (**Tabela 23**). Os resultados práticos demonstraram a validade do modelo matemático para o DHM.

Tabela 23 - Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersão das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de flubendazol.

% TPGS	DHM teórico (nm)	DHM prático (nm)	IP
2,25	316,75	328,8 ± 11,9	0,188 ± 0,036
2,75	249,85	255,0 ± 3,6	0,230 ± 0,027

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; IP: índice de polidispersão.

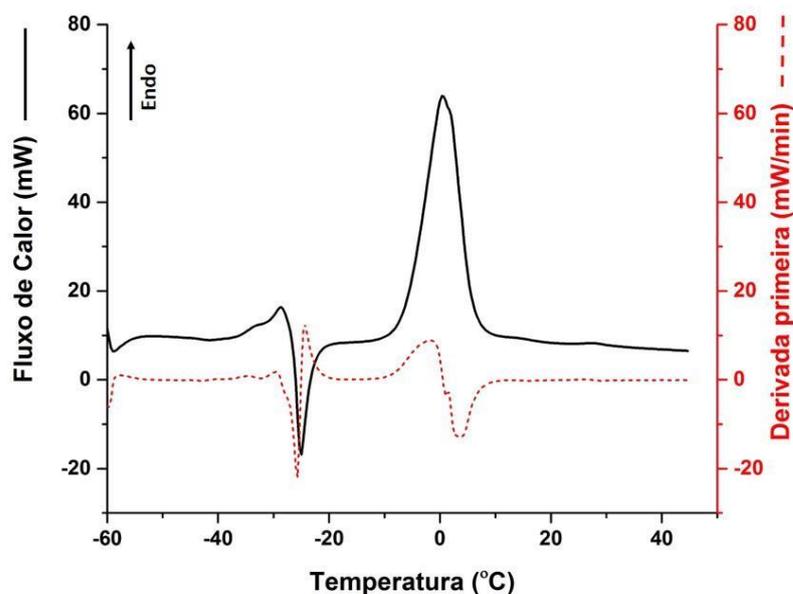
5.8 Avaliação da temperatura de transição vítrea (T_g') da nanossuspensão de flubendazol por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para o desenvolvimento da curva de liofilização

Com a finalidade de otimizar o processo de liofilização da nanossuspensão, foram avaliadas as propriedades críticas da formulação. A nanossuspensão liofilizada foi preparada com 28% p/p de flubendazol, 2,8% p/p do estabilizante TGPS e 5% p/p de manitol. O manitol é um excipiente utilizado como estabilizante, protegendo o produto do estresse sofrido durante o congelamento e a secagem, no controle da osmolaridade, e é amplamente utilizado como agente de volume em formulações liofilizadas. Embora seja um material relativamente inerte e cristalino, pode ocorrer sua amorfização durante a etapa de congelamento, sendo necessária a determinação da sua temperatura de transição vítrea (T_g'). Uma vez conhecida a T_g' , é possível estimar a temperatura máxima utilizada durante a secagem primária, a fim de evitar recristalizações e colapsos no processo de liofilização que prejudiquem a qualidade do líofilo obtido (REY; MAY, 2007).

Foi realizada uma curva de DSC (**Figura 38**) da nanossuspensão contendo 5% p/p de manitol. A mesma foi congelada até -60°C e, em seguida, foi aquecida com razão de aquecimento de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de 45°C . Foram evidenciados eventos na região de -45°C a -40°C que podem estar relacionados aos rearranjos do material amorfo (fração amorfa de manitol) ou mesmo às transições vítreas do sistema relacionadas à fração solubilizada do fármaco amorfo. Na temperatura de aproximadamente -35°C , observa-se a transição vítrea do manitol, seguida por uma recuperação entálpica (rearranjo da fase amorfa) denominada de T_{g2}' . O evento exotérmico está relacionado com a cristalização do manitol. O pico endotérmico ao redor de -5 a 5°C trata-se da fusão do gelo, relacionada com a água livre. Perfis térmicos semelhantes, relacionados à solução aquosa de manitol congelada, foram relatados por

CAVATUR et al. (2012). Utilizando uma razão de aquecimento mais branda (10 °C/min), os autores observaram com maior precisão o evento térmico que ocorre com o manitol durante o congelamento. Ainda naquele estudo, foi possível constatar as duas temperaturas de transição vítrea: T_{g1}' a -32°C, relacionada à fração de manitol amorfo presente; T_{g2}' a -25°C, atribuída a um rearranjo estrutural. Adicionalmente, os autores observaram rápida cristalização (evento exotérmico) devido à elevada mobilidade das moléculas dos componentes amorfos, quando são submetidos à temperatura acima da sua T_g' (CAVATUR et al., 2002; YONEMOCHI et al., 2006).

Figura 38 - Curva DSC da nanossuspensão de flubendazol à razão de aquecimento de 20 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂, na faixa de temperatura de -60 °C a 45 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para formulações de matriz cristalina, com temperatura de transição vítrea muito baixa e, conseqüentemente, grande período de secagem primária, é comum adicionar uma etapa de tratamento térmico (*annealing*), na qual a amostra é mantida à temperatura de subcongelamento acima da temperatura de transição vítrea por um período de tempo. O *tratamento térmico* tem efeito drástico sobre o tamanho dos cristais de gelo, promove o crescimento e aumenta o diâmetro dos poros, resultando em melhor eficiência na etapa de secagem primária. Reduzindo-

se a heterogeneidade da taxa de secagem, é possível obter um material liofilizado com uma estrutura mais homogênea (REY; MAY, 2007).

A técnica de calorimetria exploratória diferencial permitiu determinar a temperatura de transição vítrea da nanossuspensão de flubendazol, evidenciando a necessidade de incorporar uma etapa de tratamento térmico na liofilização. A temperatura e a pressão, em cada etapa, foram as seguintes: congelamento até $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$; *annealing* com aquecimento até $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantida a essa temperatura por 3 horas; secagem primária à temperatura de prateleira de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de $850\text{ }\mu\text{bar}$ por 30 h; e etapa de secagem secundária, temperatura da prateleira de $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob pressão de $30\text{ }\mu\text{bar}$ durante 4h.

5.9 Aspectos físico-químicos do nanocrystal liofilizado

A nanossuspensão foi liofilizada no liofilizador da IMA Life (Itália), seguindo os parâmetros descritos no método. A **Figura 39** apresenta a imagem da nanossuspensão e do produto final liofilizado. O volume e a aparência da pastilha formada foram satisfatórios, com ausência de colapsos durante o processo de liofilização, evidenciando a efetividade do ciclo delineado utilizando-se a curva DSC. Foi avaliado o teor do nanocrystal liofilizado, constatando $96,34\% \pm 0,375$ de flubendazol. A umidade residual apresentada pelo liofilizado foi de $1,4\%$.

Figura 39 – Imagem de frascos com a nanossuspensão e com o nanocrystal de flubendazol liofilizado



Fonte: Elaborado pelo autor

A **Tabela 24** apresenta os valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) após reconstituição do nanocrystal de flubendazol, empregando-se o mesmo volume de água removido na liofilização. Pode-se observar que a amostra apresentou incremento de apenas 9,8% no tamanho médio hidrodinâmico (nm) após a etapa de liofilização, demonstrando o tensoativo (TPGS) e o crioprotetor manitol empregados na formulação foram capazes de estabilizar fisicamente o nanocrystal. Os crioprotetores, como os açúcares, promovem o isolamento das partículas individuais da fração não congelada, prevenindo a agregação durante o congelamento acima da T_g . Adicionalmente, pode-se avaliar que os parâmetros utilizados nas etapas de congelamento, tratamento térmico, secagem primária e secagem secundária, durante o processo de liofilização, foram adequados, pois não foi verificada a aglomeração ou a fusão do sistema. O IP e o PZ se mantiveram praticamente sem alteração.

O potencial zeta tem função importante na estabilidade das nanossuspensões. Embora seja esperado que nanossuspensões preparadas com estabilizadores estéreis, como o TPGS, exibam valores de potencial zeta mais baixo devido à camada de absorção formada por esses polímeros na superfície das partículas, a nanossuspensão de flubendazol apresentou o potencial zeta de -30,57. Este valor pode ser explicado porque o flubendazol encontra-se ionizado negativamente no pH da nanossuspensão (pH 8,0) (RACHMAWATI et al., 2013).

Tabela 24 - Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de flubendazol reconstituído após a liofilização.

Fórmula	DHM (nm)	IP	PZ (mV)
Nanossuspensão antes liofilização	253,9 ± 3,0	0,363 ± 0,004	-30,57
Nanossuspensão após liofilização	278,8 ± 5,6	0,358 ± 0,027	-30,45

5.10 Solubilidade de saturação dos nanocristais de flubendazol

A solubilidade de saturação do flubendazol micronizado e do nanocrystal de flubendazol foi avaliada nos meios HCl 0,1 N, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato salino

pH 7,4 (tampão frequentemente utilizado em aplicações biológicas, como lavagem de células, transporte de tecidos e diluições; este tampão mimetiza o pH, a osmolaridade e as concentrações de íons do corpo humano). Os resultados estão apresentados na **Tabela 25** e na **Figura 40**.

Tabela 25 - Solubilidade de saturação do flubendazol micronizado e do nanocristal ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$, \pm desvio padrão) demonstrando o incremento (em número de vezes) da solubilidade do nanocristal.

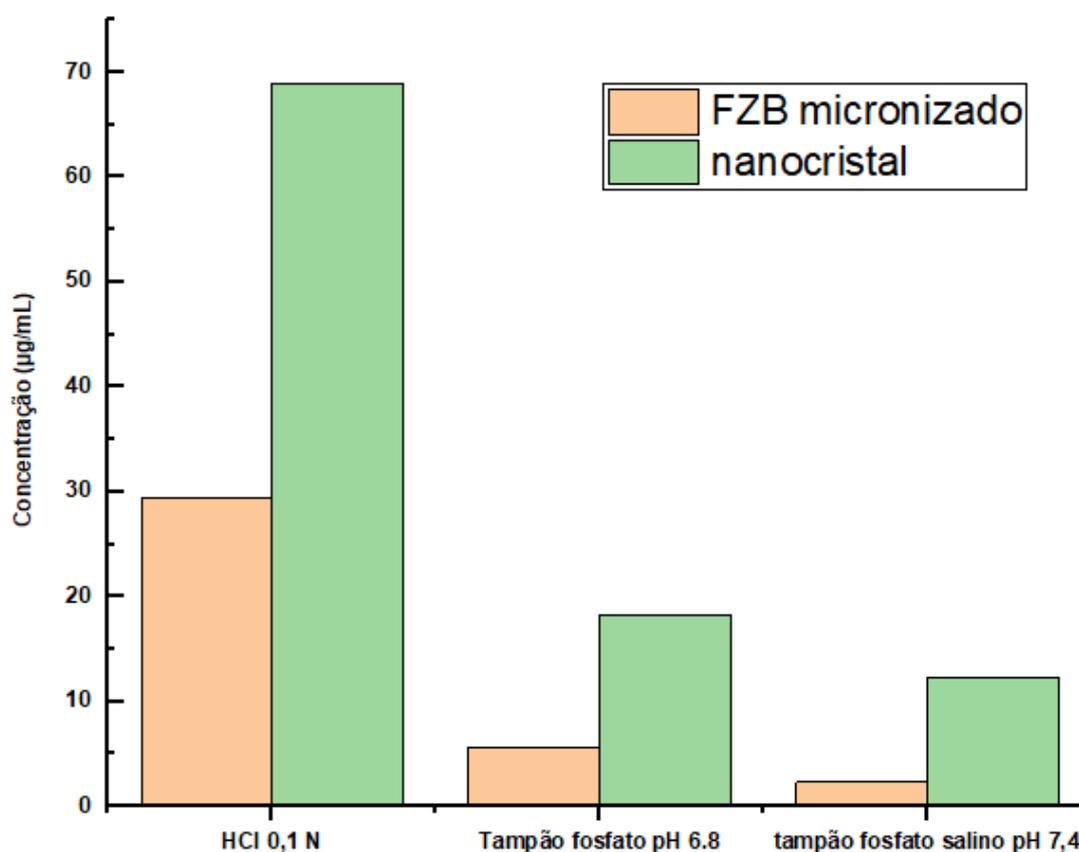
Meios	Flubendazol micronizado		Nanocristal		Incremento
	concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	
HCl 0,1 N	29,467	1,3	68,935	4,0	2,3
Tampão fosfato pH 6.8	5,661	5,4	18,254	5,3	3,2
tampão fosfato salino pH 7,4	2,333	0,4	12,230	2,1	5,2

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 25, os nanocristais proporcionaram aumento na solubilidade de saturação em 2,3 vezes, 3,2 vezes e 5,2 vezes, em relação ao flubendazol micronizado, nos meios HCl 0,1 N, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato salino pH 7,4, respectivamente. Um desempenho semelhante foi constatado com nanocristais de dexametasona, ibuprofeno e tacrolimo produzidos pela técnica de moagem à alta energia. Nos ensaios de solubilidade de saturação, foi possível observar o incremento de 1,3 a 6,6 vezes destes fármacos quando o tamanho de partícula foi reduzido de 1 μg para aproximadamente 300 nm (COLOMBO et al., 2017).

O aumento da solubilidade de saturação dos nanocristais de flubendazol sugere grande potencial para aumento na sua biodisponibilidade. Araujo et al. (2018) demonstraram, através de ensaios *in silico*, que o sal de flubendazol com ácido málico (com solubilidade três vezes maior do que o flubendazol puro) foi capaz de aumentar em 2,6 vezes a taxa de absorção do flubendazol, 1,4 vezes o pico de concentração plasmática e em 60% a extensão de absorção, constatando melhora das propriedades farmacocinéticas (ARAUJO et al., 2018).

SHARMA et al. (2016) demonstraram a relação positiva entre o aumento da solubilidade de saturação de nanocristais de febuxostat estabilizado com Soluplus[®] com o aumento do $C_{\text{máx}}$ e área sobre a curva em testes *in vivo* após administração oral (SHARMA; PATEL; MEHTA, 2016).

Figura 40 - Solubilidade obtida através do método de equilíbrio do flubendazol micronizado e do nanocrystal de flubendazol.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.11 Ensaio de dissolução comparativa: flubendazol micronizado *versus* o nanocrystal

Com o intuito de avaliar o incremento da velocidade de dissolução do nanocrystal, foi realizado um perfil de dissolução comparativo entre o flubendazol micronizado e o nanocrystal. O meio de dissolução de escolha foi o HCl 0,1N, meio no qual o flubendazol apresenta maior solubilidade, acrescido de 0,1% de TPGS, para facilitar a molhabilidade do flubendazol micronizado, visto que este fármaco seja um material de alta hidrofobicidade ($\log P = 3$). As leituras referentes ao fármaco liberado foram realizadas por espectrofotometria, no espectrofotômetro da série SI400 da SI Photonics® (Tucson, Arizona, USA), com dispositivo de amostragem de fibra óptica de 0,5 mm (**Figura 41**). As leituras de absorbância foram captadas pelo equipamento a cada minuto. As **Tabelas 26** e **27** apresentam os resultados de dissolução do flubendazol micronizado e do nanocrystal, a cada 5 minutos, durante uma hora. A **Figura 42** demonstra o perfil de dissolução comparativo do flubendazol micronizado *versus*

o nanocristal, no qual podemos observar o aumento de 40,7% da quantidade de flubendazol dissolvida: 73,2 % do nanocristal *versus* 32,5% do flubendazol micronizado.

Tabela 26 - Resultados de dissolução do flubendazol micronizado

Tempo	Micronizado ensaio 1 (%)	Micronizado ensaio 2 (%)	Micronizado ensaio 3 (%)	Desvio padrão	Média (%)	DPR (%)
5	10,71	9,93	8,63	1,0489	9,76	10,7510
10	18,51	22,78	19,80	2,1862	20,36	10,7360
15	22,00	28,04	24,39	3,0433	24,81	12,2667
20	23,98	30,82	26,80	3,4386	27,20	12,6421
25	25,61	32,16	27,97	3,3204	28,58	11,6179
30	26,78	33,24	28,91	3,2944	29,64	11,1131
35	27,37	34,41	29,93	3,5660	30,57	11,6649
40	27,66	35,10	30,52	3,7538	31,09	12,0734
45	28,23	35,36	30,75	3,6149	31,45	11,4957
50	28,81	35,79	31,12	3,5554	31,90	11,1440
55	29,34	36,03	31,33	3,4351	32,23	10,6577
60	29,80	36,25	31,52	3,3372	32,52	10,2615

Tabela 27 - Resultados de dissolução do nanocrystal.

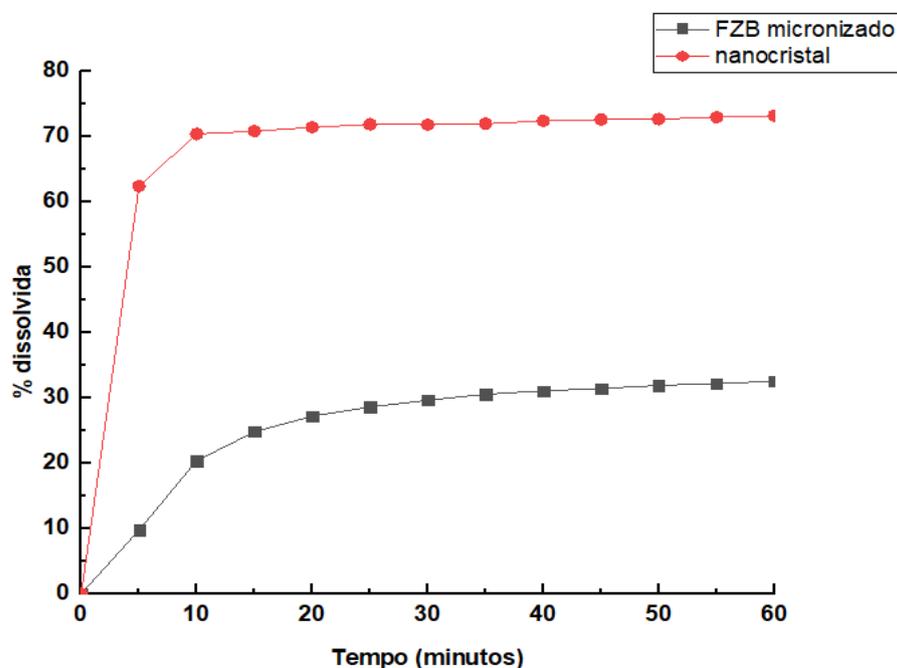
Tempo (min)	Nanocrystal ensaio 1 (%)	Nanocrystal ensaio 2 (%)	Nanocrystal ensaio 3 (%)	Desvio padrão	Média (%)	DPR (%)
5	76,68	76,54	48,35	16,3167	62,44	26,1312
10	76,85	76,83	64,01	7,4062	70,42	10,5176
15	76,88	76,92	64,79	6,9899	70,85	9,8652
20	76,94	76,90	66,00	6,3059	71,45	8,8257
25	77,27	77,23	66,55	6,1768	71,89	8,5918
30	77,50	77,52	66,17	6,5457	71,84	9,1110
35	77,58	77,38	66,57	6,3007	71,98	8,7538
40	77,93	77,87	67,00	6,2931	72,44	8,6879
45	77,88	77,88	67,39	6,0554	72,63	8,3367
50	77,75	77,69	67,73	5,7671	72,71	7,9316
55	77,91	77,75	68,23	5,5465	72,99	7,5993
60	78,03	77,74	68,68	5,3184	73,21	7,2645

Figura 41 – Foto do sistema adaptado para o ensaio de perfil de dissolução utilizando o equipamento espectrofotômetro da série SI400 da SI Photonics®, com sonda óptica de 0,5 mm, 40 ml de meio HCl 0,1N, sob aquecimento a 37°C e agitação a 300 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 42 - Perfil de dissolução comparativo entre o flubendazol micronizado e o nanocrystal, em HCl 0,1 N com 0,1% de TPGS, 300 rpm de agitação, 40 ml de meio HCl 0,1N em espectrofotômetro da série SI400 da SI Photonics®, com sonda óptica de 0,5 mm.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.12 Avaliação da atividade antitumoral do nanocrystal de flubendazol em células da linhagem de câncer de pulmão humano A-549

As nanoestruturas têm apresentado resultados satisfatórios quando utilizadas em fármacos antitumorais, uma vez que penetram facilmente pela vasculatura dos tumores e possuem tempo de retenção aumentado consideravelmente (MIAO et al., 2018). O mecanismo de transporte de nanocristais difere do fármaco livre, uma vez que está relacionado ao tamanho, à forma, à carga superficial, à modificação de superfície e à hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade. As partículas grandes são capturadas por fagocitose ou macropinocitose, enquanto as nanopartículas podem ser capturadas por mecanismos múltiplos, endocitose não específica ou específica (mediada por um receptor), podendo até penetrar na membrana celular por difusão passiva (LIU et al., 2010). Com a acumulação passiva e favorecida dos nanocristais no espaço intersticial da vasculatura tumoral, há a liberação lenta do fármaco, ocasionando o aumento do tempo de exposição e concentração no local do tumor, que garante maior eficácia e menor toxicidade. Adicionalmente, nanocristais injetados na corrente sanguínea são sequestrados por

células fagocíticas mononucleares, que, por sua vez, podem agir como depósitos de fármacos para melhorar ainda mais a farmacocinética e a biodistribuição dos medicamentos antitumorais (MIAO et al., 2018).

A entrega direcionada de fármacos é outra aplicação emergente dos nanocristais que se mostra muito promissora, especialmente em terapias antitumorais. Talekar e col. (2013) reportam que nanocristais de PIK-75, um inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), produziram incremento de 5 a 10 vezes de acúmulo do fármaco no tumor. Estudos de distribuição indicaram que, para uma suspensão contendo o PIK-75 livre, a maior parte do fármaco foi distribuída para o rim e os pulmões, enquanto que, nas nanossuspensões, a maioria do fármaco foi distribuída para o baço, os pulmões e o fígado. Em estudos *in vitro* com linhagem de carcinoma de ovário humano, SKOV3, os nanocristais representaram diminuição de até 0,2 vezes do valor de IC50 (TALEKAR et al., 2013).

Um estudo que comparou o nanocristal de paclitaxel e o paclitaxel livre, ambos administrados oralmente em camundongos, demonstrou que o nanocristal foi capaz de reduzir em um terço o tamanho do tumor quando comparado com o fármaco livre. Referente aos resultados de biodisponibilidade, o nanocristal de paclitaxel foi capaz de promover aumento da biodisponibilidade em 12,6 vezes quando comparado com o Taxol[®], apresentando também menor depuração. Sendo assim, o nanocristal foi mais eficaz na redução do crescimento tumoral, pois apresentou maiores níveis sistêmicos (LIU et al., 2010 e SHARMA et al., 2015).

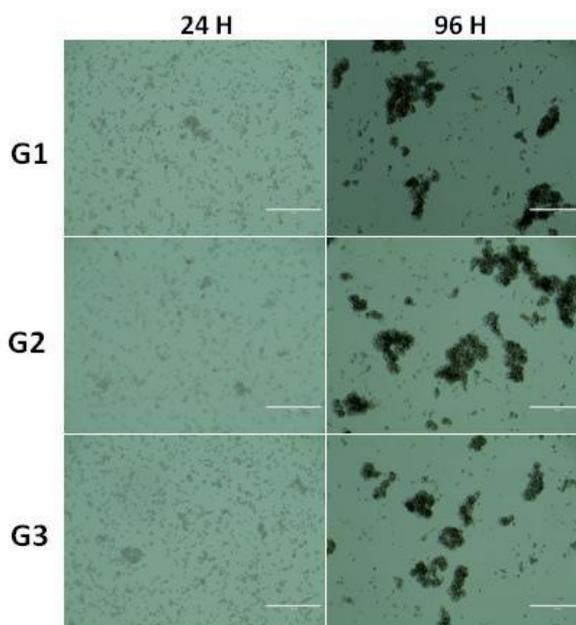
Quando administrados parentalmente, nanocristais de docetaxel e camptotecina estabilizados com poloxamer F127 inibiram o crescimento tumoral de câncer de pulmão humano e câncer de mama murino, respectivamente (MIAO et al., 2018).

Recentemente, estudos demonstraram que o flubendazol é capaz de induzir a morte celular em tumores malignos e retardar o seu crescimento, por meio da alteração da estrutura de microtúbulos e da inibição da polimerização da tubulina. O flubendazol apresentou atividade antiproliferativa em linhagens de leucemia e de mieloma, câncer intestinal, câncer de mama, neuroblastoma. Reporta-se também que o flubendazol apresentou efeito sinérgico em terapias com a vincristina, a vimblastina e o paclitaxel (HANUSOVA et al., 2015).

Nesse sentido, foi realizado um estudo comparativo da atividade do flubendazol na progressão do câncer de pulmão quando veiculado na forma de nanocristais (formulação liofilizada otimizada desenvolvida nesse trabalho) *versus* a veiculação convencional (suspensão micronizada convencional) (VAZQUEZ et al., 1983). A toxicidade do flubendazol foi avaliada em tumoresferas de câncer de pulmão (**Figura 43**). As células da linhagem de

câncer de pulmão humano A-549 foram mantidas em garrafas por 4 dias, sem a troca do meio, para a formação das tumoresferas e foram acompanhadas ao microscópio diariamente.

Figura 43 - Tumoresferas de células tumorais de pulmão A549: as figuras correspondem às tumoresferas de pulmão em tempos de cultivo de 24 horas e 96 horas, respectivamente. Microscópio EVOS. Aumento de 400X.

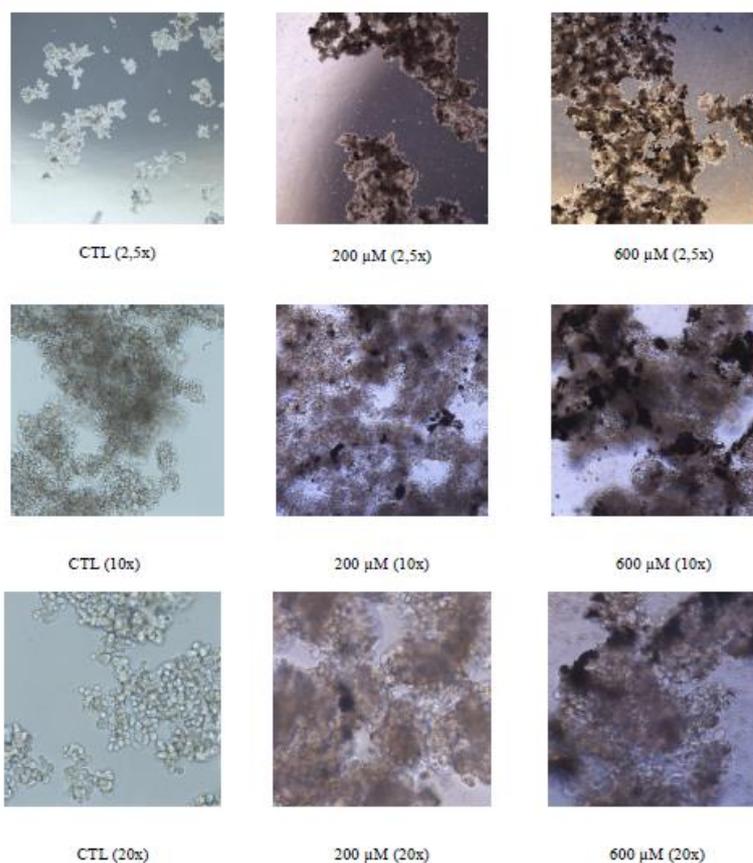


Fonte: Elaborado pelo autor

As concentrações do nanocristal variaram de 0,01 μ M a 1,2 μ M no ensaio de morte celular. Após as 48 horas de tratamento, as tumoresferas foram incubadas com MTT (150 μ g/mL), por 3 horas a 37°C, e foi realizado um ciclo de centrifugação que permitiu a coleta e o descarte do sobrenadante. Para a dissolução dos cristais de formazan, foi utilizado DMSO. As placas de 96 poços tiveram a absorvância determinada no espectrofotômetro FlexStation 3 (Molecular Devices), sendo a leitura realizada em comprimento de onda de 590 nm.

Verificou-se que o tratamento das tumoresferas com o nanocristal, nas concentrações testadas (0,1 μ M a 1,2 μ M), não resultou em morte celular (**Figura 44**). Também foi observada a presença de grande quantidade do fármaco precipitado nos poços onde as células foram plaqueadas.

Figura 44 - Ensaio de MTT: Imagens de tumoresferas obtidas 96 horas após o plaqueamento, em meio definido, e após 48 horas de tratamento com o nanocristal (em concentrações de 200 μM e 600 μM). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência Zeiss Axio Image fluorescence (Oberkochen, Alemanha) acoplado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para estudar os efeitos antitumorais do nanocristal e os comparar com os do flubendazol convencional, foram realizadas injeções subcutâneas das células A-549 em camundongos BalbC/Nude para a indução de tumor xenográfico. Os animais foram tratados com os fármacos semanalmente, via intraperitoneal. Os tumores foram medidos com paquímetro e os animais foram pesados duas vezes por semana.

Foi possível verificar que os tumores dos animais dos três grupos, controle, tratados com flubendazol convencional e tratados com nanocristal de flubendazol, apresentaram desenvolvimento e/ou característica diferentes (**Figura 45**). O animal tratado com o veículo apresentou uma mancha avermelhada no tumor, que não foi detectada nos tumores de animais tratados com FBZ convencional ou com nanocristal de flubendazol.

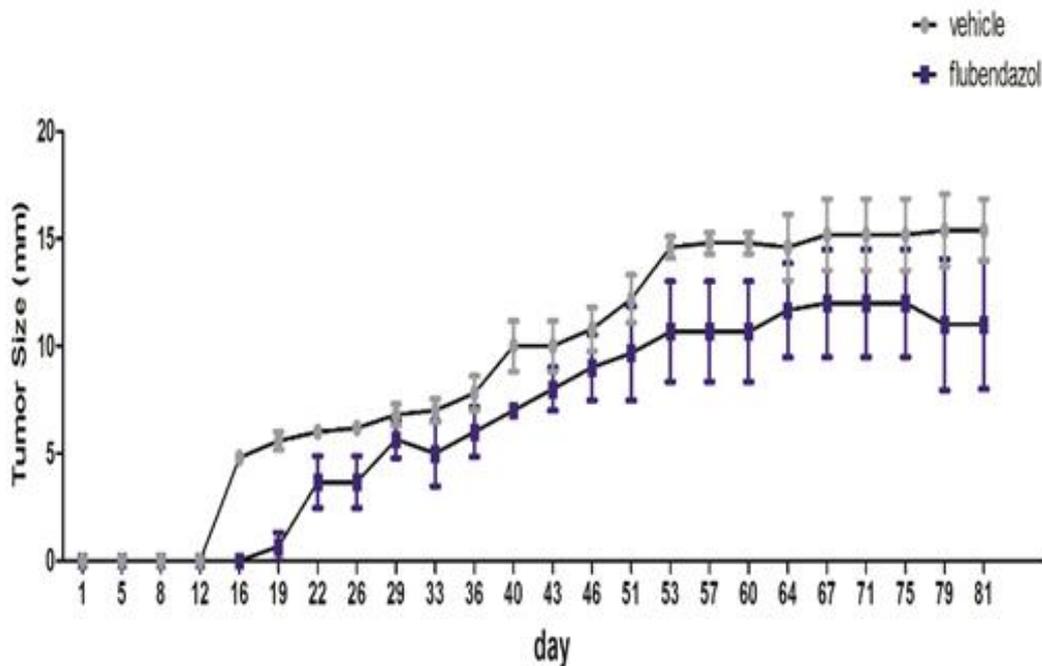
Figura 45 - Animais xenotransplantados com células A-549. Figura (A) Camundongo representando grupo de animais tratados com veículo (controle), tamanho do tumor 15 mm. Figura (B) Camundongo representando grupo de animais tratados com flubendazol convencional, tamanho do tumor 17 mm. Figura (C) Camundongo representando grupo de animais tratados com flubendazol nanoestruturado, tamanho do tumor 9 mm.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação ao desenvolvimento dos tumores, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais injetados com flubendazol convencional e os do grupo de animais injetados com o veículo. Entretanto, o crescimento do tumor foi retardado nos animais tratados com flubendazol convencional, como pode ser observado na **Figura 46**. No grupo de animais injetados com o veículo, a formação do tumor se iniciou no dia 12 após a injeção das células, enquanto que, no grupo de animais tratados com o flubendazol convencional, se iniciou a formação do tumor no 16º dia.

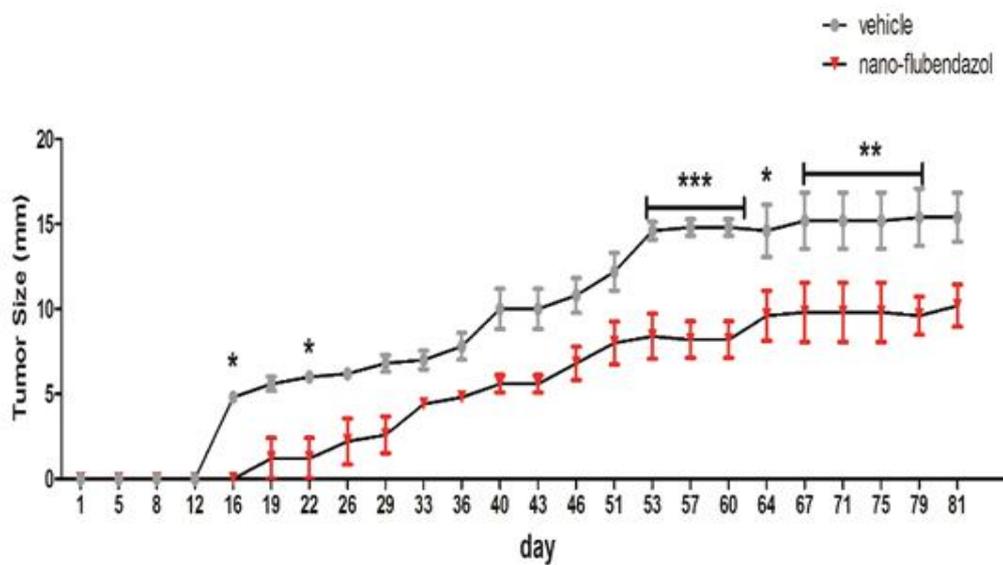
Figura 46 - Efeito do flubendazol convencional no crescimento do tumor. Gráfico do desenvolvimento do tumor pelo tempo (em dias). O gráfico representa a média \pm desvio padrão do tamanho dos tumores de 5 animais controle (*vehicle*) e 3 animais tratados com flubendazol convencional.



Fonte: Elaborado pelo autor

No entanto, foi verificado que os animais tratados com nanocristal de flubendazol, além de apresentarem retardo no aparecimento do tumor, quando comparados aos do grupo controle, também tiveram diferença significativa no tamanho dos tumores (**Figura 47**), mostrando a melhor eficiência do nanocristais de flubendazol como antitumoral. Como pode ser observado no gráfico, os animais tiveram o aparecimento do tumor consolidado apenas no 26º dia após a injeção das células, mostrando retardo de 10 dias no desenvolvimento do tumor. Além disso, ao final do experimento, os tumores de animais tratados com o nanocristal foram cerca 40% menores do que os tumores no grupo controle.

Figura 47 - Efeito do nanocristal de flubendazol no crescimento do tumor. Gráfico do desenvolvimento do tumor pelo tempo (em dias). O gráfico representa a média \pm desvio padrão do tamanho dos tumores de 5 animais controle (*vehicle*) e 5 animais tratados com flubendazol nanoestruturado.



Fonte: Elaborado pelo autor

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu o desenvolvimento de nanocristais de flubendazol a partir do processo de microfluidização – uma plataforma nanotecnológica capaz de reduzir o tamanho de partícula de princípios ativos de baixa solubilidade para a escala nanométrica. Esta redução drástica do tamanho de partícula é realizada com o fármaco em suspensão, sendo dependente das forças de impacto, cisalhamento e cavitação que ocorrem na câmara do microfluidizador.

Avaliando-se as variáveis críticas do processo de microfluidização, foi possível determinar as melhores combinações entre o tempo de moagem (ou número de ciclos), a temperatura do produto, a pressão aplicada e as características da formulação, como o tipo e a concentração do estabilizante, além da concentração do fármaco na suspensão. Nos ensaios exploratórios, foi estudada a relação entre a redução do tamanho das partículas e o tempo de processo (expresso em número de ciclos), chegando-se a um valor ótimo de 2 horas de moagem para 100 gramas de produto.

A seleção do agente estabilizante se mostrou uma etapa crítica, uma vez que estes excipientes possuem papel importante na preservação das características físicas dos nanocristais, evitando a formação de aglomerados, e podem impactar na redução de tamanho de partícula e na biodisponibilidade do fármaco. Foram avaliados, por meio de ensaios exploratórios, os efeitos de três diferentes tensoativos na estabilização das nanossuspensões de flubendazol: o polissorbato 80, o poloxamer 188 e o TPGS. A formulação F3, contendo o TPGS, foi a que apresentou menor diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, de $254,0 \text{ nm} \pm 3,0$ (avaliado por DLS), com índice de polidispersibilidade de $0,3 \pm 0,004$, indicando uma população de partículas com baixa polidispersibilidade e estabilidade satisfatória comprovada após 30 dias de acompanhamento a $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $75\% \pm 5\% \text{ UR}$. O tamanho de partícula da formulação F3 foi também avaliado ortogonalmente pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA), na qual observou-se tamanho hidrodinâmico médio $d(0,5)$ de $151,8 \text{ nm} \pm 4,1$; esta técnica é conhecida por representar melhor o tamanho médio de partícula da população, uma vez que é capaz de rastrear partículas individualmente e visualizar – por meio de um microscópio óptico e uma câmara de vídeo acoplada.

A abordagem empregando o planejamento estatístico de experimentos permitiu entender e modelar o efeito de algumas das variáveis significativas para a obtenção dos nanocristais de flubendazol. Os resultados indicaram que a concentração do estabilizante TPGS

é significativa na redução do tamanho de partícula e que a concentração do flubendazol na nanossuspensão não é significativa; também foi possível validar a equação do modelo gerado.

A análise térmica consistiu-se uma ferramenta essencial na avaliação de possíveis interações entre o flubendazol e os tensoativos e para a determinação da temperatura de decomposição térmica dos componentes, uma vez que o processo de microfluidização pode promover aumento na temperatura do material. A temperatura de início de degradação térmica dos materiais encontra-se na faixa de 225 a 420 °C, demonstrando que nenhum dos materiais é susceptível à degradação pelo calor gerado durante a microfluidização, uma vez que, no decorrer do processo, o produto não atinge temperaturas tão elevadas. As curvas termoanalíticas demonstraram, também, a diminuição da estabilidade térmica do flubendazol nas formulações, com adiantamento do início da decomposição. Porém, esse início ocorre em temperaturas acima de 100 °C, demonstrando, ainda, um nível aceitável de estabilidade. A análise térmica foi utilizada também para otimizar o processo de liofilização da nanossuspensão. A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) permitiu determinar a temperatura de transição vítrea apresentada na matriz cristalina da nanossuspensão, evidenciando a necessidade de incorporar uma etapa de tratamento térmico na liofilização.

A difração de raio X (DRX) foi utilizada para avaliar a integridade da estrutura cristalina do flubendazol antes e após o processo de microfluidização seguido da liofilização; tanto o DRX do flubendazol puro quanto o do nanocrystal liofilizado apresentaram picos característicos em 6,5 , 10,2 e 16,9 em 2 theta, indicando que a posição dos picos característicos permaneceu inalterada no nanocrystal, diferindo apenas na altura, o que sugere diferentes tamanhos de cristais e nível de cristalinidade. Ressalta-se que o material manteve-se na forma cristalina mesmo depois do processo de microfluidização seguido da liofilização.

A solubilidade de saturação do flubendazol micronizado e do nanocrystal de flubendazol foi avaliada nos meios HCl 0,1 N, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato salino pH 7,4. Os nanocristais proporcionaram aumento na solubilidade de saturação em 2,3 vezes, 3,2 vezes e 5,2 vezes, respectivamente. Este aumento da solubilidade de saturação dos nanocristais de flubendazol sugere grande potencial para aumento na sua biodisponibilidade.

Com o intuito de avaliar o incremento da velocidade de dissolução do nanocrystal, foi realizado um perfil de dissolução comparativo entre o flubendazol micronizado e o nanocrystal. Em meio HCl 0,1N acrescido de 0,1% de TPGS, foi possível observar aumento de 40,7% da

quantidade de flubendazol dissolvida, 73,2 % do nanocristal *versus* 32,5% do flubendazol micronizado.

As nanoestruturas têm apresentado resultados satisfatórios quando utilizadas em fármacos antitumorais, uma vez que penetram facilmente pela vasculatura dos tumores e possuem tempo de retenção consideravelmente maior. Nesse sentido, o presente trabalho demonstrou a significativa ação dos nanocristais de FBZ em tumores de pulmão, demonstrando, também, sua capacidade de retardar o crescimento e diminuir em 40% o tamanho desses tumores em camundongos xenotransplantados.

Assim, por meio da tecnologia de nanocristais, o presente trabalho foi capaz de aprimorar as propriedades de solubilidade e dissolução do flubendazol, além de promover seu impressionante desempenho *in vivo* no tratamento de tumores. Trabalhos futuros poderão avançar na viabilização do desenvolvimento e da produção de medicamentos mais efetivos e promissores contendo nanocristais de flubendazol.

7. REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 30. dez. 2006.

ALI, H. S. M. et al. Hydrocortisone Nanosuspensions for Ophthalmic Delivery: A Comparative Study between Microfluidic Nanoprecipitation and Wet Milling. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 149, n. 2, p. 175–181, jan. 2011.

AL-NAHARY T.T. et al. Multiclass analysis on repaglinide, flubendazole, robenidine hydrochloride and danofloxacin drugs. **Arab. J. Chem.**, v. 6, n. 1, p. 131 – 144, 2013.

ARAUJO, G.L.B. et al. A New Thermodynamically Favored Flubendazole/Maleic Acid Binary Crystal Form: Structure, Energetics, and in Silico PBPK Model-Based Investigation. **Crystal Growth Design**, v. 18, n. 4, p. 2377–2386, feb. 2018

BARBOSA, S. F. et al. Physical-Chemical Properties of Furosemide Nanocrystals Developed Using Rotation Revolution Mixer. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 7, p. 812–822, nov. 2016.

BEIROWSKI, J. et al. Freeze-drying of nanosuspensions, 1: Freezing rate versus formulation design as critical factors to preserve the original particle size distribution. **J. Pharm. Sci.**, v. 100, n. 5, p. 1958–1968, may 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília. 2017.

BRITAIN, H. G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. **Informa Healthcare USA, Inc.**, v. 192, p. 327 a 342, Nova York, 2009.

ČÁŇOVÁ, K.; ROZKYDALOVÁ, L.; RUDOLF, E. Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. **Acta Medica**, v. 60, n. 1, p. 5-11, april 2017.

CARDELINNI A. et al. Thermal transport phenomena in nanoparticle suspensions. **Journal of Physics: Condensed Matter**, vol. 28, p. 483003, 2016.

CAVATUR, R. K. et al. Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Aqueous Solutions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 894–900, jun. 2002.

CEBALLOS, L. et al. Exploring the Potential of Flubendazole in Filariasis Control: Evaluation of the Systemic Exposure for Different Pharmaceutical Preparations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 29 may 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038472/>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

CEBALLOS, L. et al. Exploring flubendazole formulations for use in sheep. Pharmacokinetic evaluation of a cyclodextrin-based solution. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 71, 2012.

CEBALLOS L. et al. Exploring the potential of flubendazole in filariasis control: evaluation of the systemic exposure for different pharmaceutical preparations. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites Onchocerciasis**. Disponível em <<https://www.cdc.gov/parasites/onchocerciasis/index.html>>. Acesso em out. 2018.

CHUNG, N.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of Freeze-Drying Drug Nanosuspensions. **International journal of pharmaceutics**, v. 437, n. 1–2, p. 42–50, 1 nov. 2012.

COLOMBO, M. et al. In situ determination of the saturation solubility of nanocrystals of poorly soluble drugs for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1–2, p. 156–166, 15 abr. 2017.

CONTRERAS H. et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Nanocompartment and Its Potential Cargo Proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n.26, p. 18279–18289, jun. 2014.

COOK E. J., LAGACE A. P. **Apparatus for forming emulsions**. Int. Cl. B01F 5/06. US patent 4,533,254. USA, august 1985.

DWYER, L. M., et al. “Confined crystallization of fenofibrate in nanoporous silica.” **CrystEngComm**. Vol. 17, n.41, p. 7922-7929, 2015.

DUSI, G.; GAMBA, V.; FAGGIONATO, E. Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 375-379, 2005.

EERDENBRUGH, V. B. et al. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. **Int. J. Pharm.**, v. 364, n.1, p. 64-75, nov. 2008.

FANGUEIRO, J. F. et al. Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1848–1853, 2012.

FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, may 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**. Office of the Commissioner, jun. 2014.

GEORGE, M.; GHOSH, I. Identifying the Correlation between Drug/Stabilizer Properties and Critical Quality Attributes (CQAs) of Nanosuspension Formulation Prepared by Wet Media Milling Technology. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 142–152, jan. 2013.

GLOBAL CHEMICAL NETWORK. 31430-15-6, **Flubendazole**. Disponível em: <<http://www.chemnet.com/cas/en/31430-15-6/Flubendazole.html>>. Acesso em: 27 maio. 2017.

GOODMAN, L.S. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre AMGH Editora, 2012.

HANUSOVA, V. et al. Potential Anti-Cancer Drugs Commonly Used for Other Indications. **Current Cancer Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 35–52, 2015.

HE, J. et al. Preparation and Evaluation of Celecoxib Nanosuspensions for Bioavailability Enhancement. **RSC Advances**, v. 7, n. 22, p. 13053–13064, 24 feb. 2017.

HELGASON T. et al. Formation of transparent solid lipid nanoparticles by microfluidization: influence of lipid physical state on appearance. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 448, p.114- 122, june 2015.

JACOBS, C.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Production and Characterization of Mucoadhesive Nanosuspensions for the Formulation of Bupravaquone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1–2, p. 3–7, 19 fev. 2001.

JUNGHANNS, J.A. H.; MÜLLER, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 295–310, sept. 2008.

JUNYAPRASERT, V. B.; MORAKUL, B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 13–23, feb. 2015.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, v. 5, n. 5, p. 442–453, sept. 2015.

KAYSER, O. Nanosuspensions for the formulation of aphidicolin to improve drug-targeting effects against Leishmania infected macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 253–256, 10 march. 2000.

KENTH, S. et. al. Fabrication of Paclitaxel Nanocrystals by Femtosecond Laser Ablation and Fragmentation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n.3, p. 1022-1030, march 2011.

KHARB, V. et al. Nanoparticle Technology for Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. **Pharmaceutical Technology**, v. 30, n. 2, feb. 2006.

KIM, M. S. et al. Enhanced bioavailability of sirolimus via preparation of solid dispersion nanoparticles using a supercritical antisolvent process. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2997–3009, 2011.

KISHORE R. S. et al. Degradation of polysorbates 20 and 80: Studies on thermal autoxidation and hydrolysis. **J. Pharm. Sci.**, v. 100, n. 2, p. 721-731, 2011.

KWON S. S. et al. Preparation and characterization of coenzyme Q10-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, n. 1, p. 95-104, out. 2002.

KUMARESAN G.; VELRAJ, R. ; INIYAN, S. Thermal Analysis of D-mannitol for Use as Phase Change Material for Latent Heat Storage. **Journal of Applied Sciences**. V. 11, n.16, p.3044-3048, 2011

LESTARI M. L. A. D. et al. Systematic Screening of Different Surface Modifiers for the Production of Physically Stable Nanosuspensions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 1128–1140, march 2015.

LI, M. et al. Microfluidization-assisted synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 67, n. 3, p. 501–506, sept. 2013.

LIVERSIDGE, G. G.; CUNDY, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.125, p. 91-97, 1995.

LIU, F. et al. Targeted cancer therapy with novel high drug-loading nanocrystals. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, n. 8, p. 3542–3551, aug. 2010.

LIU, P. et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1–2, p. 215–222, 15 jun. 2011.

LIU, T. et al. Systematical investigation of a combinative particle size reduction technology for production of resveratrol nanosuspensions. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, p. 1-9, sept. 2016.

LOUAGE, B. et al. Poly (glycerol sebacate) nanoparticles for encapsulation of hydrophobic anti-cancer drugs. **The Royal Society of Chemistry**, jan. 2017.

LONGO, M. et al. In vivo preliminary investigations of the effects of the benzimidazole anthelmintic drug flubendazole on rat embryos and fetuses. **Reproductive Toxicology**, v. 49, p. 33–42, nov. 2014.

MACKENZIE, C.; GEARY, T. Flubendazole: a candidate macrofilaricide for lymphatic filariasis and onchocerciasis field programs. **Expert review of anti-infective therapy**, vol.9 (5), p.497-501, may 2011.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1–2, p. 202–209, march 2009.

MEHRABI, K. et al. Improvements in Nanoparticle Tracking Analysis to Measure Particle Aggregation and Mass Distribution: A Case Study on Engineered Nanomaterial Stability in Incineration Landfill Leachates. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 10, p. 5611–5621, may 2017.

MERKUS, H. G. **Particle size measurements: fundamentals, practice, quality**. New York: Springer, 2009.

MIAO, X. et al. Drug nanocrystals for cancer therapy. **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol**, v.10, n. 3, p. 1499, may 2018.

MICHAELIS, M. et al. Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. **Scientific reports**, v.5, p. 8202, feb. 2015.

MICROFLUIDICS. **Microfluidics technology and equipment**. Disponível em <<https://www.microfluidicscorp.com/microfluidic-technology-equipment/>> Acesso em nov. 2018.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; COOK, A. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3 ed. New Jersey: Wiley, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica e Eliminação da Filariose Linfática. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, 2009.

- MOREL, C. M. Promotoras da Pobreza. **Valor Econômico**, p. A14, jan. 2011.
- MÜLLER, R. H. et al. Berlin, Germany. **Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution**. Int. Cl. A61K 9/14. US patent 5858410. USA, jan. 1999.
- MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. **Adv Drug Deliv. Rev.**, v. 47, n. 1, p. 3–19, march 2001.
- MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. DissoCubes – a novel formulation for poorly soluble and poorly bioavailable drugs. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, Modified-Release Drug Delivery Technology, v.126, p. 135-149, 2003.
- MÜLLER, R. H.; GOHLA, S.; KECK, C. M. State of the Art of Nanocrystals - Special Features, Production, Nanotoxicology Aspects and Intracellular Delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 1–9, may 2011.
- MULLER, R.H.; PETERS, K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I. Preparation by a size-reduction technique. **International Journal of pharmaceutics**, v. 160, n. 2, p. 229-237, 1998.
- MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3–19, 23 mar. 2001.
- NOBILIS, M. et. al. Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole ant its metabolites in biometrics using UV photodiode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, vol.1149, p.112-120, 2007.
- ODETADE, D. F.; VLADISAVLJEVIC, G. T. Microfluidic Fabrication of Hydrocortisone Nanocrystals Coated with Polymeric Stabilisers. **Micromachines**, v. 7, n. 12, p. 236, 18 dez. 2016.
- O' NEILL, M. et al. An In Vitro / In Vivo Model to Analyze the Effects of Flubendazole Exposure on Adult Female *Brugia malayi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10 (5), p. e0004698, may 2016.
- PANIC, G. et al. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 185-200, december 2014.
- RACHMAWATI, H. et al. Development of Curcumin Nanocrystal: Physical Aspects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 204–214, 1 jan. 2013.
- REY, L.; MAY, J. C. Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. **Drugs and the pharmaceutical sciences**. **New York Informa Healthcare**, v. 137, 2007.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 3 ed, 2014.
- ROMERO G.B. et al. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 501 (1-2), p. 236-244, march, 2016.

SALAZAR, J.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Combinative Particle Size Reduction Technologies for the Production of Drug Nanocrystals. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1-14. 2014.

SEOK, S. H. et al. Formulation of Nanoparticle Containing Everolimus Using Microfluidization and Freeze-Drying. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, n. 10, p. 1445–1449, 2016.

SHARMA, O. P.; PATEL, V.; MEHTA, T. Design of experiment approach in development of febuxostat nanocrystal: Application of Soluplus® as stabilizer. **Powder Technology**, v. 302, p. 396–405, nov. 2016.

SHARMA, S. et al. Investigating the role of pluronic-g-cationic polyelectrolyte as functional stabilizer for nanocrystals: Impact on paclitaxel oral bioavailability and tumor growth. **Acta Biomater**, v. 26, p. 169–183, oct.. 2015.

SINHA, B.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. **Int. J. Pharm.**, v. 453, n. 1, p. 126-141, august 2013.

SONG, Y. et al. Investigation of Drug–Excipient Interactions in Lapatinib Amorphous Solid Dispersions Using Solid-State NMR Spectroscopy. **Mol. Pharmaceutics**, v. 12, n.3, p. 857–866, jan. 2015.

SOUZA, W. Doenças Negligenciadas. **Academia Brasileira de Ciências**, 2010. Disponível em: <<http://www.cenapro.com.br/docs-free.asp?codigo=177>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

SRINIVAS, N. S. K et al. A quality by design approach on polymeric nanocarrier delivery of gefitinib: formulation, in vitro, and in vivo characterization. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 12, p. 15-28, 2017.

STORPIRTIS S., et. al. **Biofarmacotécnica**. 1 ed. Rio de janeiro. Guanabara Koogan, p. 321, 2009.

Sun, B. ; Yeo, Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **Curr. Opin. Solid State Mater Sci.**, v.16, n.6, p. 295–301, dec. 2012.

TALEKAR, M. et al. Development of PIK-75 nanosuspension formulation with enhanced delivery efficiency and cytotoxicity for targeted anti-cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, p. 278-289, jun. 2013.

TUOMELA, A., HIRVONEN, J., PELTONEN, L. Stabilizing Agents for Drug Nanocrystals: Effect on Bioavailability. **Pharmaceutics**, v.8, n.2, p.16, june 2016.

VAN EERDENBRUGH, B. et al. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 364, p. 64–75, 2008.

VARSHOSAZ, J. et al. Dissolution enhancement of gliclazide using in situ micronization by solvent change method. **Powder Technology**, v. 187, n. 3, p. 222-230, 2008.

VERMA, S. et al. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1–2, p. 185–198, 30 jul. 2009.

VAZQUEZ, A. D, et.al. Comparison of Flubendazole and Diethylcabamazine in treatment of Onchocerciasis. **The Lancet**, v. 321, p. 139-143, 1983.

VIALPANDO, M. et al. Evaluation of Three Amorphous Drug Delivery Technologies to Improve the Oral Absorption of Flubendazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2782–2793, sept. 2016.

WANG, H. et al. Enhanced Anti-Tumor Efficacy by Co-Delivery of Doxorubicin and Paclitaxel with Amphiphilic Methoxy PEG-PLGA Copolymer Nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 32, p. 8281–8290, nov. 2011.

WANG, Y. et al. Cost-Effective Method to Prepare Curcumin Nanosuspensions with Enhanced Oral Bioavailability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 485, p. 91–98, jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**, v. 92, n. 40, p. 589 – 608, oct. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Progress Towards Elimination**. Disponível em <http://www.who.int/lymphatic_filariasis/global_progress/en/> Acesso em out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lymphatic filariasis**. Disponível em <http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/> Acesso em out. 2018.

YONEMOCHI, E. et al. Application of XRD-DSC System to the Optimization of Manufacturing Process for the Freeze-Dried Pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 85, n. 3, p. 693–697, sept. 2006.

ZHOU, X. et al. Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis. **Cell Death Discovery**, vol. 4, n 18, feb. 2018.

ANEXOS

Anexo I: Ficha do aluno – Débora de Souza Gonçalves

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
 FICHA DO ALUNO

9139 - 9381902/1 - Debora de Souza Gonçalves

Email: deborafarma@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)

Data de Nascimento: 25/01/1986

Cédula de Identidade: RG - 404546390 - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutica - Universidade São Francisco - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Mestrado

Programa: Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Data de Matrícula: 06/07/2016

Início da Contagem de Prazo: 06/07/2016

Data Limite para o Depósito: 07/01/2019

Orientador: Prof(a). Dr(a). Nádia Araci Bou Chacra - 06/07/2016 até 10/04/2018.
Email: chacra@usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Gabriel Lima Barros de Araujo - 11/04/2018 até o presente. Email: gabriel.araujo@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/07/2016

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/07/2017

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 06/07/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2018

Impresso em: 18/12/2018 16:08:17

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 9381902/1 - Debora de Souza Gonçalves

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5805-2/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	11/08/2016	19/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5807-1/2	Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Aplicações no Desenvolvimento de Formulações Farmacêuticas	05/10/2016	26/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/8	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	09/03/2017	22/06/2017	45	3	87	A	N	Concluída
FBF5779-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	10/03/2017	19/05/2017	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5713-2/2	Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial	08/05/2017	02/06/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5751-8/1	Introdução aos Métodos Termoanalíticos	29/08/2017	09/11/2017	150	10	100	A	N	Concluída
FBF5778-2/3	Estudos Biofarmacotécnicos para Avaliação in vitro da Permeabilidade de Fármacos e Candidatos a Fármacos Empregando Culturas Celulares	01/03/2018	11/04/2018	60	4	86	A	N	Concluída
FBF5821-1/4	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços e Desafios no Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados para a Liberação Modificada de Fármacos)	03/09/2018	16/09/2018	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2018

Impresso em: 18/12/2018 16:08:17

Anexo II: Parecer da Comissão de Ética no Uso Animais

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO N° 63/2017

Certifico que o Projeto "*Mecanismos de Metástase de Tumores Infantis para a Medula Óssea*" desenvolvido sob responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Claudiana Lameu**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 08/05/2017.

We attest that the project entitled "*Mecanismos de Metástase de Tumores Infantis para a Medula Óssea*", developed under the responsibility of **Dr(a). Claudiana Lameu**, follows the regulations established by the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 05/08/2017.

São Paulo, 08 de Maio de 2017.

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

Anexo III: Pedido de depósito de patente

20/08/2018 870180073155
18:20

29409161802732402

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 017054 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 63025530000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Rua da Reitoria, 374 - Butantã

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508220

País: Brasil

Telefone: (11) 3091.4474

Fax:

Email: pidireto@usp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/08/2018 às 18:20, Petição 870180073155

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES NANOCRISTALINAS DE FLUBENDAZOL, FÓRMULAÇÕES NANOCRISTALINAS DE FLUBENDAZOL E USO

Resumo: A presente invenção descreve um processo de obtenção de formulações nanocristalinas de flubendazol, as formulações nanocristalinas obtidas e o uso destas no tratamento de filarioses e oncocercoses, bem como terapias antitumorais. O processo de homogeneização à alta pressão (HAP) ora utilizado permite a obtenção de formulações que visam o aumento da solubilidade aquosa do fármaco, a fim de se obter uma adequada absorção e biodisponibilidade.

Figura a publicar: 4

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/08/2018 às 18:20, Petição 870180073155

Anexo IV: Exposição de poster na AAPS ANNUAL 2017

Development of Flubendazole Nanocrystals Using High-Pressure Microfluidization: effect of stabilizers and microfluidization time on particle size reduction

D. S. Gonçalves¹, N. A. Bou-Chacra¹, R. Löbenberg², G. L. B. de Araujo¹

¹Universidade de Sao Paulo, ²University of Alberta

Purpose.

Lymphatic filariasis and onchocerciasis are diseases caused by helminth worms that affect millions of people living in extreme poverty in Africa, Asia, and Latin America. Drugs such as albendazole, diethylcarbamazine, and ivermectin, currently used in the treatment of helminthiasis, can reduce the incidence but don't promote the eradication of these diseases, once they are not effective in eliminating adult worms. Consequently, the development of an innovative medicine that presents macrofilaricidal action is of fundamental importance. Flubendazole has been reported to have high macrofilaricidal activity, although its low solubility in water limits the development of formulations for systemic use. The major challenge is to achieve the improvement of the dissolution rate of flubendazole in oral formulations. Nanocrystal technology has been used as a platform for the development of pharmaceutical dosage forms with greater efficacy and safety; nanometric particle size reduction increases the saturation solubility and dissolution rate allowing an increase in the oral bioavailability of poorly soluble drugs. The present study aims to evaluate the effect of a critical process parameter and formulation stabilizers on particle size reduction, in order to develop an enhanced nanosuspension that can potentially improve the bioavailability and antihelmintic activity of flubendazole formulations.

Methods.

Flubendazole aqueous nanosuspensions were prepared by using a high-pressure microfluidizer (Model M-110P, Microfluidics, USA). Two different stabilizers polysorbate (Tween 80) and poloxamer 188 were tested resulting in two formulations F1 and F2, respectively. The critical process parameter recirculation time was also evaluated. Measurements of particle size distribution were performed using photon correlation spectroscopy (Zetasizer ZS90, Malvern Instruments, UK) for both formulations. The process parameter recirculation time was also evaluated. Measurements of particle size distribution were performed using photon correlation spectroscopy (Zetasizer ZS90, Malvern Instruments, UK) for both formulations.

Results.

The flubendazole nanocrystals were efficiently prepared by high-pressure microfluidization. Both formulations reached the minimum particle size distribution in the nanometer range after 2 hours of microfluidization at 30,000 psi. The formulation F1 exhibited the smallest mean particle size value of $336,1 \pm 5,1$ nm and a polydispersity index of $0,249 \pm 0,01$; the formulation F2 exhibited the mean particle size value of $613,0 \pm 6,6$ nm with a polydispersity index of $0,336 \pm 0,017$.

Conclusion.

The flubendazole nanosuspensions were successfully obtained with both stabilizers, polysorbate 80 and poloxamer 188, after 2 hours of high-pressure microfluidization at 30,000 psi. Nevertheless, the use of polysorbate 80 as stabilizer provides superior particle size reduction and might be more suitable for the achievement of an innovative formulation with enhanced bioavailability.

ANEXO V: Artigo científico publicado

A New Thermodynamically Favored Flubendazole/Maleic Acid Binary Crystal Form: Structure, Energetics, and *in Silico* PBPK Model-Based Investigation

Gabriel L. B. de Araujo,^{*,†,Ⓜ} Fabio Furlan Ferreira,^{*,‡,Ⓜ} Carlos E. S. Bernardes,^{§,Ⓜ} Juliana A. P. Sato,[‡] Otávio M. Gil,^{||} Dalva L. A. de Faria,^{||} Raimar Loebenberg,[⊥] Stephen R. Byrn,[#] Daniela D. M. Ghisleni,[†] Nadia A. Bou-Chacra,[†] Terezinha J. A. Pinto,[†] Selma G. Antonio,[∇] Humberto G. Ferraz,[†] Dmitry Zemlyanov,[○] Débora S. Gonçalves,[†] and Manuel E. Minas da Piedade[§]

[†]Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas and ^{||}Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

[‡]Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, São Paulo, Brazil

[§]Centro de Química e Bioquímica e Centro de Química Estrutural, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1748-016 Lisboa, Portugal

[⊥]Faculty of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2H7

[#]Department of Industrial and Physical Pharmacy and [○]Birck Nanotechnology Center, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907, United States

[∇]Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: The use of flubendazole (FBZ) in the treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis (two high incidence neglected tropical diseases) has been hampered by its poor aqueous solubility. A material consisting of binary flubendazole/maleic acid crystals (FBZ/MA), showing considerably improved solubility and dissolution rate relative to flubendazole alone, has been prepared in this work through solvent assisted mechanical grinding. The identification of FBZ/MA as a binary crystalline compound with salt character (proton transfer from MA to FBZ) relied on the combined results of powder X-ray diffraction, Raman spectroscopy, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), thermogravimetry (TG), and differential scanning calorimetry (DSC). Isothermal solution microcalorimetry studies further suggested that the direct formation of FBZ/MA from its precursors in the solid state is thermodynamically favored. A comparison of the *in silico* pharmacokinetic performance of the FBZ/MA with that of pure FBZ based on a rat fasted physiology model indicated that the absorption rate, mean plasma peak concentration, and absorption extension of FBZ/MA were ~2.6 times, ~1.4 times, and 60% larger, respectively, than those of FBZ. The results here obtained therefore suggest that the new FBZ/MA salt has a considerable potential for the development of stable and affordable pharmaceutical formulations with improved dissolution and pharmacokinetic properties. Finally, powder X-ray diffraction studies also led to the first determination of the crystal structure of FBZ.

